



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



César Augusto Abreu Pereira

**Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes
de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol**

Araraquara

2021



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



César Augusto Abreu Pereira

Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), para o exame de defesa visando a obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Claudia Pavarina
Coorientadora: Prof. Dra. Marlise Klein Furlan

Araraquara

2021

P436a

Pereira, César Augusto Abreu

Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol / César Augusto Abreu Pereira. -- Araraquara, 2021
105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Ana Claudia Pavarina

Coorientadora: Marlise Inez Klein Furlan

1. Fotoquimioterapia. 2. *Candida albicans*. 3. Resistência antifúngica a fármacos. I. Título.

César Augusto Abreu Pereira

Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol

Comissão Avaliadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientadora: Profa Dra Ana Claudia Pavarina

2º Examinador Profa Dra Fernanda Lourenção Brighenti

3º Examinador Profa Dra Natalia Mayumi Inada

Araraquara, 30 de junho de 2021.

DADOS CURRICULARES

César Augusto Abreu Pereira

Nascimento: 16/09/1994 – São Luís – Maranhão.

FILIAÇÃO: Elismar Abreu Pereira
Vicente Muniz Pereira Filho.

2013 - 2018 – Graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

2014-2016 – Bolsista no projeto de extensão “Promoção de Saúde Bucal às Gestantes da Maternidade”.

2015 – Bolsista PIBIC-V no projeto “Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de óleo essencial extraído da *Citrus bergamia* risso em modelo animal de osteoartrite”.

2016 – Bolsista PIBIC-V no projeto “Avaliação de um método de estimativa de idade pela mineralização dentária dos terceiros molares”.

2016-2018 – Iniciação Científica na disciplina de Periodontia.

2019 – Estágio docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II.

2019-2021 – Pós- graduação em Reabilitação Oral em andamento, nível mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, a Ele toda honra e toda glória! Essa jornada só foi possível graças aos seus planos e a sua infinita bondade. **“O que é nascido de Deus vence o mundo; e esta é a vitória que vence o mundo: a nossa fé”** (1 João 5:4).

Aos meus amados pais, **Vicente e Elismar**, por todos os ensinamentos, incentivo aos estudos, apoio nos meus mais altos voos e por todo amor que foi incutido em mim durante toda a vida. Sem vocês essa conquista não teria o mesmo sabor e importância, pois é para vocês que dedico esse título.

Agradeço também à minha irmã **Tanuza Abreu** e ao meu querido e amado sobrinho **Pedro Ryan** por acreditarem no meu sucesso profissional, por todo amor distribuído durante esses 2 anos em que estive distante geograficamente. Vocês me deram forças para continuar minha jornada!

A minha tia **Maria da Conceição** e a minha prima querida **Thaynan Abreu** por todo apoio e suporte. Obrigado por acreditar e torcer junto comigo nas minhas conquistas.

Agradeço também a todos os membros das famílias **Rêgo Abreu e Borges Pereira** por serem tão queridos e por sempre torcerem por cada vitória minha.

Agradeço especialmente a minha orientadora **Prof Ana Claudia Pavarina** por acreditar em mim e na seriedade do meu trabalho. Poder trabalhar com uma profissional tão admirável me enche de orgulho e satisfação. Obrigado por todo carinho, profissionalismo, atenção e ensinamentos repassados, sem a sua orientação este trabalho não teria a mesma qualidade e importância. Serei eternamente grato por ter tido a oportunidade de realizar o mestrado com a presença de uma orientadora extremamente compreensível e amorosa. **“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”** (Isaac Newton).

Agradeço imensamente a minha coorientadora **Prof Marlize Inês Klein Furlan** por todo suporte e paciência em ensinar algo que, até então, era novo para mim. Aprender sobre biofilmes e metodologias de avaliação me tornaram um pesquisador mais consistente. Obrigado de todo coração por todo ensinamento transmitido. Este trabalho também é reflexo da sua dedicação pela ciência.

À minha querida aluna de Iniciação Científica, companheira de pesquisa e grande amiga **Ana Luiza Gorayb Pereira** por estar sempre ao meu lado, por dividir o cansaço, a ansiedade, as alegrias e as conquistas ao longo destes 2 anos. Gratidão por ter alguém tão especial ao meu lado nesta jornada. Poder contar com uma amiga tão querida foi muito importante para que esse trabalho fosse realizado com leveza e de forma prazerosa. Este trabalho é só o primeiro de muitos outros que ainda virão! **“Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolvermos em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos”** (Sócrates).

À queridíssima **Claudia Carolina Jordão** por todo companheirismo, ensinamentos, auxílios e conselhos. Uma grata surpresa que a FOAr me presenteou. Obrigado pelos risos e por todo carinho que você distribui por onde passa. Sou seu admirador tanto pelo perfil profissional quanto pela postura pessoal, tão condizente com tudo aquilo que acredito. Desejo muito sucesso e voos cada vez mais altos, pois você faz por merecer cada conquista realizada.

À querida **Prof Juliana Álvares Duarte Bonini Campos** por me mostrar a maravilha que é o mundo da estatística. Agradeço por toda atenção, carinho e zelo. A sua postura enquanto professora,

mulher e ser humano é admirável e me sinto muito grato por ter tido a oportunidade de conhecê-la e aprender, acima de tudo, sobre a vida. Estou certo de que aprendi e ainda aprenderei valiosas lições que levarei por toda a vida. **“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”** (Cora Coralina).

À Professora e amiga **Rosana Costa Casanovas** por incentivar meu crescimento acadêmico, por continuar sempre presente, apesar da distância física, em todos os momentos dessa caminhada. Agradeço imensamente por todas as oportunidades confiadas a mim, por todos os projetos e artigos que desenvolvemos juntos nestes últimos dois anos. Sua contribuição para minha formação profissional e pessoal é imensurável, visto a grandeza de dimensão que ela possui. A base de toda conquista é o professor! **“Ouça conselhos e aceite instruções, e acabará sendo sábio”** (Provérbios 19:20).

À **Lucas Arrais de Campos** por toda paciência, atenção e colaboração no desenvolvimento da análise estatística deste trabalho. Obrigado por tanto!

À **Prof Livia Nordi Dovigo** por todas as considerações para este trabalho nas etapas de pré-qualificação e qualificação. Agradeço ainda pelos ensinamentos estatísticos repassados durante a disciplina prática. Obrigado também por estar sempre disponível em elucidar minhas dúvidas deste universo tão rico que é o estatístico.

Aos professores do **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese** por todo ensinamento transmitido e que contribuíram de forma substancial para a minha formação profissional.

Agradeço também aos membros da banca avaliadora, **Prof Fernanda Lourenção Brighenti** e **Prof Natalia Mayumi Inada**, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho. Muito obrigado!

Agradeço a **Camyla Pereira Jansen** por ser fundamental para que este sonho se realizasse. Obrigado por entender a minha necessidade por mais conhecimento, por acreditar na seriedade e dedicação do meu trabalho, por toda ajuda financeira e por todo carinho e amor que você transmite para mim. Agradeço a Deus todos os dias pela sua vida! **“Rico, de fato, não é aquele que tem, mas aquele que dá”** (João Paulo II).

Aos amigos da minha turma de mestrado, por todo companheirismo e amizade ao longo desta caminhada, especialmente à **Marina Mantovani, Fernanda Kitagawa, Amanda Brandão, Bruno Mascaro, Marlon Eduardo, Amanda Ferro, Thais Santana, Suellen Pedrosa, Maydson Meneses, Igor Paulino, Mariana Baldochi, Isabela Souza e Juliana Padilha**.

Aos amigos de pós-graduação por toda amizade e momentos vividos dentro e fora da faculdade, especialmente à **Jessica Katarine Abreu Silva** por ser tão querida, atenciosa e por sempre ter a palavra certa, ao querido **Lucas Portela Oliveira** por toda ajuda e disponibilidade em transmitir ensinamentos, à **Amanda Bellini** por todo companheirismo e risadas, e à **Carmélia Isabel Lobo, Guilherme Rocha e Elkin Flores** por toda ajuda nos experimentos realizados no **Laboratório de Biologia Molecular – BIOMOL** e no **Laboratório de Microbiologia Aplicada**.

Aos amigos da **Cobertura (CBT)** por me adotarem, por todo carinho e atenção ao longo desse caminho. Vocês foram essenciais para que essa jornada fosse realizada de forma mais divertida e especial.

À **Prefeitura Municipal de Cajari – MA** (gestão 2016-2020) por todo apoio para que eu pudesse concretizar essa etapa de forma digna e confortável.

Aos meus amigos do Maranhão por entenderem a minha ausência e por vibrarem por cada conquista minha, em especial à **Beatriz Nogueira, Celso Afonso Rodrigues, Rodolfo Rêgo, Vinicius Ahid, Giuliana Santos e Isadora, Maurício Viana, Julyana Cunha, Lídia Machado, Glenda Serra, Priscila Santos, Gabriel Magalhães, Deborah Pinheiro e Nicole Veras.**

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP** por promover o conhecimento e abrir as portas para que pesquisas tão necessárias sejam realizadas com condições adequadas para que possamos devolver à comunidade científica resultados confiáveis. Agradeço todos os funcionários que fazem parte dessa grande instituição.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/11602-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Agradeço ao **CEPID (Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão)** (2013/07276-1).

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

*Só mesmo o tempo pode revelar
O lado oculto das coisas
O que se foi e o que não passará
Inesquecíveis sensações
Que sempre vão ficar pra nos fazer lembrar
Dos sonhos, tantos momentos bons...*

Pereira CAA. Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistente a fluconazol [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) promove a inativação dos microrganismos em cultura planctônica, entretanto, biofilmes são menos sensíveis à essa terapia. A resistência dos biofilmes de *Candida spp.* é multifatorial e está associada ao efeito protetor da matriz extracelular do biofilme (MEC) que impede a penetração do agente fotossensibilizador (FS) e de fármacos. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da enzima DNase I associada à TFD, mediada por Photodithazine® (200 mg/L) e Luz LED (660 nm; 50 J/cm²), sobre biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (CaR). Biofilmes de 48 horas foram formados a partir das cepas de CaR [ATCC 96901; e dois isolados clínicos (R14 e R70)]. A DNase foi utilizada com objetivo de degradar a MEC dos biofilmes e potencializar o efeito da TFD. Os biofilmes foram expostos a pré-incubação com DNase por 5 min, seguida da aplicação do fotossensibilizador (P) e da Luz (L), de forma isolada ou em associação, originando 8 grupos de tratamento (P+L+, P-L+, P+L-, P-L-, P-L-DNase, P+L+DNase, P+L-DNase e P-L+DNase; n=12). A eficácia dos tratamentos foi avaliada através dos seguintes métodos: contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), quantificação de: peso seco total e insolúvel, proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e em álcali (ASP), e DNA extracelular (eDNA). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA three-way com pós teste de Bonferroni. O tratamento com DNase em associação à TFD (P+L+DNase) apresentou redução de 1.92; 1.65 e 1.29 em log₁₀ da viabilidade celular para as cepas ATCC 96901, R14 e R70, respectivamente. Também foi observado redução dos componentes da MEC dos biofilmes, como WSP e eDNA, bem como sua biomassa insolúvel quando comparados com o grupo controle (P-L-). O peso seco total e a quantificação de proteínas não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Todas as cepas apresentaram o mesmo padrão de comportamento quando tratadas com DNase, e os componentes da MEC foram afetados, potencializando a eficácia da TFD.

Palavras – chave: Fotoquimioterapia. *Candida albicans*. Resistência antifúngica a fármacos.

Pereira CAA. Evaluation of the effectiveness of Dnase associated with photodynamic therapy in inactivating biofilms from clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy (PDT) promotes microorganisms' inactivation in planktonic cultures; however, the same effect does not occur in biofilms. The resistance of *Candida spp.* biofilms is multifactorial and it has been associated to the protective effect of biofilm's matrix extracellular (MEC) that prevents the penetration of photosensitizing agent (PA) and drugs. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of DNase I enzyme associated with PDT, mediated to Photodithazine® (200 mg/L) and LED light (660 nm; 50 J/cm²), on biofilms of fluconazole-resistant *C. albicans*' clinical isolates (CaR). 48h-old biofilms were formed from the strains of CaR [ATCC96901; and two clinical isolates (R14 and R70)]. DNase was used in the aim of degrading the MEC of the biofilms and potentializing the effect of PDT. Biofilms were exposed to pre-incubation with DNase for 5 minutes, followed by photosensitizer application (P) and the light (L), either in isolated or associated form, giving rise for 8 groups of treatment (P+L+, P-L+, P+L-, P-L-, P-L-DNase, P+L+DNase, P+L-DNase and P-L+DNase; n=12). The effectiveness of treatments was evaluated through the following methods: colony forming unit (CFU) counting, quantification of: total and insoluble dry-weight, soluble and insoluble proteins, water-soluble polysaccharides from (WSP) and alkali-soluble polysaccharides (ASP), and extracellular DNA (eDNA). The data were analyzed by three-way ANOVA test with Bonferroni's post-test. The DNase treatment associated with PDT (P+L+DNase) showed a reduction of 1.92; 1.65 e 1.29 in log₁₀ of cell viability to ATCC 96901, R14 and R70 strains, respectively. It was also noticed a reduction of biofilms MEC's components, like WSP and eDNA, as well as its insoluble biomass when it's been compared with control group (P-L-). The total dry-weight and the proteins quantification showed no statistical difference between treatments. All of the strains showed the same standard behavior when treating with DNase, and MEC's components were affected, improving PDT's effectiveness.

