



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



Amanda Bellini

Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de *Candida albicans* em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana

Araraquara

2022



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



Amanda Bellini

Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de *Candida albicans* em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)–Universidade Estadual Paulista (UNESP) para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Reabilitação Oral.

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

Araraquara

2022

B444i	Bellini, Amanda Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de <i>Candida albicans</i> em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana / Amanda Bellini. -- Araraquara, 2022 83 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientadora: Ana Cláudia Pavarina 1. <i>Candida albicans</i>. 2. Biofilmes. 3. Matriz extracelular. 4. Fotoquimioterapia. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Amanda Bellini

Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de *Candida albicans* em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana

Comissão avaliadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – Universidade Estadual Paulista (UNESP) para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Reabilitação Oral.

Presidente e orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

2ª examinadora (titular): Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge

3ª examinadora (titular): Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Dias Panariello

4ª examinadora (suplente): Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti

5ª examinadora (suplente): Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 03 de junho de 2022.

DADOS CURRICULARES

Amanda Bellini

Nascimento: 14/07/1997 – Matão – São Paulo

Filiação: Claudia Cristina Chiozzini Bellini

Luis Paulo Ferreira Bellini

2015-2019: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – Universidade Estadual Paulista (UNESP).

2017/2018: Bolsista PIBIC no projeto intitulado “Influência de *Lactobacillus casei* na composição da matriz do biofilme de *Candida albicans* resistente a fluconazol”.

2018/2019: Bolsista PIBIC no projeto intitulado “Avaliação da composição da matriz extracelular do biofilme de *Lactobacillus rhamnosus* e *Candida albicans* resistente a fluconazol”.

2019/2019: Bolsista PIBIC no projeto intitulado “Pode a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada por Curcumina desenvolver resistência em *Candida albicans*?”.

2020-2022: Pós-graduação em Odontologia, área de concentração em Reabilitação Oral, em andamento, curso de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – Universidade Estadual Paulista (UNESP).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Claudia e Luis Paulo**, que se esforçaram muito para que eu pudesse estar em Araraquara, superando a distância física, a saudade e sempre me dando apoio e incentivo para que mais esse sonho fosse realizado.

À minha irmã, **Rafaela**, meu maior orgulho e amor, por ser a pessoa que sempre esteve ao meu lado, sendo o meu alicerce, me dando forças e me divertindo nos momentos de maiores dificuldades.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Pavarina**, que me orienta desde 2017 e que confiou no meu potencial para realizar esse projeto que estará para sempre guardado na minha memória e no meu coração.

Às professoras das minhas bancas da pré-qualificação, qualificação e defesa, **Prof^a. Dr^a. Marlise, Prof^a. Dr^a. Josimere, Prof^a. Dr^a. Janaína, Prof^a. Dr^a. Beatriz, Prof^a. Dr^a. Fernanda e Prof^a. Dr^a. Karin** que foram muito atenciosas e fizeram comentários essenciais para a finalização desse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, **Luana, Karine, Kallen, César, Ana Luiza, Tábata e Cláudia**, que me deram apoio e foram extremamente dedicados para finalização desse projeto.

Às minhas amigas de Araraquara, **Vitória, Mariely, Iolanda e Camyla**, que foram as minhas companheiras de jantares, caminhadas e que sempre ouviram os meus desabafos.

Aos meus amigos de Matão, **Lucas, Júlia, Giovanni, Marcos, Hugo, Marina, Maria Luiza e Juliana**, que entenderam a minha ausência e me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Aos meus amigos do LEO Clube, **Vitor, Felipe, Emanuely, João e Rodrigo**, que, mesmo com a distância física, conseguiram estar ao meu lado em momentos especiais da minha vida.

A todos os alunos da **Turma 92** que, durante o estágio docência, me acolheram de uma forma muito carinhosa e sempre tiveram paciência comigo, aceitando os meus erros e elogiando os meus acertos.

Aos usuários dos **Laboratórios de Microbiologia Aplicada e de Biologia Molecular** que sempre me trataram com carinho, empatia e estiveram disponíveis para me ajudar em momentos difíceis.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP** que me acolheu com 17 anos no ano de 2015 para uma jornada de 7 anos e meio que superou absolutamente todas as minhas expectativas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 e 88887.513788/2020-00.

Agradeço ao **Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão** (CEPID-FAPESP-2013/07276-1) pelo apoio oferecido no desenvolvimento dessa pesquisa.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que participaram, ativamente ou não, da realização desse trabalho.

“Sagacidade além da medida é o maior tesouro do homem.”

Luna Lovegood citando Rowena Ravenclaw*

* Rowling J. K. Harry Potter e a Ordem da Fênix. Rio de Janeiro: Rocco; 2003.

Bellini A. Influência da matriz extracelular na susceptibilidade de *Candida albicans* em biofilme após sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) promove a inativação de *Candida albicans* em suspensão, entretanto, a completa inativação do fungo em biofilmes ainda não foi observada. A tolerância de *C. albicans* em biofilme é multifatorial e tem sido associada a fatores como o efeito protetor da matriz extracelular (MEC) do biofilme que dificulta a penetração de antifúngicos e outros fármacos. Dessa forma, esse estudo avaliou a influência da MEC na susceptibilidade de *C. albicans* em biofilme à aPDT, mediada por Photoditazine® (PDZ) associado ao diodo emissor de luz (LED). Foram formados biofilmes de *C. albicans* (ATCC 90028). Após 48 horas, todos os biofilmes foram submetidos às seguintes condições de tratamento: I) aPDT [os biofilmes foram incubados por 20 minutos com PDZ (25 mg/L) e iluminados com LED (660 nm, 18 J/cm²); n=6]; II) DNase+aPDT [os biofilmes foram incubados por 5 minutos com DNase I (20 unidades/mL) e submetidos à aPDT; n=6]; III) sonicação+aPDT [os biofilmes foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) e submetidos à aPDT; n=6]; ou IV) DNase+sonicação+aPDT [os biofilmes foram incubados com DNase I, sonicados e submetidos à aPDT; n=6]. A seguir, nos biofilmes remanescentes foram realizadas dez aplicações sucessivas de aPDT. Os seguintes métodos foram utilizados para avaliar a eficácia das diferentes estratégias de tratamentos sobre os biofilmes: contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), quantificação do peso seco (total e insolúvel), das proteínas solúveis e insolúveis, análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP), polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), DNA extracelular (eDNA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk, Levene e ANOVA two-way, com nível de significância de 5%. Os resultados de UFC foram avaliados após cada uma das aplicações e de componentes da MEC foram quantificados após as aplicações 1, 5 e 10. Os resultados demonstraram redução na viabilidade celular em todas as condições, a maior redução (5,7 log₁₀) foi observada na décima aplicação da condição I (aPDT). Não houve diferença significativa nos valores de peso seco total, peso seco insolúvel e ASP em nenhuma condição experimental. Foi observada redução dos valores de proteínas solúveis após quinta e décima aplicações (p<0,001) em todas as condições e dos valores de proteínas insolúveis somente após a primeira aplicação nas condições I e IV (p<0,001). Os valores de WSP e eDNA apresentados após os tratamentos foram significativamente menores quando comparados ao grupo controle (P-L-; p<0,001) em todas as condições experimentais. A MEV demonstrou aparecimento de deformidades nas paredes celulares e redução no número de células e aglomerados celulares. As estratégias avaliadas para desestruturação do biofilme não aumentaram a susceptibilidade de *C. albicans* à aPDT.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Biofilmes. Matriz extracelular. Fotoquimioterapia.

Bellini A. Influence of extracellular matrix on susceptibility of *Candida albicans* in biofilm after successive applications of antimicrobial photodynamic therapy [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) promotes the inactivation of *Candida albicans* in suspension, however, complete inactivation of fungus in biofilms has not yet been observed. The tolerance of *C. albicans* biofilms is multifactorial and has been associated with factors such as the protective effect of the extracellular matrix (ECM) of the biofilm, making it difficult for antifungals and other drugs to penetrate. Thus, this study evaluated the influence of ECM on the susceptibility of *C. albicans* biofilms to aPDT, mediated by Photoditazine® (PDZ) associated with light-emitting diode (LED). Biofilms of *C. albicans* strain (ATCC 90028) were formed. After 48 hours, biofilms were submitted to the following treatment conditions: I) aPDT [biofilms were incubated for 20 minutes with PDZ (25mg/L) and illuminated with LED (660 nm, 18 J/cm²; n=6]; II) DNase+aPDT [biofilms were incubated for 5 minutes with DNase I (20 units/mL) and submitted to aPDT; n=6]; III) sonication+aPDT [biofilms were sonicated for 30 seconds (7 W 170 to 190 J) and submitted to aPDT; n=6]; or IV) DNase+sonication+aPDT [biofilms were incubated with DNase I, sonicated and submitted to aPDT; n=6]. After, ten successive applications of aPDT were performed on the remaining biofilms. The following methods were used to evaluate the effectiveness of different strategies on biofilms: colony forming units count (CFU), quantification of dry weight (total and insoluble), soluble and insoluble proteins, analysis of water-soluble polysaccharides (WSP), alkali-soluble polysaccharides (ASP), extracellular DNA (eDNA) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The Shapiro-Wilk, Levene and two-way ANOVA tests were used, with significance level of 5%. CFU results were evaluated after each application and ECM components were quantified after applications 1, 5 and 10. The results showed cell viability reduction in all experimental conditions, the greatest reduction (5.7 log₁₀) was observed in tenth application of condition I (aPDT). There was no significant difference in the values of total dry weight, insoluble dry weight and ASP in any experimental condition. A reduction in values of soluble protein was observed after the fifth and tenth applications (p<0.001) in all conditions and in values of insoluble proteins only after the first application under conditions I and IV (p<0.001). The WSP and eDNA values presented after the treatments were significantly lower when compared to the control group (P-L-; p<0.001) in all experimental conditions. SEM showed the appearance of deformities in the cell walls and a reduction in the number of cells and cell slusters. The strategies evaluated for biofilm disruption did not increase the susceptibility of *C. albicans* to aPDT.

Keywords: *Candida albicans*. Biofilms. Extracellular matrix. Photochemotherapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO.....	15
2.1 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 <i>Candida albicans</i> e Biofilme.....	16
3.2 Resistência Antifúngica.....	17
3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	18
3.4 Desestruturação Química por meio da Utilização de Enzimas.....	21
3.5 Desestruturação Mecânica por meio de Sonicação.....	22
4 MATERIAL E MÉTODO.....	24
4.1 Material.....	24
4.1.1 Materiais de consumo.....	24
4.1.2 Instrumentais.....	25
4.1.3 Equipamentos.....	26
4.2 Método.....	26
4.2.1 Formação de biofilme de <i>Candida albicans</i>	26
4.2.2 Preparo do fotossensibilizador e parâmetros de irradiação.....	27
4.2.3 Preparo da enzima DNase I.....	28
4.2.4 Condições experimentais.....	28
4.2.4.1 <i>Condição I: os biofilmes foram submetidos à aPDT</i>	28
4.2.4.2 <i>Condição II: os biofilmes foram tratados com DNase e, a seguir, submetidos à aPDT</i>	29
4.2.4.3 <i>Condição III: os biofilmes foram submetidos a sonicação e, a seguir, submetidos à aPDT</i>	30
4.2.4.4 <i>Condição IV: os biofilmes foram tratados com DNase, seguida da sonicação e da aPDT</i>	31
4.2.5 Avaliação da eficácia dos tratamentos avaliados.....	32
4.2.5.1 <i>Contagem de unidades formadoras de colônias</i>	33
4.2.5.2 <i>Peso seco total</i>	34
4.2.5.3 <i>Quantificação de proteínas</i>	34
4.2.5.3.1 <i>Proteínas solúveis da matriz</i>	35
4.2.5.3.2 <i>Proteínas insolúveis do biofilme</i>	35
4.2.5.4 <i>Análise de polissacarídeos solúveis em água</i>	36
4.2.5.5 <i>Peso seco insolúvel</i>	36
4.2.5.6 <i>Análise de polissacarídeos solúveis em álcali</i>	37
4.2.5.7 <i>Análise de DNA extracelular</i>	38
4.2.5.8 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	39
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	40
5.1 Análise Estatística de Unidades Formadoras de Colônias.....	40
5.2 Análise Estatística da Caracterização do Biofilme.....	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Unidades Formadoras de Colônias.....	41
6.2 Caracterização do Biofilme.....	46

6.2.1 Resultados da caracterização do biofilme após a primeira aplicação de aPDT.....	46
6.2.1.1 <i>Peso seco total (mg)</i>	46
6.2.1.2 <i>Peso seco insolúvel (mg)</i>	47
6.2.1.3 <i>Proteínas solúveis da matriz (μg)</i>	47
6.2.1.4 <i>Proteínas insolúveis do biofilme (μg)</i>	47
6.2.1.5 <i>WSP (μg)</i>	48
6.2.1.6 <i>ASP (μg)</i>	49
6.2.1.7 <i>eDNA (ng)</i>	49
6.2.2 Resultados da caracterização do biofilme após a quinta aplicação de aPDT.....	52
6.2.2.1 <i>Peso seco total (mg)</i>	52
6.2.2.2 <i>Peso seco insolúvel (mg)</i>	52
6.2.2.3 <i>Proteínas solúveis da matriz (μg)</i>	52
6.2.2.4 <i>Proteínas insolúveis do biofilme (μg)</i>	53
6.2.2.5 <i>WSP (μg)</i>	54
6.2.2.6 <i>ASP (μg)</i>	54
6.2.2.7 <i>eDNA (ng)</i>	55
6.2.3 Resultados da caracterização do biofilme após a décima aplicação de aPDT.....	57
6.2.3.1 <i>Peso seco total (mg)</i>	57
6.2.3.2 <i>Peso seco insolúvel (mg)</i>	57
6.2.3.3 <i>Proteínas solúveis da matriz (μg)</i>	57
6.2.3.4 <i>Proteínas insolúveis do biofilme (μg)</i>	58
6.2.3.5 <i>WSP (μg)</i>	58
6.2.3.6 <i>ASP (μg)</i>	59
6.2.3.7 <i>eDNA (ng)</i>	59
6.2.4 Resultados da comparação nos grupos submetidos ao tratamento fotodinâmico após as condições avaliadas nas aplicações 1, 5 e 10.....	61
6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	63
7 DISCUSSÃO.....	71
8 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral e trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis são colonizados por fungos do gênero *Candida* spp; *Candida albicans* tem sido descrita como a espécie mais prevalente e patogênica deste gênero¹. Em alguns casos, esse fungo pode causar infecções mucocutâneas superficiais, como Candidose Orofaríngea (OPC, do inglês *oropharyngeal candidiasis*) e formas disseminadas da infecção¹. A OPC tem sido relatada em pacientes que utilizam medicamentos imunossupressores após transplante de órgãos, antibióticos de amplo espectro, diabéticos, terapias antineoplásicas, nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida e em usuários de próteses dentárias^{2,3}.

As infecções causadas por *C. albicans* geralmente estão associadas ao biofilme, que é uma microestrutura complexa de células aderidas a uma superfície e agrupadas dentro de uma matriz extracelular (MEC), composta de substâncias derivadas de lise celular ou produzidas e secretadas pelas próprias células⁴. Uma das funções da MEC é proteger os patógenos incorporados na mesma da ação de antimicrobianos, dificultando a penetração de fármacos no biofilme e reduzindo a susceptibilidade dos microrganismos contra terapias medicamentosas frequentemente utilizadas⁴. Dessa forma, essa estrutura contribui para a preservação de biofilmes e para manutenção das interações estáveis entre célula-célula e célula-superfície e com o meio ambiente⁵.

Para tratamento da OPC têm sido utilizados os antifúngicos poliênicos, azóis e equinocandinas⁶. Os medicamentos de uso tópico, como, por exemplo, a nistatina e o miconazol têm se mostrado eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da doença, entretanto, muitas vezes não eliminam completamente as espécies de *Candida*, uma vez que, os efeitos diluentes da saliva e movimentos da musculatura bucal normalmente reduzem a dose desses agentes a concentrações sub-terapêuticas, o que reduz a eficácia dos medicamentos². Consequentemente, infecções recorrentes são frequentes após a utilização do antifúngico. A prescrição de antifúngico sistêmico (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) tem sido instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e em episódios de infecções recorrentes⁶, porém tem sido relatada a ocorrência de efeitos hepatotóxicos ou nefrotóxicos². Além disso, a utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC tem resultado no desenvolvimento de resistência em espécies de

*Candida*⁷. Considerando o aumento na incidência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos medicamentos utilizados, estudos têm buscado estratégias para eliminar microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais.

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade de tratamento que tem sido utilizada no combate ao câncer e para a inativação de microrganismos⁸. O processo fotodinâmico requer a utilização de um agente fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS e a presença de oxigênio⁹. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz de comprimento de onda adequado deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular⁸.

Os FSS mais utilizados na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) são predominantemente das famílias das porfirinas¹⁰ e das fenotiazinas¹¹. Além disso, uma nova classe de FS vem sendo empregada em aPDT, os FSS de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas reduzidas, que apresentam forte banda de absorção na região vermelha (625-740 nm) do espectro fotomagnético. O Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e6 solúvel em água e tem sido utilizada com sucesso na aPDT contra o câncer devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete¹² e também na eliminação de microrganismos¹³⁻¹⁵.

Com aPDT tem sido observada completa inativação de culturas planctônicas de *C. albicans*, entretanto, o mesmo padrão de comportamento não foi observado em biofilmes¹⁵. Quando submetidas à aPDT, tem sido observado células de *C. albicans* sobreviventes a esse tratamento, denominadas “*persisters cells*”¹⁶. A sobrevivência desses microrganismos pode ser atribuída à complexa estrutura dos biofilmes, fornecendo proteção aos mesmos e tolerância às drogas¹⁷, o que torna os biofilmes de *Candida* spp. menos susceptíveis à aPDT quando comparados com culturas planctônicas dessas espécies. A persistência do biofilme de *C. albicans* após aplicações de aPDT pode ser atribuída a presença da MEC do biofilme? Para elucidar esta questão, torna-se importante a utilização de estratégias capazes de desestruturar a MEC do biofilme para facilitar a penetração do fotossensibilizador e da luz nas multicamadas do biofilme expondo as células à aPDT.

Entre as estratégias para a desestruturação da MEC do biofilme de microrganismos, podemos citar o emprego de enzimas^{18,19}. Foi verificado que o tratamento de biofilmes maduros com 50 µg/mL de DNase resultou numa diminuição de 30% de biomassa de biofilme, de forma semelhante à observada para os tratamentos com proteinase K². A susceptibilidade do biofilme de *C. albicans* a anfotericina B foi aumentada pelo tratamento do biofilme com DNase²⁰. A incubação de biofilmes de 48 horas de cepas de *C. albicans* susceptíveis e resistentes ao fluconazol por 5 minutos com diferentes enzimas hidrolíticas mostrou que a enzima DNase reduziu significativamente o eDNA e proteínas solúveis da MEC de ambas as cepas de *C. albicans*; e polissacáridos solúveis em água (WSP) de *C. albicans* resistente¹⁹. A redução de proteínas solúveis e do teor de WSP pela DNase indica que esses componentes da MEC podem estar entrelaçados com o eDNA¹⁹.

Além da desestruturação da MEC do biofilme de microrganismos com o uso de enzimas^{18,19}, podemos desestruturar a MEC com a utilização de métodos mecânicos²¹. Portanto, podemos sugerir que, se conseguirmos degradar a MEC do biofilme, seja por métodos químicos ou físicos, pode ser possível potencializar o efeito da aPDT. Considerando esses aspectos e levando em consideração que, até o momento, não há evidências na literatura quanto a influência da MEC na susceptibilidade dos biofilmes de *C. albicans* frente sucessivas aplicações de aPDT, o objetivo deste estudo é avaliar a influência da MEC na susceptibilidade de biofilmes de *C. albicans* a sucessivas aplicações de aPDT utilizando como estratégias de desestruturação da MEC a enzima DNase e o método mecânico de sonicação.

2 OBJETIVO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a influência da matriz extracelular (MEC) na susceptibilidade de biofilmes de *C. albicans* à sucessivas aplicações de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), mediada por Photodithazine® associado ao diodo emissor de luz (LED) através do uso de estratégias química (enzima DNase) e mecânica (sonicação) para a desestruturação da MEC.

As seguintes estratégias de tratamento foram avaliadas: I) aPDT [os biofilmes foram incubados por 20 minutos com PDZ (25 mg/L) e iluminados com LED (660 nm, 18 J/cm²)]; II) DNase+aPDT; III) sonicação+aPDT; ou IV) DNase+sonicação+aPDT. Os biofilmes foram submetidos a dez aplicações sucessivas de aPDT.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar a viabilidade celular de *C. albicans* em biofilme após a aplicação das estratégias para desestruturação do biofilme e após as aplicações sucessivas de aPDT. A viabilidade celular foi avaliada após cada aplicação de aPDT.

Avaliar os componentes do biofilme (peso seco total e insolúvel e proteínas insolúveis) após os tratamentos seguidos das aplicações de aPDT. Os componentes do biofilme foram avaliados após 1, 5 e 10 aplicações.

Avaliar os componentes da matriz extracelular do biofilme ([proteínas solúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP), polissacarídeos solúveis em álcali (ASP) e DNA extracelular (eDNA)] após os tratamentos seguidos das aplicações de aPDT. Os componentes da matriz extracelular foram avaliados após 1, 5 e 10 aplicações.

Analisar as características estruturais do biofilme por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após os tratamentos descritos após 1 e 10 aplicações de aPDT.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Será apresentada a seguir a revisão de literatura, com base em estudos antigos e recentes publicados sobre os temas.

3.1 *Candida albicans* e Biofilme

As espécies do gênero *Candida* podem ser comumente encontradas na cavidade oral de indivíduos saudáveis. Em situações de desequilíbrio imunológico do hospedeiro, este fungo pode se tornar patogênico²², invadir os tecidos e ocasionar infecções, tais como Candidose Orofaríngea (OPC) e formas disseminadas dessa infecção⁶. A OPC pode se apresentar clinicamente como manchas brancas raspáveis na mucosa e na língua, eritema e edema no palato e fissuras nos cantos da boca, isso se deve à capacidade da levedura de colonizar diferentes superfícies orais²³.

A OPC resulta da adesão e penetração de leveduras nos tecidos orais quando as defesas físicas e imunológicas do hospedeiro estão prejudicadas, de forma que a invasão dos tecidos pode ser auxiliada pela formação de hifas e pela secreção de enzimas hidrolíticas pelo fungo²³. O aumento do número de pacientes imunossuprimidos resultou no ressurgimento de infecções orais por *Candida*²². Dessa forma, é o sistema imunológico do hospedeiro que determina se vai ocorrer a eliminação, a colonização ou o desenvolvimento da candidíase²³.