Keywords: Photochemotherapy. *Candida albicans*. Antifungal drug resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO.....	16
2.1 Proposição Geral.....	16
2.2 Proposições Específicas.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Biofilmes de <i>C. albicans</i>.....	17
3.2 Resistência Antifúngica.....	23
3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	30
3.4 Utilização de Enzimas para Degradar a Matriz do Biofilme.....	45
4 MATERIAL E MÉTODO	50
4.1 Material.....	50
4.1.1 Materiais de consumo.....	50
4.1.2 Instrumentais.....	51
4.1.3 Equipamentos.....	51
4.2 Método.....	52
4.2.1 Determinação da curva de crescimento dos microrganismos.....	52
4.2.2 Análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados clínicos.....	53
4.2.3 Formação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> resistentes ao fluconazol (ATCC e isolados clínicos)	54
4.2.4 Realização dos tratamentos.....	55
4.2.4.1 Preparo da enzima DNase.....	55
4.2.4.2 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	55
4.2.4.3 Realização dos tratamentos.....	56
4.2.5 Avaliação da eficácia dos tratamentos.....	57
4.2.5.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	57
4.2.5.2 Análise do peso seco.....	58
4.2.5.2.1 Peso seco total	58
4.2.5.3 Quantificação de proteínas.....	58
4.2.5.3.1 Solúveis.....	58
4.2.5.3.2 Insolúveis.....	59
4.2.5.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	59
4.2.5.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP).....	60

4.2.5.5.1 Peso seco insolúvel	60
4.2.5.6 Análise de eDNA.....	62
4.2.6 Análise estatística.....	63
4.2.6.1 Variáveis de estudo.....	63
4.2.6.2 Tabulação e organização dos dados.....	63
4.2.6.3 Testes estatísticos.....	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Cepa ATCC 96901.....	66
5.1.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	66
5.1.2 Análise do peso	66
5.1.2.1 Peso seco total.....	66
5.1.2.2 Peso seco insolúvel.....	67
5.1.3 Análise de proteínas.....	67
5.1.3.1 Proteínas totais.....	67
5.1.3.2 Proteínas insolúveis	67
5.1.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	67
5.1.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP).....	68
5.1.6 Análise de eDNA.....	68
5.2 Isolado Clínico R14.....	70
5.2.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	70
5.2.2 Análise do peso	70
5.2.2.1 Peso seco total.....	70
5.2.2.2 Peso seco insolúvel.....	70
5.2.3 Análise de proteínas.....	71
5.2.3.1 Proteínas totais.....	71
5.2.3.2 Proteínas insolúveis	71
5.2.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	71
5.2.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP).....	71
5.2.6 Análise de eDNA.....	71
5.3 Isolado Clínico R70.....	73
5.3.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	73
5.3.2 Análise do peso	73
5.3.2.1 Peso seco total.....	73
5.3.2.2 Peso seco insolúvel.....	73

5.3.3 Análise de proteínas.....	74
5.3.3.1 Proteínas totais.....	74
5.3.3.2 Proteínas insolúveis	74
5.3.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP).....	74
5.3.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP).....	74
5.3.6 Análise de eDNA.....	74
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A – TESTES ESTATÍSTICOS.....	94

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é uma das espécies mais prevalentes e patogênicas da cavidade oral humana, ela tem sido associada a manifestações clínicas de infecção que variam desde lesões mucocutâneas superficiais, como Candidose Orofaríngea (OPC), até formas disseminadas da infecção^{1,2}.

As infecções causadas por *Candida spp.* são frequentemente associadas ao biofilme, que é uma microestrutura complexa de células microbianas aderidas a uma superfície e incorporadas dentro de uma matriz extracelular (MEC), composta de substâncias derivadas de lise celular ou produzidas e secretadas pelas células microbianas³. A MEC contribui para a preservação de biofilmes e para manutenção das interações estáveis entre célula-célula, célula-superfície e com o meio ambiente⁴.

Além do efeito protetor da MEC realizado pelas β -glucanas, foi demonstrado que o DNA extracelular (eDNA) é um componente decisivo da MEC do biofilme de *C. albicans*, contribuindo para a integridade estrutural do mesmo⁹. A evidência para o papel do eDNA como um componente estrutural da MEC do biofilme bacteriano surgiu a partir de estudos que mostram que o eDNA é necessário nos estágios iniciais da formação do biofilme^{10,11}. Além disso, estudos independentes que avaliaram o DNA exógeno e o efeito da DNase na susceptibilidade antimicrobiana de biofilmes^{11,12} verificaram uma associação entre eDNA e o aumento da resistência microbiana aos antibióticos⁵⁻⁸.

Para tratamento da OPC são utilizados os antifúngicos poliênicos, azóis e equinocandinas¹³. Dentre os medicamentos tópicos, a Nistatina tem se mostrado eficaz no alívio dos sinais e sintomas clínicos da doença, entretanto, muitas vezes não inativam 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, reduzindo a eficácia deste medicamento¹. A prescrição de antifúngicos sistêmicos (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) é realizada para indivíduos com saúde geral comprometida e em episódios de infecções recorrentes¹⁴. Porém, é relatada a ocorrência de efeitos hepatotóxicos ou nefrotóxicos com a utilização desses medicamentos¹. Além disso, a utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC pode contribuir no desenvolvimento de resistência em espécies de *Candida*¹⁵.

A resistência antifúngica pode ser definida como a persistência ou a progressão de uma infecção após aplicação do tratamento antimicrobiano¹⁵. Algumas espécies de

Candida possuem resistência intrínseca aos medicamentos antifúngicos, especialmente ao fluconazol¹⁶. Sendo assim, uma das principais preocupações com a formação de biofilmes de *Candida* spp. é o fato de que suas células podem apresentar sensibilidade reduzida contra azóis e poliênicos, devido ao desenvolvimento de resistência¹⁷.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento utilizada no combate ao câncer, e para a inativação de microrganismos¹⁸. 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 oxigênio¹⁹. 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 provocar a inativação celular¹⁸, ocorrendo a transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), permitindo a produção de espécies reativas de oxigênio¹⁸. Dessa forma, qualquer macromolécula celular pode ser considerada como alvo para a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) e como o FS é aplicado externamente à célula, a membrana celular é considerado o alvo inicial¹⁹.

Os FSs mais utilizados na TFD são predominantemente das famílias das porfirinas²⁰ e das fenotiazinas²¹. Entretanto, uma nova classe de FS vem sendo empregada na TFD, 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 utilizada com sucesso na TFD contra o câncer, devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete²².

A TFD mediada pelo PDZ promoveu redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de *C. tropicalis* e *C. glabrata* enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a TFD. Quando avaliado o biofilme, TFD promoveu redução na viabilidade celular equivalente a 0.9 log₁₀ (UFC/mL) para *C. albicans* e 1.4 e 1.5 log₁₀ (UFC/mL) para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente²⁰. Outro estudo, utilizando modelo murino de candidose, avaliou a eficácia da TFD, mediada pelo PDZ e Luz LED na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol (ATCC e isolados clínicos)²³. Os resultados demonstraram que a TFD promoveu redução na ordem de 1.15 a 1.96 log₁₀, dependendo da cepa avaliada (R15, ATCC 96901,

respectivamente), enquanto em outra cepa (R10) não houve decréscimo na quantidade de UFC, portanto foi menos sensível à TFD.

A resistência dos biofilmes de *Candida spp.* é multifatorial e está associada a fatores como o estado fisiológico das células, a ativação de bombas de efluxo de fármacos²⁴ e o efeito protetor da MEC do biofilme realizado pelas β -glucanas, que se ligam ao fluconazol²⁵ e à anfotericina B, impedindo a penetração de fármacos no biofilme¹⁶. A utilização de enzimas pode degradar a matriz do biofilme de cepas de *Candida* susceptível a fluconazol^{26,27}, uma vez que o tratamento de biofilmes maduros com 50 μ g/mL de DNase resultou numa diminuição de 30% de biomassa de biofilme, de forma semelhante à observada para os tratamentos com proteinase K². A incubação de biofilmes maduros de 48 h de cepas susceptíveis e resistentes ao fluconazol por 5 minutos com diferentes enzimas hidrolíticas (Dextranase, β -glucanase e DNase), sozinhas ou em associação, evidenciou que a enzima DNase apresentou o melhor resultado, reduzindo significativamente o eDNA e proteínas solúveis da matriz de ambas as cepas; e polissacarídeos solúveis em água (WSP) da matriz *C. albicans* resistente (CaR)²⁸. A redução da proteína solúvel e do teor de WSP pela DNase indica que esses componentes da matriz podem estar entrelaçados com o eDNA⁷. Neste mesmo estudo, biofilmes de 48h de cepa susceptível (ATCC 90028) foram incubados com DNase por 5 min, seguido de incubação com PDZ por 20 min e exposição à Luz LED (660 nm, 50 J/cm²). Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com DNase permitiu a penetração do PDZ em camadas mais profundas de biofilme, conseqüentemente, o efeito da TFD foi potencializado, demonstrando uma redução significativa da viabilidade celular e da quantidade de eDNA da matriz do biofilme. Dessa forma, a DNase afetou a composição da matriz melhorando a penetração do fotossensibilizador e a eficácia da TFD.

Com base nos resultados deste estudo, julga-se oportuno avaliar se a aplicação da enzima DNase poderia potencializar a ação da TFD em biofilmes de cepas resistentes, melhorando a eficácia da terapia. Além disso, para aumentar a relevância do estudo e a abrangência dos resultados obtidos, serão avaliadas outras duas cepas que são isolados clínicos também resistentes ao fluconazol.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Proposição Geral

Avaliar a eficácia da enzima DNase associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana, mediada pelo Photodithazine® e Luz LED, sobre biofilmes de cepa padrão e isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol.

2.2 Proposições Específicas

- Avaliar se a associação da DNase à TFD interfere nos componentes da MEC dos biofilmes;
- Avaliar a viabilidade celular dos biofilmes após os tratamentos;
- Verificar se a cepa padrão (ATCC 96901) e os isolados clínicos (R14 e R70) se comportaram de forma semelhante de acordo com os tratamentos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biofilmes de *C. albicans*

Em 2007, Flemming et al.⁴, discorreram sobre as substâncias poliméricas extracelulares (EPS) de biofilmes, que são biopolímeros de origem microbiana em que os microrganismos do biofilme são incorporados. De acordo com os autores, as EPS determinam as condições imediatas de vida das células do biofilme afetando a porosidade, densidade, teor de água, carga, propriedades de sorção, hidrofobicidade e estabilidade mecânica. A EPS não é composta apenas de polissacarídeos, mas também por uma variedade de proteínas, glicoproteínas e glicolipídios e, em alguns casos, quantidades expressivas de DNA extracelular (eDNA). Além disso, essas substâncias são altamente hidratadas e formam uma matriz, que mantém as células do biofilme juntas e ajudam na retenção de água. Esta matriz interage com o meio ambiente, auxiliando na adesão de biofilmes às superfícies e por meio de sua propriedade de sorção, permite o sequestro de substâncias dissolvidas e particuladas do ambiente, fornecendo nutrientes para os microrganismos do biofilme. Os biofilmes possuem uma troca de material genético, ocorrendo a transferência horizontal de genes, uma vez que as células são mantidas próximas umas das outras, não estando totalmente imobilizadas, o que facilita a troca de informações genéticas. Os ácidos nucleicos têm estado em evidência, desde que foi observado a presença, em biofilmes, de eDNA que, embora já tenha sido relatado como um componente de biofilmes, era comumente considerado um remanescente de células lisadas. A matriz é uma rede que fornece estabilidade mecânica suficiente para manter um arranjo espacial por um período prolongado. Esta estabilidade é fornecida por interações hidrofóbicas, reticulação por cátions multivalentes e emaranhados de biopolímeros, na presença de eDNA. Dessa maneira, a matriz EPS parece ser mais do que apenas uma estrutura para organizar biofilmes em superfícies, pois possui um sistema altamente complexo que auxilia na integridade do biofilme com características particulares.

De acordo com Taff et al.²⁹, em 2014, a presença da matriz extracelular é um dos principais fatores que contribuem para a resistência de *Candida* em relação à atividade de fármacos como os poliênicos e azóis. Os componentes da matriz, como a β - glucana e DNA extracelular, são descritos como os principais responsáveis pela resistência do biofilme a múltiplos antifúngicos. A *Candida* spp. cria múltiplos processos para adquirir resistência aos antimicrobianos convencionais, que variam de acordo com as fases de

formação do biofilme. Na fase inicial da formação do biofilme, as bombas de efluxo colaboram para a resistência, pois ocorre um aumento transitório na atividade de bomba durante as fases de adesão e maturação do biofilme. Em contrapartida, à medida que o biofilme amadurece, as bombas de efluxo diminuem a sua atividade e mecanismos mais específicos passam a desempenhar maior função. Em biofilmes maduros, a produção da matriz extracelular, um polímero que promove a aderência e protege as células do biofilme, é uma característica que pode dificultar a penetração dos antimicrobianos, através do sequestro dos medicamentos. Os biofilmes maduros produzem matriz extracelular contendo β -1,3 glucano, que participa do sequestro de antifúngicos, como fluconazol, anfotericina B, nistatina e flucitosina, além possuir ergosterol em sua composição, que é um dos conteúdos predominantes na fase inicial de crescimento do microrganismo. Diante do exposto, os autores sugerem que os biofilmes maduros dependem menos do ergosterol para manter a fluidez da membrana, limitando a eficácia dos fármacos direcionados ao ergosterol, como os azóis e poliênicos, em grande escala. O DNA extracelular da matriz também promove resistência à anfotericina B e às equinocandinas.