As infecções causadas por *Candida spp.* estão associadas ao biofilme. Biofilmes são comunidades biológicas organizadas, estruturadas, coordenadas e funcionais⁶. É considerado o estado mais comum de crescimento microbiano encontrado em pacientes infectados com organismos patogênicos²⁴. Biofilme é definido como uma microestrutura complexa de células aderidas a uma superfície e agrupadas dentro de uma matriz extracelular (MEC), composta de substâncias derivadas de lise celular produzidas e secretadas pelas próprias células⁴. A MEC tem como função proteger os patógenos incorporados na mesma contra ação de antimicrobianos dificultando a penetração dos fármacos no biofilme e reduzindo a susceptibilidade dos microrganismos contra as terapias medicamentosas frequentemente utilizadas⁵. Dessa forma, essa estrutura contribui para a preservação de biofilmes e para manutenção das interações estáveis entre célula-célula e célula-superfície e com o meio ambiente⁵. A autoprodução da MEC fornece um ambiente

protetor para as células, oferecendo uma estrutura tridimensional e facilitando a adesão e coesão celular. Este material extracelular é fonte de nutrientes para a comunidade microbiana e controla a dispersão das células²⁴, função importante para possibilitar a colonização de novos nichos, como superfícies e hospedeiros²⁵.

A MEC de biofilmes de *C. albicans* foi analisada quimicamente e foi observada a presença de hexosamina, fósforo, ácido urônico, polissacarídeos, proteínas de adesão e DNA extracelular (eDNA)²⁶. Em estudo anterior²⁷ foi identificada a presença de importantes polissacarídeos: α -1,2 e α -1,6-mananos associados com β -1,6-glucanos em um complexo chamado manano-glucano (MGCx), que é essencial e indispensável para a proteção dos microrganismos. Além disso, foi identificada também a presença de β -1,3-glucano, que se relaciona à capacidade da MEC de prevenir a penetração de antifúngicos²⁷. Considerando esses achados, foi investigado o efeito da enzima β -1,3 glucanase na susceptibilidade de culturas planctônicas e biofilmes ao fluconazol e à anfotericina B. Foi observado que a sua utilização das enzimas aumentou significativamente a atividade dos antifúngicos testados nos dois tipos de culturas celulares estudados²⁸.

Em biofilme de bactéria foi demonstrado que o eDNA funciona como um suporte estrutural para manter a arquitetura do biofilme²⁹. Essa barreira física formada pela MEC é relevante pois protege as células de ameaças externas, como antimicrobianos utilizados para realização de tratamentos convencionais²⁴.

3.2 Resistência Antifúngica

Os conceitos usados para distinguir os termos resistência, tolerância e persistência a antibióticos em cepas bacterianas foram abordados por Brauner et al.³⁰. Segundo esses autores, a resistência é a capacidade herdada de um microrganismo se desenvolver quando exposto a altas concentrações do antibiótico; tolerância é a capacidade herdada (ou não) de um microrganismo sobreviver à exposição transitória do fármaco, independentemente da duração do tratamento, sem alterar a Concentração Inibitória Mínima; e, persistência, foi definida como a capacidade de uma sub-população clonal sobreviver a altas concentrações de antibióticos após a morte de uma quantidade significativa de células.

O aumento na recorrência de infecções fúngicas tem sido associado à frequência com que essas infecções são resistentes à terapia antifúngica

convencional. Fatores que contribuem para a resistência aos antifúngicos são: fatores clínicos (estado imunológico do paciente, farmacologia dos medicamentos e tipo de infecção fúngica); fatores celulares (substituição de uma cepa susceptível por uma cepa resistente ou alteração de uma cepa endógena para um fenótipo resistente); e fatores moleculares (superexpressão de bombas de efluxo e superexpressão ou mutação de enzimas alvo)³¹.

Os polissacarídeos β -1,3 glucanos têm sido associados ao mecanismo de resistência^{28,32}. A resistência antifúngica dos biofilmes de *C. albicans* à fármacos convencionais é considerada multifatorial e está associada à estimulação de bombas de efluxo, estado fisiológico das células e proteção exercida pela MEC por meio de β -glucanos que se ligam ao fluconazol e anfotericina B^{33,34}. Além do β -glucano, foi relatado que o eDNA também é um constituinte importante da MEC e promove integridade estrutural dos biofilmes, atuando na proteção do biofilme microbiano contra difusão de antimicrobianos^{29,35}.

O surgimento de resistência a antifúngicos restringem sua como agentes profiláticos de longo prazo para infecções por *Candida*. Diante desse cenário, outros tratamentos têm sido sugeridos como uma alternativa útil para o manejo da candidíase. Estudos indicam que probióticos, particularmente os *Lactobacillus*, suprimem o crescimento de *Candida* e o desenvolvimento do biofilme *in vitro*³⁶. Estudo recente mostra que *Lactobacillus casei* reduz a viabilidade celular, WSP e eDNA de *C. albicans* susceptível a fluconazol em biofilme misto, dificultando o desenvolvimento do biofilme, o que conseqüentemente compromete sua integridade estrutural³⁶.

3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A terapia fotodinâmica (PDT) inicialmente foi utilizada no combate a células neoplásicas e lesões cancerígenas. Esta terapia baseia-se na administração local de um fotossensibilizador (FS), que quando ativado pelo comprimento de onda de luz apropriado, interage com oxigênio molecular e forma uma espécie reativa tóxica (oxigênio singlete) capaz de promover a morte celular³⁷. A utilização de FS combinado com luz visível também tem sido utilizada no tratamento de infecções microbianas, devido ao seu amplo espectro de ação, inativação de cepas e baixo potencial mutagênico. Portanto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) representa uma modalidade alternativa e eficaz para tratamento de infecções microbianas³⁷.

A aPDT tem sido sugerida como tratamento alternativo para candidíase oral. O mecanismo de ação da aPDT envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I), ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), induzindo assim a produção de espécies reativas⁸. As espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem reatividade não específica com moléculas orgânicas e podem causar danos irreversíveis em alvos celulares, tais como a lise da membrana e inativação de proteínas. Dessa forma, qualquer macromolécula celular pode ser considerada como alvo para a aPDT^{8,9}.

Os FSs da classe das porfirinas apresentam adequadas propriedades fotoquímicas, principalmente, a geração de oxigênio singleto, tornando-os uma opção para aPDT. Entretanto, as porfirinas costumam ser pouco solúveis em água, por isso, a eficiência das porfirinas depende de nanopartículas¹⁰. A eficácia da utilização de aPDT mediada por azul de metileno (classe das fenotiazinas) foi avaliada para tratamento de candidíase oral em camundongos imunossuprimidos. Os animais foram inoculados com *C. albicans* e, após estabelecida a infecção, receberam a administração tópica de solução de azul de metileno em concentrações de 250 a 500 g/mL por 10 minutos, então, foram submetidos à luz (664 nm). Os resultados indicaram a erradicação completa da infecção com a utilização de 450 a 500 g/mL da solução³⁸.

Photodithazine® (PDZ) é um FS de segunda geração derivado da clorina e6, extraído da alga *Spirulina platensis*, que possui bandas de absorção na região vermelha do espectro (660 nm), o que facilita a penetração nos tecidos¹². Foi estudada a produção de oxigênio singleto após a realização de aPDT mediada por PDZ, constatando que o resultado foi maior em 25% quando comparado à uma clorina e6 pura na mesma concentração. Provavelmente, pelo fato do PDZ ser mais solúvel em água³⁹.

Em estudo anterior¹⁵ foi demonstrado que a aPDT mediada pelo PDZ e diodo emissor de luz (LED) promoveu redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de isolados clínicos de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a aPDT. Quando a eficácia da aPDT foi avaliada em biofilme, foi observado que a aPDT promoveu redução na viabilidade celular equivalente a 0,9 log₁₀ (UFC/mL⁻¹) para *C. albicans* e 1,4 e 1,5 log₁₀ (UFC/mL⁻¹) para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente¹⁵.

A eficácia da aPDT no tratamento da infecção causada por *C. albicans* foi avaliada em modelo murino de candidose. Os animais foram tratados durante cinco dias consecutivos com aPDT (100 mg/L de PDZ com LED) ou com antifúngico tópico Nistatina (NIS). Os resultados demonstraram que a aPDT foi tão efetiva quanto a NIS na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3,2 log₁₀, respectivamente. Além disso, os animais tratados com aPDT apresentaram remissão completa das lesões orais, enquanto os animais tratados com NIS apresentaram remissão parcial das mesmas¹³.

Em outro estudo⁴⁰ utilizando o mesmo modelo murino de infecção, foi observado que a cepa resistente ao fluconazol (ATCC 96901) foi menos susceptível à aPDT, uma vez que a redução de *C. albicans* nos animais tratados com aPDT ou NIS foi de 1,3 e 1,1 log₁₀, respectivamente. Adicionalmente, os autores também observaram que o aspecto macroscópico da lesão permaneceu igual aos animais que não receberam tratamento. Por outro lado, quando as terapias foram associadas, a redução no número de colônias foi mais acentuada com os valores de 2,6 e 2,1 log₁₀ para os grupos NIS+aPDT e aPDT+NIS, respectivamente. Além disso, a remissão da lesão foi de aproximadamente 90%, 24 horas após o tratamento (em comparação ao grupo controle)⁴⁰. De maneira geral, os estudos supracitados^{13,40} demonstraram a susceptibilidade das espécies de *Candida spp.* à aPDT em biofilme, entretanto a completa inativação das células fúngicas ainda não foi verificada.

O FS Tri-Py⁺-Me-PF foi utilizado em um ensaio *in vitro* com as bactérias *Vibrio fischeri* e *Escherichia coli*. Para determinar a recuperação bacteriana após o tratamento, o fotossensibilizador foi adicionado às suspensões bacterianas e as amostras foram irradiadas com luz branca (40 W m⁻²) por 270 minutos. Após esse período de irradiação, as colônias sobreviventes foram coletadas e ressuspensas. Para avaliar o desenvolvimento de resistência após o tratamento, as suspensões bacterianas foram expostas novamente à luz branca por 25 minutos na presença do fotossensibilizador e repetido dez vezes para cada bactéria. Os resultados sugerem que aPDT usando Tri-Py⁺-Me-PF representa uma abordagem promissora para destruir bactérias de forma eficiente, uma vez que, após um único tratamento, esses microrganismos não recuperam sua viabilidade, como também, nenhuma das bactérias desenvolveu resistência ao processo fotodinâmico após dez aplicações de luz¹⁶.

Em estudo anterior Dias et al.¹⁴ avaliaram o potencial de aplicações sucessivas de aPDT em afetar a susceptibilidade de *C. albicans* e também se a presença de

fluconazol influencia a recuperação dos fungos no meio de cultura. Culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* foram submetidos a aplicações sucessivas de aPDT mediada pelo PDZ associada ao LED (660 nm, 18 J/cm²). Para culturas planctônicas, 6,3 log₁₀ de redução na viabilidade do fungo foi observada após a terceira aplicação de aPDT. Por outro lado, utilizando os mesmos parâmetros em modelo de biofilme, após cinco aplicações foi observada ~6,1 log₁₀ de redução. As células de *C. albicans* presentes no biofilme foram mais tolerantes as sucessivas aplicações de aPDT mediadas por PDZ quando comparadas as culturas planctônicas.

A fototerapia também tem sido avaliada para inativação e inibição do desenvolvimento de biofilmes⁴¹. Foi observado que a aplicação da fototerapia com luz azul duas vezes ao dia pode afetar o desenvolvimento e a composição da MEC do biofilme de *Streptococcus mutans* formados em discos de hidroxiapatita. Neste mesmo estudo, além da alteração na morfologia do biofilme, foi observado a redução na viabilidade celular, nos polissacarídeos e no peso seco⁴¹. Em outro estudo⁴² foram avaliados os efeitos do tratamento com LED vermelho (43,8 J/cm², 87,6 J/cm² e 175,5 J/cm²) e azul (72 J/cm²) no desenvolvimento de biofilme de *C. albicans*. Os autores concluíram que a exposição ao LED vermelho ou azul duas vezes ao dia, afeta o desenvolvimento do biofilme e a fisiologia da produção de polissacarídeos e são mecanismos potenciais para o controle do desenvolvimento da MEC do biofilme de *C. albicans*⁴².

3.4 Desestruturação Química por meio da Utilização de Enzimas

O DNA foi descrito como um componente estrutural da MEC, porém em *C. albicans*, há um conhecimento escasso a respeito da contribuição do eDNA para a MEC e estrutura geral do biofilme. Anteriormente, um estudo observou a presença e quantidade de eDNA na MEC do biofilme de *C. albicans*, como também, o efeito do tratamento com DNase na MEC do biofilme. Foi detectado o acúmulo de eDNA na MEC extraída de biofilmes de *C. albicans* formados. Os autores concluíram que a adição de DNA exógeno (>160 ng/mL) aumenta a biomassa do biofilme e, inversamente, o tratamento com DNase (>0,03 mg/mL) diminui a biomassa do biofilme. Dessa forma, as evidências demonstram que o eDNA é um elemento chave da MEC em biofilmes maduros de *C. albicans* e desempenha um papel predominante na integridade e manutenção estrutural do biofilme³³.

Em estudo de Panariello et al.¹⁹, foram formados biofilmes de 48 horas com cepa de *C. albicans* susceptível (CaS) e *C. albicans* resistente à fluconazol (CaR), seguido por incubação com enzimas hidrolíticas β -glucanase e DNase individualmente ou em combinação. Os resultados mostram uma redução significativa de WSP e eDNA na utilização da enzima DNase isoladamente em biofilmes de CaR. Além disso, foi observada redução de proteínas solúveis nos biofilmes de ambas as cepas com a utilização das enzimas¹⁹. Nesse mesmo estudo, as enzimas foram aplicadas seguidas por incubação com PDZ por 20 minutos e exposição ao LED (660 nm, 50 J/cm²). A DNase apresentou melhores resultados ao reduzir eDNA e proteínas solúveis da matriz, portanto, o pré-tratamento com DNase permitiu a penetração do PDZ em camadas mais profundas do biofilme, consequentemente, o efeito da aPDT foi potencializado, causando uma redução significativa da viabilidade celular e da quantidade de eDNA da matriz do biofilme de *C. albicans*¹⁹.

3.5 Desestruturação Mecânica por meio de Sonicação

Propriedades mecânicas do biofilme são descritas como a capacidade de resistir à força aplicada, presença de cátions divalentes, produção e composição da MEC. Essas propriedades de biofilmes de *Candida* não recebem atenção necessária, apesar de serem importantes por aumentar a resistência de biofilmes bacterianos⁴³.

Em 2019, o efeito de ultrassom de baixa intensidade e baixa frequência em combinação com tobramicina foi investigado em biofilmes de *E. coli*. A morfologia desses biofilmes foi afetada, principalmente, a espessura que foi reduzida, por conta disso houve o aumento da penetração do antibiótico, e, consequentemente o aumento do efeito antimicrobiano⁴⁴. Outro estudo identificou fatores que determinam a resistência à compressão de biofilmes de diferentes cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Os resultados demonstraram que a proporção de hifas para leveduras influencia na resistência à compressão de biofilmes de *C. albicans*, uma vez que, biofilmes com conteúdo de hifas maior que 50% possuíam mais resistência à compressão, e consequentemente, eram mais difíceis de destruir por vórtex e sonicação, em comparação aos biofilmes com um menor conteúdo de hifas⁴³.

Uma pesquisa estudou a combinação entre ultrassom e aPDT. Nesse caso, o ultrassom foi utilizado com o objetivo de ativar o FS escolhido (azul de metileno). No

grupo tratamento, os resultados demonstraram redução bacteriana de aproximadamente 98%, quando comparado ao grupo controle. Portanto, essa terapia aumentou a profundidade de penetração da aPDT nos biofilmes de *E. faecalis*, havendo uma maior atividade antimicrobiana em comparação ao uso somente da aPDT⁴⁵.

4 MATERIAL E MÉTODO

Serão apresentados a seguir os materiais e as metodologias utilizadas durante esta pesquisa.

4.1 Material

Para a realização de todas as etapas deste estudo foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentais e equipamentos:

4.1.1 Materiais de consumo

- Ácido Sulfúrico (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Água destilada (Gehaka - Indústria e Comércio Eletroeletrônica Limitada, São Paulo, Brasil);
- Água Mili-Q (Mega Purity, Billerica, EUA);
- Alça de inoculação 10 µL (Laborplast, Cassinetta di Lugagnano, MI, Itália);
- Álcool 70% (Itajá, Goianésia, Goiás, Brasil);
- Álcool 90% (Itajá, Goianésia, Goiás, Brasil);
- Álcool Isoamílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Álcool Isopropílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Cepa padrão de *Candida albicans*, ATCC 90028 (Rockville, MD, EUA);
- Cloreto de Potássio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Cloreto de Sódio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Cubetas para leitura em espectrofotômetro (Cartel, São Paulo, Brasil);
- D-Glicose Anidra (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Fenol 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Fosfato de Potássio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- KH₂PO₄ (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 5µg/mL de clorofenicol (Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA);

- MOPS Purificado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- NaOH (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm) (BOECO, Hamburgo, Alemanha);
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA);
- Photodithazine® (Veta-Grand Co., Moscou, Rússia);
- Placas de 24 poços (Kasvi, K12-024, Pequim, China);
- Placas de 96 poços (Kasvi, K12-096, Pequim, China);
- Placas de Petri 90x15 mm (Pleion, Barueri, São Paulo, Brasil);
- Ponteira para micropipeta (100-10000 µL) (Kasvi, Pequim, China);
- Ponteira para micropipeta (20-200 µL) (Kasvi, Pequim, China);
- Ponteira para micropipeta 5 mL (Kasvi, Pequim, China);
- Ponteira para repetidora 1 mL (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Ponteira para repetidora 5 mL (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Sulfato de Magnésio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Tubo tipo eppendorf 1,5 mL (Kasvi, Pequim, China);
- Tubo tipo eppendorf 2 mL (Kasvi, Pequim, China);
- Tubo tipo FALCON cônico 15 mL (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- Tubo tipo FALCON cônico 50 mL (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça);
- Tubos de vidro 10x2x5 (Uniglas, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Yeast Nitrogen Base (YNB) (Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA).

4.1.2 Instrumentais

- Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Béquero graduado (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Garrafas de vidro graduadas (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Micropipeta de 0,5-10 µL (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de 100-1000 µL (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de 20-200 µL (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Micropipeta de repetição (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, São Paulo, Brasil).

4.1.3 Equipamentos

- Agitador de tubos. Modelo: AP 56. Série: 9803 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Agitador Orbital TE-420 (Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Aparelho de LED, 660 nm, (LXHL-PR09, Luxeon III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California EUA), desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos – USP, São Carlos, Brasil;
- Autoclave vertical. Modelo: AV 60. No 6614 (PHOENIX Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Balança de precisão. Modelo: BG 400. No 016450. (GEHAKA – Indústria e Comércio Eletroeletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, Brasil);
- Banho seco para microtubos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA);
- Centrífuga para microtubos (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Dissecador de amostras (RVC 2–18 CD plus, Christ, Osterode am Harz, Alemanha);
- Espectrofotômetro (Kasvi, Pequim, China);
- Estufa para secagem e esterilização. Modelo: MA 033. Serie: 9819 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Freezer -20°C (CVU30, Consul, São Paulo, Brasil);
- Freezer -80°C (REVCO, Thermo Scientific, EUA);
- Leitor de microplacas tipo ELISA (EZ Read 400, Biochrom, Cambridge, Inglaterra);
- Nanoespectrofotômetro (DS-11, DeNovix, EUA).

4.2 Método

Para a realização de todas as etapas deste estudo foram utilizadas as seguintes metodologias:

4.2.1 Formação de biofilme de *Candida albicans*

Previamente à sua utilização, a cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) foi descongelada e semeada em placas de Petri com meio de cultura *Sabourand dextrose ágar* (SDA) suplementado com cloranfenicol (0,05 g/L) que foram incubadas a 37°C

por 48 horas. Decorrido esse período, vinte colônias foram inoculadas em 20 mL de meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) suplementado com 100 mM de glicose e incubadas a 37°C por 16 horas em estufa de crescimento. Após 16 horas de incubação, 16,1 mL da cultura (pré-inóculo) foi colocado em garrafa de vidro esterilizada contendo 305,9 mL de meio de cultura YNB fresco (diluição 1:20 do pré-inóculo). O inóculo foi incubado à 37°C até atingir a fase mid-log de crescimento que é equivalente a densidade óptica ($DO_{540\text{ nm}}$) de $0,55 \pm 0,08 \text{ nm}^{46}$ (incubação por aproximadamente 8 horas). A concentração das suspensões de *C. albicans* foram ajustadas em espectrofotômetro ($DO_{540\text{ nm}}$), que corresponde a uma concentração de 10^7 UFC/mL . Essas culturas foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, pH 7,2) a $4000 \times g$ por 5 minutos e, novamente ressuspensas em solução PBS.

Para formação de biofilme maduro de 48 horas, alíquotas de 1 mL do inóculo foram transferidas para orifícios correspondentes a cada grupo experimental em uma placa de 24 orifícios. A seguir, foi adicionado o volume de 1 mL de meio YNB fresco suplementado com 100 mM de glicose. Essas placas foram incubadas a 37°C sob agitação orbital (75 rpm) durante 1 hora e meia⁴⁷, que corresponde à fase de adesão. A seguir, as células foram lavadas duas vezes com solução PBS e foi adicionado 2 mL de RPMI 1640 tamponado com ácido-3-(N-morfolino) propane sulfônico (MOPS) a um pH de 7,8 a cada orifício da placa para a formação de biofilme, seguido de incubação a 37°C. Após 24 horas, 1 mL do meio de cultura foi removido e adicionado 1 mL do mesmo meio (RPMI+MOPs) fresco, as placas foram novamente incubadas por mais 24 horas. Após a incubação, os biofilmes maduros de 48 horas formados foram lavados duas vezes com solução PBS e os tratamentos foram realizados.

4.2.2 Preparo do fotossensibilizador e parâmetros de irradiação

Para a realização da aPDT a fotossensibilização dos biofilmes foi realizada com Photodithazine® (PDZ). Esse fotossensibilizador tem um pico de absorção em 660 nm e foi fornecido pelo Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP). O PDZ foi aplicado na concentração de 25 mg/L. Assim, antes de cada experimento, a solução-padrão de PDZ (5000 mg/L) foi diluída em solução de PBS para obter a concentração final de 25 mg/L. Os parâmetros do tratamento foram selecionados de acordo com estudos prévios, em que a

associação do fotossensibilizador PDZ e de LED não foram capazes de inativar completamente suspensões de *C. albicans* (dose sub-letal)¹⁵.

4.2.3 Preparo da enzima DNase I

Uma solução estoque da enzima DNase I de pâncreas bovino foi preparada no dia de sua utilização em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,5) na concentração de 20 unidades/mL. A solução de DNase foi adicionada aos biofilmes. As placas foram incubadas a 37°C por 5 minutos de acordo com estabelecido no estudo de Panariello et al.¹⁹.

4.2.4 Condições experimentais

Para alcançar os objetivos do presente estudo, os biofilmes de *C. albicans* foram submetidos a estratégias para desestruturação da MEC e, então foram submetidos a dez aplicações sucessivas de aPDT, conforme descrito nos tópicos seguintes:

4.2.4.1 Condição I: os biofilmes foram submetidos à aPDT

Nos biofilmes do grupo P+L+, foram realizadas dez aplicações sucessivas de aPDT. Para isso, os mesmos foram incubados com PDZ (25 mg/L) por 20 minutos (pré-incubação) e, a seguir, iluminados com LED vermelho por 11 minutos (18 J/cm²). No grupo P+L-, os biofilmes foram incubados somente com PDZ (25 mg/L) por 20 minutos (pré-incubação), sem aplicação da luz. Os biofilmes do grupo P-L+, foram apenas iluminados com LED vermelho por 11 minutos (18 J/cm²), sem a aplicação do FS. Os biofilmes do grupo P-L- não foram submetidos ao tratamento fotodinâmico.

Após cada aplicação, os biofilmes foram cuidadosamente desprendidos do fundo dos orifícios da placa com o auxílio da ponteira de 200 µL, transferidos para um microtubo esterilizado e sonificados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) com o intuito de dispersar as células e facilitar a diluição seriada. Em seguida foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), o plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas. Os biofilmes foram submetidos a dez aplicações sucessivas dos tratamentos

descritos. E os experimentos foram realizados em duplicata em três ocasiões distintas (n=6).

4.2.4.2 *Condição II: os biofilmes foram tratados com DNase e, a seguir, submetidos à aPDT*

Na condição II os biofilmes foram submetidos ao tratamento com DNase previamente a aplicação da aPDT com o intuito de desestruturar a MEC do biofilme e potencializar o tratamento fotodinâmico. Então, após a aplicação da DNase os biofilmes foram submetidos a dez ciclos do tratamento fotodinâmico como descrito no item 4.2.4.1.

Os biofilmes do grupo DNP+L+, foram tratados com a enzima DNase I (20 unidades/mL) por 5 minutos. Após esse período a DNase I foi removida e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS; então, foram realizadas dez aplicações sucessivas de aPDT como descrito anteriormente para o grupo P+L+. Para isso, os biofilmes foram incubados com PDZ (25 mg/L) por 20 minutos e iluminados com LED vermelho por 11 minutos (18 J/cm²). Após cada aplicação, os biofilmes foram cuidadosamente removidos dos orifícios e colocados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL. A seguir os mesmos foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) com o intuito de dispersar as células e facilitar a diluição seriada. Então, foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), o plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

No grupo DNP+L-, os biofilmes foram tratados com a enzima DNase I (20 unidades/mL). Após 5 minutos a DNase I foi removida e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS; e então, foram incubados com PDZ (25 mg/L) por 20 minutos (pré-incubação). Após o tempo de cada aplicação da luz, os biofilmes foram cuidadosamente removidos dos orifícios, transferidos para um tubo tipo eppendorf de 2 mL e sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) com o intuito de dispersar as células e facilitar a diluição seriada. Por fim, foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

No grupo DNP-L+, os biofilmes foram tratados com a enzima DNase I (20 unidades/mL). Após 5 minutos a DNase I foi removida e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS e iluminados com LED vermelho por 11 minutos (18 J/cm²). Então, os mesmos foram raspados por 45 segundos, colocados em um tubo tipo

eppendorf de 2 mL e sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) com o intuito de dispersar as células e facilitar a diluição seriada. Finalmente, foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

Os biofilmes do grupo DNP-L-, foram tratados com a enzima DNase I (20 unidades/mL) por 5 minutos. Após o tratamento, a enzima foi removida e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS. A seguir os biofilmes foram removidos dos orifícios, colocados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL e sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) com o intuito de dispersar as células e facilitar a diluição seriada. Então, foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas. Neste grupo não foi realizado o tratamento fotodinâmico. Os experimentos foram realizados em duplicata em três ocasiões distintas (n=6).

4.2.4.3 *Condição III: os biofilmes foram submetidos a sonicação e, a seguir, foram submetidos à aPDT*

Na condição III os biofilmes foram submetidos a sonicação previamente a aplicação da aPDT com o intuito de desestruturar a MEC do biofilme e potencializar o tratamento fotodinâmico. Então, após a sonicação os biofilmes foram submetidos a dez ciclos do tratamento fotodinâmico como descrito previamente.

No grupo SOP+L+, os biofilmes foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J). A seguir, foram realizadas dez aplicações sucessivas de aPDT conforme descrito previamente para o grupo P+L+. Resumidamente, os biofilmes foram incubados com PDZ (25 mg/L) por 20 minutos e iluminados com LED vermelho por 11 minutos (18 J/cm²). Então, os mesmos foram cuidadosamente removidos dos orifícios e transferidos para um tubo tipo eppendorf de 2 mL. Por fim, foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

No grupo SOP+L-, os biofilmes foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) e tratados somente com o FS. Para isso foram incubados com PDZ (25 mg/L) por 20 minutos (pré-incubação) e, decorrido o tempo de aplicação da luz, foram removidos e colocados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL. Então, foi realizada a

diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

No grupo SOP-L+, os biofilmes foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) e somente iluminados com LED vermelho por 11 minutos (18 J/cm²); após o tempo de cada aplicação, foram raspados por 45 segundos e colocados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL, e, por fim, foi realizada a diluição seriada (0, 1, 2 e 3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

No grupo SOP-L-, após a formação dos biofilmes maduros, os mesmos foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) com o intuito de desestruturar a MEC. Decorrido o tempo de cada aplicação, os biofilmes foram raspados por 45 segundos e colocados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL, e, por fim, foi realizada diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas. Neste grupo não foi realizado o tratamento fotodinâmico. Os experimentos foram realizados em duplicata em três ocasiões distintas (n=6).

4.2.4.4 *Condição IV: os biofilmes foram tratados com DNase, seguida da sonicação e da aPDT*

Na condição IV os biofilmes foram submetidos ao tratamento com DNase, sonicados e então submetidos a aplicação da aPDT. Esses tratamentos foram realizados com o intuito de desestruturar a MEC do biofilme e potencializar o tratamento fotodinâmico. Então, após os tratamentos, os biofilmes foram submetidos a dez ciclos do tratamento fotodinâmico como descrito previamente.

Os biofilmes do grupo DNSOP+L+ foram tratados com a enzima DNase I (20 unidades/mL) por 5 minutos. Em seguida, a enzima foi removida e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS. Então, esses biofilmes foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) com o intuito de desestruturar a MEC e facilitar a penetração do FS. A seguir, nestes biofilmes foram realizadas dez aplicações sucessivas de aPDT. Para isso, os mesmos foram incubados com PDZ (25 mg/L) por 20 minutos e iluminados com LED vermelho por 11 minutos (18 J/cm²). Após cada aplicação, os biofilmes foram cuidadosamente removidos e transferidos para um tubo tipo eppendorf de 2 mL. Então, foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

No grupo DNSOP+L-, os biofilmes foram tratados com a enzima DNase I (20 unidades/mL) por 5 minutos. A seguir a enzima foi removida e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS. Então, os mesmos foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) e incubados com PDZ (25 mg/L) por 20 minutos (pré-incubação). Decorrido o tempo de cada aplicação, os biofilmes foram raspados por 45 segundos e colocados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL. Então, foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

No grupo DNSOP-L+, os biofilmes foram tratados com a enzima DNase I (20 unidades/mL) por 5 minutos. A seguir, a DNase I foi removida e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS; depois, foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J). Então, os biofilmes foram iluminados com LED vermelho por 11 minutos (18 J/cm²). A seguir os biofilmes foram raspados por 45 segundos e colocados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL. Por fim, foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas.

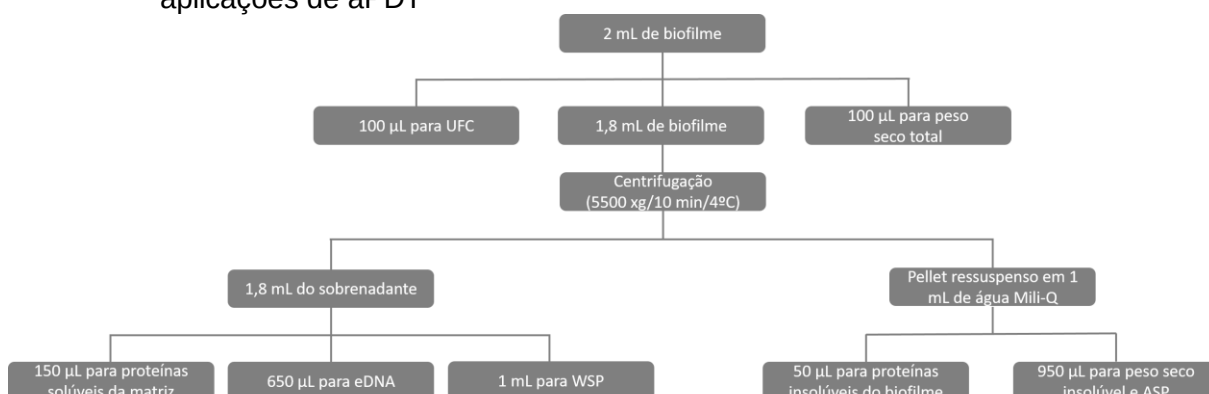
No grupo DNSOP-L-, os biofilmes foram tratados com a enzima DNase I (20 unidades/mL) por 5 minutos. A enzima foi removida e os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS. Então, foram sonicados por 30 segundos (7 W 170 a 190 J) com o intuito de desestruturar a MEC; e, após o tempo de cada aplicação dos tratamentos, foram removidos dos orifícios e colocados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL. Finalmente foi realizada a diluição seriada (0, -1, -2 e -3), plaqueamento em SDA e incubação em estufa a 37°C por 48 horas. Neste grupo não foi realizado o tratamento fotodinâmico. Os experimentos foram realizados em duplicata em três ocasiões distintas (n=6).

4.2.5 Avaliação da eficácia dos tratamentos avaliados

Para a avaliação da eficácia das condições de tratamento avaliadas a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi realizada após cada uma das 10 aplicações de aPDT. A quantificação dos componentes do biofilme bem como da matriz extracelular do biofilme foi realizada após 1, 5 e 10 aplicações de aPDT nas condições de tratamento descritas utilizando os seguintes métodos: análise do peso seco total e insolúvel, quantificação de proteínas solúveis e insolúveis, quantificação de polissacarídeos solúveis em água (WSP), polissacarídeos solúveis em álcali (ASP) e DNA extracelular (eDNA).

Do volume de 2 mL do biofilme; 0,1 mL foi separado para plaqueamento e realização de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e 0,1 mL foi utilizado para realizar o cálculo do peso seco total. O restante do volume (1,8 mL) foi centrifugado a 5500 xg por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Do sobrenadante armazenado foi utilizado 0,15 mL para quantificação de proteínas solúveis, 0,65 mL para quantificação de DNA extracelular (eDNA) e 1 mL para avaliação de polissacarídeos solúveis em água (WSP). O precipitado celular com os componentes insolúveis da MEC foi ressuspensão em 1 mL de água Mili-Q esterilizada, dos quais 0,05 mL foram utilizados com o intuito de realizar a quantificação de proteínas insolúveis e 0,95 mL para a determinação do peso seco insolúvel e de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP). Os procedimentos relativos ao processamento dos biofilmes estão descritos no fluxograma na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma relativo as etapas de processamento do biofilme após 1, 5 e 10 aplicações de aPDT



Fonte: Adaptado de Panariello et al. 2017 (Panariello BHD, Klein MI, Pavarina AC, Duarte S. Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. J Oral Microbiol. 2017 Oct 17;9(1):1385372.).

4.2.5.1 Contagem de unidades formadoras de colônias

A contagem de unidades formadoras de colônias foi realizada após as condições de tratamento descritas e após cada uma das 10 aplicações de aPDT. Para isso alíquotas de 100 µL da suspensão do biofilme de cada orifício da placa foram submetidos a diluições seriadas (0, -1, -2 e -3) em microtubos contendo 900 µL de PBS. Posteriormente, o plaqueamento foi realizado em duplicata em placas de Petri contendo SDA. Todas as placas foram incubadas aerobiamente a 37°C por 48 horas e então a contagem das colônias viáveis foi realizada. Após, foi obtida a média entre

as duplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado. Para o cálculo de UFC/mL, foi utilizada a fórmula a seguir:

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

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

4.2.5.2 *Peso seco total*

Para avaliação do peso seco total, alíquotas de 100 µL do biofilme tratado foram adicionadas em papel alumínio previamente etiquetado e pesado em balança de alta precisão e, em seguida, foram colocadas em um forno a 100°C. Após a secagem, o papel alumínio foi novamente pesado e a diferença entre o peso final e o peso inicial foi considerado como o peso seco total da amostra, esse valor foi utilizado para a normalização dos dados⁴⁶.

4.2.5.3 *Quantificação de proteínas*

O método de Bradford⁴⁸ foi utilizado para a quantificação das proteínas. Uma curva padrão com Albumina Sérica Bovina (BSA) foi padronizada para análise das amostras. O BSA diluído a 200 mg/mL foi utilizado para a construção dos pontos dessa curva, conforme descrito na Tabela 1. Outra substância importante para a construção dessa curva foi o reagente de Bradford, que foi utilizado em um volume de 250 µL.

Tabela 1 - Valores da curva padrão para o teste de quantificação de proteínas pelo método de Bradford

BSA (mg/mL)	Volume de BSA a 2 mg/mL	Volume de água Mili-Q
0	0 μ L	1 mL
0,03125	15,625 μ L	984,37 μ L
0,0625	31,25 μ L	968,75 μ L
0,125	62,5 μ L	937,5 μ L
0,25	125 μ L	875 μ L
0,5	250 μ L	750 μ L
1	500 μ L	500 μ L
1,5	700 μ L	300 μ L

Fonte: elaboração própria.

4.2.5.3.1 Proteínas solúveis da matriz

Uma alíquota de 150 μ L do sobrenadante foi utilizada para quantificação das proteínas solúveis da matriz do biofilme. Então, 5 μ L da amostra foi adicionado em uma placa de 96 poços, em triplicata. A seguir foi adicionado 250 μ L de reagente de Bradford e, por fim, a placa foi incubada em agitação orbital (75 rpm/37°C) por 20 minutos. A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm. Os dados da leitura das amostras dos biofilmes foram convertidos em concentrações de proteínas solúveis através da reta gerada dentro dos parâmetros (inclinação: 0,020-0,026; R^2 próximo a 1).

4.2.5.3.2 Proteínas insolúveis do biofilme

Para determinação das proteínas insolúveis, o volume de 50 μ L foi reservado. Esse valor foi transferido para um microtubo contendo 100 μ L de esferas de vidro e 200 μ L de água Mili-Q esterelizada. Em seguida, as amostras foram submetidas a disrupção mecânica usando beadbeater (3 vezes/30 segundos), aquecidas sob agitação (100 xg/60 minutos/100°C). A seguir as amostras foram centrifugadas (quickspin; 10000 xg/minuto) e o sobrenadante foi transferido para um microtubo esterilizado. Então, 5 μ L da amostra diluída foram utilizados, em triplicata, para a quantificação das proteínas da porção insolúvel dos biofilmes usando o método de Bradford⁴⁸, conforme descrito no item 4.2.5.3.1.

4.2.5.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água

O volume de 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e a alíquota de 2,5 mL de etanol 95% foi adicionada a essa amostra. O conteúdo foi homogeneizado e mantido em freezer -20°C por, no mínimo, 18 horas para precipitação dos polissacarídeos solúveis em água (WSP). Em seguida, as amostras foram vortexadas e centrifugadas (9500 xg/20 minutos/4°C) e os sobrenadantes foram descartados. As amostras foram lavadas três vezes com 3,5 mL de etanol 75% gelado, sempre descartando o sobrenadante. Após todas as lavagens, os *pellets* foram secos ao ar e ressuspensos em 500 µL de água Mili-Q. Em seguida, a amostra foi vortexada para quantificação de carboidratos através do método com fenol e ácido sulfúrico⁸. Uma curva padrão foi construída utilizando glicose 0,1% e água Mili-Q em tubos de ensaio de vidro, conforme descrito na Tabela 2. Em seguida, 200 µL das amostras foram transferidos para tubos de ensaio, em duplicata, seguida de 200 µL de fenol 5% e 1 mL de ácido sulfúrico. Após 20 minutos de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de luz de 490 nm. Os valores de DO_{490 nm} das amostras foram convertidos em concentração de WSP através da equação da reta gerada (slope 0,048-0,051; R² próximo de 1).

Tabela 2 - Valores da curva padrão para o teste de quantificação de WSP pelo método fenol-ácido sulfúrico

Tubo	Volume de Glicose 1%	Volume de água Mili-Q
0 µg	0 µL	200 µL
0,75 µg	0,75 µL	199,25 µL
1,25 µg	1,25 µL	198,75 µL
2,5 µg	2,5 µL	197,5 µL
5 µg	5 µL	195 µL
10 µg	10 µL	190 µL
15 µg	15 µL	185 µL
20 µg	20 µL	180 µL
25 µg	25 µL	175 µL

Fonte: elaboração própria.

4.2.5.5 Peso seco insolúvel

Alíquota de 950 µL da amostra foi transferida para um microtubo previamente pesado e foi colocada imediatamente em gelo. Após a refrigeração, foi centrifugada (13000 xg/10 minutos/4°C). O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o *pellet*

foi seco em um concentrador de amostras por aproximadamente 3 horas. Após o procedimento, os microtubos foram novamente pesados e a diferença entre o peso final e o peso inicial foi considerada como o peso seco insolúvel.

4.2.5.6 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali

Após a etapa descrita no tópico anterior, o valor do peso seco insolúvel foi considerado para adicionar 300 μ L de 1N NaOH para cada 1 mg do peso seco do *pellet*. Após, os microtubos foram incubados por 2 horas em banho seco (300 xg/37°C). Em seguida as amostras foram centrifugadas (13000 xg/10 minutos/4°C) e o sobrenadante foi cuidadosamente colocado em outro microtubo de 2 mL. O *pellet* foi ressuspense no mesmo volume inicial de 1N NaOH, os microtubos foram novamente incubados por 2 horas em banho seco (300 xg/37°C), as amostras foram novamente centrifugadas (13000 xg/10 minutos/4°C) e o sobrenadante foi mais uma vez colocado no microtubo citado anteriormente. No último ciclo, os *pellets* foram ressuspensos novamente no mesmo volume inicial de 1N NaOH e foram apenas centrifugados (13000 xg/10 minutos/4°C), esse último sobrenadante foi adicionado aos sobrenadantes previamente coletados e o *pellet* residual foi descartado.

Após a extração dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), foi adicionado álcool 95% gelado em um volume de três vezes o de 1N NaOH anteriormente adicionado, as amostras foram vortexadas e levadas ao freezer -20°C pelo período de, pelo menos, 18 horas para precipitação do ASP. Após, os microtubos foram removidos do freezer, agitados e centrifugados (9000 xg/20 minutos/4°C). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas três vezes com álcool 75% gelado. Após, os *pellets* secaram ao ar e foram ressuspensos em 1N NaOH no mesmo volume inicial. Em seguida, a amostra foi vortexada para quantificação de carboidratos, através do método com fenol e ácido sulfúrico⁴⁹. Uma curva padrão foi construída utilizando 1N NaOH, glicose 0,1% e água Mili-Q em tubos de ensaio de vidro, conforme descrito na Tabela 3. Em seguida, 40 μ L das amostras foram transferidos para tubos de ensaio, em duplicata, seguida de 160 μ L de água Mili-Q, 200 μ L de fenol 5% e 1 mL de ácido sulfúrico. Após 20 minutos de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de luz de 490 nm. Os valores de DO_{490 nm} das amostras foram convertidos em concentração de ASP através da equação da reta gerada (slope 0,048-0,051; R² próximo de 1).

Tabela 3 - Valores da curva padrão para o teste de quantificação de ASP pelo método fenol-ácido sulfúrico

Tubo	Volume de 1N NaOH	Volume de Glicose 1%	Volume de água Mili-Q
0 µg	40 µL	0 µL	160 µL
0,75 µg	40 µL	0,75 µL	159,25 µL
1,25 µg	40 µL	1,25 µL	158,75 µL
2,5 µg	40 µL	2,5 µL	157,5 µL
5 µg	40 µL	5 µL	155 µL
10 µg	40 µL	10 µL	150 µL
15 µg	40 µL	15 µL	145 µL
20 µg	40 µL	20 µL	140 µL
25 µg	40 µL	25 µL	135 µL

Fonte: elaboração própria.

4.2.5.7 *Análise de DNA extracelular*

A quantificação de DNA extracelular (eDNA) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rice et al.⁴⁹. Para extração do eDNA, uma alíquota de 650 µL do sobrenadante da amostra foi utilizada e misturada com 650 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na concentração de 25:24:1. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas em movimentos curtos e repetidos de vai-e-vem por 30 vezes. A amostra foi centrifugada (13000 xg/20 minutos/4°C) e a parte aquosa foi transferida para um microtubo de 2 mL. Uma segunda extração foi feita, portanto, neste novo microtubo foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico na concentração de 24:1. A seguir, uma nova centrifugação (13000 xg/20 minutos/4°C) foi realizada, e, novamente, a parte aquosa foi removida e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. A fase aquosa de cada amostra foi misturada com 3 volumes de álcool 99% e 1/10 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e armazenada à -20°C por, pelo menos, 18 horas. O eDNA precipitado com etanol foi coletado por centrifugação (13000 xg/20 minutos/4°C), e posteriormente, lavado três vezes com etanol 70% gelado. Em seguida, essa amostra foi seca ao ar, e então, dissolvida em 20 µL de tampão Tris-EDTA (TE). A quantidade de eDNA foi determinada usando nanoespectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm.

4.2.5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os biofilmes foram cultivados sobre discos circulares de poliestireno obtidas do fundo de placas de 24 poços⁵⁰. Previamente a formação dos biofilmes, os discos foram esterilizados em micro-ondas por 3 minutos a 650 W e secos em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta (UV) por 30 minutos cada lado⁵¹. A seguir, foram inseridas em placas de 24 poços, para a formação dos biofilmes de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Após 48 horas, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS esterilizado e submetidos aos tratamentos descritos. Em seguida, os discos foram fixados com glutaraldeído a 2,5% por 60 minutos em temperatura ambiente, lavados duas vezes com PBS e desidratados. O processo de desidratação foi realizado com lavagens com álcool 70% e 90% por 60 minutos cada, seguido de 5 lavagens de 30 minutos com álcool absoluto. As amostras foram armazenadas em dessecador com sílica por, pelo menos, 7 dias para garantir amostras livres de umidade. Em seguida, as amostras foram submetidas à metalização e analisadas em microscópio eletrônico de varredura^{52,53}.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para a análise dos resultados obtidos com a realização deste estudo foram utilizadas as seguintes metodologias estatísticas:

5.1 Análise Estatística de Unidades Formadoras de Colônias

A análise experimental in vitro possui como variável de resposta (dependente) quantitativa contínua: UFC/mL. As variáveis independentes qualitativas nominais são: grupos (P+L+; P+L-; P-L+; P-L-), condições experimentais (condição I; condição II; condição III; condição IV) e aplicações (de 1 a 10). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado e apontou ausência de distribuição normal dos dados. O teste de Levene foi utilizado e os dados demonstraram-se heterocedásticos quanto a sua variância. Diante disso, o teste ANOVA-two way não paramétrico com estimativa de média com intervalo de confiança de 95% foi aplicado. O Software SPSS (IBM® SPSS® Statistics, versão 27, Chicago, IL, EUA) foi utilizado, com nível de significância de 5%.