Em um dos primeiros estudos em que o cristal violeta e o teste XTT são comparados para analisar a capacidade de espécies clinicamente relevantes de *Candida* e *não-Candida* em produzir biofilme, Marcos-Zambrano et al.³⁰, em 2014, avaliaram se a produção de biofilme em *Candida spp.* pode ser estudada medindo a biomassa produzida após a aplicação do corante violeta de cristal ou medindo a atividade metabólica com XTT. Para isso, 577 isolados que causam fungemia foram utilizados. Com base na produção de biomassa medida por cristal violeta e a atividade metabólica medida por XTT, as cepas foram divididas em tercís para estabelecer cortes provisórios para classificar os isolados como sendo formação de biofilme baixa, moderada ou alta e com atividade metabólica baixa, moderada ou alta. Os autores comentam que uma considerável variabilidade na produção de biofilme e atividade metabólica foi encontrada tanto entre as espécies quanto dentro das espécies. *C. tropicalis* apresentou a maior produção de biomassa, enquanto *C. glabrata* apresentou a maior atividade metabólica, e isolados de espécies *não-Candida* apresentaram a menor atividade metabólica. Os isolados foram classificados como baixa atividade metabólica, moderada atividade metabólica e alta atividade metabólica de acordo com seus pontos de corte por XTT (<0.097 , $0.097-0.2$ e > 0.2) e como baixa formação de biofilme, moderada formação de

biofilme e alta formação de biofilme de acordo com seus cortes por cristal violeta (<0.44 $0.44-1.17$ e > 1.17). A concordância categórica geral entre os procedimentos foi de 43.7%, que aumentou para $> 50\%$ para *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Zarnowski et al.³¹, em 2014, realizaram uma análise global da matriz de *Cândida albicans*, tanto *in vitro* quanto em um modelo clínico em animais. Foi investigada a função dos componentes da matriz, incluindo o impacto na resistência aos medicamentos. Nós descobrimos componentes de cada uma das classes macromoleculares (55% de proteína, 25% de carboidrato, 15% de lipídio e 5% de ácido nucleico) na matriz de biofilme de *C. albicans*. Três polissacarídeos individuais foram identificados e sugeridos para interagir fisicamente. Os autores sugerem que os polissacarídeos mais abundantes incluíram α -1,2 α -1,6-mananos ramificados (87%) associados com β -1,6-glucanos não ramificados (13%) em um complexo aparente de manano-glucano (MGCx). O polissacarídeo β -1,3-glucano compreende apenas uma pequena porção do carboidrato total da matriz. A análise proteômica da matriz funcional revelou 458 atividades distintas nos biofilmes. Os lipídios da matriz consistiam em glicerolípidos neutros (89.1%), glicerolípidos polares (10.4%) e esfingolipídios (0.5%). O exame do ácido nucleico da matriz identificou a presença de DNA, principalmente em sequências não codificantes. Vários dos componentes da matriz, incluindo proteínas e cada um dos polissacarídeos, também estavam presentes na matriz de biofilme *in vivo*, sendo clinicamente relevante. A análise de ressonância magnética nuclear demonstrou interação da matriz com o antifúngico fluconazol, consistente com um papel na grandeza elétrica do fármaco e na contribuição de múltiplos componentes da matriz. As células do biofilme vivem imersas em uma matriz autoproduzida, uma mistura de biopolímeros extracelulares, muitos dos quais não caracterizados. Dessa forma, a virulência da *Candida* está associada à sua capacidade de formar biofilmes e, uma vez estabelecidas, as infecções por biofilme são de difícil controle.

Mitchell et al.,³² no estudo de 2015, relataram que a biogênese da matriz está envolvida na entrega coordenada de polissacarídeos e que a matriz é coordenada extracelularmente e, portanto, reflete as ações cooperativas da comunidade do biofilme. Já no estudo de 2016, Mitchell et al.⁷, inferiram que a autólise provavelmente contribui para que o eDNA entre na matriz, pois a atividade da quitinase aumenta a liberação de DNA pelo *Aspergillus* em biofilmes, concluindo que a MEC do biofilme representa uma interação complexa de vários componentes macromoleculares, e que vários desses

constituintes possuem papel na proteção celular. Contudo, a função da maioria dos elementos da matriz permanece inexplorada.

Panariello et al.³³, avaliaram, em 2017, a influência da inativação dos genes *TEC1* e *EFG1* na composição da matriz extracelular e morfologia do biofilme de *C. albicans*. Para isso, a matriz extracelular de uma cepa padrão (WT, SN425) e duas cepas mutantes de *C. albicans*, *tec1* (CJN2330) e *efg1* (CJN2302), foram avaliados. Foram analisados: unidades formadoras de colônias (UFC), biomassa total (mg), polissacarídeos solúveis em água (WSPs), polissacarídeos solúveis em álcali (ASPs), proteínas da parte insolúvel dos biofilmes e proteínas da matriz, e DNA extracelular (eDNA). Em seguida, foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser. O biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) e a espessura máxima (μm) de os biofilmes foram quantificados usando COMSTAT2. Os autores observaram que o conteúdo de ASP foi mais alto no WT (média $\pm$ DP: $74.5 \pm 22.0 \mu\text{g}$), seguido por *tec1* ($44.0 \pm 24.1 \mu\text{g}$) e *efg1* ($14.7 \pm 5.0 \mu\text{g}$). A proteína se correlacionou com ASPs ($r = 0.666$) e com proteínas de matriz ($r = 0.670$) na cepa WT. A população em *efg1* correlacionada com a proteína ($r = 0.734$) e seus biofilmes exibiram a menor biomassa e biovolume. Em biofilmes *tec1*, ASP se correlacionou com eDNA ($r = 0.678$). Diante disso, os autores concluíram que a produção de ASP pode estar ligada à morfologia filamentosa das células de *C. albicans*.

Pierce et al.³⁴, em revisão de 2017, resumiram o conhecimento acumulado nas últimas duas décadas em relação à composição, estrutura e função da matriz de biofilmes de *C. albicans*. A presença de uma matriz extracelular foi considerada a principal característica do biofilme de *C. albicans*. A matriz, formada por uma conglomeração de materiais exopoliméricos com representação de todas as principais classes macromoleculares, envolve os biofilmes e confere a ele proteção do meio ambiente. Durante a infecção, isso se traduz em proteção contra as respostas imunes do hospedeiro e, talvez mais significativamente, alto níveis de resistência aos antifúngicos. A estrutura geral da matriz do biofilme também pode mudar dependendo do ambiente e das condições em que este se encontra, a exemplo das condições de fluxo, que normalmente interferem na produção de matriz do biofilme, sendo um método pelo qual os biofilmes podem aumentar a resistência da matriz estrutural em resposta às tensões mecânicas impostas por forças de cisalhamento.

Hirota et al.³⁵, em 2017, relataram que *Candida albicans* é um membro comumente encontrado na microflora humana e é um importante patógeno fúngico

oportunista humano. Uma perturbação do microbioma pode levar a doenças infecciosas causadas por vários microrganismos, incluindo *C. albicans*. Além disso, as interações entre *C. albicans* e bactérias são consideradas críticas para a saúde humana. A principal característica biológica de *C. albicans*, que impacta a saúde humana, reside em sua capacidade de formar biofilmes. Em particular, a matriz extracelular (MEC) do biofilme de *Candida* desempenha um papel multifacetado e, portanto, pode ser considerada um alvo altamente atraente para combater doenças infecciosas relacionadas ao biofilme. Além disso, DNA extracelular (eDNA) também desempenha um papel crucial na formação de biofilme de *Candida* e sua integridade estrutural induz a transição morfológica da levedura para a forma de crescimento de hifas durante o desenvolvimento do biofilme. Em conclusão, os autores afirmaram que bactérias são frequentemente encontradas com *Candida* em biofilmes polimicrobianos e que, a presença desses biofilmes tem implicações importantes na saúde humana.

Panariello et al³⁶. em 2018 caracterizaram biofilmes de *C. albicans* (Ca) e *Candida glabrata* (Cg) sensíveis(S) e resistentes(R) ao fluconazol (FLZ) na presença ou ausência de FLZ com foco nas características da matriz extracelular (MEC). Biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028 (CaS) e ATCC 96901 (CaR) e de *C. glabrata* ATCC 2001 (CgS) e ATCC 200918 (CgR) foram cultivados em Meio RPMI com ou sem FLZ a 5× a concentração inibitória mínima (37 °C / 48 h). Os biofilmes foram avaliados por unidade formadora de colônia (UFC/mL), biomassa e componentes de MEC (polissacarídeos solúveis em álcali [ASP], polissacarídeos solúveis em água [WSP], eDNA e proteínas). Os autores observaram que: 1- o FLZ reduziu o UFC/mL de todas as cepas ($p < 0.001$), exceto para CaS ($p = 0.937$); 2- A quantidade de ASP em CaS foi significativamente reduzida por FLZ ($p = 0.034$), enquanto o fármaco não teve efeito sobre os níveis de ASP em outras cepas ($p > 0.05$); 3- biomassa total e WSP foram significativamente reduzido por FLZ em todos os biofilmes ($p < 0.001$), mas os níveis de eDNA e as proteínas não foram afetadas ($p > 0,05$). Diante disso, concluíram que o FLZ interfere em biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, com redução na biomassa, que coincidiu com a redução do número de células e da quantidade de WSPs.

Em estudo de 2019 com objetivo de determinar os efeitos do tratamento com luz com luz vermelha ou azul, sem fotossensibilizador, no desenvolvimento de biofilme de *C. albicans*, Silveira et al³⁷. desenvolveram biofilmes de 48 h de *C. albicans* SN425. Após a formação, os biofilmes foram expostos duas vezes ao dia a luz azul e vermelho

(LumaCare; 420 nm e 635 nm). A densidade de energia aplicada foi de 72 J cm^{-2} para luz azul e 43.8 J cm^{-2} , 87.6 J cm^{-2} e 175.5 J cm^{-2} para luz vermelha. Os grupos controle positivo (PC) e controle negativo (NC) foram tratados duas vezes ao dia por 1 min com 0.12% clorexidina (CHX) e NaCl a 0.89% respectivamente. Os biofilmes foram analisados para unidades formadoras de colônias (UFC), peso seco e exopolissacarídeos (solúveis e insolúveis). Os autores observaram que o peso seco foi inferior ao do grupo controle negativo ($p < 0.001$) e se aproximou dos níveis do controle positivo com os tratamentos com luz vermelha e azul. As UFCs eram também menores nos grupos expostos à luz azul e luz vermelha ($p < 0.05$). Medidas de EPS solúvel e insolúvel em EPS foram reduzidos de forma variável pela exposição à luz. Em conclusão, os autores determinam que a exposição duas vezes ao dia às luzes azul e vermelha afetam o biofilme bem como o desenvolvimento e a fisiologia da produção de polissacarídeos, sendo mecanismos potenciais para o controle do biofilme de *C. albicans* e desenvolvimento de matriz.

Em 2019, McCall et al.³⁸ usaram um sistema de fluxo com imagens em tempo real para avaliar o comportamento de células de *C. albicans* à medida que aderem e crescem. Taxas de adesão celular e dispersão de *C. albicans*, fatores de transcrição e deleções com fenótipo hiperfilamentoso foram quantificadas durante 18 h de desenvolvimento do biofilme. A adesão celular sob fluxo é um processo multifásico iniciado com a rolagem da célula, então ocorre uma fixação inicial firme ao substrato. Após a fixação, as células entram em uma fase de crescimento em que se comprometem a aderir ou se dispersam. Células *C. albicans* reduziram significativamente a fixação inicial e adesão subsequente. As células aumentaram a adesão durante a fase tardia de crescimento, quando as hifas eram mais expressas. As cepas hiperfilamentares tiveram crescimento total do biofilme 10 vezes maior, mostrando que a morfogênese das hifas é importante para a manutenção da adesão no biofilme em desenvolvimento. A taxa de dispersão da biomassa de *C. albicans* foi mais importante para determinar a densidade da biomassa madura. A manutenção da adesão foi mediada em parte por Ywp1, uma proteína anteriormente pensada para regular a dispersão, portanto, funciona como uma proteína de manutenção da adesão em *C. albicans*. Os autores concluem que o fungo patógeno oportunista *Candida albicans* é capaz de aderir à mucosa oral apesar das forças criadas pelo fluxo salivar. Embora muitas proteínas de adesão fúngica tenham sido identificadas, menos se sabe sobre o desenvolvimento temporal da adesão celular e crescimento de biofilme em um ambiente de fluxo.

Em revisão de literatura de 2020, Nett e Andes³⁹, destacaram como a matriz extracelular do biofilme contribui para a patogenicidade, particularmente através do seu papel na promoção da tolerância a fármacos antifúngicos e evasão imunológica. Os autores inferem que a produção de matriz extracelular, uma propriedade definidora da formação de biofilme, é fundamental para fornecer essa tolerância, tendo alguns estudos definido os polissacarídeos da matriz como a chave para componentes envolvidos na tolerância a fármacos. A matriz é formada por uma variedade de macromoléculas, incluindo proteínas (55%), carboidratos (25%), lipídios (15%) e DNA (5%). Embora o componente da matriz mais abundante seja a proteína, muito pouco se sabe sobre a função de proteínas individuais. Os autores explicam que a tolerância antifúngica de biofilmes de *Candida* se correlaciona intimamente com os polissacarídeos da matriz extracelular. A presença desses polissacarídeos contribui para a resistência de biofilmes de *Candida*, pois o mecanismo da interação fármaco-polissacarídeo forma um complexo que sequestra os fármacos, provavelmente por meio de interações não covalentes. Por fim, afirmam que esses estudos podem revelar novas estratégias para combater a infecção promovida por biofilmes.

Ao analisar as características de biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* desenvolvidos sob condições neutras ou ácidas (pH 4), Gonçalves et al.⁴⁰, em 2020, observaram que a *C. albicans* produziu biofilmes mais espessos e filamentosos sob condições neutras do que sob condições ácidas. Por outro lado, os biofilmes de *C. glabrata* foram potencializados pelas condições ácidas, sugerindo a alta adaptabilidade desta espécie. Em *C. albicans*, a quantidade de carboidrato total, medido em pH 7, foi seis vezes maior do que o medido em pH 4, e na cepa de referência, foi quase quatro vezes maior do que em condições neutras. Além disso, conteúdo superior de proteína também foi encontrado na matriz de biofilmes de *C. albicans* formados em condições neutras, mas a diferença em relação ao ambiente ácido não foi estatisticamente significativa ($p > 0.05$). Os autores concluíram que, em geral, ambas as espécies desenvolveram biofilmes, contendo maiores quantidades de componentes da matriz (proteínas e carboidratos) sob condições neutras do que em condições ácidas, embora o resultado oposto tenha sido encontrado para uma cepa de *C. glabrata*.