5.2 Análise Estatística da Caracterização do Biofilme

Após a tabulação dos dados, foi realizada a estatística descritiva. Em seguida, a normalidade e homocedasticidade dos dados para cada um dos componentes da matriz (variáveis dependentes) foram avaliadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Foi realizado o teste de variância ANOVA two-way seguido de pós-teste de Tukey (dados homocedásticos) ou Games-Howell (dados heterocedásticos) para verificação de interação entre os fatores de tratamento (grupos experimentais e condições experimentais; variáveis independentes). O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). As análises foram realizadas com o software SPSS (IBM® SPSS® Statistics, versão 27, Chicago, IL, EUA).

6 RESULTADOS

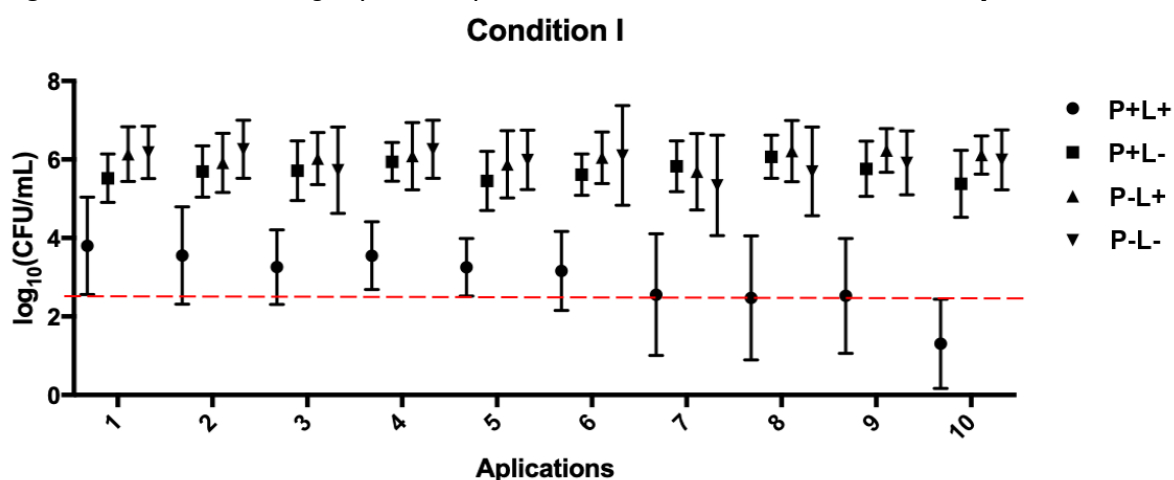
Serão apresentados a seguir os resultados obtidos durante a realização desta pesquisa.

6.1 Unidades Formadoras de Colônias

Os resultados demonstram que na condição I, os grupos controle (P+L-, P-L+ e P-L-) não apresentaram diferença estatística entre as aplicações, sendo estatisticamente semelhantes entre si até a 10ª aplicação. O grupo tratamento (P+L+) apresentou diferença estatística dos grupos controle (P-L+, P-L- e P+L-) durante todas as aplicações.

Quando comparamos as aplicações dentro da variável independente (grupo P+L+), pode-se observar que houve redução de 3,2 $\log_{10}$ na viabilidade celular após a 1ª aplicação de aPDT, 3,8 $\log_{10}$ após a 5ª aplicação e 5,7 $\log_{10}$ após a 10ª. A redução observada entre a 5ª e 10ª aplicação é de 2,1 $\log_{10}$. Apesar de haver uma redução relevante na viabilidade celular na 10ª aplicação (P+L+), a mesma demonstrou ser estatisticamente semelhante as aplicações 6, 7, 8 e 9 (Figura 2).

Figura 2 - Valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* da condição I



Biofilmes submetidos à aPDT (grupo P+L+), biofilmes tratados somente com PDZ (grupo P+L-), biofilmes submetidos apenas ao LED vermelho (grupo P-L+) e biofilmes sem tratamentos (grupo P-L-).

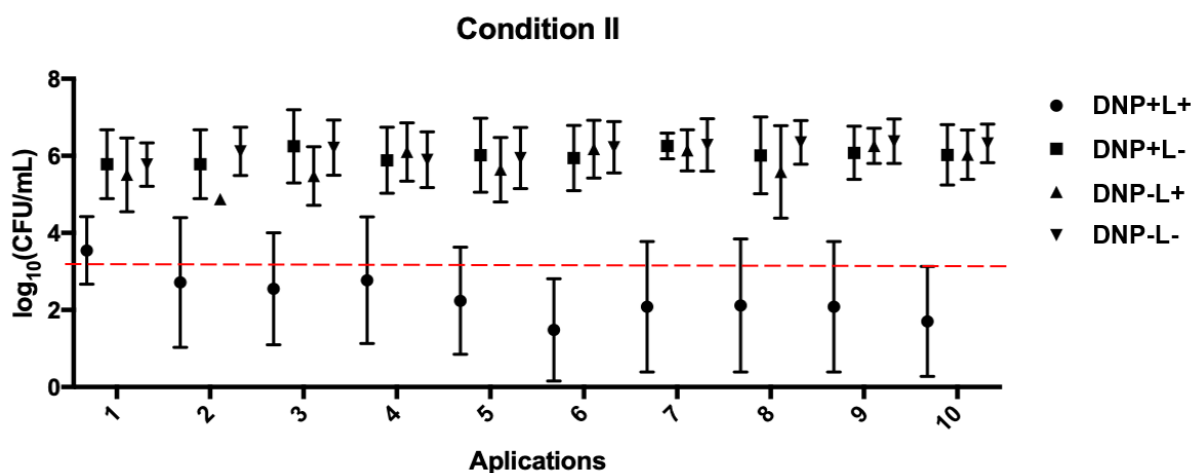
Gráfico representativo de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%. Valores mínimo e máximo da barra de erro de $\log_{10}$ (UFC/mL) representam os limites inferior e superior do intervalo de confiança. A não interseção das barras de erro denotam diferença estatística $p < 0,05$.

Fonte: elaboração própria.

Os resultados obtidos pela análise demonstram que, semelhante à condição I, os grupos controle (DNP+L-, DNP-L+ e DNP-L-) da condição II, apresentaram semelhança estatística entre as aplicações.

Ao analisar as aplicações dentro da variável independente (grupo DNP+L+) foi observado redução de 3,5 $\log_{10}$ na viabilidade celular após a 1ª aplicação de aPDT, 4,5 $\log_{10}$ após a 6ª aplicação e 5,5 $\log_{10}$ após a 10ª. Adicionalmente, a redução observada entre a 6ª e 10ª aplicações é de 1 $\log_{10}$. Apesar de haver uma redução de viabilidade celular mais acentuada após a 10ª aplicação do grupo DNP+L+, a mesma demonstrou ser estatisticamente semelhante as aplicações 7, 8 e 9 (Figura 3).

Figura 3 - Valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* da condição II



Biofilmes submetidos à DNase+aPDT (grupo DNP+L+), biofilmes tratados com DNase+PDZ (grupo DNP+L-), biofilmes submetidos à DNase+LED vermelho (grupo DNP-L+) e biofilmes tratados somente com DNase (grupo DNP-L-).

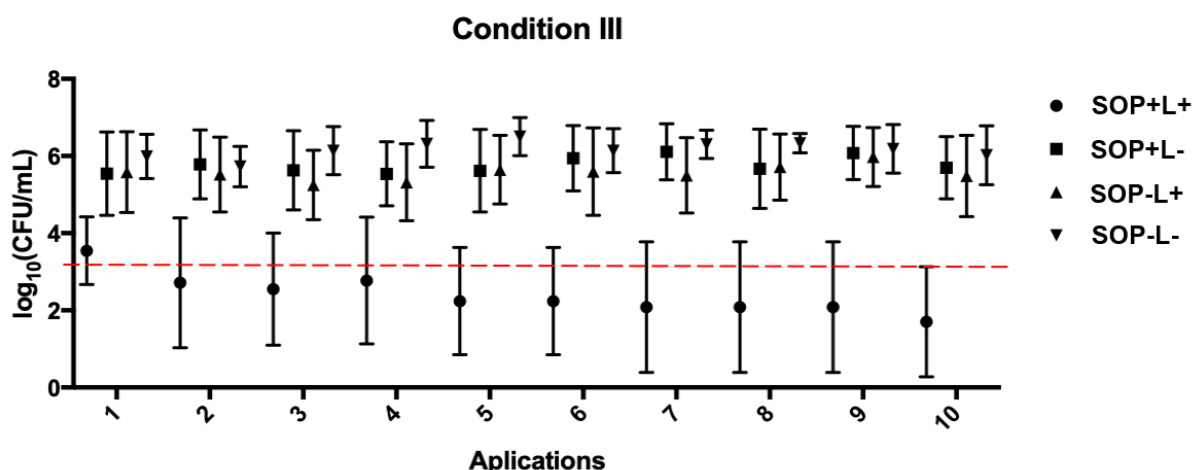
Gráfico representativo de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%. Valores mínimo e máximo da barra de erro de $\log_{10}$ (UFC/mL) representam os limites inferior e superior do intervalo de confiança. A não interseção das barras de erro denotam diferença estatística $p < 0,05$.

Fonte: elaboração própria.

Os resultados obtidos referentes à condição III demonstram que os grupos controle (SOP+L-, SOP-L+ e SOP-L-) não apresentaram diferença estatística entre as aplicações, sendo estatisticamente semelhantes entre si até a 10ª aplicação. O grupo SOP-L+ apresenta semelhança estatística apenas na 4ª aplicação quando comparado ao grupo SOP+L+. Ao comparar os grupos SOP+L+ e SOP-L- foi observada diferença estatística em todas as aplicações.

Foi observada dentro da variável independente (grupo SOP+L+) uma redução de 3,5 $\log_{10}$ na viabilidade celular após a 1ª aplicação de aPDT e 5,3 $\log_{10}$ após a 10ª aplicação. A redução observada entre a 1ª e 10ª aplicação no grupo SOP+L+ é de 1,8 $\log_{10}$. No entanto, apesar de haver diminuição na viabilidade celular após a 10ª aplicação, dentro do grupo SOP+L+, a mesma demonstrou ser estatisticamente semelhante as demais aplicações avaliadas (Figura 4).

Figura 4 - Valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* da condição III



Biofilmes submetidos à sonicação+aPDT (grupo SOP+L+), biofilmes tratados com sonicação+PDZ (grupo SOP+L-), biofilmes submetidos à sonicação+LED vermelho (grupo SOP-L+) e biofilmes tratados somente com sonicação (grupo SOP-L-).

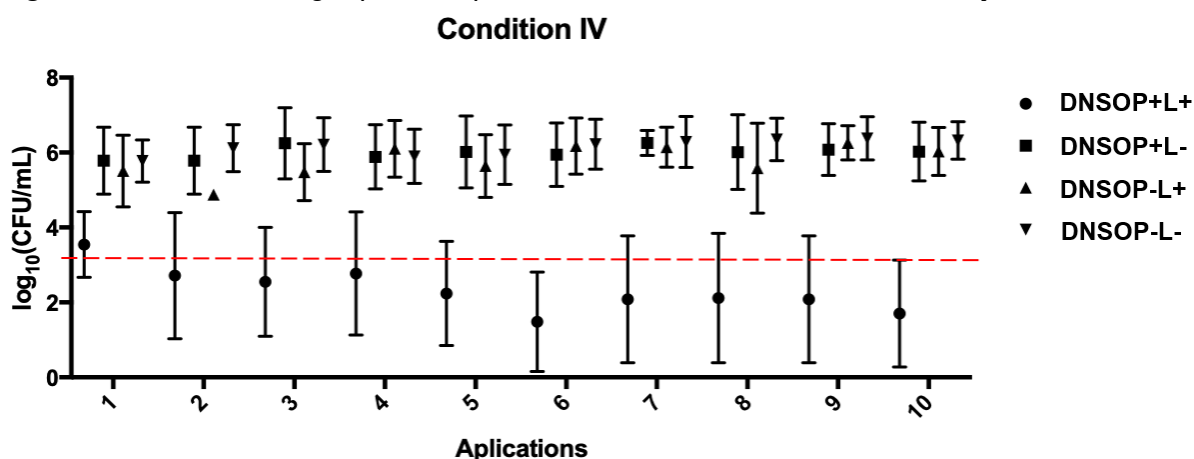
Gráfico representativo de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%. Valores mínimo e máximo da barra de erro de $\log_{10}$ (UFC/mL) representam os limites inferior e superior do intervalo de confiança. A não interseção das barras de erro denotam diferença estatística $p < 0,05$.

Fonte: elaboração própria.

Os resultados demonstraram que na condição IV, os grupos controle (DNSOP+L-, DNSOP-L+ e DNSOP-L-) não apresentaram diferença estatística entre as aplicações. No entanto, os grupos DNSOP+L-, DNSOP-L+ e DNSOP-L- apresentaram diferença estatística em todas as aplicações quando comparados ao grupo DNSOP+L+.

Ao analisar as aplicações dentro da variável independente (grupo DNSOP+L+) foi observada uma redução de 3,5 $\log_{10}$ na viabilidade celular após a 1ª aplicação de aPDT e 5,3 $\log_{10}$ após 10ª aplicação. Adicionalmente, a redução observada entre a 1ª e a 10ª aplicação é de 1,8 $\log_{10}$. Apesar de haver redução na viabilidade celular após a 10ª aplicação (DNSOP+L+), a mesma demonstrou ser estatisticamente semelhante as todas as demais aplicações avaliadas (1 a 9) (Figura 5).

Figura 5 - Valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* da condição IV



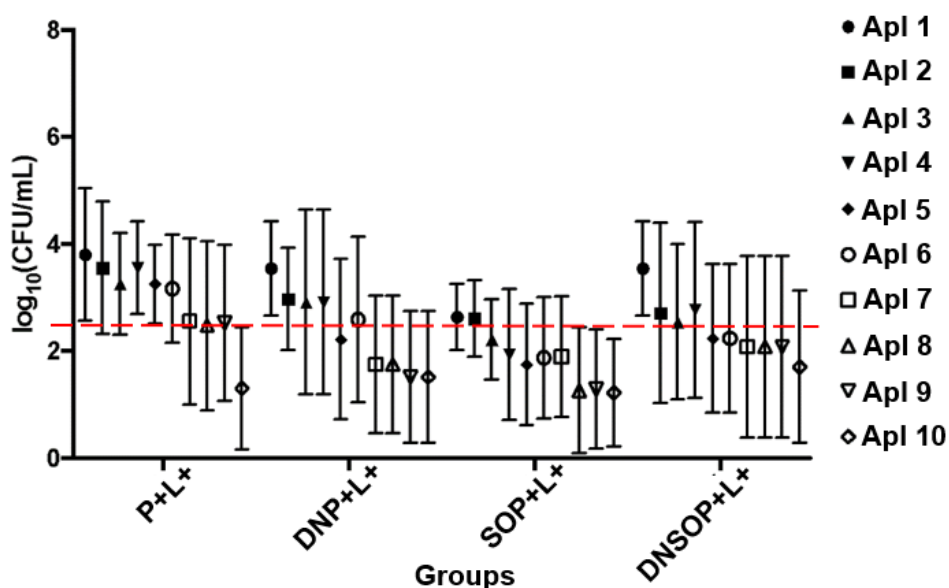
Biofilmes submetidos à DNase+sonicação+aPDT (grupo DNSOP+L+), biofilmes tratados com DNase+sonicação+PDZ (grupo DNSOP+L-), biofilmes submetidos à DNase+sonicação+LED vermelho (grupo DNSOP-L+) e biofilmes tratados somente com DNase+sonicação (grupo DNSOP-L-).

Gráfico representativo de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%. Valores mínimo e máximo da barra de erro de $\log_{10}$ (UFC/mL) representam os limites inferior e superior do intervalo de confiança. A não interseção das barras de erro denotam diferença estatística $p < 0,05$.

Fonte: elaboração própria.

Na Figura 6 estão apresentados os resultados obtidos de todas as condições avaliadas nos grupos submetidos somente à terapia fotodinâmica isoladamente (P+L+) ou após a aplicação das estratégias de tratamento avaliadas (DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+). Os resultados demonstraram que em todas as condições avaliadas nos grupos submetidos à terapia fotodinâmica (P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+) todos os grupos são estatisticamente semelhantes entre si; exceto pelas aplicações 1 e 10 (grupo P+L+), 10 (grupo P+L+) e 1 (grupo DNP+L+), 10 (grupo P+L+) e 1 (grupo DNSOP+L+), e 8, 9 e 10 (grupo SOP+L+) e 1 (grupo DNSOP+L+) (Figura 6). A redução entre a primeira aplicação e a última aplicação dos grupos P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+, foi de 2,5 $\log_{10}$, 2 $\log_{10}$, 1,8 $\log_{10}$ e 1,8 $\log_{10}$, respectivamente.

Figura 6 - Valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* nas condições de tratamento avaliadas



Biofilmes submetidos somente à aPDT (P+L+), biofilmes tratados com DNase+aPDT (DNP+L+), biofilmes submetidos à sonicação+aPDT (SOP+L+) e biofilmes tratados com DNase+sonicação+aPDT (DNSOP+L+)

Gráfico representativo de média $\pm$ intervalo de confiança de 95%. Valores mínimo e máximo da barra de erro de $\log_{10}$ (UFC/mL) representam os limites inferior e superior do intervalo de confiança. Apl: Aplicação. A não interseção das barras de erro denota diferença estatística $p < 0,05$.

Fonte: elaboração própria.

6.2 Caracterização do Biofilme

Serão apresentados a seguir os resultados obtidos para caracterização do biofilme durante a realização desta pesquisa.

6.2.1 Resultados da caracterização do biofilme após a primeira aplicação de aPDT

Os resultados da avaliação dos componentes do biofilme após a primeira aplicação de aPDT estão apresentados na Tabela 5.

6.2.1.1 *Peso seco total (mg)*

Não houve interação estatisticamente significativa entre os dois fatores de tratamento (grupos e condições) ($p=0,666$). Ao observarmos os fatores de tratamento isoladamente, foi observado que ambos apresentaram interação estatisticamente significativa ($p<0,001$) em relação à variável dependente (peso seco total).

As condições de tratamento avaliadas não influenciaram os valores de peso seco total no grupo submetido apenas à aPDT (P+L+; $p\geq 0,463$). Entretanto a luz, quando associada a DNase (DNP-L+) ou DNase+sonicação (DNSOP-L+), promoveu aumento significativo ($p\leq 0,006$) nos valores do peso seco total.

Ao compararmos os grupos podemos observar que o grupo submetido à aPDT (P+L+) apresentou valores de peso seco total estatisticamente semelhante ($p\geq 0,463$) aos demais grupos avaliados (P+L-, P-L+ e P-L-). A aplicação da enzima DNase previamente à aPDT promoveu redução significativa nos valores de peso seco total no grupo DNP+L+ que foi estatisticamente diferente dos grupos DNP-L+ ($p=0,034$) e DNP-L- ($p=0,041$). Após ser submetido à sonicação previamente a aPDT, os valores de peso seco total do grupo SOP+L+ foram reduzidos significativamente em comparação com o grupo SOP-L-. Quando os biofilmes foram submetidos à DNase+sonicação+aPDT, também foi observada redução significativa ($p=0,003$) nos valores de peso seco total no grupo DNSOP+L+ em relação ao grupo controle (DNSOP-L-).

6.2.1.2 *Peso seco insolúvel (mg)*

Os valores de peso seco insolúvel foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas, tendo sido observada a interação ($p < 0,001$) entre os grupos e as condições experimentais. Os grupos submetidos à aPDT precedida pelo tratamento com DNase+sonicação (DNSOP+L+) apresentou os maiores valores de peso seco insolúvel em comparação com o biofilme submetido à aPDT (P+L+), sendo estatisticamente diferentes ($p = 0,005$) entre si. Por outro lado, os valores de peso seco insolúvel observados para o biofilme submetido a aPDT (P+L+) foram estatisticamente semelhantes ($p = 1,000$) ao biofilme submetido à DNase+aPDT (DNP+L+) e ao biofilme submetido à sonicação+aPDT (SOP+L+).

O biofilme submetido somente à aPDT (P+L+) apresentou valores de peso seco insolúvel estatisticamente semelhantes ($p = 1,000$) aos grupos P-L+ e P-L- e diferentes ($p = 0,014$) do grupo P+L-. Esse mesmo padrão de comportamento foi observado no peso seco insolúvel do biofilme submetido à sonicação+aPDT (SOP+L+; $p \geq 0,335$; $p < 0,001$). Por outro lado, podemos observar que a aplicação da DNase+aPDT (DNP+L+) não alterou estatisticamente ($p \geq 0,276$) os valores de peso seco insolúvel entre os grupos avaliados. Entretanto, os valores de peso seco insolúvel no grupo submetido à aplicação da DNase+sonicação+aPDT (DNSOP+L+) foram significativamente maiores ($p = 0,009$) quando comparado aos demais grupos avaliados (DNSOP+L-, DNSOP-L+ e DNSOP-L-).

6.2.1.3 *Proteínas solúveis da matriz (μ g)*

Os valores de proteínas solúveis da matriz do biofilme não foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas de forma que não foi observada a interação entre os fatores de tratamento ($p = 0,993$), nem quando avaliados de forma isolada ($p \geq 0,990$). Também não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,077$) entre os grupos analisados.

6.2.1.4 *Proteínas insolúveis do biofilme (μ g)*

Os valores de proteínas insolúveis do biofilme foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas, havendo interação estatisticamente significativa

($p < 0,001$) com os grupos avaliados. Os valores de proteínas insolúveis do biofilme obtidos após a aplicação da DNase+sonicação+aPDT (DNSOP+L+) foram significativamente diferentes da condição somente aPDT (P+L+; $p = 0,028$) e sonicação+aPDT (SOP+L+; $p = 0,047$). Entretanto, os valores obtidos na condição aPDT (P+L+) foram estatisticamente semelhantes a aplicação da DNase+aPDT (DNP+L+; $p = 0,756$). Também foi observada redução significativa nos valores de proteínas insolúveis do biofilme nas condições DNase+aPDT (DNP+L+; $p = 0,014$) e sonicação+aPDT (SOP+L+; $p < 0,001$) em comparação com o grupo sem tratamento (P-L-).

Na comparação entre grupos, na mesma condição, podemos observar que o grupo submetido somente à aPDT (P+L+) apresentou semelhança estatística ($p = 1,000$) com o grupo P+L- e redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de proteínas insolúveis do biofilme quando comparado ao grupo P-L-. Podemos observar que a aplicação da DNase+sonicação+aPDT (DNSOP+L+) promoveu redução significativa ($p \leq 0,001$) nos valores de proteínas insolúveis do biofilme quando comparado aos demais grupos avaliados (DNSOP+L-, DNSOP-L+ e DNSOP-L-).

6.2.1.5 WSP (μg)

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p < 0,001$).

De maneira geral os valores de WSP foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas. Os biofilmes submetidos ao tratamento com DNase+aPDT (DNP+L+), sonicação+aPDT (SOP+L+) e DNase+sonicação+aPDT (DNSOP+L+) foram estatisticamente semelhantes entre si ($p = 1,000$) e apresentaram redução significativa ($p \leq 0,001$) nos valores de WSP em relação ao biofilme submetido apenas à aPDT (P+L+). Comportamento semelhante foi observado nos grupos submetidos ao tratamento com luz após a DNase (DNP-L+), sonicação (SOP-L+) e DNase+sonicação (DNSOP-L+; $p < 0,001$; $p \geq 0,184$). Além disso, houve redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de WSP nos grupos tratados com FS após DNase (DNP+L-) e DNase+sonicação (DNSOP+L-). A aplicação de DNase, sonicação e DNase+sonicação também promoveram redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de WSP nos grupos DNP-L-, SOP-L- e DNSOP-L-.