3.2 Resistência Antifúngica

Arévalo et al.⁴¹, em 1994, avaliaram a atividade in vitro de três antifúngicos convencionais (fluconazol, itraconazol e cetoconazol) contra 625 cepas de *Candida spp.*

provenientes de isolados clínicos, sendo 388 do *C. albicans*, 84 *C. tropicalis*, 84 *C. glabrata* e 69 *C. parapsilosis*. Para isso, foi realizada a distribuição dos antifúngicos nas placas de 96 poços contendo os microrganismos. Então foi realizada uma diluição entre os poços que resultou em concentrações variando de 50 µl/mL no primeiro poço a 0.05 µl/mL no último poço com a solução antifúngica. Os resultados mostraram que *C. albicans* é 10.0% resistentes ao itraconazol; 8.8% ao fluconazol e 1.8% resistente ao cetoconazol. Cerca de 39% de *C. tropicalis* foram resistentes ao itraconazol, 34.5% ao fluconazol e 2.4% ao cetoconazol. Para *C. glabrata* 19.1% foram resistentes ao fluconazol e 13.1% ao itraconazol; 4.4% de *C. parapsilosis* foram resistentes ao fluconazol e 1.5 ao itraconazol. Diante dos resultados, os autores concluíram que *C. tropicalis* foi a cepa mais resistente e *C. parapsilosis* a mais susceptível aos antifúngicos avaliados.

Em 1998, Hunter et al.⁴² investigaram o efeito pós-tratamento do fluconazol na flora micológica oral e na sensibilidade de isolados de *C. albicans* ao fluconazol. Para isso, amostras da cavidade bucal foram coletadas de 89 pacientes HIV-positivos, dos quais 48 haviam sido expostos ao fluconazol e 41 não haviam sido expostas. Os microrganismos foram cultivados em ágar Sabouraud e Pagano Levin, e as leveduras foram identificadas por métodos padrão. A sensibilidade ao fluconazol dos isolados de *C. albicans* foi avaliada pelo ensaio de difusão em disco. *C. albicans* foi isolada em 69% dos pacientes que receberam fluconazol e em 93% dos pacientes que não receberam fluconazol ($p < 0.05$). Nove outras espécies de leveduras também foram isoladas, sendo *C. glabrata* a mais comum. 16 dos pacientes expostos ao fluconazol eram portadores de outras espécies não *C. albicans*, em comparação com apenas cinco pacientes do grupo que não recebeu fluconazol ($p < 0.01$). Todas as cepas resistentes ao fluconazol foram isoladas de pacientes com contagens de CD4 baixas (menos de 100 células/ml) e após exposições prolongadas ao fluconazol. No entanto, alguns pacientes que tiveram um tempo médio de exposição ao fluconazol maior (em meses) do que outros pacientes não desenvolveram significativamente mais resistência in vitro ou diversidade de espécies. Portanto, os autores concluíram, de acordo com os resultados deste estudo, que o tratamento de longo prazo com fluconazol pode ter efeitos significativos na flora bucal, particularmente em um paciente com contagem de CD4 inferior a 100 células/mL.

A resistência de *Candida* aos antifúngicos azólicos para o tratamento de infecções mucosas foi avaliada por Sanguinetti et al.⁴³, em 2004, através das alterações no gene de *C. glabrata* ERG11 (CgERG11), que codifica a enzima alvo do azol, e a regulação

positiva dos genes CgCDR1 e CgCDR2, que codificam as bombas de efluxo. Para isso, os mecanismos moleculares de 29 isolados clínicos de *C. glabrata* diferentes foram testados, dos quais 20 isolados eram resistentes e 9 eram suscetíveis de forma dose-dependentes (S-DD) ao fluconazol. Os isolados foram recuperados de pacientes que participavam de uma pesquisa hospitalar de 3 anos para avaliar a resistência aos antifúngicos. Quatro dos 20 isolados resistentes ao fluconazol foram analisados juntamente com isolados suscetíveis previamente retirados dos mesmos pacientes. Vinte outros isolados clínicos de *C. glabrata* sensíveis ao azol foram incluídos como controles. Os dados de MIC para todos os isolados resistentes ao fluconazol revelaram extensa resistência cruzada com os outros azóis testados (itraconazol, cetoconazol e voriconazol). As análises quantitativas de PCR em tempo real mostraram que CgCDR1 e CgCDR2, sozinhos ou em combinação, foram regulados positivamente em níveis elevados em todas as amostras, exceto em dois isolados resistentes ao fluconazol e, em menor extensão, nos isolados S-DD. Além disso, houve discreto aumento no nível relativo de expressão de CgSNQ2, que codifica um transportador de ATP podendo estar associado à resistência ao azol. Os dois isolados resistentes ao fluconazol que expressam níveis normais de CgCDR1 e CgCDR2 exibiram níveis aumentados de expressão de CgSNQ2. Por outro lado, o sequenciamento de CgERG11 e a análise de sua expressão não mostraram mutação ou regulação exacerbada em nenhum isolado de *C. glabrata*, sugerindo que CgERG11 não está envolvido na resistência aos azóis nesta espécie. Quando os isolados foram cultivados na presença de fluconazol, os perfis de expressão de todos os genes, incluindo CgERG11, não foram alterados ou foram apenas minimamente alterados nos isolados resistentes, enquanto aumento marcante nos níveis de expressão gênica, particularmente para CgCDR1 e CgCDR2, foram observados nos isolados suscetíveis ao fluconazol ou S-DD. Por fim, os inibidores do transportador de ATP (FK506) foram capazes de reverter a resistência ao azol de todos os isolados. Diante dos resultados, os autores fornecem evidências de que a regulação positiva das bombas de efluxo codificadas por CgCDR1, CgCDR2 e CgSNQ2 pode explicar a resistência azólica em isolados de *Candida*.

Em 2012, Da Silva et al.⁴⁴, avaliaram o efeito da exposição de fluconazol ou nistatina a biofilmes de *Candida albicans*, considerando a matriz de polissacarídeos extracelulares. Dessa forma, uma cepa referência de *C. albicans* (ATCC 90028) foi submetida ao teste de mínima concentração inibitória (MIC) utilizando-se o fluconazol

ou nistatina como agentes antifúngicos. Após, espécimes foram confeccionados em resina acrílica de polimetilmetacrilato (PMMA) de acordo com as recomendações do fabricante e tiveram sua rugosidade de superfície padronizada. Em seguida, os biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos na superfície dos espécimes durante 48 h. Após, os biofilmes foram expostos a fluconazol ou nistatina nas concentrações de MIC, 10 x MIC ou 100 x MIC, por 24 h. A atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada pelo teste de XTT. A produção de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis, bem como dos polissacarídeos intracelulares foi avaliada pelo método fenol-ácido sulfúrico. A arquitetura dos biofilmes e proporção de células vivas e mortas foi investigada utilizando-se microscopia confocal a laser. Os autores relatam que a presença do fluconazol ou nistatina em concentrações maiores que o MIC resultou em uma redução significativa da atividade metabólica ($p < 0.001$). Nas concentrações de 10 x MIC, biofilmes expostos ao fluconazol apresentaram quantidades significativas de polissacarídeos intracelulares ($p < 0.05$), enquanto não houve alterações na quantidade de polissacarídeos extracelulares ($p > 0.05$). A presença de nistatina também não alterou a matriz de polissacarídeos extracelulares em todas as concentrações investigadas ($p > 0.05$). A arquitetura dos biofilmes não foi afetada por ambos os agentes antifúngicos, em qualquer concentração testada ($p > 0.05$). Com conclusão, os autores afirmam que tanto para o fluconazol quanto para a nistatina, concentrações maiores que MIC reduziram a atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans*; no entanto, tais concentrações não alteraram a matriz de polissacarídeos extracelulares nem a arquitetura dos biofilmes.

Sanità et al.⁴⁵, em 2013, investigaram a suscetibilidade de 198 isolados clínicos de espécies de *Candida* contra caspofungina, anfotericina B, itraconazol e fluconazol. Para isso, as suspensões dos microrganismos foram espalhadas em placas de ágar Roswell Park Memorial Institute (RPMI). As tiras de Etest foram colocadas nas placas e a concentração inibitória mínima (MIC) foi lida após a incubação (48 h a 37 ° C). Os resultados demonstraram que *C. glabrata* apresentou os maiores valores de MIC contra caspofungina, itraconazol e fluconazol. Para anfotericina B, os valores de MIC de *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram maiores do que os de *C. albicans*. O itraconazol foi o antifúngico menos eficaz; 93.3% dos isolados de *C. glabrata*, 3.3% de *C. albicans* e 1.3% de *C. tropicalis* foram resistentes. Todos os microrganismos foram suscetíveis à caspofungina e anfotericina B. Os autores concluíram que Caspofungina e anfotericina B devem ser recomendadas como uma alternativa eficaz para o tratamento de infecções

orais por *Candida* quando o tratamento com medicamentos tópicos ou outros medicamentos sistêmicos falhou definitivamente.

Vincent et al.⁴⁶, em 2013, relatam que *C. albicans* é o principal patógeno fúngico em humanos que desenvolve resistência de maneira rápida às duas principais classes de antifúngicos: triazóis e equinocandinas. Entretanto, a resistência a anfotericina B (AmB), permanece extremamente rara. Os autores usaram o sequenciamento do genoma total de isolados clínicos resistentes a AmB, bem como cepas desenvolvidas em laboratório para identificar e investigar mutações que conferem resistência a AmB in vitro. Dessa maneira, avaliam que a resistência à AmB é rara, pois ocorreram mutações que conferem resistência e criam, simultaneamente, diversos estresses que exigem altos níveis do chaperone molecular Hsp90 para a sobrevivência celular, mesmo na ausência de AmB. Esta exigência resulta em severos estresses internos causados pelas mutações, diminuindo drasticamente a tolerância a estresses externos do hospedeiro. Portanto, os autores evidenciam outro mecanismo pelo qual o buffer Hsp90 potencializa o surgimento de novos fenótipos e, com isso, o desenvolvimento de antibióticos que criam deliberadamente tais restrições evolutivas pode ser uma estratégia para limitar o rápido surgimento de resistência aos medicamentos.

Em revisão de literatura de 2017, Whaley et al.⁴⁷, discorreram sobre a resistência azólica em infecções causadas por *C. albicans*, bem como espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, descrevendo a compreensão a base molecular de resistência aos azóis nessas espécies de fungos. Os autores relataram que antifúngicos azólicos, como o fluconazol, são frequentemente associadas ao tratamento para muitas infecções por *Candida*, pois são baratos, apresentam toxicidade limitada e estão disponíveis para administração oral. Entretanto é relatada uma resistência intrínseca desenvolvida por várias espécies de *Candida* aos antifúngicos azólicos. Essa resistência é extensivamente estudada, principalmente em *C. albicans*, onde um mecanismo de resistência identificado nesta espécie é a presença de mutações pontuais no ERG11, resultando em um aumento da resistência ao fluconazol. Os autores concluíram que, à medida que aumenta a frequência de isolados de *Candida* resistentes a azóis, torna-se essencial elucidar os mecanismos de tal resistência para preservar e melhorar a classe de antifúngicos azólicos para o tratamento de infecções por *Candida*.

Robbins et al.⁴⁸, em 2017, relataram que os azólicos têm sido a classe de fármacos antifúngicos mais amplamente difundida devido ao seu amplo espectro de atividade, perfil de segurança favorável e biodisponibilidade. Entretanto, a capacidade de um patógeno se desenvolver e se reproduzir na presença de um antimicrobiano, tem tornado esses microrganismos resistentes, fato frequentemente atribuído a mutações genéticas de ergosterol, que é o principal esteroide na membrana da célula fúngica responsável pelas características estruturais e regulatórias da membrana, como a fluidez e a permeabilidade. Os azóis bloqueiam a biossíntese do ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase codificada por ERG11 em *C. albicans*. Isso resulta na depleção de ergosterol e no acúmulo de um esteroide de membrana tóxico produzido por Erg3, que exerce um estresse na membrana quando incorporado à membrana do fungo, inibindo o processo de proliferação. Os azóis clinicamente aprovados (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol) têm atividade fungistática, principalmente contra leveduras de espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. No entanto, a natureza tipicamente fungistática dos azóis, que permite a sobrevivência de populações de fungos, combinado com o uso indiscriminado de azóis como profiláticos, resultou em resistência generalizada.

Em revisão de literatura de 2018, Revie et al⁴⁹. relataram que os microrganismos têm notável capacidade de desenvolver resistência a agentes antimicrobianos, ameaçando a eficácia do limitado arsenal de antimicrobianos, podendo causar uma grave crise de saúde pública. A escassez de antifúngicos com utilidade clínica se deve em parte às relações evolutivas próximas entre esses patógenos eucarióticos e seus hospedeiros humanos, o que limita os alvos únicos a serem explorados terapêuticamente. A ação dos antifúngicos azólicos se dá pela inibição da via biossintética do ergosterol, interrompendo a sua produção e resultando no acúmulo de esteróides intermediários tóxicos que perturbam a estabilidade da membrana e impedem o crescimento de fungos. Um dos mecanismos mais prevalentes de resistência aos azóis envolve justamente a alteração do gene alvo do fármaco, tendo substituições de aminoácidos em regiões próximas ao local de ligação com a enzima. Além disso, a super expressão do gene ERG11 via mutações de ganho de função no ativador transcricional é comumente encontrada em isolados clínicos de *C. albicans* resistentes. Alterações em outros componentes da via biossintética do ergosterol, como a perda da função de enzimas específicas, também podem permitir a resistência aos

azóis. Dessa forma, a resistência ao azol mediada por ERG3 depende intimamente dos principais reguladores da resposta ao estresse, como proteínas e enzimas.