Na comparação entre grupos, na mesma condição, podemos observar que o grupo submetido à aPDT (P+L+) apresentou redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de WSP quando comparado ao grupo P-L- e aos demais grupos avaliados (P+L- e P-L+; $p \leq 0,014$). Os valores de WSP no grupo submetido à sonicação+aPDT (SOP+L+) foram estatisticamente menores comparados ao grupo SOP-L-. Os valores de WSP nos grupos submetido à DNase e DNase+sonicação foram estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,238$) entre si em todos os grupos avaliados.

6.2.1.6 ASP (μg)

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p < 0,001$).

Os resultados demonstraram que os valores de ASP não foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas, foi observada a redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis de ASP em todas as condições avaliadas comparadas com o grupo P-L-. Os valores de ASP obtidos para grupos submetidos à aPDT, à aplicação isolada do FS e ao tratamento apenas com luz precedidos pelos tratamentos com DNase, sonicação e DNase+sonicação apresentaram valores de ASP estatisticamente semelhantes ($p = 1,000$) entre si.

6.2.1.7 eDNA (ng)

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p < 0,001$).

De maneira geral os valores de eDNA foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas. Os tratamentos com DNase+aPDT (DNP+L+) e DNase+sonicação+aPDT (DNSOP+L+) promoveram redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de eDNA sendo estatisticamente semelhantes entre si e diferentes dos grupos P+L+ e SOP+L+. Os valores de eDNA também foram significativamente ($p \leq 0,038$) reduzidos nos grupos DNP+L-, SOP+L-, DNSOP+L- e DNP-L-, SOP-L-, DNSOP-L-, quando comparados com os grupos P+L- e P-L-, respectivamente.

Na avaliação dos grupos de tratamento foi possível observar que os menores valores de eDNA foram obtidos após o tratamento com DNase+aPDT (DNP+L+) e DNase+sonicação+aPDT (DNSOP+L+). Esses valores foram significativamente

($p < 0,001$) diferentes dos grupos controles (P+L-, P-L+ e P-L-). No biofilme submetido à aPDT foi observado redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de eDNA nos grupos P+L+ e P-L+ em relação aos grupos P+L- e P-L-. Para os biofilmes submetidos à DNase+aPDT e sonicação+aPDT, os valores de eDNA dos grupos DNP+L+ e SOP+L+ foram significativamente ($p \leq 0,001$) menores que os demais grupos avaliados.

Tabela 5 - Médias e desvios-padrão dos componentes do biofilme avaliados após uma aplicação de aPDT

Componentes	Condição	Grupos			
		P+L+	P+L-	P-L+	P-L-
Peso seco total (mg)	aPDT	21,733 ± 4,083 ^{Aa}	22,433 ± 4,321 ^{Aa}	26,566 ± 5,554 ^{Aa}	29,833 ± 3,943 ^{Aa}
	DN+aPDT	24,133 ± 2,115 ^{Aa}	29,833 ± 9,195 ^{ABa}	33,466 ± 5,386 ^{Bab}	33,233 ± 7,130 ^{Ba}
	SO+aPDT	20,000 ± 2,909 ^{Aa}	24,066 ± 8,139 ^{Aa}	28,600 ± 2,647 ^{ABa}	33,166 ± 6,224 ^{Ba}
	DN+SO+aPDT	25,866 ± 5,736 ^{Aa}	29,833 ± 3,693 ^{ACa}	39,800 ± 7,536 ^{Bb}	37,900 ± 6,404 ^{BCa}
Peso seco insolúvel (mg)	aPDT	1,250 ± 0,978 ^{Aab}	2,591 ± 0,222 ^{Ba}	1,571 ± 0,630 ^{ABa}	1,382 ± 0,217 ^{Aa}
	DN+aPDT	1,983 ± 1,019 ^{Abc}	1,245 ± 0,954 ^{Ab}	1,177 ± 0,771 ^{Aa}	1,181 ± 0,352 ^{Aa}
	SO+aPDT	0,900 ± 0,702 ^{Aa}	2,891 ± 0,349 ^{Ba}	1,668 ± 0,829 ^{Aa}	1,038 ± 0,290 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	2,717 ± 1,020 ^{Ac}	1,245 ± 0,614 ^{Bb}	1,091 ± 0,577 ^{Ba}	1,421 ± 0,5117 ^{Ba}
Proteínas solúveis da matriz (µg)	aPDT	0,030 ± 0,007 ^{Aa}	0,027 ± 0,005 ^{Aa}	0,042 ± 0,004 ^{Aa}	0,045 ± 0,006 ^{Aa}
	DN+aPDT	0,024 ± 0,023 ^{Aa}	0,033 ± 0,019 ^{Aa}	0,043 ± 0,019 ^{Aa}	0,044 ± 0,006 ^{Aa}
	SO+aPDT	0,020 ± 0,003 ^{Aa}	0,028 ± 0,025 ^{Aa}	0,046 ± 0,026 ^{Aa}	0,040 ± 0,034 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	0,022 ± 0,021 ^{Aa}	0,033 ± 0,021 ^{Aa}	0,045 ± 0,006 ^{Aa}	0,051 ± 0,036 ^{Aa}
Proteínas insolúveis do biofilme (µg)	aPDT	0,020 ± 0,003 ^{Aab}	0,021 ± 0,004 ^{Aa}	0,032 ± 0,008 ^{Ba}	0,043 ± 0,005 ^{Ca}
	DN+aPDT	0,026 ± 0,004 ^{Abc}	0,028 ± 0,001 ^{Aab}	0,028 ± 0,006 ^{Aab}	0,031 ± 0,006 ^{Ab}
	SO+aPDT	0,027 ± 0,004 ^{Aa}	0,021 ± 0,004 ^{Aa}	0,022 ± 0,006 ^{Ab}	0,023 ± 0,008 ^{Ab}
	DN+SO+aPDT	0,026 ± 0,005 ^{Ac}	0,036 ± 0,009 ^{BCb}	0,030 ± 0,011 ^{Bab}	0,042 ± 0,008 ^{Ca}
WSP (µg)	aPDT	0,030 ± 0,005 ^{Aa}	0,039 ± 0,002 ^{Ba}	0,043 ± 0,012 ^{Ba}	0,077 ± 0,005 ^{Ca}
	DN+aPDT	0,015 ± 0,003 ^{Ab}	0,021 ± 0,002 ^{Ab}	0,019 ± 0,004 ^{Ab}	0,021 ± 0,002 ^{Ac}
	SO+aPDT	0,018 ± 0,004 ^{ACb}	0,031 ± 0,006 ^{Ba}	0,025 ± 0,005 ^{ABb}	0,060 ± 0,006 ^{Cb}
	DN+SO+aPDT	0,015 ± 0,003 ^{Ab}	0,022 ± 0,002 ^{Ab}	0,021 ± 0,003 ^{Ab}	0,019 ± 0,002 ^{Ac}
ASP (µg)	aPDT	0,059 ± 0,005 ^{Aa}	0,059 ± 0,005 ^{Aa}	0,058 ± 0,004 ^{Aa}	0,079 ± 0,006 ^{Ba}
	DN+aPDT	0,056 ± 0,008 ^{Aa}	0,061 ± 0,002 ^{Aa}	0,060 ± 0,007 ^{Aa}	0,061 ± 0,007 ^{Ab}
	SO+aPDT	0,056 ± 0,003 ^{Aa}	0,069 ± 0,006 ^{Aa}	0,059 ± 0,008 ^{Aa}	0,061 ± 0,009 ^{Ab}
	DN+SO+aPDT	0,058 ± 0,005 ^{Aa}	0,063 ± 0,004 ^{Aa}	0,057 ± 0,004 ^{Aa}	0,061 ± 0,003 ^{Ab}
eDNA (ng)	aPDT	21,670 ± 2,098 ^{Aa}	58,088 ± 1,930 ^{Ba}	26,862 ± 4,370 ^{Aa}	60,521 ± 1,526 ^{Ba}
	DN+aPDT	9,250 ± 2,107 ^{Ab}	50,105 ± 3,776 ^{Bb}	28,258 ± 2,637 ^{Ca}	51,420 ± 4,064 ^{Bb}
	SO+aPDT	20,083 ± 2,810 ^{Aa}	51,680 ± 4,889 ^{Bb}	28,257 ± 4,800 ^{Ca}	54,772 ± 4,727 ^{Bb}
	DN+SO+aPDT	12,735 ± 1,698 ^{Ab}	49,987 ± 4,854 ^{Bb}	25,208 ± 2,440 ^{Ca}	45,763 ± 3,760 ^{Bc}

Letras maiúsculas correspondem a comparação entre os grupos (linhas), letras minúsculas correspondem a comparação entre as condições (colunas). Letras desiguais indicam diferença estatística significativa, apontada no pós-teste de Tukey ou Games-Howell ($\alpha=0,05$).

Fonte: elaboração própria.

6.2.2 Resultados da caracterização do biofilme após a quinta aplicação de aPDT

Os resultados da avaliação dos componentes do biofilme após a quinta aplicação de aPDT estão apresentados na Tabela 6.

6.2.2.1 *Peso seco total (mg)*

Não foi observada interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p=0,325$). As condições de tratamento avaliadas não influenciaram os valores de peso seco total nos grupos avaliados ($p=0,851$).

Ao compararmos os grupos, não observamos interação estatisticamente significativa. O peso seco total também não foi influenciado pelas condições de tratamento avaliadas ($p\geq 0,066$).

6.2.2.2 *Peso seco insolúvel (mg)*

Os valores de peso seco insolúvel do biofilme não foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas em cinco aplicações, de forma que não foi observada a interação entre os fatores de tratamento ($p=0,978$), nem quando avaliados de forma isoladamente ($p\geq 0,884$). Também não foram observadas diferenças significativas ($p\geq 0,103$) entre os grupos analisados.

6.2.2.3 *Proteínas solúveis da matriz (μg)*

Não foi observada interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p=0,325$). Quando avaliados isoladamente, os fatores de tratamento apresentaram interação estatisticamente significativa ($p<0,001$).

Os valores de proteínas solúveis da matriz foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas, o grupo DNSOP-L- apresentou os maiores valores, entretanto, foi estatisticamente semelhante aos grupos P-L- ($p=1,000$) e SOP-L- ($p=0,117$). O grupo DNP-L- apresentou os menores valores e foi estatisticamente semelhante aos grupos P-L- ($p=1,000$) e SOP-L- ($p=0,117$). O grupo DNSOP-L+

apresentou os maiores valores de proteínas solúveis da matriz e foi estatisticamente diferente do grupo SOP-L+ ($p=0,047$).

Ao compararmos os grupos podemos observar que o biofilme submetido somente à aPDT (P+L+) apresentou os menores valores de proteínas solúveis da matriz, entretanto esses valores foram estatisticamente semelhantes ($p=1,000$) ao grupo P+L- e diferentes dos demais grupos. O grupo em que foi realizado a sonicação previamente a aPDT (SOP+L+) apresentou os menores valores de proteínas solúveis da matriz comparadas ao grupo SOP-L- ($p<0,001$) e aos demais grupos (SOP+L- e SOP-L+; $p\leq 0,007$) que apresentaram valores estatisticamente semelhantes ($p=0,841$) entre si. Padrão de comportamento semelhante foi observado no biofilme tratado com DNase previamente à aPDT (DNP+L+). Neste caso, o grupo DNP+L+ foi apresentou os menores valores que foram estatisticamente diferentes ($p\leq 0,001$) dos demais grupos avaliados. A aplicação da DNase+sonicação previamente à aPDT (DNSOP+L+) promoveu redução significativa ($p<0,001$) nos valores de proteínas solúveis de matriz quando comparado ao controle (P-L-).

6.2.2.4 Proteínas insolúveis do biofilme (μg)

Não foi observada interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p=0,640$). Quando avaliados isoladamente, o fator grupo não apresentou interação significativa ($p=0,062$), entretanto o fator condição apresentou interação estatisticamente significativa ($p=0,002$).

Os valores de proteínas insolúveis do biofilme foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas nos grupos submetidos à aPDT. Os valores de proteínas insolúveis do biofilme do grupo P+L+ foram menores, entretanto foram estatisticamente semelhantes ($p\geq 0,170$) aos demais grupos. Além disso, foi observado que os grupos DNP+L+ e DNSOP+L+ foram estatisticamente semelhantes ($p=0,333$) entre si.

Na comparação entre grupos, nas mesmas condições, não foram observadas diferenças estatísticas ($p\geq 0,091$) entre os grupos avaliados.

6.2.2.5 WSP (μg)

Não foi observada interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p=0,085$). Quando avaliados isoladamente, os fatores de tratamento apresentaram interação estatisticamente significativa ($p\leq 0,003$).

De maneira geral os valores de WSP foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas quando foi realizado o tratamento fotodinâmico. Os grupos DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+ apresentaram os menores valores de WSP em relação ao grupo P+L+ e foram estatisticamente semelhantes ($p\leq 0,021$) entre si.

Na comparação entre grupos, na condição aPDT, podemos observar que para o grupo P+L+ não foi observada alteração significativa ($p=1,000$) nos valores de WSP quando comparado ao grupo P-L-. Os valores de WSP no grupo SOP+L+ foram estatisticamente menores ($p\leq 0,036$) quando comparados ao grupo SOP-L-, entretanto os valores foram estatisticamente semelhantes ($p=0,052$) ao grupo SOP-L+. Os valores de WSP no grupo DNP+L+ foram estatisticamente semelhantes aos valores dos grupos DNP-L+ e DNP-L- ($p\geq 0,105$). Os valores de WSP obtidos para o grupo DNSOP+L+ foram estatisticamente diferentes ($p=0,031$) dos observados para o grupo DNSOP-L-, entretanto, foram semelhantes aos valores do grupo DNSOP-L+ ($p=1,000$).

6.2.2.6 ASP (μg)

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p<0,001$).

Os valores de ASP obtidos para grupo submetido à aPDT (P+L+) não foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas ($p\geq 0,066$). Por outro lado, as condições de tratamento influenciaram os valores dos grupos controles (P+L-, P-L+ e P-L-). Nos grupos DNP-L- e SOP-L- houve redução dos valores de ASP e foram significativamente diferentes ($p\leq 0,008$) do biofilme do grupo P-L-.

Na comparação entre grupos, na mesma condição, podemos observar que o biofilme submetido à aPDT (P+L+) apresentou os menores valores de ASP e foi estatisticamente diferente dos grupos P+L-, P-L+ e P-L- ($p\leq 0,046$). No grupo SOP+L+ houve redução significativa ($p=0,002$) dos valores de ASP em comparação com o grupo SOP-L-, entretanto os valores foram estatisticamente semelhantes ($p=0,111$).

aos obtidos para o grupo SOP-L+. Comportamento semelhante também foi observado na condição DNase+sonicação+aPDT, isto é, redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de ASP do grupo DNSOP+L+ em comparação com o grupo DNSOP-L- e os grupos DNSOP+L+ e DNSOP-L+ estatisticamente semelhantes ($p = 0,677$) entre si.

6.2.2.7 eDNA (ng)

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p < 0,001$).

Os valores de eDNA não foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas nos grupos P+L+ e P-L+. As condições DNase+aPDT (DNP-L-) e DNase+sonicação+aPDT (DNSOP-L-) reduziram significativamente ($p \leq 0,005$) os valores de eDNA em relação aos grupos P-L- e SOP-L-. Os grupos P+L- e SOP+L- foram estatisticamente semelhantes entre si ($p = 1,000$) e diferentes dos grupos DNP+L- e DNSOP+L- ($p \leq 0,045$).

Na avaliação dos grupos de tratamento, na condição aPDT, foi possível observar que os menores valores de eDNA foram obtidos para o grupo P+L+. Esses valores foram significativamente diferentes do grupo P-L- ($p \leq 0,001$) e dos demais grupos avaliados (P+L- e P-L+; $p \leq 0,001$). O grupo P-L+ também apresentou valores reduzidos e significativamente diferente dos demais grupos ($p \leq 0,001$).

De maneira geral os níveis de eDNA em todos os grupos avaliados apresentaram comportamento semelhante nas condições DNase+aPDT, sonicação+aPDT e DNase+sonicação+aPDT, ou seja, os valores de eDNA dos grupos submetidos à terapia fotodinâmica foram estatisticamente reduzidos ($p \leq 0,002$) em relação aos grupos tratados apenas com FS (DNP+L-, SOP+L- e DNSOP+L-) e aos grupos sem tratamento (DNP-L-, SOP-L- e DNSOP-L-) e semelhantes ($p \geq 0,056$) aos dos grupos tratados apenas com luz (DNP-L+, SOP-L+ e DNSOP-L+).

Tabela 6 - Médias e desvios-padrão dos componentes do biofilme avaliados após cinco aplicações de aPDT

Componentes	Condição	Grupos			
		P+L+	P+L-	P-L+	P-L-
Peso seco total (mg)	aPDT	21,100 ± 8,931 ^{Aa}	20,833 ± 9,026 ^{Aa}	31,866 ± 4,591 ^{Aa}	32,933 ± 3,024 ^{Aa}
	DN+aPDT	25,733 ± 7,302 ^{Aa}	30,133 ± 9,607 ^{Aa}	26,066 ± 3,645 ^{Aa}	34,966 ± 5,931 ^{Aa}
	SO+aPDT	28,133 ± 5,979 ^{Aa}	28,900 ± 14,887 ^{Aa}	30,400 ± 15,703 ^{Aa}	28,866 ± 4,593 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	26,733 ± 5,866 ^{Aa}	27,566 ± 5,074 ^{Aa}	33,766 ± 12,515 ^{Aa}	37,500 ± 6,572 ^{Aa}
Peso seco insolúvel (mg)	aPDT	1,312 ± 0,495 ^{Aa}	1,683 ± 1,002 ^{Aa}	1,563 ± 0,940 ^{Aa}	1,784 ± 1,182 ^{Aa}
	DN+aPDT	1,147 ± 0,470 ^{Aa}	1,200 ± 0,910 ^{Aa}	1,428 ± 0,180 ^{Aa}	2,081 ± 1,841 ^{Aa}
	SO+aPDT	1,312 ± 0,761 ^{Aa}	1,668 ± 1,493 ^{Aa}	1,177 ± 0,197 ^{Aa}	2,055 ± 1,358 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	1,080 ± 0,333 ^{Aa}	1,612 ± 0,503 ^{Aa}	1,526 ± 0,996 ^{Aa}	2,550 ± 1,855 ^{Aa}
Proteínas solúveis da matriz (µg)	aPDT	0,028 ± 0,005 ^{Aa}	0,030 ± 0,003 ^{Aa}	0,044 ± 0,006 ^{Bab}	0,046 ± 0,007 ^{Bab}
	DN+aPDT	0,020 ± 0,004 ^{Aa}	0,033 ± 0,004 ^{Ba}	0,037 ± 0,005 ^{Bab}	0,039 ± 0,007 ^{Ba}
	SO+aPDT	0,021 ± 0,004 ^{Aa}	0,032 ± 0,004 ^{Ba}	0,036 ± 0,003 ^{BCa}	0,042 ± 0,009 ^{Cab}
	DN+SO+aPDT	0,029 ± 0,005 ^{Aa}	0,031 ± 0,005 ^{Aa}	0,046 ± 0,005 ^{Bb}	0,049 ± 0,006 ^{Bb}
Proteínas insolúveis do biofilme (µg)	aPDT	0,019 ± 0,008 ^{Ab}	0,029 ± 0,007 ^{Aa}	0,029 ± 0,005 ^{Aa}	0,030 ± 0,007 ^{Aa}
	DN+aPDT	0,020 ± 0,005 ^{Ab}	0,021 ± 0,003 ^{Aa}	0,022 ± 0,005 ^{Aa}	0,024 ± 0,004 ^{Aa}
	SO+aPDT	0,028 ± 0,006 ^{Aa}	0,032 ± 0,006 ^{Aa}	0,026 ± 0,004 ^{Aa}	0,033 ± 0,008 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	0,024 ± 0,005 ^{Ab}	0,027 ± 0,014 ^{Aa}	0,024 ± 0,004 ^{Aa}	0,026 ± 0,006 ^{Aa}
WSP (µg)	aPDT	0,026 ± 0,003 ^{Aa}	0,029 ± 0,005 ^{Aa}	0,027 ± 0,007 ^{Aa}	0,029 ± 0,006 ^{Aa}
	DN+aPDT	0,018 ± 0,004 ^{Ab}	0,034 ± 0,008 ^{Ba}	0,026 ± 0,005 ^{ABa}	0,024 ± 0,007 ^{Aa}
	SO+aPDT	0,016 ± 0,003 ^{Ab}	0,025 ± 0,004 ^{Ba}	0,021 ± 0,003 ^{ABa}	0,025 ± 0,010 ^{Ba}
	DN+SO+aPDT	0,016 ± 0,002 ^{Ab}	0,030 ± 0,007 ^{Ba}	0,018 ± 0,003 ^{ACa}	0,026 ± 0,002 ^{BCa}
ASP (µg)	aPDT	0,061 ± 0,001 ^{Aa}	0,068 ± 0,003 ^{Bab}	0,070 ± 0,004 ^{BCa}	0,077 ± 0,004 ^{Ca}
	DN+aPDT	0,058 ± 0,003 ^{Aa}	0,070 ± 0,004 ^{Bab}	0,059 ± 0,003 ^{Ab}	0,063 ± 0,003 ^{Ab}
	SO+aPDT	0,056 ± 0,004 ^{Aa}	0,072 ± 0,005 ^{Ba}	0,062 ± 0,003 ^{ACb}	0,066 ± 0,003 ^{Cb}
	DN+SO+aPDT	0,054 ± 0,003 ^{Aa}	0,065 ± 0,003 ^{Bb}	0,058 ± 0,005 ^{Aa}	0,074 ± 0,006 ^{Ca}
eDNA (ng)	aPDT	16,541 ± 1,990 ^{Aa}	52,589 ± 3,808 ^{Ba}	25,898 ± 3,681 ^{Ca}	65,442 ± 5,982 ^{Da}
	DN+aPDT	14,732 ± 0,910 ^{Aa}	58,879 ± 4,472 ^{Bb}	20,830 ± 2,537 ^{Aa}	52,638 ± 3,333 ^{Cb}
	SO+aPDT	18,345 ± 4,423 ^{Aa}	49,672 ± 6,195 ^{Ba}	23,612 ± 4,388 ^{Aa}	60,590 ± 4,689 ^{Ca}
	DN+SO+aPDT	16,747 ± 1,540 ^{Aa}	60,905 ± 5,334 ^{Bb}	20,586 ± 2,585 ^{Aa}	52,365 ± 3,013 ^{Cb}

Letras maiúsculas correspondem a comparação entre os grupos (linhas), letras minúsculas correspondem a comparação entre as condições (colunas). Letras desiguais indicam diferença estatística significativa, apontada no pós-teste de Tukey ou Games-Howell ($\alpha=0,05$).