Em 2019, Spettel et al.⁵⁰, desenvolveram um estudo com o objetivo de detectar mutações em genes de resistência de cepas resistentes aos azóis, resistentes à equinocandina ou multirresistentes usando a tecnologia de sequenciamento, que permite a análise de múltiplos mecanismos de resistência em um ambiente de alto rendimento. Para isso, quarenta isolados clínicos de *Candida* (16 cepas de *C. albicans* e 24 cepas de *C. glabrata*) resistentes aos azóis e equinocandinas foram examinados. Os genes ERG11, ERG3, TAC1 e GSC1 (FKS1) em *C. albicans*, bem como ERG11, CgPDR1, FKS1 e FKS2 em *C. glabrata* foram sequenciados e foram identificadas 54 mutações diferentes, das quais 13 não haviam sido relatadas previamente. Todos os nove isolados de *Candida* resistentes à equinocandina mostraram mutações nas regiões em FKS1, FKS2 ou GSC1. No ERG3, dois códons (trio de bases nitrogenadas) de parada prematuros homozigotos foram identificados em duas cepas de *C. albicans* altamente resistentes aos azóis e moderadamente resistentes à equinocandina. Sete mutações pontuais em ERG11 foram determinadas em *C. albicans* resistente a azóis, enquanto em *C. glabrata* resistente a azóis, nenhuma mutação ERG11 foi detectada. Em 10 de 13 *C. glabrata* resistentes a azóis, foram verificadas 12 mutações diferentes de ganho de função potencial no fator de transcrição CgPDR1, que estão associadas a uma superexpressão das bombas de efluxo CDR1/2. Os autores concluíram que o sequenciamento de última geração desses microrganismos permite uma caracterização completa de diferentes genes de resistência em uma amostra grande de cepas altamente resistentes, podendo ser diferenciadas entre mutações causais e polimorfismos.

Em 2020, Costa-de-Oliveira et al.⁵¹, relatam que o sucesso de *C. albicans* como patógeno depende muito de sua capacidade de diversidade tanto no nível genético quanto no nível morfológico e fisiológico. Alterações morfogênicas estão associadas à formação de biofilme, que desempenha um papel importante na virulência, e sua formação atua como uma barreira física que protege as células subjacentes de fármacos antifúngicos, o que reduz a sua concentração disponível. O desenvolvimento de células do biofilme é caracterizado por uma rede reguladora de genes e fatores de transcrição complexos como Efg1, Tec1, Bcr1, Brg1, Ndt80 e Rob1, que estão envolvidos na regulação da superfície celular, formação de hifas e desenvolvimento e expressão de virulência. Essas comunidades de células do biofilme de *Candida* contra-atacam a ação antifúngica por

meio de mecanismos multifatoriais como as bombas de efluxo, que atuam como transportadores de ligação de ATP (CDR1 e CDR2) e o transportador de facilitador principal (MDR1), e estão envolvidas na resistência aos azóis do biofilme *C. albicans*, principalmente nos estágios iniciais de sua formação. A matriz extracelular do biofilme também é um fator contribuinte para a resistência antifúngica em *C. albicans*, sendo os azóis e anfotericina B convencional ineficazes contra biofilmes.

3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Demidova et al.⁵², em 2005, investigaram se os corantes devem se ligar e penetrar em várias classes de microrganismo para produzir morte eficaz após a iluminação. Dessa forma, foram realizadas as interações de três fotossensibilizadores antimicrobianos: rosa bengala (RB), azul de toluidina (TB) e um conjugado de poli-L-lisina clorina (e6) (pL-ce6) com de três classes representativas de patógenos; *Escherichia coli* (bactéria gram-negativa), *Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva), *C. albicans* (levedura). Foi comparada a sobrevivência celular dependente da fluência após a iluminação com os comprimentos de onda apropriados de luz antes e depois do corante extracelular ter sido aplicado, sendo utilizada três diluições de 10 vezes da concentração celular. O pL-ce6 foi, em geral, o fotossensibilizador mais poderoso, foi igualmente eficaz, com e sem lavagem, e mostrou uma forte dependência da concentração celular. O TBO foi menos eficaz em todos os casos após o tratamento e a dependência da concentração de células foi menos pronunciada. RB foi ineficaz para *C. albicans*, mas ainda mostrou uma dependência da concentração celular. A ordem geral de suscetibilidade foi *S. aureus* > *E. coli* > *C. albicans*. Os autores concluíram que o número e o tamanho das células competem tanto pela ligação do corante disponível quanto pelas espécies reativas de oxigênio geradas extracelularmente, sendo sugerido maiores concentrações de FS e elevada fluência de luz para potencializar a inativação de *C. albicans* via TFD.

Collins et al.⁵³, em 2010, relataram que a terapia fotodinâmica mediada por porfirinas no tratamento de infecções bacterianas possui ação promissora uma vez que a foto ativação de porfirinas facilita a produção de oxigênio singlete, que danifica biomoléculas associadas a células e biofilmes. O efeito de uma porfirina catiónica em biofilmes *P. aeruginosa* (PAO1) foi avaliada expondo biofilmes estáticos a porfirinas catiónicas em diferentes níveis. Os biofilmes foram visualizados usando microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) e a viabilidade celular determinada. Em uma concentração de 100 μ M de TMP, houve morte substancial de *P. aeruginosa* (PAO1) de

tipo selvagem. A exposição a 225 μM à porfirina resultou em uma redução na viabilidade células de biofilmes PAO1. Em contraste, biofilmes mutantes (pqsA), que apresentam menos DNA extracelular, permaneceram intactos. A contagens de células recuperadas de biofilmes revelou uma redução de 4.1 para 3.9 $\log_{10}$ em células viáveis de PAO1 e pqsA, respectivamente. Esses resultados sugerem que a ação de uma porfirina catiônica fotoativada em biofilmes de *P. aeruginosa* provoca a morte direta de células individuais dentro de biofilmes e o seu descolamento no substrato, não

havendo nenhuma evidência de toxicidade.

Em 2011, Dovigo et al.⁵⁴ avaliaram a efetividade da TFD na inativação de suspensões celulares e biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, susceptível e resistente a fluconazol, por meio da utilização do FS Photogem® e da iluminação com LEDs de comprimento de onda azul (455 nm). A solução estoque de Photogem® foi preparada por meio de diluição em salina estéril e mantida ao abrigo de luz até o momento de utilizá-la. As suspensões celulares de cada cepa de *Candida* foram tratadas com 5 concentrações de Photogem® e expostas a 4 tempos de iluminação segundo as doses de luz aplicadas (14, 24, 34 ou 50 minutos). Para avaliação da viabilidade celular após a TFD, os autores utilizaram o método da contagem das colônias viáveis (UFC/mL). Para isso, após a execução dos experimentos, diluições seriadas de cada amostra (10^{-2} e 10^{-3}), foram plaqueadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, e as placas foram incubadas por 48 horas. Com relação aos biofilmes, os mesmos foram cultivados sobre um filtro de membrana de celulose e tratados com 25 mg/L de Photogem® e iluminados por 37.5 J/cm². Os resultados demonstraram que as culturas planctônicas das cepas sensíveis e resistentes foram inativadas após a TFD. Além disso, foi observado redução significativa na viabilidade do biofilme para todas as cepas de *C. albicans* e de *C. glabrata* avaliadas. Os autores demonstraram que as cepas resistentes a fluconazol apresentaram menor susceptibilidade à TFD, em comparação com as cepas susceptíveis, e que os biofilmes foram mais resistentes à terapia em relação às suspensões celulares.

Paschoal et al.⁵⁵, em 2013, investigaram o efeito antimicrobiano de uma nova fonte única de luz de diodo emissor de luz (LED) que cobre todo o espectro de luz visível além de sondas intercambiáveis em alta intensidade de energia. Para tal, sondas LED azuis e vermelhas foram usadas em diferentes tempos de exposição a diferentes concentrações ativas de Curcumina (C) e azul de toluidina (T) em suspensões planctônicas de *Streptococcus mutans* (UA 159, *S. mutans*). Então suspensões de

S. mutans foram padronizadas e submetidas a: 1- tratamento em três concentrações de FS em três exposições radiantes de uma luz LED azul (BL) e uma luz LED vermelha (RL); 2- Curcumina ou azul de toluidina sozinhos; 3- ambas as luzes LED e 4- nem FS nem iluminação LED (grupo de controle). Para isso, alíquotas das suspensões foram diluídas e cultivadas em placas de ágar sangue. O número de unidades formadoras de colônia foi calculado após 48 h. Os resultados demonstraram que os grupos submetidos a TFD apresentaram taxa de fotocuração letal para todas as concentrações de FS nas dosimetrias testadas. Em comparação com o grupo controle, quando as luzes LED e FS foram usados sozinhos não houve diminuição no número de contagens de células viáveis. Os autores concluíram que o novo dispositivo LED, em combinação com curcumina e azul de toluidina, promoveu uma fotoinativação eficaz de *S. mutans* em tempos de iluminação ultracurtos.

Em 2013, Kato et al.⁵⁶, avaliaram o potencial da TFD em uma dose subletal em alterar a patogenicidade de *C. albicans* e se as alterações induzidas por essa terapia foram mantidas nas células-filhas. Para isso, *C. albicans* foi submetida ao tratamento com o fotossensibilizador azul de metileno (0.05 mM) combinado com laser de diodo GAIAS. In vitro foi avaliado os efeitos da TFD no crescimento do microrganismo, capacidade de formação de hifa, sensibilidade ao estresse oxidativo e osmótico, integridade da parede celular e susceptibilidade ao fluconazol. In vivo foi avaliada a patogenicidade da inoculação de *C. albicans* em um modelo murino de infecção sistêmica. Os autores observaram redução na taxa de crescimento e a capacidade de o fungo formar hifas em comparação com o controle (células não tratadas). A taxa de sobrevivência dos animais tratados com TFD foi significativamente aumentada em comparação ao grupo não tratado. A TFD promoveu aumento na sensibilidade de *C. albicans* a alguns metabólitos testados, como sulfato de sódio, cafeína e peróxido de hidrogênio. O MIC para o fluconazol das células tratadas com a TFD foi reduzido. Entretanto, nenhum desses parâmetros foi alterado nas células-filhas de *C. albicans* submetidas à TFD, indicando que essa terapia apresenta efeitos transitórios. Os autores sugerem que essa terapia possa ser combinada ao fluconazol para tratar as infecções por *C. albicans*.

Rossoni et al.⁵⁷, em 2014, compararam, in vitro, a sensibilidade de biofilmes de *C. albicans* de sorotipos A (ATCC 36801) e B (ATCC 36802) para Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFD). Foram formados biofilmes, em modelo de fundo de placa, por 48 horas e em seguida submetidos ao tratamento nos seguintes grupos: 1- fotossensibilizador

e fonte de luz (P+ L+); 2- somente a aplicação da luz (L+ P-); 3 -somente a aplicação do fotossensibilizador (L- P+); 4- aplicação de solução salina como controle (L- P-). Para isso, um laser de Arseneto de Gálio-Alumínio (660 nm) foi usado como fonte de luz e azul de metileno (300 µm) como fotossensibilizador. Após o tratamento, os biofilmes foram diluídos em solução PBS e semeados em placas de Ágar Sabouraud para determinação de unidades formadoras de colônia (UFC / mL). Os resultados evidenciaram que as duas cepas estudadas foram sensíveis à TFD (L+ P+), com redução de 0.49 log₁₀ para o sorotipo A e de 2.34 log₁₀ para o sorotipo B. A aplicação do laser por si só reduziu as células do sorotipo B (0.53 log₁₀), e o uso do fotossensibilizador sozinho não teve efeito sobre as cepas testadas. Foi concluído que biofilmes in vitro de *C. albicans* são sensíveis à TFD.

Dovigo et al.²⁰, em 2013, estudaram a TFD mediada por Photodithazine® (PDZ) e associada à luz LED em 15 isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, em culturas planctônicas e de biofilme. O PDZ foi avaliado nas concentrações de 75, 100 e 125 mg e as doses de luz testadas em 18, 25.5 e 37.5 J/cm². O tempo de pré-incubação foi de 20 minutos. As amostras foram tratadas com PDZ, seguida da luz (P+L+). O delineamento experimental contou ainda com grupos tratados só com PDZ (P+L-) ou apenas com Luz LED (P-L+). As amostras do grupo controle não foram tratadas, ou seja, não foram expostas à luz nem PDZ (P-L). A avaliação da eficácia do tratamento foi avaliada por meio da contagem de unidades formadoras de colônia. Os resultados evidenciaram que a terapia fotodinâmica promoveu uma redução significativa nas suspensões de 6.4 log₁₀, 5.6 log₁₀ e 4.3 log₁₀ para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. Nos biofilmes foram observados 0.9 log₁₀, 1.4 log₁₀ e 1.5 log₁₀ para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. Em síntese, a TFD diminuiu a viabilidade celular nos isolados clínicos de *Candida* spp. Entretanto, o efeito foi mais pronunciado em cultura planctônica que em biofilme.