Fonte: elaboração própria.

6.2.3 Resultados da caracterização do biofilme após a décima aplicação de aPDT

Os resultados da avaliação dos componentes do biofilme após a décima aplicação de aPDT estão apresentados na Tabela 7.

6.2.3.1 *Peso seco total (mg)*

Não foi observada interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p=0,889$). Quando avaliados isoladamente, os fatores de tratamento apresentaram interação estatisticamente significativa ($p\leq 0,047$).

Entretanto, as condições de tratamento estudadas não influenciaram os valores de peso seco total nos grupos avaliados e, ao compararmos os grupos, nas condições de tratamento avaliadas, podemos observar que os valores de peso seco total foram estatisticamente semelhantes ($p\geq 0,142$) entre os grupos avaliados.

6.2.3.2 *Peso seco insolúvel (mg)*

Não foi observada interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p=0,143$). Quando avaliados isoladamente, o fator grupo não apresentou interação significativa ($p=0,062$), entretanto o fator condição apresentou interação estatisticamente significativa ($p=0,002$).

As condições de tratamento não influenciaram os valores de peso seco insolúvel nos grupos avaliados.

Ao compararmos os grupos, na condição sonicação+aPDT, podemos observar que o grupo submetido à aPDT (SOP+L+) apresentou maiores valores de peso seco insolúvel, estatisticamente diferente do grupo SOP-L- ($p=0,004$) e dos demais grupos avaliados (SOP+L- e SOP-L+; $p\leq 0,002$).

6.2.3.3 *Proteínas solúveis da matriz (μg)*

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p<0,001$).

No grupo DNSOP-L- houve redução significativa ($p \leq 0,001$) da quantidade de proteínas solúveis da matriz em relação as outras condições avaliadas. Os grupos DNP-L+ e SOP-L+ foram estatisticamente diferentes do grupo P-L+ ($p \leq 0,024$).

Ao compararmos os grupos, na condição aPDT, podemos observar que o grupo submetido P+L+ apresentou valores reduzidos de proteínas solúveis da matriz e estatisticamente diferentes ($p < 0,001$) dos grupos P-L+ e P-L-. Nas condições DNase+aPDT e sonicação+aPDT, os valores de proteínas solúveis da matriz foram significativamente reduzidos nos grupos DNP+L+ e SOP+L+ em relação aos grupos DNP-L- e SOP-L- ($p \leq 0,005$).

6.2.3.4 Proteínas insolúveis do biofilme (μg)

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p < 0,014$).

Os biofilmes do grupo SOP-L+ apresentaram os menores valores de proteínas insolúveis do biofilme e foram estatisticamente diferentes ($p = 0,022$) da condição aPDT (P-L+). As demais condições avaliadas foram estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,138$) entre si.

Na comparação entre grupos, na condição sonicação+aPDT, podemos observar que o grupo SOP-L+ foi estatisticamente diferente ($p \leq 0,007$) dos demais grupos que foram semelhantes ($p = 1,000$) entre si.

6.2.3.5 WSP (μg)

Não foi observada interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p = 0,084$). Quando avaliados isoladamente, os fatores de tratamento apresentaram interação estatisticamente significativa ($p \leq 0,003$).

Houve redução significativa ($p \leq 0,003$) dos valores de WSP nos grupos DNP-L- e DNSOP-L- em relação ao grupo P-L-, que foi estatisticamente semelhante ($p = 0,146$) ao grupo SOP-L-.

Na comparação entre grupos, na condição aPDT, podemos observar que o P+L+ apresentou redução significativa ($p < 0,001$) nos valores de WSP quando comparado ao grupo P-L-, entretanto foi semelhante aos demais grupos avaliados (P+L- e P-L+; $p \geq 0,129$). Os valores de WSP no grupo SOP+L+ foram estatisticamente

menores comparados aos grupos SOP+L- ($p=0,006$) e SOP-L- ($p<0,001$), porém foram semelhantes ($p=0,114$) ao grupo SOP-L+. Os valores de WSP nas condições DNase+aPDT e DNase+sonicação+aPDT foram estatisticamente semelhantes ($p\geq 0,059$) entre si, independentemente do grupo avaliado.

6.2.3.6 ASP (μg)

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p<0,001$).

Os resultados demonstraram que os valores de ASP foram influenciados pelas condições de tratamento avaliadas. O grupo DNSOP+L+ reduziu os valores de ASP e foi estatisticamente diferente ($p\leq 0,015$) do grupo P+L+, que foi semelhante ($p\geq 0,055$) as demais condições avaliadas (DNP+L+ e SOP+L+). No grupo DNSOP-L+ também apresentou redução dos valores de ASP e foi estatisticamente diferente ($p\leq 0,003$) dos grupos P-L+ e SOP-L+. Os grupos DNP-L- e DNSOP-L- foram estatisticamente semelhantes ($p=0,500$) entre si e diferentes ($p<0,001$) dos grupos P-L- e SOP-L-.

Os valores de ASP obtidos nos grupos DNP+L+ e SOP+L+ apresentaram-se estatisticamente reduzidos ($p\leq 0,003$) em relação aos demais grupos. No grupo DNSOP+L+ se comportou de maneira semelhante ($p=0,123$) ao grupo DNSOP-L+, sendo diferente ($p\leq 0,003$) dos demais grupos avaliados.

6.2.3.7 eDNA (ng)

Houve interação estatisticamente significativa entre os fatores de tratamento ($p<0,001$).

Os grupos DNP+L-, DNP-L-, DNSOP+L- e DNSOP-L- foram estatisticamente semelhantes ($p=1,000$) entre si e promoveram redução significativa ($p\leq 0,045$) nos valores de eDNA em relação aos grupos P+L- e P-L-.

Na avaliação dos grupos de tratamento, independentemente da condição de tratamento avaliada, foi possível observar que os menores valores de eDNA foram obtidos para os grupos submetidos à aPDT (P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+), esses valores foram significativamente diferentes ($p<0,001$) dos grupos controle (P-L-, DNP-L-, SOP-L- e DNSOP-L-). O grupo P-L+ também apresentou redução significativa ($p\leq 0,003$) nos valores de eDNA em todas as condições avaliadas.

Tabela 7 - Médias e desvios-padrão dos componentes do biofilme avaliados após dez aplicações de aPDT

Componentes	Condição	Grupos			
		P+L+	P+L-	P-L+	P-L-
Peso seco total (mg)	aPDT	19,766 ± 7,524 ^{Aa}	20,633 ± 6,115 ^{Aa}	28,866 ± 5,818 ^{Aa}	30,766 ± 8,125 ^{Aa}
	DN+aPDT	23,933 ± 8,909 ^{Aa}	34,733 ± 4,927 ^{Aa}	34,533 ± 4,664 ^{Aa}	35,633 ± 4,944 ^{Aa}
	SO+aPDT	31,733 ± 9,004 ^{Aa}	28,500 ± 5,022 ^{Aa}	36,233 ± 15,117 ^{Aa}	34,466 ± 7,025 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	23,366 ± 13,348 ^{Aa}	29,633 ± 1,920 ^{Aa}	36,833 ± 5,310 ^{Aa}	36,866 ± 4,497 ^{Aa}
Peso seco insolúvel (mg)	aPDT	1,680 ± 1,310 ^{Aa}	2,388 ± 2,030 ^{Aa}	1,447 ± 0,794 ^{Aa}	1,111 ± 0,478 ^{Aa}
	DN+aPDT	2,392 ± 1,924 ^{Aa}	1,170 ± 0,833 ^{Aa}	1,125 ± 0,790 ^{Aa}	1,440 ± 0,164 ^{Aa}
	SO+aPDT	1,367 ± 1,521 ^{Aa}	0,990 ± 0,939 ^{Ba}	1,038 ± 0,244 ^{Ba}	1,091 ± 0,159 ^{Ba}
	DN+SO+aPDT	2,542 ± 1,923 ^{Aa}	1,170 ± 0,715 ^{Aa}	1,237 ± 0,685 ^{Aa}	1,590 ± 0,579 ^{Aa}
Proteínas solúveis da matriz (µg)	aPDT	0,023 ± 0,004 ^{Aa}	0,030 ± 0,004 ^{Aa}	0,050 ± 0,005 ^{Ba}	0,055 ± 0,009 ^{Ba}
	DN+aPDT	0,021 ± 0,006 ^{Aa}	0,035 ± 0,004 ^{Ba}	0,037 ± 0,008 ^{Cb}	0,050 ± 0,008 ^{Dab}
	SO+aPDT	0,022 ± 0,004 ^{Aa}	0,031 ± 0,002 ^{Ba}	0,041 ± 0,005 ^{Cb}	0,045 ± 0,004 ^{Cb}
	DN+SO+aPDT	0,024 ± 0,003 ^{Aa}	0,027 ± 0,004 ^{Aa}	0,043 ± 0,004 ^{Bab}	0,032 ± 0,004 ^{Ac}
Proteínas insolúveis do biofilme (µg)	aPDT	0,028 ± 0,004 ^{Aab}	0,028 ± 0,001 ^{Aa}	0,029 ± 0,004 ^{Aa}	0,031 ± 0,006 ^{Aa}
	DN+aPDT	0,026 ± 0,005 ^{Aab}	0,028 ± 0,012 ^{Aa}	0,026 ± 0,008 ^{Aab}	0,038 ± 0,002 ^{Ba}
	SO+aPDT	0,034 ± 0,009 ^{Aa}	0,033 ± 0,007 ^{Aa}	0,017 ± 0,007 ^{Bb}	0,031 ± 0,006 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	0,022 ± 0,006 ^{Ab}	0,026 ± 0,009 ^{Aa}	0,023 ± 0,004 ^{Aab}	0,029 ± 0,004 ^{Aa}
WSP (µg)	aPDT	0,025 ± 0,002 ^{Aa}	0,033 ± 0,011 ^{Aa}	0,029 ± 0,004 ^{Aa}	0,040 ± 0,004 ^{Ba}
	DN+aPDT	0,019 ± 0,003 ^{Aa}	0,028 ± 0,006 ^{Aa}	0,026 ± 0,002 ^{Aa}	0,027 ± 0,003 ^{Ab}
	SO+aPDT	0,018 ± 0,006 ^{Aa}	0,030 ± 0,004 ^{BCa}	0,026 ± 0,010 ^{ACa}	0,032 ± 0,004 ^{Cab}
	DN+SO+aPDT	0,020 ± 0,003 ^{Aa}	0,0024 ± 0,006 ^{Aa}	0,023 ± 0,004 ^{Aa}	0,028 ± 0,004 ^{Ab}
ASP (µg)	aPDT	0,060 ± 0,003 ^{Aa}	0,068 ± 0,004 ^{Ba}	0,071 ± 0,003 ^{Ba}	0,078 ± 0,002 ^{Ca}
	DN+aPDT	0,054 ± 0,003 ^{Aab}	0,065 ± 0,003 ^{Ba}	0,062 ± 0,003 ^{Bbc}	0,065 ± 0,005 ^{Bb}
	SO+aPDT	0,058 ± 0,004 ^{Aab}	0,068 ± 0,003 ^{Ba}	0,066 ± 0,004 ^{Bac}	0,075 ± 0,004 ^{Ca}
	DN+SO+aPDT	0,053 ± 0,002 ^{Ab}	0,064 ± 0,001 ^{Ba}	0,058 ± 0,004 ^{ACb}	0,061 ± 0,002 ^{BCb}
eDNA (ng)	aPDT	11,681 ± 1,256 ^{Aa}	50,981 ± 4,327 ^{Ba}	20,374 ± 2,471 ^{Ca}	65,168 ± 3,505 ^{Da}
	DN+aPDT	9,563 ± 1,117 ^{Aa}	57,645 ± 3,486 ^{Bb}	17,384 ± 6,919 ^{Aa}	53,297 ± 1,221 ^{Cb}
	SO+aPDT	11,468 ± 4,228 ^{Aa}	48,693 ± 3,374 ^{Ba}	21,385 ± 2,434 ^{Aa}	57,995 ± 7,803 ^{Ca}
	DN+SO+aPDT	10,144 ± 1,851 ^{Aa}	56,386 ± 2,525 ^{Bb}	18,879 ± 1,781 ^{Ca}	50,070 ± 2,482 ^{Db}

Letras maiúsculas correspondem a comparação entre os grupos (linhas), letras minúsculas correspondem a comparação entre as condições (colunas). Letras desiguais indicam diferença estatística significativa, apontada no pós-teste de Tukey ou Games-Howell ($\alpha=0,05$).

Fonte: elaboração própria.

6.2.4 Resultados da comparação nos grupos submetidos ao tratamento fotodinâmico após as condições avaliadas nas aplicações 1, 5 e 10

Na Tabela 8 estão apresentados a análise dos resultados obtidos de todas as condições avaliadas nos grupos submetidos somente à terapia fotodinâmica (P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+). Os resultados da Tabela 8 demonstram se houve diferença estatística entre as três de aplicações (Apl 1, Apl 5 e Apl 10) para todas as condições avaliadas nos grupos submetidos à terapia fotodinâmica (P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+).

Em relação as proteínas insolúveis do biofilme, foi observado que, na condição aPDT, houve um aumento estatisticamente significativo ($p=0,044$) na quantidade dessas proteínas após 10 aplicações de aPDT. As demais condições apresentaram igualdade estatística entre si ($p\geq 0,051$) em todas as aplicações ($p\geq 0,053$).

Os níveis de WSP foram estatisticamente semelhantes ($p\geq 0,090$) independentemente da quantidade de aplicações. Os biofilmes submetidos a uma única aplicação de aPDT tiveram redução estatisticamente significativa ($p<0,001$) nos níveis de WSP nos grupos DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+ quando comparados com o grupo P+L+. Quando os biofilmes foram submetidos a cinco e a dez aplicações de aPDT, também foi observada a redução significativa ($p\leq 0,021$) nos níveis de WSP para os mesmos grupos em relação ao grupo P+L+.

Quando observados os níveis de eDNA, os biofilmes da condição aPDT apresentaram redução estatisticamente significativa ($p\geq 0,003$) entre as aplicações, sendo que após 10 aplicações sucessivas de aPDT, foram observados os menores níveis de eDNA. Os biofilmes da condição SO+aPDT apresentaram redução estatisticamente significativa ($p<0,001$) de eDNA apenas após 10 aplicações. Os grupos DNP+L+ e DNSOP+L+ apresentaram os menores níveis de eDNA nas aplicações 1 e 10, sendo estatisticamente semelhantes entre si ($p\geq 0,207$) e diferentes ($p\leq 0,001$) da aplicação 5. Após a primeira aplicação de aPDT, foi observado que os grupos DNP+L+ e DNSOP+L+ apresentaram redução significativa ($p<0,001$) nos níveis de eDNA quando comparados com os grupos P+L+ e SOP+L+.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as condições de tratamento e a quantidade de aplicações de aPDT para os componentes: peso seco total ($p\geq 0,291$), peso seco insolúvel ($p\geq 0,082$), proteínas solúveis da matriz ($p\geq 0,804$) e ASP ($p\geq 0,068$).

Tabela 8 - Médias e desvios-padrão dos componentes da do biofilme dos grupos submetidos à aPDT isoladamente ou após as condições avaliadas e comparando as três aplicações (1, 5 e 10)

Componentes	Condição	Apl 1	Apl 5	Apl 10
Peso seco total (mg)	aPDT	21,733 ± 4,082 ^{Aa}	21,100 ± 8,931 ^{Aa}	19,766 ± 7,524 ^{Aa}
	DN+aPDT	24,133 ± 2,115 ^{Aa}	25,733 ± 7,302 ^{Aa}	23,933 ± 8,909 ^{Aa}
	SO+aPDT	20,000 ± 2,909 ^{Aa}	28,133 ± 5,979 ^{ABa}	31,733 ± 9,004 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	25,866 ± 5,736 ^{Aa}	26,733 ± 5,866 ^{Aa}	23,366 ± 13,348 ^{Aa}
Peso seco insolúvel (mg)	aPDT	1,350 ± 0,978 ^{Aa}	1,312 ± 0,495 ^{Aa}	1,680 ± 1,310 ^{Aa}
	DN+aPDT	1,983 ± 1,019 ^{Aa}	1,147 ± 0,470 ^{Aa}	2,392 ± 1,924 ^{Aa}
	SO+aPDT	0,900 ± 0,702 ^{Aa}	1,312 ± 0,761 ^{Aa}	1,367 ± 0,521 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	2,717 ± 1,020 ^{Aa}	1,080 ± 0,333 ^{Aa}	2,542 ± 1,923 ^{Aa}
Proteínas solúveis da matriz (µg)	aPDT	0,030 ± 0,007 ^{Aa}	0,028 ± 0,005 ^{Aa}	0,023 ± 0,004 ^{Aa}
	DN+aPDT	0,024 ± 0,023 ^{Aa}	0,020 ± 0,004 ^{Aa}	0,021 ± 0,006 ^{Aa}
	SO+aPDT	0,020 ± 0,003 ^{Aa}	0,021 ± 0,004 ^{Aa}	0,022 ± 0,004 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	0,022 ± 0,021 ^{Aa}	0,029 ± 0,005 ^{Aa}	0,024 ± 0,003 ^{Aa}
Proteínas insolúveis do biofilme (µg)	aPDT	0,020 ± 0,003 ^{Aa}	0,019 ± 0,008 ^{Aa}	0,028 ± 0,004 ^{Ba}
	DN+aPDT	0,026 ± 0,004 ^{Aa}	0,020 ± 0,005 ^{Aa}	0,028 ± 0,004 ^{Aa}
	SO+aPDT	0,027 ± 0,004 ^{Aa}	0,028 ± 0,006 ^{Aa}	0,028 ± 0,004 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	0,026 ± 0,005 ^{Aa}	0,024 ± 0,005 ^{Aa}	0,028 ± 0,004 ^{Aa}
WSP (µg)	aPDT	0,030 ± 0,005 ^{Aa}	0,026 ± 0,003 ^{Aa}	0,025 ± 0,002 ^{Aa}
	DN+aPDT	0,015 ± 0,003 ^{Ab}	0,018 ± 0,004 ^{Ab}	0,019 ± 0,003 ^{Aab}
	SO+aPDT	0,018 ± 0,004 ^{Ab}	0,016 ± 0,003 ^{Ab}	0,018 ± 0,006 ^{Ab}
	DN+SO+aPDT	0,015 ± 0,003 ^{Ab}	0,016 ± 0,002 ^{Ab}	0,020 ± 0,003 ^{Aab}
ASP (µg)	aPDT	0,059 ± 0,005 ^{Aa}	0,061 ± 0,001 ^{Aa}	0,060 ± 0,003 ^{Aa}
	DN+aPDT	0,056 ± 0,008 ^{Aa}	0,058 ± 0,003 ^{Aa}	0,054 ± 0,003 ^{Aa}
	SO+aPDT	0,056 ± 0,003 ^{Aa}	0,056 ± 0,004 ^{Aa}	0,058 ± 0,004 ^{Aa}
	DN+SO+aPDT	0,058 ± 0,005 ^{Aa}	0,054 ± 0,003 ^{Aa}	0,053 ± 0,002 ^{Aa}
eDNA (ng)	aPDT	21,670 ± 2,098 ^{Aa}	16,541 ± 1,990 ^{Ba}	11,681 ± 1,256 ^{Ca}
	DN+aPDT	9,250 ± 2,107 ^{Ab}	14,732 ± 0,910 ^{Ba}	9,563 ± 1,117 ^{Aa}
	SO+aPDT	20,083 ± 2,810 ^{Aa}	18,345 ± 4,423 ^{Aa}	11,468 ± 4,228 ^{Ba}
	DN+SO+aPDT	12,735 ± 1,698 ^{Ab}	16,747 ± 1,540 ^{Ba}	10,144 ± 1,851 ^{Aa}

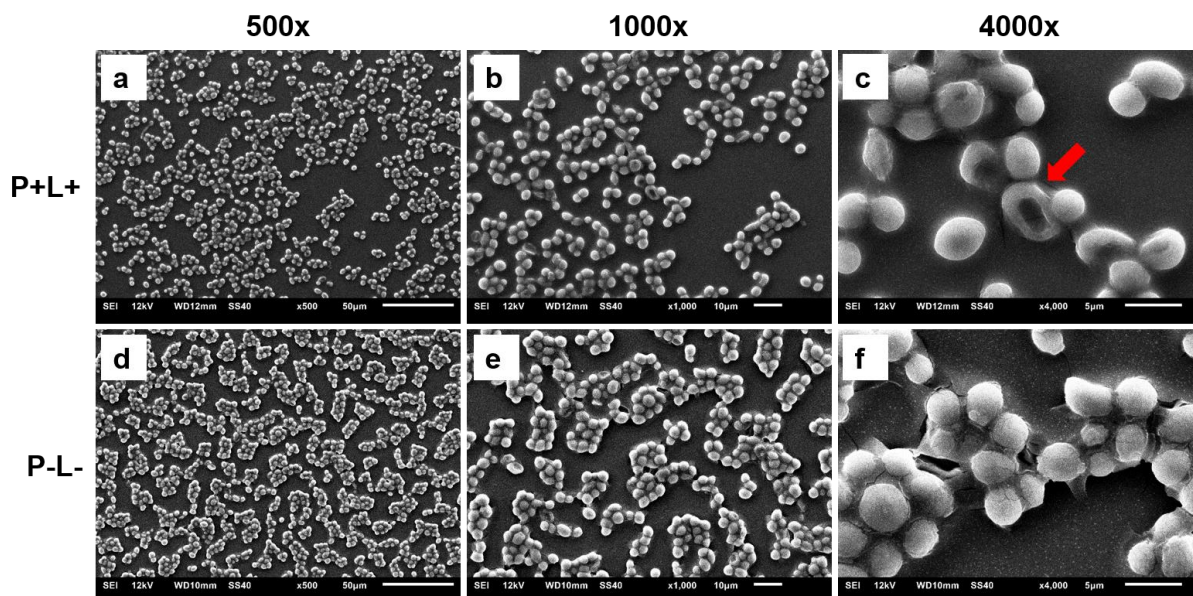
Letras maiúsculas correspondem a comparação entre as aplicações (linhas) e letras minúsculas correspondem a comparação entre as condições (colunas). Letras desiguais indicam diferença estatística significativa, apontada no pós-teste de Tukey ou Games-Howell ($\alpha=0,05$).

Fonte: elaboração própria.

6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Nos aumentos de 500x e de 1000x é possível observar maior prevalência de *C. albicans* no grupo P-L- (imagens d, e) em relação ao grupo P+L+ (imagens a, b). No detalhamento da morfologia, no aumento de 4000x (imagens c, f), nota-se a presença de deformidades nas paredes celulares no grupo P+L+ (imagem c, seta vermelha), o que não é notado no grupo P-L- (imagem f). Além disso, no grupo P-L- (imagem f) também é possível observar maior presença de MEC.

Figura 7 - Imagens de MEV dos biofilmes de *C. albicans* submetidos à uma aplicação de terapia fotodinâmica na condição aPDT



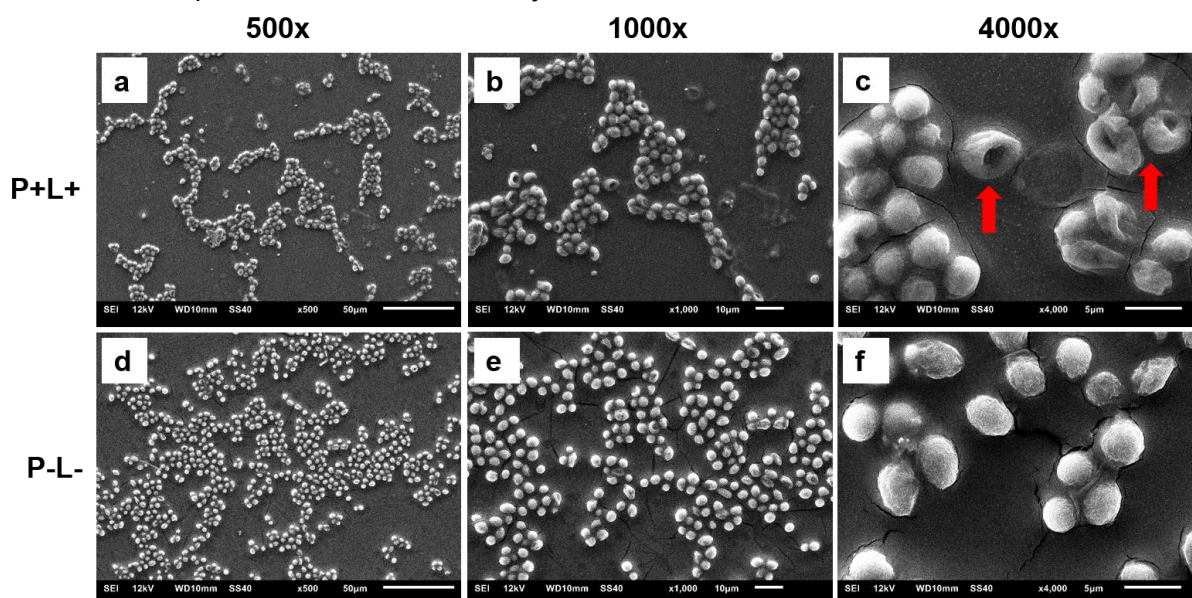
Biofilmes do grupo P+L+ (a, b, c, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente). Biofilmes do grupo P-L- (d, e, f, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente).

Fonte: arquivo pessoal.

Nos aumentos de 500x e de 1000x é possível observar maior prevalência de *C. albicans* no grupo P-L- (imagens d, e) em relação ao grupo P+L+ (imagens a, b). No detalhamento da morfologia, no aumento de 4000x (imagens c, f), nota-se a presença de deformidades nas paredes celulares no grupo P+L+ (imagem c, setas vermelhas), o que não é notado no grupo P-L- (imagem f).

Quando comparados à Figura 7, os grupos submetidos à 10 aplicações de aPDT (Figura 8) apresentam menores quantidades de *C. albicans*, assim como uma maior prevalência de deformidades de membrana celular (setas vermelhas).

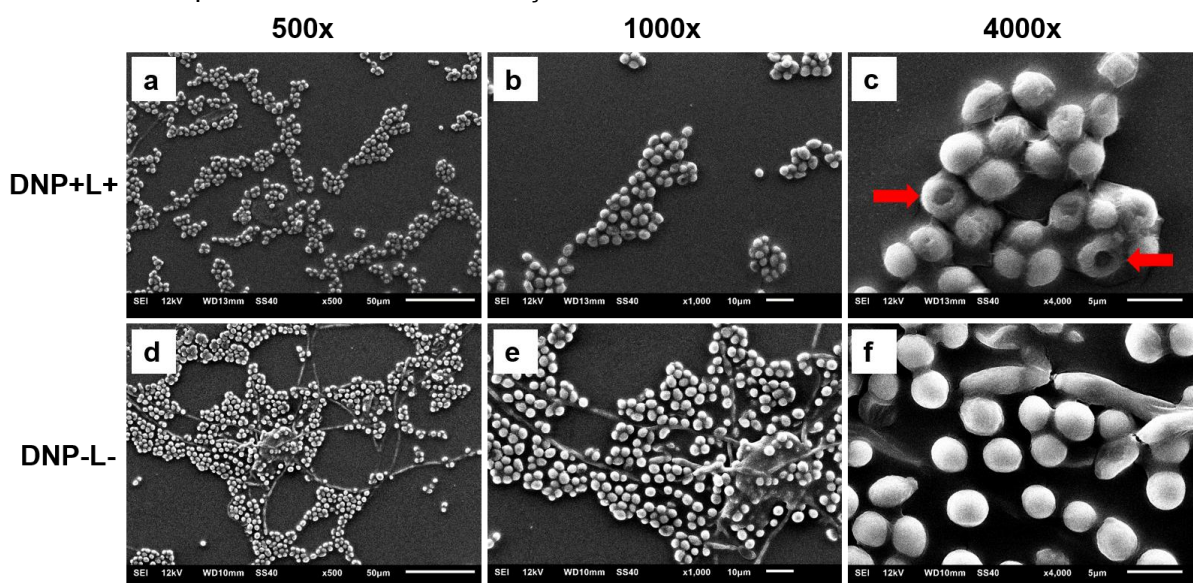
Figura 8 - Imagens de MEV dos biofilmes de *C. albicans* submetidos à dez aplicações de terapia fotodinâmica na condição aPDT



Biofilmes do grupo P+L+ (a, b, c, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente). Biofilmes do grupo P-L- (d, e, f, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente).
 Fonte: arquivo pessoal.

Nos aumentos de 500x e de 1000x é possível observar maior prevalência de *C. albicans* no grupo DNP-L- (imagens d, e) em relação ao grupo DNP+L+ (imagens a, b). No detalhamento da morfologia, no aumento de 4000x (imagens c, f), nota-se a presença de deformidades nas paredes celulares no grupo DNP+L+ (imagem c, setas vermelhas), o que não é notado no grupo DNP-L- (imagem f).

Figura 9 - Imagens de MEV dos biofilmes de *C. albicans* submetidos à uma aplicação de terapia fotodinâmica na condição DNase+aPDT

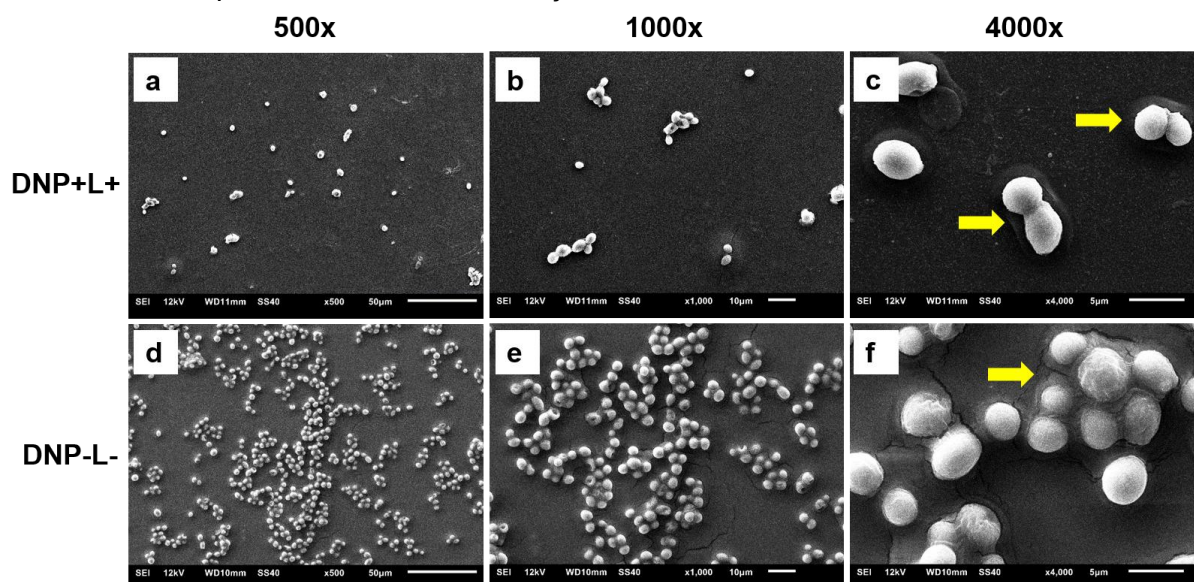


Biofilmes do grupo DNP+L+ (a, b, c, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente). Biofilmes do grupo DNP-L- (d, e, f, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente).
 Fonte: arquivo pessoal.

Nos aumentos de 500x e de 1000x é possível observar maior prevalência de *C. albicans* no grupo DNP-L- (imagens d, e) em relação ao grupo DNP+L+ (imagens a, b). No detalhamento da morfologia, no aumento de 4000x (imagens c, f), nota-se a menor presença de aglomerados celulares no grupo DNP+L+ (imagem c, setas amarelas), em relação ao grupo DNP-L- (imagem f, seta amarela).

Quando comparados à Figura 9, os grupos submetidos à 10 aplicações de aPDT (Figura 10) apresentam menores quantidades de *C. albicans*, assim como menor presença de aglomerados celulares (setas amarelas).

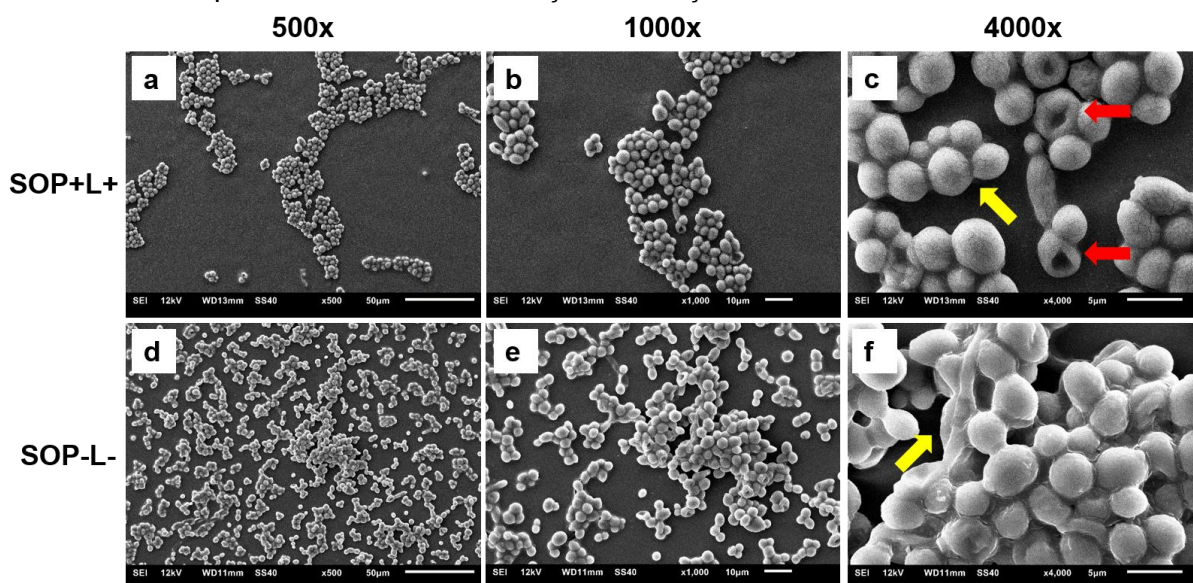
Figura 10 - Imagens de MEV dos biofilmes de *C. albicans* submetidos à dez aplicações de terapia fotodinâmica na condição DNase+aPDT



Biofilmes do grupo DNP+L+ (a, b, c, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente). Biofilmes do grupo DNP-L- (d, e, f, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente).
 Fonte: arquivo pessoal.

Nos aumentos de 500x e de 1000x é possível observar maior prevalência de *C. albicans* no grupo SOP-L- (imagens d, e) em relação ao grupo SOP+L+ (imagens a, b). No detalhamento da morfologia, no aumento de 4000x (imagens c, f), nota-se a presença de deformidades nas paredes celulares no grupo SOP+L+ (imagem c, setas vermelhas) e a menor presença de aglomerados celulares (imagem c, seta amarela), em relação ao grupo SOP-L- (imagem f, seta amarela).

Figura 11 - Imagens de MEV dos biofilmes de *C. albicans* submetidos à uma aplicação de terapia fotodinâmica na condição sonicação+aPDT



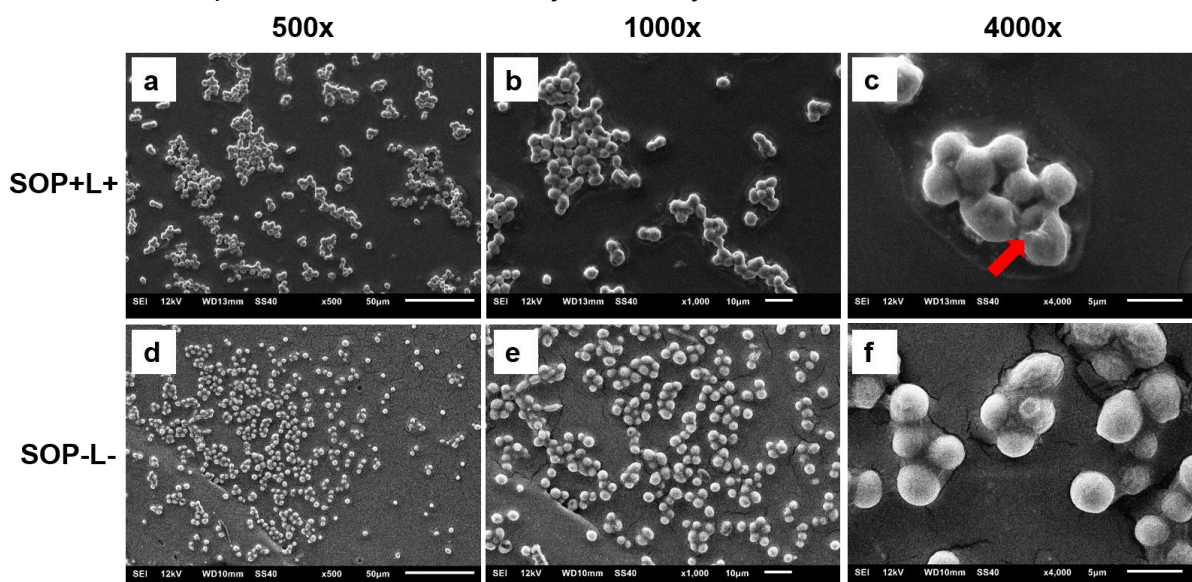
Biofilmes do grupo SOP+L+ (a, b, c, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente). Biofilmes do grupo SOP-L- (d, e, f, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente).

Fonte: arquivo pessoal.

Nos aumentos de 500x e de 1000x é possível observar maior prevalência de *C. albicans* no grupo SOP-L- (imagens d, e) em relação ao grupo SOP+L+ (imagens a, b). No detalhamento da morfologia, no aumento de 4000x (imagens c, f), nota-se a presença de deformidades nas paredes celulares no grupo SOP+L+ (imagem c, seta vermelha), o que não é notado no grupo SOP-L- (imagem f).

Quando comparados à Figura 11, os grupos submetidos à 10 aplicações de aPDT (Figura 12) apresentam discreta redução nas quantidades celulares de *C. albicans*.

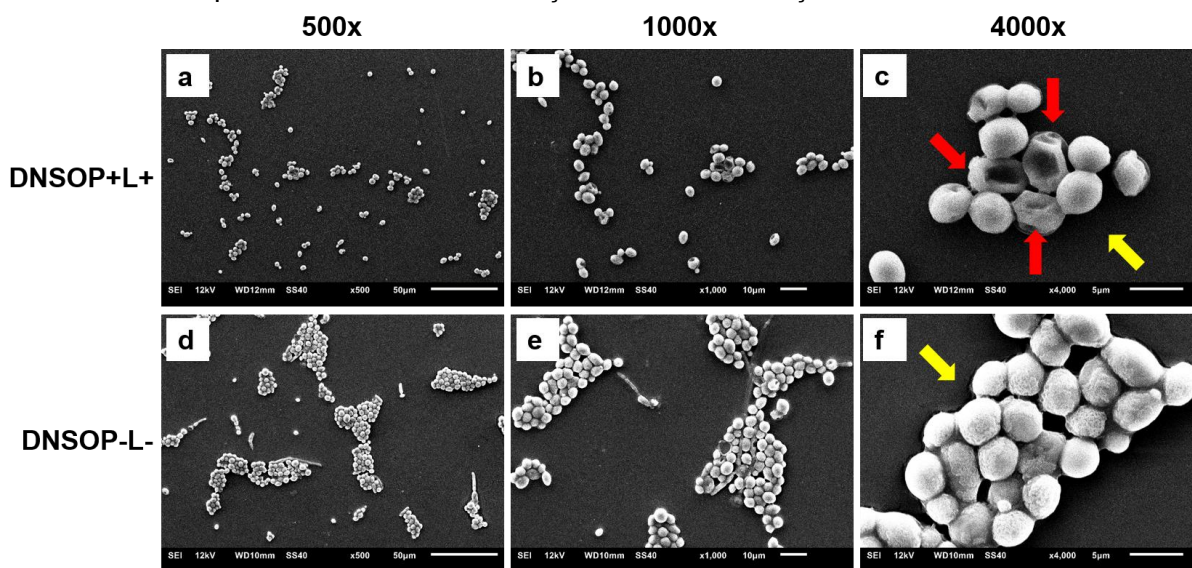
Figura 12 - Imagens de MEV dos biofilmes de *C. albicans* submetidos à dez aplicações de terapia fotodinâmica na condição sonicação+aPDT



Biofilmes do grupo SOP+L+ (a, b, c, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente). Biofilmes do grupo SOP-L- (d, e, f, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente).
 Fonte: arquivo pessoal.

Nos aumentos de 500x e de 1000x é possível observar maior prevalência de *C. albicans* no grupo DNSOP-L- (imagens d, e) em relação ao grupo DNSOP+L+ (imagens a, b). No detalhamento da morfologia, no aumento de 4000x (imagens c, f), nota-se a presença de deformidades nas paredes celulares no grupo DNSOP+L+ (imagem c, setas vermelhas) e a menor presença de aglomerados celulares (imagem c, seta amarela), em relação ao grupo DNSOP-L- (imagem f, seta amarela).

Figura 13 - Imagens de MEV dos biofilmes de *C. albicans* submetidos à uma aplicação de terapia fotodinâmica na condição DNase+sonicação+aPDT

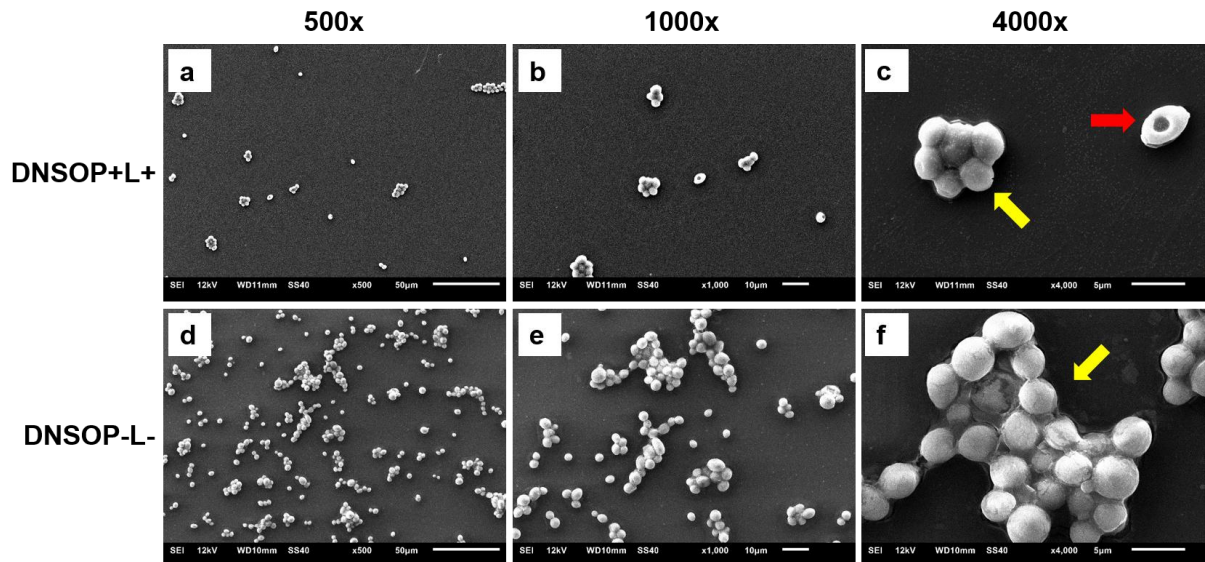


Biofilmes do grupo DNSOP+L+ (a, b, c, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente). Biofilmes do grupo DNSOP-L- (d, e, f, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente).
 Fonte: arquivo pessoal.

Nos aumentos de 500x e de 1000x é possível observar maior prevalência de *C. albicans* no grupo DNSOP-L- (imagens d, e) em relação ao grupo DNSOP+L+ (imagens a, b). No detalhamento da morfologia, no aumento de 4000x (imagens c, f), nota-se a presença de deformidades nas paredes celulares no grupo DNSOP+L+ (imagem c, seta vermelha) e a menor presença de aglomerados celulares (imagem c, seta amarela), em relação ao grupo SOP-L- (imagem f, seta amarela).

Quando comparados à Figura 13, os grupos submetidos à 10 aplicações de aPDT (Figura 14) apresentam menores quantidades de *C. albicans*, assim como menor presença de aglomerados celulares (setas amarelas).

Figura 14 - Imagens de MEV dos biofilmes de *C. albicans* submetidos à dez aplicações de terapia fotodinâmica na condição DNase+sonicação+aPDT



Biofilmes do grupo DNSOP+L+ (a, b, c, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente). Biofilmes do grupo DNSOP-L- (d, e, f, aumentos de 500x, 1000x e 4000x, respectivamente).
 Fonte: arquivo pessoal.

7 DISCUSSÃO

As infecções causadas por *Candida* estão associadas ao desenvolvimento de biofilme, que é uma microestrutura organizada de células aderidas a uma superfície e incorporadas em uma MEC, que protege as mesmas contra as defesas imunológicas do hospedeiro e limita a difusão de fármacos^{5,54,55}. Devido à proteção que a MEC proporciona aos biofilmes, neste estudo foram avaliados métodos químico (DNase) e mecânico (sonicação) ou a associação dos mesmos (DNase+sonicação) com objetivo de desestruturar essa microestrutura o que facilitaria a penetração do FS melhorando a eficácia da aPDT. Esses tratamentos foram associados a realização de 10 aplicações sucessivas de aPDT mediadas por PDZ (25 mg/L associado a 18 J/cm² de LED vermelho) e seu efeito sobre o biofilme de *C. albicans* foram avaliados por meio da quantificação das unidades formadoras de colônias, peso seco total, peso seco insolúvel, proteínas solúveis da matriz, proteínas insolúveis do biofilme, WSP, ASP, eDNA e MEV.