Quishida et al.⁵⁸, em 2015, avaliaram sucessivas aplicações de TFD mediada pelo fotossensibilizante Photodithazine® (PDZ) e Luz LED, na inativação de biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *Staphylococcus mutans* cultivados em resina acrílica. Aliquotas de 500 µL de cada suspensão celular padronizada (*C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*) foram adicionadas a placas de microtitulação de 24 poços, e foram incubadas durante 90 min a 37°C num agitador orbital em 75 rpm (fase de adesão). Após a formação do biofilme, foram realizadas 3 aplicações de TFD, onde o PDZ foi adicionado à superfície

dos biofilmes nas concentrações de 175 e 200 mg e incubado 20 min, seguida da iluminação com 37.5 J/cm^2 de Luz LED (P+L+). Também foram avaliados grupos que só foram tratados com PDZ (P+L-) ou apenas com Luz LED (P-L+), e um grupo controle onde não houve tratamento (P-L-). As amostras foram submetidas a uma ou em três aplicações consecutivas. A viabilidade celular foi determinada por contagens de colônias (UFC / mL), atividade metabólica, biomassa total e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Os dados foram analisados por uma ANOVA não paramétrica de dois fatores e testes de Tukey ($\alpha = 0.05$). Os resultados obtidos demonstraram efeito significativo ($p < 0.05$) do número de aplicações e grupos de tratamento para UFC / mL, sendo que *S. mutans* apresentou a maior suscetibilidade. A atividade metabólica do biofilme multiespécies foi significativamente reduzida ($p < 0.05$) após TFD, independente do número de aplicações. A biomassa total do biofilme foi significativamente diferente para os grupos submetidos a três aplicações API. CLSM mostrou um aumento visual de células mortas após TFD. Os autores concluíram que três aplicações consecutivas de API foram mais eficazes para reduzir a viabilidade celular e a biomassa total de biofilmes multiespécies.

Carmello et al.⁵⁹, em 2015, avaliaram os efeitos da fotoinativação de *Candida albicans* em modelo murino de candidose oral, mediada por Photodithazine® (PDZ). Dessa forma, camundongos de seis semanas de idade foram imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* para induzir candidose oral. Após cinco dias, a terapia fotodinâmica (TFD) mediada por PDZ nas concentrações (75, 100, 125 e 150 mg/L^{-1}) foi aplicada na língua dos camundongos. Em seguida, a avaliação microbiológica foi realizada através da recuperação de *C. albicans* da língua por meio de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Após 24 horas de tratamento, os animais foram mortos e as línguas removidas cirurgicamente para análise histológica. Os resultados demonstraram que TFD foi eficaz na redução de *C. albicans* na língua de camundongos usando 100 mg/L de PDZ, quando comparado ao grupo controle, onde não houve tratamento. Nenhum efeito adverso nos tecidos da língua foi verificado após TFD. Diante dos resultados, os autores avaliaram que TFD foi eficaz para a inativação de *C. albicans* sem causar nenhum efeito prejudicial nos tecidos do hospedeiro, sendo uma resposta promissora para futuros ensaios clínicos.

Em 2015, de Sousa et al.⁶⁰., determinaram como o tratamento duas vezes ao dia com luz azul afeta o desenvolvimento e a composição de um biofilme rico em matriz.

Para isso, biofilmes de *Streptococcus mutans* (UA159) foram formados em discos de hidroxiapatita revestidos com saliva por 5 dias. Os biofilmes foram expostos duas vezes ao dia a luz azul não coerente (LumaCare; 420 nm) sem um fotossensibilizador. A distância entre a luz e a amostra foi de 1,0 cm; densidade de energia de 72 J cm^{-2} ; e tempo de exposição de 12 min 56 s. Os controles positivo e negativo foram clorexidina 0.12% (CHX) duas vezes ao dia e NaCl 0.89%, respectivamente. Os biofilmes foram analisados quanto à viabilidade bacteriana, peso seco e polissacarídeos extras (insolúveis e solúveis em EPS) e intracelulares (IPS). Microscopia eletrônica de varredura de pressão variável e microscopia confocal a laser de varredura foram utilizadas para verificar a morfologia do biofilme e a viabilidade bacteriana, respectivamente. Quando os biofilmes foram expostos à luz azul duas vezes ao dia, os EPS foram reduzidos significativamente mais do que em qualquer grupo de controle (CHX e 0.89% NaCl). A viabilidade bacteriana e o peso seco também foram reduzidos em relação ao controle negativo (NaCl 0.89%) quando os biofilmes foram tratados com luz azul duas vezes ao dia. Diferentes morfologias também foram visíveis quando os biofilmes foram tratados com luz azul. Dessa maneira, os autores concluíram que o tratamento duas vezes ao dia com luz azul sem fotossensibilizador é um mecanismo promissor para a inibição do desenvolvimento de biofilme rico em matriz.

Em estudo de 2016, Hamblin⁶¹ relatou os mecanismos de ação da TFD é amplamente investigado, mas ainda não é totalmente compreendido. Envolve a absorção de um fóton de luz (com um comprimento de onda que corresponde à banda de absorção do corante) levando à excitação do corante (fotossensibilizador, FS) ao seu estado eletrônico excitado de curta duração (singlete). Este estado do FS pode sofrer uma transição eletrônica para um estado tripleto de vida muito mais longa. A vida útil mais longa permite que o FS tripleto reaja com o oxigênio ambiente por uma das duas vias fotoquímicas diferentes, chamadas de Tipo 1 e Tipo 2. O Tipo 1 envolve uma transferência de elétrons para produzir radical superóxido e, em seguida, radicais hidroxila enquanto o Tipo 2 envolve a transferência de energia para produzir oxigênio singlete de estado excitado. Ambos são espécies de oxigênio altamente reativas (ROS) que podem danificar quase todos os tipos de biomoléculas (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) e matar células. Como conclusão, os autores relatam ser necessário descobrir novas tecnologias antimicrobianas alternativas às quais os microrganismos não serão capazes de desenvolver resistência e que funcionem igualmente bem, independentemente

do estado de resistência. Nesse sentido, a TFD tem um papel importante neste caminho. Novos FS e estratégias inovadoras de potenciação fotoquímica devem ser investigados.

Em um estudo de 2016 promovido por Carmello et al.⁶², foi avaliada a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) no tratamento da candidíase oral em um modelo murino utilizando Photodithazine® (PDZ). Para isso, camundongos com seis semanas de idade foram imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* para induzir candidíase oral. Este modelo de candidíase oral foi desenvolvido para permitir o monitoramento da infecção e o estabelecimento do tratamento via TFD. Durante 5 dias consecutivos, o tratamento com TFD e nistatina mediada por PDZ foi realizado, com uma aplicação diária. Foi realizada avaliação macroscópica das lesões orais. Após cada tratamento, a língua foi esfregada para recuperar células de *C. albicans*. As colônias viáveis foram quantificadas e o número de UFC/ml determinado. Os animais foram sacrificados 24 horas e 7 dias após o tratamento e as línguas removidas cirurgicamente para análise histológica e análise da expressão de citocinas inflamatórias (IL-1, TNF- α e IL-6) por RT-qPCR. Os autores observaram que TFD mediada por PDZ foi tão eficaz quanto a nistatina (grupo NYS) na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3.2 logs₁₀, respectivamente, 24 h após o tratamento. Os animais submetidos a TFD mediada por PDZ apresentaram remissão completa das lesões orais, enquanto os animais tratados com NYS apresentaram remissão parcial das lesões orais nos dois períodos avaliados. A avaliação histológica revelou infiltrado inflamatório leve nos grupos tratados com TFD e NYS em ambos os períodos avaliados. Dessa forma, concluíram que a TFD induziu a expressão do TNF- α , quando comparado ao controle, 24 h e 7 dias após o tratamento.

Carmello et al.⁶³, em 2017, avaliaram a eficácia da TFD mediada por Photodithazine® (PDZ) associada à Luz LED, na inativação de biofilmes mono e duas espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Foram utilizadas suspensões celulares padronizadas de cada cepa para a formação do biofilme, as quais foram tratadas com 150 e 175 mg/L de PDZ por 20 min (tempo de pré-irradiação) e expostas à Luz LED a uma dose de 37.5 J/cm² (660 nm) por 9 minutos. Amostras adicionais foram tratadas com PDZ ou somente com luz, e o controle não recebeu nenhum tratamento. Os autores observaram 1.0 e 1.2 log₁₀ de redução de *C. albicans* após TFD mediada por 150 mg/mL e 175 mg/mL de PDZ, respectivamente e, da mesma forma, TFD com 150 mg/L de PDZ foi capaz de promover 1.0 e 1.1 log₁₀ de redução de *C. tropicalis* e *C. glabrata*,

respectivamente. Quando foi utilizado 175 mg/L de PDZ, obteve-se 1.6 e 1.0 log₁₀ de redução, para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos P+L-, P-L + e P-L, mostrando que a aplicação da luz ou PDZ separadamente não foi tóxico para as espécies avaliadas. Os autores concluíram que o uso de 150 mg/L de PDZ associado à Luz LED promoveu uma redução significativa na viabilidade dos microrganismos avaliados.

Alves et al.⁶⁴, em 2017, avaliaram os efeitos da TFD mediada por Photodithazine® (PDZ) e Luz LED em cepas de *C. albicans* ATCC 90028 (susceptível ao fluconazol, CaS) e *C. albicans* ATCC 96901 (resistentes ao fluconazol, CaR). Após 48 horas da formação do biofilme, as cepas foram incubadas com PDZ (100 mg/L) e, em seguida, as placas foram deixadas por 20 minutos no escuro (pré-irradiação) e iluminadas com Luz LED por 9 min (660 nm, 37.5 J/cm²). Os resultados demonstraram que TFD reduziu a viabilidade de cepa de *C. albicans*, tanto resistente como suscetível ao fluconazol. Foi observado que a cepa CaR apresentou menor susceptibilidade à TFD quando comparada com a cepa CaS. Além disso, observou-se que todas as células submetidas aos tratamentos apresentaram capacidade reduzida de adesão de 1.20 log₁₀ e 1.14 log₁₀ em comparação com os grupos controles para CaS e CaR, respectivamente. Para a cepa CaR, foi observada diferença significativa apenas entre os grupos P+L+CaR e P-L-CaR (p =0.002) e os grupos P+L+CaR e P-L+CaR, além de todos os grupos do CaS. Observou-se também que houve diferença significativa (p =0.026) na produção de fosfolipase entre as cepas avaliadas, com a cepa resistente produzindo significativamente menos enzima do que a suscetível (p <0.001). Da mesma forma que para a proteinase, também foi observada correlação significativa (p =0.004) e positiva entre a produção da enzima e os valores de log₁₀ (UFC/mL) (r =0.338), o que significa que a produção da enzima foi influenciada pela quantidade de células viáveis.

Em 2018, Hidalgo et al.⁶⁵, também avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) associada a Nistatina (NYS) no tratamento de candidose oral induzida em camundongos infectados com *Candida albicans* resistente a fluconazol (ATCC 96901). O experimento contou com a utilização de 174 camundongos com aproximadamente 5 semanas de vida. Esses animais foram imunossuprimidos com prednisolona 100 mg/kg no 1º, 5º e 13º dia de experimento. No 2º dia, os animais foram sedados com 0.1 mL de cloridrato de clorpromazina e uma suspensão de *C. albicans* foi inoculada na língua dos mesmos. Do dia 7 ao 11 os tratamentos foram realizados. No

grupo TFD foi utilizado 200 mg/L de Photodithazine (PDZ) associado à Luz LED de 50 J/cm² (grupo P+L+); no grupo (P+L-) foi utilizado apenas com PDZ; o grupo (P-L+) recebeu só Luz LED e nos animais do grupo NYS o medicamento foi aplicado uma vez ao dia. Além disso, foi avaliada a combinação de duas terapias: P+L+NYS e NYS+P+L+. Um grupo recebeu apenas inoculação de *C. albicans* (grupo P-L-) e outro grupo de animais saudáveis. Após os tratamentos, foi realizada a recuperação de *C. albicans* por meio de swabs estéreis. Então diluições seriadas foram realizadas e plaqueadas em placas de Petri com SDA. Após 48 horas de incubação a 37°C, as colônias foram quantificadas e o número de UFC/mL foi determinado. Os camundongos então foram sacrificados 24 horas e 7 dias após os tratamentos. Com os resultados, os autores relataram que a combinação das terapias promoveu redução de 2.6 log₁₀ e 2.1 log₁₀ para os grupos P+L+NYS+ e NYS+P+L+, respectivamente, 24 horas após os tratamentos. A análise macroscópica revelou remissão das lesões orais, e a análise histológica demonstrou expressiva redução da reação inflamatória no tecido que apresentou características histológicas de normalidade. Os autores concluíram que a combinação de terapias é uma alternativa para o tratamento de candidose induzida com cepas de *C. albicans* resistente ao fluconazol.

Em revisão de literatura de 2018, Hu et al⁶⁶. investigaram a atuação da terapia fotodinâmica nos biofilmes e em mecanismos mediados por espécies reativas de oxigênio (ROS), que são produzidas por fotoativação e atacam alvos adjacentes, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos presentes na matriz do biofilme. Os autores descreveram o biofilme como uma população microbiana envolvida por uma matriz extracelular auto secretada, composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. As substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que representam cerca de 90% do peso total do biofilme, contribuem para a complexidade estrutural e resistência do biofilme. A matriz é definida como a primeira linha de defesa do biofilme, agindo contra a difusão de antimicrobianos e restringindo a penetração do fotosensibilizador (FS). A membrana citoplasmática do fungo, outro fator contribuinte na proteção, possui uma bicamada fosfolipídica constituída de proteínas e a superfície celular de *C. albicans* possui uma parede celular complexa contendo principalmente quitina, glucana e glicoproteínas. A terapia fotodinâmica necessita de uma luz visível com comprimento de onda específico para excitar ao fotossensibilizador, sendo uma etapa fundamental, tendo em vista que as espécies reativas (ROS) ocorrem após a irradiação, em dois mecanismos. O mecanismo

tipo I é caracterizada pela presença de um elétron de transferência que ajudará a formar espécies reativas de oxigênio tóxicas (superóxido e radicais hidroxila) e o mecanismo do tipo II produz oxigênio singlete, sendo que as duas reações podem ocorrer simultaneamente. A terapia fotodinâmica pode promover a degradação enzimática extracelular, sendo que enzimas destruidoras de EPS, como a dispersina e nucleases, podem degradar o DNA extracelular e a proteinase K. Os autores relatam ainda que as ROS atuam no enfraquecimento e degradação da estrutura da matriz e dos EPS. O processo anti-biofilme da TFD inclui duas etapas: na primeira, o fotossensibilizador inicialmente se liga à matriz do biofilme e, em algumas ocasiões, o FS pode ser sequestrado pelo EPS, enquanto em outros casos, o fotossensibilizador (FS) penetra parcialmente no EPS e entra em contato com as células microbianas. Alguns tipos de FS se ligam à célula superfície, enquanto outros tipos de FS atravessam a membrana e chegam ao citoplasma celular, podendo atingir organelas e o núcleo das células fúngicas, podendo as ROS geradas atuar em várias moléculas adjacentes, incluindo alvos dentro do biofilme (polissacarídeos), na superfície celular e dentro das células (proteínas e DNA), resultando no colapso da matriz do biofilme e desintegração de células microbiana. Na segunda etapa, as ROS promovem danos oxidativos, ocasionando a destruição da matriz do biofilme. Dessa maneira, polissacarídeos e os demais constituintes do biofilme, como proteínas, lipídios, DNA, são facilmente oxidados por ROS, em um processo irreversível. Por fim, os autores concluíram que TFD pode oxidar irreversivelmente os componentes vitais das células, promovendo oxidação de lipídeos insaturados, degradando DNA e inativando proteínas, tendo como principal consequência a alteração na permeabilidade da membrana, causando a morte das células microbianas.

Em um estudo de 2019, Ma et al.⁶⁷, investigaram in vitro o efeito antifúngico da TFD mediada por Curcumina (CUR) em biofilmes de *C. albicans*. Para esse estudo, foram utilizadas uma cepa padrão ATCC 90028, dois isolados clínicos, um de HIV (CCA1) e outro de líquen plano oral (CCA2). Os biofilmes foram fotossensibilizados com 60 μ M CUR e irradiados por diodo emissor de Luz (LED) sob comprimento de onda de 455 nm e em diferentes densidades de energia (2.64; 5.28; 7.92; 10.56; 13.2 J/cm²). Após o tratamento, os efeitos antifúngicos da TFD foram avaliados por ensaio de redução XTT e observações de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Os efeitos da TFD nos níveis de expressão de genes relacionados ao biofilme foram avaliados pelo teste PCR (qRT-PCR). Os autores observaram que as taxas de inibição dos biofilmes das diferentes

cepas (ATCC 90028, CCA1, CCA2) após a TFD foram 90.87%, 66.44% e 86.74% respectivamente ($p < 0.05$). Os níveis de expressão gênica relativa de EFG1, UME6, HGC1 e ECE1 foram todos regulados para baixo após CUR-TFD, com diminuição de 6.86; 3.38; 2.16 e 6.88 para a cepa ATCC 90028; 2.46; 2.14; 1.62 e 3.10 para CCA1 e 5.40; 2.34; 2.07 e 3.71 em CCA2 ($p < 0.05$). Diante dos resultados, os autores concluíram que a TFD mediada pela Curcumina pode efetivamente inativar biofilmes de *Candida albicans* in vitro.

Silva et al.⁶⁸, em 2019, analisaram, por meio de espectroscopia de fluorescência, biofilmes de *C. albicans* formados em cavidades ósseas artificiais e tratados com TFD mediada por diodo emissor de Luz azul (LED) a 450 nm e Curcumina como fotossensibilizador. Também foi analisada a correlação entre a eficácia da TFD e as imagens de espectroscopia de fluorescência. Para isso, lesões ósseas artificiais ($n = 40$) foram confeccionadas em ossos bovinos e inoculadas com suspensões padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) para formação de biofilme (14 dias / $36^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$). As 40 amostras foram distribuídas em quatro grupos experimentais ($n = 10$): L-C- (controle), L+C- (LED por 5 min), L-C+ (Curcumina por 5 min) e L+C+ (TFD). Aliquotas de 100 μL foram coletadas das cavidades ósseas após os tratamentos e semeadas em duplicata em Ágar Sabouraud Dextrose por 24h a $36^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ e as unidades formadoras de colônia (UFC / mL) foram contadas. Antes e depois de cada tratamento, os espécimes foram submetidos à fluorescência espectral e as imagens foram comparadas usando o programa Image J. Foi observada a redução de *C. albicans* no grupo L+C+ (TFD) e a espectroscopia de fluorescência foi correlacionada ao resultado microbiológico. Os autores concluíram que houve uma consistência entre o número de UFC/mL e os dados de pixel vermelho das imagens de fluorescência, demonstrando que o dispositivo de diagnóstico de fluorescência reflete a verdadeira condição microbiológica dos biofilmes de *C. albicans* nas cavidades ósseas durante o período pré-tratamento e pós-tratamento, proporcionando ao clínico a capacidade de verificar de forma dinâmica, simples e instantânea o desempenho do tratamento utilizado.

Tendo observado a terapia fotodinâmica como um tratamento promissor para infecções por *Candida* spp, Wiench et al.⁶⁹, em 2019, estudaram a eficácia da TFD usando Luz laser de diodo de 635 nm e azul de toluidina (TB) na eliminação de espécies de *Candida* cultivadas em superfície acrílica. Para isso, 108 placas de acrílico foram colocadas em três placas de Petri estéreis e contaminadas com suspensões de *C. albicans*,

C. glabrata e *C. krusei*. Após a formação do biofilme, as placas de acrílico foram divididas em nove grupos de estudo (B) e nove grupos controle (K). Nos grupos de estudo, as placas de acrílico com biofilme fúngico foram imersas em TB e em seguida foi aplicada a irradiação a laser com diferentes parâmetros de exposição (grupos: B1 - 400 mW, 24 J/cm², 30 s; B2 - 300 mW, 18 J/cm², 30 s; B3 - 200 mW, 12 J/cm², 30 s) separadamente para cada espécie de *Candida*. Os grupos do tipo controle continham os seguintes parâmetros: sem exposição à luz laser ou TB, tratamento apenas com TB sem irradiação laser, ou apenas irradiação laser sem imersão prévia em TB. Os cálculos das unidades formadoras de colônias (UFC) foram conduzidos usando aCOlyte (Sinbiose). Os autores relatam que em todos os grupos de estudo, a redução nas UFCs foi estatisticamente significativa e concluíram que a eficácia do TFD contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* é dependente dos parâmetros do laser e da espécie avaliada.

Jan et al.⁷⁰, em 2019, investigaram os efeitos da TFD mediada pela hipocrelina B (HB) em *C. albicans* sensível ao azol e resistente in vitro. A eficácia da TFD mediada por HB na cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 10231), isolado clínico de *C. albicans* sensível ao azol e isolado clínico de *C. albicans* resistente ao azol foram avaliadas através da captação de HB em células de *C. albicans* por meio de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Os efeitos da TFD na estrutura celular e nas características da superfície foram investigados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os autores relataram que o HB não exibiu toxicidade significativa no escuro, mas inativou *C. albicans* resistente e sensível ao azol em dose de luz dependente da concentração de FS. As imagens CLSM indicaram que as células de *C. albicans* tratadas com TFD apresentaram fluorescência mais forte em comparação com as células não tratadas. As imagens de TEM sugeriram que danos significativos à parede celular, membrana e citoplasma foram induzidos por TFD mediada por HB. A análise SEM revelou que a superfície das células de *C. albicans* se rompeu após o tratamento com TFD mediada por HB, o que não aconteceu da mesma forma só quando houve a TFD. Por fim, espécie planctônica de *C. albicans* resistente e sensível ao azol pode ser efetivamente inativada por HB na presença de luz, sendo uma alternativa promissora para o tratamento de *C. albicans*. Entretanto, foi necessário um período de irradiação mais longo para cepas resistentes.

Alves et al.,¹⁹ em 2019, investigaram a eficácia da TFD contra *C. albicans* resistente a fluconazol em modelo murino de candidose oral. Para isso, os camundongos

foram inoculados com dois isolados (R10, R15) e uma cepa de referência (ATCC) de *C. albicans* resistente para induzir candidose oral. Após a inoculação, TFD foi realizada, sendo mediada por Photodithazine® (PDZ) e Luz LED. O uso apenas do PDZ ou só da luz também foi investigado. Animais adicionais foram tratados com Nistatina (NYS), e outros não tratados ou saudáveis também foram acompanhados. A avaliação microbiológica ocorreu por meio de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *C. albicans* presentes na língua dos animais que, após 24 horas, foram sacrificados e as línguas foram removidas para análise histológica. Os resultados demonstraram que todas as cepas tiveram o mesmo comportamento após o tratamento com TFD e NYS. Uma redução significativa na viabilidade de *C. albicans* foi alcançada após ambos os tratamentos para R15 e ATCC. Nenhuma redução significativa foi verificada para *C. albicans* R10 submetido a TFD ou NYS. A análise histológica revelou que TFD não causou efeitos colaterais nos tecidos. Dessa forma, os autores concluíram que TFD foi eficaz para a inativação de duas das três cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol avaliadas.

Garcia et al.⁷¹, em 2020, compararam a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) com biofilmes de *C. albicans* formados em dois substratos diferentes - resina acrílica ou fundo de placa de poliestireno; e dois regimes de aplicação de TFD - duas vezes ao dia ao longo de 48 h ou tratamento único após 48 h de formação do biofilme. Dessa forma, biofilmes de *C. albicans* SN425 foram cultivados e depois incubados por 5 min com azul de toluidina (44 µM) usado como fotossensibilizador antes da exposição à luz vermelha (635 nm; 175.2 J/cm²) por 2 min. Como controle negativo, foi utilizada água ultrapura e como controle positivo clorexidina 0.12% (CHX). Os biofilmes foram analisados para unidades formadoras de colônias (UFC) e morfologia das células por microscopia confocal de varredura a laser. O tratamento único com TFD duas vezes ao dia em placa de poliestireno e o tratamento único em resina acrílica não reduziram significativamente o UFC ($p > 0.05$), em contraste, TFD aplicada duas vezes ao dia em resina acrílica reduziu *C. albicans* abaixo do limite de detecção, de forma semelhante ao tratamento com CHX. O tratamento TFD único na placa de poliestireno e na resina apresentou um biofilme volumoso e homogêneo, predominantemente formado por pseudo-hifas. Por outro lado, no grupo da resina, o biofilme tratado duas vezes ao dia com TFD era predominantemente formado por células de levedura, enquanto pseudo-hifas eram ocasionalmente visíveis. Diante dos resultados, os autores concluíram que

biofilmes formados em placas de poliestireno são mais resistentes a TFD do que biofilmes formados em resina acrílica. Além disso, a aplicação de TFD duas vezes ao dia reduz o desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* na resina acrílica e é uma abordagem melhor contra biofilmes de *C. albicans* do que uma única aplicação no biofilme maduro.

Em 2020, Ma et al.⁷², avaliaram os efeitos fotodinâmicos mediados pela emodina de aloe vera (AE), um composto natural isolado de Aloe vera e Rheum palmatum, em *C. albicans* sensível e resistente a azóis in vitro. AE não exibiu toxicidade significativa no escuro, mas na presença de luz, efetivamente inativou as células de *C. albicans* de uma maneira dependente da concentração utilizada. A captação de AE por células fúngicas foi investigada por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM), e os resultados mostraram que AE possui maior capacidade de entrar nas células de *C. albicans* após irradiação de luz. A análise de microscopia eletrônica de transmissão sugeriu que a TFD mediada por AE poderia induzir danos à parede celular, citoplasma e núcleo. Danos à superfície de *C. albicans* foram observados por microscopia eletrônica de varredura. Estes resultados sugerem que AE é um FS potencial para TFD em cepas de *C. albicans* resistentes a fármacos.

Em um ensaio clínico randomizado de 2020, Alves et al.⁷³, avaliaram a eficácia da TFD mediada por Photodithazine® (PDZ) para tratar pacientes com estomatite protética. Pacientes com estomatite protética foram aleatoriamente designados em grupos: 1- TFD (n = 30) e 2 - nistatina (NYS, n = 35). Os pacientes do grupo 1 receberam 6 sessões de TFD, três vezes por semana, durante 15 dias, que envolveu a aplicação tópica de PDZ (200 mg/L) por 20 minutos no palato e na prótese superior, seguido por iluminação LED (660 nm, 50 J/cm²). Para o grupo 2, os pacientes foram instruídos a utilizar, com o auxílio de um conta-gotas, a NYS por um minuto, quatro vezes ao dia, durante 15 dias. Em seguida, foram realizadas coletas do material microbiológico de próteses e palatos para análise de unidades formadoras de colônia. A viabilidade microbiana foi determinada e fotografias dos palatos foram realizadas para avaliação clínica. Os autores observaram que TFD foi mais eficaz para reduzir a microbiota total do que NYS (TFD reduziu 1.98 do palato e 1.91 log¹⁰ da prótese, enquanto o NYS reduziu 0.05 e 0.17 log₁₀, respectivamente). Além disso, TFD foi tão eficaz como NYS para reduzir *Candida spp.* (reduções de 0.68 e 0.77 log₁₀ no palato e prótese do grupo TFD, respectivamente e reduções de 0.57 e 1.43 log₁₀ no grupo NYS, respectivamente). Em relação ao aspecto clínico da lesão oral, não foi observada diferença significativa entre os grupos sendo 53.3

de melhora para os pacientes submetidos a TFD e 54.2% para os pacientes tratados com NYS. No entanto, a recorrência de SD foi observada em ambos os grupos.