Os resultados obtidos demonstram que a aplicação de aPDT (P+L+) propiciou redução na viabilidade celular de 3,2 log₁₀ após a 1ª aplicação, de 3,8 log₁₀ após a 5ª aplicação e de 5,7 log₁₀ após a 10ª aplicação de aPDT. Em estudo anterior¹⁴, foi observada redução significativa de 6,1 log₁₀ na viabilidade somente após 5 aplicações sucessivas de terapia fotodinâmica utilizando 25 mg/L de PDZ associada a 18 J/cm² de LED. Os resultados do estudo citado corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que, ambos apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular de biofilmes de *C. albicans* quando utilizado o PDZ associado à luz no comprimento de onda adequado. Entretanto, a metodologia utilizada para a indução de tolerância no biofilme não foi a mesma. No presente estudo os biofilmes foram submetidos a aplicações sucessivas e na metodologia utilizada por Dias et al.¹⁴ os biofilmes foram formados a partir de células recultivadas que foram submetidas ao tratamento fotodinâmico e, segundo os autores, essa metodologia pode fragilizar os biofilmes e não seria tão adequada para induzir a tolerância do biofilme.

A redução da viabilidade de culturas planctônicas de *C. albicans* após 1 aplicação de aPDT mediada por PDZ foi relatada por Dovigo et al.¹⁵. Esses autores após avaliarem diferentes doses de LED (18, 25,5 e 37,5 J/cm²) associada a distintas concentrações de PDZ (25, 50 e 75 µg/mL) verificaram que o tratamento com 50 e 75 µg/mL de PDZ combinado a 37,5 J/cm² de LED resultou na inativação completa de

isolados clínicos de *C. albicans*. Por outro lado, a redução da viabilidade observada em biofilme de isolados clínicos de *C. albicans* após uma aplicação foi de 0,9 log₁₀. Em outro estudo Giuliani et al.⁵⁶ obtiveram 3 log₁₀ de redução em *C. albicans* após 20 ciclos de aPDT, utilizando um derivado de ftalocianina (1,3 µg/mL) associado ao LED (30 J/cm²) com eficácia de morte equivalente 99,9%. Garcia et al.⁵⁷ avaliaram biofilmes de cepa padrão (SN 425) e cepas mutantes (CNJ 2302 $\Delta \Delta$ efg1 e CNJ 2330 Δ/Δ tec1) de *C. albicans* que foram expostos 2 vezes por dia com 44 µM de azul de toluidina por 5 minutos, seguido de luz vermelha (635 nm) por 1 (87,6 J/cm²) ou 2 minutos (175,2 J/cm²), foi observada redução na UFC das cepas mutantes, porém o mesmo não foi observado para a cepa padrão; as cepas mutantes avaliadas têm deficiência na formação de biofilme e MEC, portanto, os resultados demonstram a afirmação da importância da MEC para a proteção dos microrganismos contra aPDT. Os resultados dos estudos citados evidenciam o que tem sido relato na literatura, isso é, que o biofilme de *C. albicans* é mais tolerante a aPDT quando comparado a culturas planctônicas^{30,47} uma vez que aPDT quando aplicada em doses sub-letais promoveu 5,7 log₁₀ de redução após 10 aplicações o que pode sugerir uma maior tolerância dos biofilmes à aPDT.

Após a aplicação de DNase foi observada redução na viabilidade celular de 3,5 log₁₀ após a 1ª, 4,8 log₁₀ após a 5ª e 5,5 log₁₀ após a 10ª aplicações de aPDT. Em estudo anterior¹⁹ foi realizado o tratamento com a enzima DNase (20 unidades/mL por 5 minutos) previamente à aplicação de PDZ (200mg/mL por 20 minutos) e luz (50 J/cm² por 28 minutos) em biofilmes de *C. albicans* susceptível ao fluconazol (ATCC 90028) e foi observada uma redução na viabilidade celular de, aproximadamente, 3 log₁₀ após 1 aplicação de aPDT. Esses resultados corroboram com os obtidos no presente estudo após a 1ª aplicação. Estudo recente de Pereira-Abreu⁵⁸ em que foi avaliado biofilme de cepa de *C. albicans* resistente a fluconazol (ATCC 96901), também associa DNase com a terapia fotodinâmica mediada por PDZ (nos mesmos parâmetros utilizados pelo estudo anterior) foi observada redução de 1,92 log₁₀ após a realização de 1 aplicação de aPDT.

Quando foi realizada a aplicação de sonicação previamente à aPDT a redução da viabilidade celular observada foi de 3,5 log₁₀, 4,8 log₁₀ e 5,3 log₁₀, após a 1ª, 5ª e 10ª aplicações, respectivamente. Em outro estudo⁴⁴ foi avaliada a viabilidade celular de biofilmes de *E. coli* tratados com ultrassom (42 kHz e 0.66 W/cm² por 30 minutos) e tobramicina (antibiótico tópico), e foi verificado que a combinação proporcionou

redução significativa da viabilidade celular do microrganismo avaliado. O efeito da combinação entre ultrassom (desestruturação mecânica por 20 segundos), azul de metileno (FS) e luz (660 nm e 150 mW por 1 minuto) resultou em redução de aproximadamente 98% na viabilidade celular de biofilmes de *E. faecalis* após 1 aplicação de aPDT⁴⁵. No presente estudo, a redução observada foi de 50% na 1ª, 70% na 5ª e 75% na 10ª aplicação.

Nos grupos em que foi avaliada a associação entre os métodos químico (DNase) e mecânico (sonicação) foi observada a redução na viabilidade celular de 3,5 log₁₀ após a 1ª, 4,8 log₁₀ após a 5ª e 5,3 log₁₀ após a 10ª aplicação, resultados semelhantes aos dos grupos tratados apenas com DNase ou apenas com sonicação. Na literatura, até o presente momento, não foram realizados estudos que associaram os tratamentos avaliados aqui, porém os resultados obtidos demonstram que todos os tratamentos realizados isoladamente proporcionaram uma redução relevante na viabilidade celular o que sugere que a associação dos tratamentos não potencializou o efeito da aPDT.

Com a avaliação dos resultados obtidos foi possível concluir que as diferentes condições avaliadas para desestruturar a MEC não potencializaram a ação da aPDT apresentando pouca influência na redução dos valores de UFC o que sugere o desenvolvimento de tolerância do biofilme frente a aplicações sucessivas de doses sub-letais de aPDT.

As células do biofilme têm morfologia distintas e estão envoltas e abrigadas por uma MEC que é capaz de proteger o biofilme¹⁴. A MEC é composta por glicoproteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos que abrigam as células, proporcionando proteção contra a imunidade do hospedeiro, fatores ambientais e tratamentos antifúngicos⁵⁹.

Nos biofilmes, o peso seco total é composto por células do biofilme e componentes da MEC. Os resultados do presente estudo demonstram que não houve diferença significativa no peso seco total quando comparados os grupos P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+ em relação ao grupo controle (P-L-) após a 1ª, 5ª e 10ª aplicações avaliadas. Esses resultados corroboram com estudos anteriores, onde também não foi observada diferença significativa no peso seco total de biofilmes de *C. albicans* susceptível (ATCC 90028)¹⁹ ou resistente ao fluconazol (ATCC 96901, R14 e R70)⁵⁸ após serem submetidos ao tratamento apenas com aPDT ou com DNase associado à aPDT. Após tratamento com azul de toluidina seguido de aPDT, também

não foi observada redução no peso seco total de cepas padrão (SN 425) e mutante (CNJ 2330 Δ/Δ *tec1*)⁵⁷ de *C. albicans*.

Na avaliação do peso seco insolúvel também não foi observada diferença estatística entre os grupos tratamento (P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+) quando comparados ao grupo controle (P-L-) em todas as aplicações avaliadas. Esses resultados corroboram com os obtidos por Panariello et al.¹⁹ que também não observaram diferença no peso seco insolúvel de biofilmes de *C. albicans* (ATCC 90028) tratados apenas com aPDT ou submetidos à DNase seguida de aPDT quando comparado ao grupo P-L-. Cepas resistentes a fluconazol (ATCC 96901, R14 e R70) também não apresentam diferença estatística quando tratadas apenas com aPDT em relação ao grupo P-L-, por outro lado, os biofilmes formados por essas cepas apresentaram redução no peso seco insolúvel após serem tratados com DNase seguido da aPDT⁵⁸.

As proteínas solúveis estão aderidas aos polissacarídeos da MEC⁶⁰ que atuam como uma estrutura digestiva externa que degrada os biopolímeros extracelulares utilizando-os como fonte de energia²⁷. Uma aplicação das condições de tratamento avaliadas, seguidas de aPDT, não influenciou os valores de proteínas solúveis da matriz. Esses resultados corroboram com resultados de estudos anteriores quando foi avaliado cepas de *C. albicans* susceptível (ATCC 90028)¹⁹ e resistentes ao fluconazol (ATCC 96901, R14 e R70)⁵⁸, tanto no tratamento apenas com aPDT, quanto no tratamento combinando DNase e aPDT. Também pôde ser observada influência da aPDT nos valores de proteínas solúveis em cepa mutante (CNJ 2330 Δ/Δ *tec1*)⁵⁷. Após a 5ª e a 10ª aplicações das condições de tratamento avaliadas no presente estudo, todos os grupos submetidos à aPDT (P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+) apresentaram redução nos valores de proteínas solúveis da matriz quando comparados aos respectivos grupos controle (P-L-, DNP-L-, SOP-L- e DNSOP-L-).

Em relação as proteínas insolúveis do biofilme, também foi possível observar a redução nos grupos P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+ em comparação ao grupo P-L- somente após a 1ª aplicação de aPDT. Esses resultados não corroboram com estudos anteriores^{19,58}. Porém, corroboram com resultados obtidos por Garcia et al.⁵⁷, que expuseram cepas de *C. albicans* 2 vezes por dia com 44 μ M de azul de toluidina por 5 minutos, seguido de luz vermelha (635 nm) por 1 (87,6 J/cm²) ou 2 minutos (175,2 J/cm²), nesse caso foi observada redução de proteínas insolúveis nas cepas

mutantes (CNJ 2302 $\Delta \Delta$ *efg1* e CNJ 2330 Δ/Δ *tec1*) avaliadas, quando comparadas ao grupo controle.

A MEC dos biofilmes de *Candida* é formada por polissacarídeos α -mananos (WSPs) associados aos β -glucanos (ASPs) que formam o complexo manano-glucano (MGCx)⁶¹. A quantidade de polissacarídeos presentes na MEC depende de suas interações físicas isoladas e conjuntas ao complexo MGCx⁵⁹. As inter-relações no complexo MGCx são responsáveis pela resistência antifúngica do biofilme⁶¹. Os α -mananos são os polissacarídeos mais abundantes na MEC dos biofilmes fúngicos, totalizando aproximadamente 87%, seguido pelo 1,6- β -glucano (12%) e uma pequena porcentagem de 1,3- β -glucano (1%)²⁷. O equilíbrio na relação desses polissacarídeos na MEC é responsável por manter a integridade do complexo MGCx, de maneira que qualquer modificação em algum destes polissacarídeos que compõe a MEC pode alterar a susceptibilidade do biofilme as abordagens antifúngicas^{59,62,63}.

Na análise de WSP, podemos observar que após a 1ª e 10ª aplicações os valores de WSP foram reduzidos pelas condições de tratamento avaliadas (P+L+, DNP+L+, SOPL+L+ e DNSOP+L+) quando comparadas ao grupo controle (P-L-). Esses resultados corroboram com os obtidos no estudo realizado por Abreu-Pereira et al.⁵⁸ que observaram redução nos valores de WSP nos biofilmes de isolados clínicos de cepas resistentes ao fluconazol (R14 e R70), tanto no grupo tratado apenas com aPDT, quanto no grupo que avaliou a eficácia da associação da DNase e aPDT. Por outro lado, Panariello et al.¹⁹ observaram redução nos valores de WSP em biofilmes de *C. albicans* susceptível ao fluconazol tratados apenas com aPDT, porém o grupo tratado com DNase seguido de aPDT foi estatisticamente semelhante ao grupo controle (P-L-).

Quando analisamos ASP podemos observar que, os valores de ASP foram influenciados pela aplicação da DNase e sonicação previamente ao tratamento fotodinâmico (DNSOP+L+) somente após a 10ª aplicação quando comparadas ao grupo P-L-. Em estudos anteriores, que analisaram aplicação de DNase por 5 minutos previamente ao tratamento fotodinâmico em biofilmes de cepas susceptível¹⁹ e resistentes ao fluconazol⁵⁸ não foi observado efeito de ambos os tratamentos sobre os valores de ASP.

Avaliando eDNA foi verificado que todas as condições experimentais (P+L+, DNP+L+, SOP+L+ e DNSOP+L+) promoveram redução significativa nos valores de

eDNA quando comparadas aos seus respectivos grupos controle (P-L-, DNP-L-, SOP-L- e DNSOP-L-) após a 1ª, 5ª e 10ª aplicações avaliadas. Estudo de Garcia et al.⁵⁷ demonstrou a redução nos níveis de eDNA em aPDT mediada por azul de toluidina em cepas mutantes de *C. albicans*. Estudos anteriores observaram que os níveis de eDNA presentes na MEC de biofilmes formados por cepas padrão susceptível (ATCC 90028)¹⁹ e resistente ao fluconazol (ATCC 96901)⁵⁸ foram significativamente reduzidos após aPDT e também quando a enzima DNase foi associada à aPDT. Por outro lado, isolados clínicos resistentes a fluconazol (R14 e R70) apresentaram redução nos níveis de eDNA apenas quando a DNase foi combinada à aPDT⁵⁸.

Tem sido sugerido que na MEC do biofilme, o eDNA pode estar envolto e ligado aos polissacarídeos do complexo MGCx, uma vez que a enzima DNase em associação com aPDT reduziu, simultaneamente, as concentrações de WSP e de eDNA da MEC. Em estudo anterior foi observado que a aPDT foi eficaz na redução da quantidade de WSP presentes na MEC e que a associação com a enzima DNase potencializou o efeito redutor sobre α -mananas⁵⁸. A DNase hidrolisa as cadeias de eDNA e interfere na organização dos α -mananas e eDNA, o que, consequentemente, reduz a quantidade desses polissacarídeos aos quais as moléculas de eDNA estão ligadas¹⁹. WSP e eDNA estão relacionados estruturalmente, podendo apresentar ligações fracas ou fortes, o que interfere no processo de hidrólise desses polissacarídeos pelas enzimas^{27,64}. Assim, a enzima DNase, ao desorganizar essa relação, auxilia na redução de WSP em que as moléculas de eDNA estão ligadas⁴². Desta maneira, os resultados encontrados neste estudo corroboram com estudo anterior em que também foi realizado o pré-tratamento com DNase por 5 minutos seguido de aPDT e foi observada uma redução significativa do conteúdo de eDNA em biofilmes de *C. albicans* susceptível¹⁹ e resistentes ao fluconazol⁵⁸. Essa redução no conteúdo de eDNA pode ser considerada como um fator importante para desestruturação da MEC, uma vez que o eDNA está relacionado à integridade da MEC do biofilme e à sua resistência aos antifúngicos convencionais.

A MEC dificulta a penetração de antimicrobianos, reduzindo a eficácia de aPDT⁴. Por isso, a utilização de abordagens para desestruturar a MEC se torna relevante^{18,19,21}. As imagens de MEV apresentadas demonstraram o aparecimento de deformidades nas paredes celulares mostrando que as estratégias de desestruturação foram eficientes. Além disso, também pode ser observada redução na quantidade de

células e de aglomerados celulares, fato que demonstra a melhora da atuação do tratamento com aPDT.

O tratamento fotodinâmico em doses sub-letais pode causar um processo de estresse oxidativo ao microrganismo ocasionado pelas espécies reativas de oxigênio. Devido ao fato dessa dose não ser suficiente para a completa inativação, a tolerância pode ser manifestada pela necessidade de maiores concentrações da droga. Nesse contexto, as células do biofilme que sobrevivem as aplicações sucessivas do tratamento por um longo período são denominadas de tolerantes. A formação de células tolerantes ocorre quando após o tratamento é observado inativação imediata de grande parte da população, enquanto uma sub-população clonal (células-filhas) persiste por um período muito mais longo ao tratamento^{30,53}. No presente estudo foi observado que não houve aumento na eficácia de aPDT na inativação celular independentemente das estratégias utilizadas para desestruturar a matriz do biofilme o que sugere uma tolerância do biofilme a aplicações sucessivas.

8 CONCLUSÃO

-Aplicações sucessivas de aPDT reduziram a viabilidade celular de biofilmes de *C. albicans*, independentemente do tipo de estratégia avaliada;

-Não houve diferença estatística significativa nos valores de peso seco total, peso seco insolúvel e ASP em nenhuma das condições avaliadas;

-Os tratamentos demonstraram redução na quantidade de proteínas solúveis da matriz após a quinta e décima aplicação de aPDT em todas as condições;

-As proteínas insolúveis do biofilme foram reduzidas nas condições I e IV somente após a primeira aplicação de aPDT;

-Houve redução significativa nas quantidades de WSP e eDNA em todas as condições avaliadas;

-A MEV demonstrou aparecimento de deformidades nas paredes celulares, além de redução no número de células e aglomerados celulares;

-As estratégias avaliadas para desestruturação do biofilme não aumentaram a susceptibilidade de *C. albicans* à aPDT.

REFERÊNCIAS*

1. Robertson J, McGoverin C, Vanholsbeeck F, Swift S. Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Front Microbiol.* 2019 Apr 12;10:801.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002 Aug;78(922):455-9.
3. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol.* 2019 Mar;13(1):25-32.
4. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.* 2008 Jul 22;18(14):1017-24.
5. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol.* 2007 Nov;189(22):7945-7.
6. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013 Jan;62(Pt 1):10-24.
7. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* 2002 Feb;2(2):73-85.
8. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956;28:350-6.
9. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008;163(1):1-12.
10. Rabiee N, Yarak MT, Garakani SM, Garakani SM, Ahmadi S, Lajevardi A, et al. Recent advances in porphyrin-based nanocomposites for effective targeted imaging and therapy. *Biomaterials.* 2020 Feb;232:119707.
11. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2016 Oct;33:67-73.
12. Banfi S, Caruso E, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem.* 2004 Sep 15;12(18):4853-60.
13. Carmello JC, Alves F, Basso FG, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, et al. Treatment of Oral Candidiasis Using Photodithazine®-Mediated Photodynamic Therapy In Vivo. *PLoS One.* 2016 Jun 2;11(6):e0156947.
14. Dias LM. Potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana no desenvolvimento de resistência em *Candida albicans*. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.
15. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling.* 2013;29(9):1057-67.
16. Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP, Tomé AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs.* 2010 Jan 20;8(1):91-105.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

17. Ribeiro AP, Andrade MC, da Silva JF, Jorge JH, Primo FL, Tedesco AC, et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochem Photobiol.* 2013 Jan-Feb;89(1):111-9.
18. Kaplan JB. Biofilm matrix-degrading enzymes. *Methods Mol Biol.* 2014;1147:203-13.
19. Panariello BHD, Klein MI, Alves F, Pavarina AC. DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Sep;27:124-31.
20. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses.* 2012 Jan;55(1):80-5.
21. Alves F, Pavarina AC, Mima EGO, McHale AP, Callan JF. Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans*. *Biofouling.* 2018 Apr;34(4):357-67.
22. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994;5(2):125-57.
23. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res.* 1995 May;74(5):1152-61.
24. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLoS Pathog.* 2016 Sep 29;12(9):e1005828.
25. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 2010 Mar;89(3):205-18.
26. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006 Aug;55(Pt 8):999-1008.
27. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio.* 2014 Aug 5;5(4):e01333-14.
28. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Feb;51(2):510-20.
29. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008 Nov;4(11):e1000213.
30. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol.* 2016 Apr;14(5):320-30.
31. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Apr;11(2):382-402.
32. VEDIYAPPAN G, ROSSIGNOL T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May;54(5):2096-111.
33. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 2010 May;169(5):323-31.

34. Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3259-66.
35. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:85-105.
36. Panariello BHD, Klein MI, Dias LM, Bellini A, Costa VB, Barbugli PA, et al. *Lactobacillus casei* reduces the extracellular matrix components of fluconazole-susceptible *Candida albicans* biofilms. *Biofouling*. 2021 Oct-Nov;37(9-10):1006-21.
37. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):468-81.
38. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Feb;93(2):155-60.
39. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, et al. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1402-10.
40. Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, Costa CAS, Mima EGO, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy in Combination with Nystatin in the Treatment of Experimental Oral Candidiasis Induced by *Candida albicans* Resistant to Fluconazole. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019 Sep 18;12(3):140.
41. de Sousa DL, Lima RA, Zanin IC, Klein MI, Janal MN, Duarte S. Effect of Twice-Daily Blue Light Treatment on Matrix-Rich Biofilm Development. *PLoS One*. 2015 Jul 31;10(7):e0131941.
42. da Silveira PV, Panariello BHD, Costa CAGA, Maule SM, Janal MN, Zanin ICJ, et al. Twice-daily red and blue light treatment for *Candida albicans* biofilm matrix development control. *Lasers Med Sci*. 2019 Apr;34(3):441-7.
43. Paramonova E, Krom BP, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. Hyphal content determines the compression strength of *Candida albicans* biofilms. *Microbiology (Reading)*. 2009 Jun;155(Pt 6):1997-2003.
44. Hou Y, Yang M, Jiang H, Li D, Du Y. Effects of low-intensity and low-frequency ultrasound combined with tobramycin on biofilms of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2019 Feb 1;366(3):fnz026.
45. Niavarzi S, Pourhajibagher M, Khedmat S, Ghabraei S, Chiniforush N, Bahador A. Effect of ultrasonic activation on the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy: Evaluation of penetration depth of photosensitizer and elimination of *Enterococcus faecalis* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Sep;27:362-6.
46. Panariello BHD, Klein MI, Mima EGO, Pavarina AC. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Oral Microbiol*. 2018 Jun 4;10(1):1476644.
47. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc*. 2008;3(12):1909-24.
48. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

49. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 8;104(19):8113-8.
50. Zago CE, Silva S, Sanitá PV, Barbugli PA, Dias CM, Lordello VB, et al. Dynamics of biofilm formation and the interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4):e0123206.
51. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Dent Assoc*. 2012 Mar;143(3):270-7.
52. Nett JE, Crawford K, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3505-8.
53. Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA, Reinicke EL, Sanchez H, Andes DR. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of *non-albicans Candida* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1918-20.
54. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Dec;9(6):588-94.
55. Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun*. 2007 May;75(5):2126-35.
56. Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54(2):637-42.
57. Garcia BA, Panariello BHD, Freitas-Pontes KM, Duarte S. *Candida* biofilm matrix as a resistance mechanism against photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Dec;36:102525.
58. Abreu-Pereira CA, Klein MI, Lobo CIV, Gorayb Pereira AL, Jordão CC, Pavarina AC. DNase enhances photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* biofilms. *Oral Dis*. 2022 Feb 8.
59. Nett JE, Andes DR. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. *J Fungi (Basel)*. 2020 Feb 3;6(1):21.
60. Bales PM, Renke EM, May SL, Shen Y, Nelson DC. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e67950.
61. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2005 Mar;93(3):288-93.
62. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 31;112(13):4092-7.
63. Gonçalves B, Fernandes L, Henriques M, Silva S. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*. 2020 May;36(5):621-30.

- 64.** Garcez AS, Núñez SC, Azambuja N Jr, Fregnani ER, Rodriguez HM, Hamblin MR, et al. Effects of photodynamic therapy on Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. *Photomed Laser Surg.* 2013 Nov;31(11):519-25.