Jordão et al.⁷⁴, em 2020, avaliaram se o estresse oxidativo causado pela TFD afeta a expressão de genes de *C. albicans* relacionados com adesão e formação de biofilme (ALS1 e HPW1) e resposta ao estresse oxidativo (CAP1, CAT1 e SOD1). A TFD foi mediada por dois agentes fotossensibilizadores (FSs) Photodithazine® (PDZ a 100 e 200 mg/L) ou Curcumina (CUR a 40 e 80 µM) — e Luz LED (37.5 J/cm² ou 50J/cm²). A quantificação da expressão foi realizada por Transcrição Reversa-Quantitativa da Reação em Cadeia de Polimerase (RT-qPCR) usando primers específicos para os genes alvo. Os autores relatam que foi observada uma redução na expressão de ALS1, HWP1, CAP1, CAT1 e SOD1 quando TFD foi realizada usando 200 mg/L de PDZ e 80 µM de CUR associado ao LED (37.7 e 50 J/cm², respectivamente) e usando 100 mg/L de PDZ e 40 µM CUR com LED de 50 J/cm², em comparação ao grupo controle. Além disso, a expressão dos genes CAP1 e SOD1 foi reduzida após TFD usando PDZ 100 mg/L e LED de 37.5 J/cm². Houve uma significativa redução na expressão dos genes HWP1, CAP1 e SOD1 após TFD usando 40 µM CUR e 37.5 J/cm², em relação ao grupo controle. A aplicação apenas do LED em 37.5 e 50 J/cm² promoveu a regulação negativa dos genes ALS1, CAP1, CAT1 e SOD1. Portanto, TFD mediada por PDZ e CUR associada ao LED promoveu redução na expressão dos cinco genes de *C. albicans* avaliados.

Em 2020, Dias et al⁷⁵. avaliaram o potencial de sucessivas aplicações de TFD em afetar a susceptibilidade de *C. albicans* e se a presença de fluconazol afetou a recuperação dos fungos no meio de cultura. Para isso, culturas planctônicas e biofilmes foram submetidos a sucessivas aplicações de TFD associada a Luz LED (660 nm, 34 mW/cm²) e mediado por Photodithazine® (25 mg/L). O plaqueamento era realizado em Sabouraud Dextrose Agar suplementado ou não com fluconazol para recuperar unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). As células sobreviventes foram recuperadas, recultivadas e novamente expostas ao tratamento. Os tratamentos foram realizados até que não houvesse colônias suficientes disponíveis para o recultivo e continuação do protocolo. A completa inativação do fungo foi obtida após três e cinco aplicações para culturas planctônicas e biofilmes, respectivamente. Uma redução de 6.3 log₁₀ foi observada após a terceira aplicação nas culturas planctônicas cultivadas em meio sem fluconazol, enquanto houve uma redução de 7 log₁₀ dessas culturas cultivadas em meio de fluconazol. Em biofilmes, redução de 6.1 log₁₀ ocorreu após a quinta aplicação para

culturas cultivadas em meio sem fluconazol, enquanto redução de $6.7 \log^{10}$ foi observada para as culturas cultivadas em meio com o antifúngico. Dessa maneira, a TFD foi potencializada pelo fluconazol, sendo a *C. albicans* em planctônica ou biofilme suscetíveis a aplicações sucessivas de TFD mediada por PDZ, tendo o biofilme a maior tolerância a TFD.

3.4 Utilização de Enzimas para Degradar a Matriz do Biofilme

Martins et al.⁷⁶, em 2010, examinaram a presença e a quantidade de eDNA em MEC de biofilme de *C. albicans*, o efeito do tratamento com DNase e a adição de DNA exógeno no biofilme em desenvolvimento como indicadores do eDNA no desenvolvimento de biofilme. Os autores detectaram o acúmulo de eDNA no biofilme extraído da MEC de biofilmes de *C. albicans* formados sob condições de fluxo, embora a quantidade de eDNA detectada de acordo com o crescimento condições, em particular no que diz respeito ao meio usado para crescer os biofilmes. Experiências com biofilmes de *C. albicans* formados estaticamente usando um modelo de placa de microtitulação indicou que a adição de DNA exógeno ($> 160 \text{ ng/ml}$) aumenta a biomassa do biofilme e, inversamente, o tratamento com DNase ($> 0.03 \text{ mg/ml}$) diminui a biomassa do biofilme. Portanto, o eDNA consiste em um elemento chave da MEC em biofilmes maduros de *C. albicans* e desempenha um papel predominante na integridade e manutenção estrutural do biofilme.

Com a descoberta de que o DNA extracelular (eDNA) desempenha um papel importante na integridade do biofilme, Martins et al.⁶, em 2012, investigaram a contribuição do eDNA na suscetibilidade antifúngica de biofilmes de *C. albicans* pela investigação do impacto do uso combinado de desoxirribonuclease I (DNase) e antifúngicos no tratamento de biofilmes. Biofilmes de *C. albicans* foram formados em placas de 96 poços. A atividade do uso combinado de $0.13 \text{ mg l de (-1)}$ DNase e antifúngicos foi estimada através de ensaio de redução de hidróxido de tetrazólio (XTT) e contagens de unidades formadoras de colônias. Os resultados demonstraram a eficácia melhorada da anfotericina B quando combinada com DNase contra biofilmes de *C. albicans*, conforme avaliado por meio de leituras de XTT e contagens de colônias. Além disso, a DNase aumentou a eficácia da caspofungina na redução da atividade mitocondrial, porém não foram observadas alterações em termos de células cultiváveis. Diante dos resultados, os autores concluíram que os agentes que visam processos que

afetam a integridade estrutural do biofilme podem ter uso potencial como adjuvantes de uma terapia antimicrobiana.

Em 2014, Rajedran et al.⁸, relataram que a liberação extracelular de DNA por *C. albicans* é dependente da cepa e está associada à heterogeneidade do biofilme. Para isso, cepas de *C. albicans* formadoras de biofilme espesso (HBF) ou formadores de baixo biofilme (LBF) foram tratados com DNase para elucidar o papel que o eDNA desempenha na formação de biofilme. Os autores observaram que o eDNA do biofilme foi significativamente reduzido e que a biomassa de biofilmes HBF foi diminuída em cinco vezes quando comparadas com controles não tratados. Além disso, a quantificação de eDNA ao longo do período de formação de biofilme por ensaio SYBR green demonstra um nível significativamente mais alto de 2 a 6 vezes em HBF em comparação com LBF. As análises bioquímicas e transcricionais mostraram que a atividade da quitinase, um marcador de autólise, e os níveis de mRNA de genes de quitinase foram regulados positivamente na formação de biofilme de 24 h por HBF em comparação com LBF, indicando a via de autólise possivelmente envolvida na causa da variação. As análises de correlação sugeriram que o eDNA pode ser liberado enquanto a hifa está em crescimento. Finalmente, concluem que o tratamento de biofilmes com DNase aumentou significativamente a susceptibilidade antifúngica em 2 a 8 vezes e que a liberação de eDNA por isolados clínicos de *C. albicans* é variável e é associado à formação diferencial de biofilme. Dessa maneira, a digestão do eDNA do biofilme pela DNase pode fornecer um novo caminho para desestabilizar o crescimento do biofilme e melhorar a sensibilidade antifúngica.

Gándara et al.⁷⁷, em 2017, relatam que o tratamento com luz infravermelha (NIRT) possui efeitos bactericidas e de dispersão em biofilmes. Além disso, ferramentas biológicas de dispersão, como enzimas, também são empregadas em tratamentos antibiofilme. O objetivo dos autores foi usar abordagens alternativas para aumentar a eficácia da TFD, empregando terapias combinadas com enzima proteinase k ou luz infravermelha (laser de 635 nm) no intuito de provocar a ruptura parcial dos biofilmes e, consequentemente, aumentando o potencial do fotossensibilizador (FS) ou a penetração de oxigênio. Para tanto, foi aplicado o FS azul de toluidina (TB) nos biofilmes de *Staphylococcus aureus* previamente tratados com NIRT ou enzima e o resultado das terapias foi avaliado. O FS empregado a 0.5 mM induziu redução de 2 log₁₀ na viabilidade do biofilme de *S. aureus* RN6390. O tratamento prévio com NIRT seguido de TFD

induziu uma redução adicional de 1 log₁₀ na contagem de células viáveis. O tratamento com proteinase K em *S. aureus* induziu um efeito aditivo na mortalidade via TFD, levando a uma diminuição geral de 4 log₁₀ na viabilidade de *S. aureus*. As imagens realizadas em Microscopia confocal a laser de varredura após coloração do biofilme com um teste de viabilidade fluorescente foram correlacionadas com contagens de colônias. Os autores concluem que a dose de NIRT empregada (227 J/cm²) levou a um aumento de 21 para 47°C na temperatura tampão do sistema do biofilme, e esta dose de NIRT também induziu a morte de 100% dos queratinócitos. Entretanto, mais trabalho são necessários para estabelecerem as condições sob as quais a dispersão do biofilme ocorre em doses mais baixas de NIRT.

Che net al.⁷⁸, em 2018, chamam a atenção para a importância de desenvolver novos agentes antimicrobianos, evitando a geração de resistência bacteriana. Nesse contexto, as enzimas naturais possuem potencial para destruir a integridade estrutural celular ou interferir em metabolismos de proliferação, detecção de quórum e morte programada. Além disso, em comparação com as enzimas naturais, enzimas artificiais possuem uma maior estabilidade contra condições rigorosas, possuindo atividade catalítica ajustável mais facilmente. Assim, a associação de enzimas com materiais responsivos a estímulos e modalidades terapêuticas inteligentes podem inativar microrganismos de maneira controlável. Por último, diante dos papéis-chave que os DNAs extracelulares (eDNAs) desempenham na manutenção da integridade do biofilme, é possível inferir que a enzima artificial mimética de DNase pode afetar o eDNA, inibindo a formação de biofilme e dispersando os biofilmes já formados.

Panariello et al.²⁸, em 2019, realizaram um estudo com os objetivos de avaliar os componentes da matriz do biofilme de cepas de *C. albicans* (Ca) suscetíveis (S) e resistentes ao fluconazol (R) quando expostos as enzimas hidrolíticas β-glucanase e DNase individualmente ou em combinação; aplicar o melhor protocolo enzimático associado a TFD mediado por Photodithazine® (PDZ); e verificar em microscópio confocal a penetração de PDZ em biofilmes pré-tratados ou não com DNase em diferentes períodos de incubação. Para isso, biofilmes CaS e CaR com 48h de idade foram incubados com as enzimas hidrolíticas por 5 min e avaliados pela viabilidade celular, biomassa e componentes da matriz. A DNase apresentou os melhores resultados ao reduzir significativamente o DNA extracelular (eDNA) e as proteínas solúveis da matriz de ambas as cepas; e polissacarídeos solúveis em água da matriz CaR. Posteriormente,

biofilmes com 48h de cepa susceptível foram incubados com DNase por 5 min, seguido de incubação com PDZ por 20 min e exposição à Luz LED (660 nm, 50 J/cm²). Os controles foram biofilmes tratados apenas com TFD sem DNase, apenas PDZ, PDZ + DNase, apenas luz, luz+DNase e biofilme sem tratamento. Os autores concluíram que o pré-tratamento com DNase permitiu a penetração do PDZ em camadas mais profundas do biofilme, e o efeito TFD foi potencializado, mostrando uma redução significativa da viabilidade celular ($p < 0.001$) e dos valores de eDNA ($p \leq 0.047$). Dessa maneira, a DNase afetou a composição da matriz, melhorando a penetração do fotossensibilizador e a eficácia da TFD subsequente.

Em 2020, Karygianni et al.⁷⁹, com a finalidade de estudar enzimas como modificadoras dos biofilmes orais aderidos aos tecidos duros dentais, avaliaram o impacto da DNase I e/ou proteinase K na formação de um biofilme supragengival in vitro. Para isso, biofilmes de seis espécies foram cultivados anaerobiamente na presença de DNase I e proteinase K. Após 64 h, os biofilmes foram colhidos e quantificados por análise de cultura, sendo em seguida corados para leitura em microscopia confocal de varredura a laser. As células microbianas foram coradas usando corantes de DNA ou hibridização fluorescente in situ. Exopolissacarídeos, eDNA e exoproteínas foram corados com Calcofluor, anticorpo anti-DNA e SyproTM Ruby, respectivamente. Diante dos resultados, os autores observaram que nem a DNase I nem a proteinase K tiveram um impacto significativo nas unidades formadoras de colônias (UFC) em comparação com o controle sem enzimas. No entanto, a enzima DNase I suprimiu significativamente o crescimento de *Actinomyces oris*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Candida albicans*. O tratamento com proteinase K induziu aumento significativo em UFCs de *S. mutans* e *S. oralis* ($p < 0.001$), enquanto *C. albicans* e *V. dispar* mostraram menores quantidades de UFCs em comparação com o controle. As imagens confocais realizadas demonstraram a degradação do biofilme causada pela enzima DNase I. Assim, o tratamento enzimático pode ser associado com outros agentes antimicrobianos visando a eficácia bactericida e a dispersão do biofilme.

Tan et al.⁸⁰, também em 2020, investigaram a co-imobilização de celobiose desidrogenase (CDH) e desoxirribonuclease I (DNase) em nanopartículas de quitosana carregadas positivamente (CSNPs, resultando em uma nanopartícula bifuncional (CSNP-DNase-CDH) que almeja tanto interferir na matriz do biofilme quanto nos microrganismos. Foram avaliadas as atividades antibiofilme in vitro de CSNPs contra

biofilmes monomicrobianos e polimicrobianos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. De acordo com os dados coletados, os autores afirmam que os CSNPs foram capazes de penetrar na matriz dos biofilmes e interferir nas células microbianas incorporadas, tendo a nanopartícula CSNP-DNase-CDH uma atividade mais alta do que CSNPs carregados apenas com DNase ou CDH para inibir a formação de biofilme monomicrobiano e polimicrobiano, bem como para interromper biofilmes pré-formados. Além disso, a CSNP-DNase-CDH pode interromper a formação do biofilme por meio da degradação do eDNA, reduzir a espessura do biofilme e matar as células microbianas. Diante do exposto, os autores concluíram que o CSNP bi-funcional é aplicável à proteção de dispositivos médicos de biofilmes polimicrobianos ou ao tratamento de infecções associadas a dispositivos.

Em revisão de literatura de 2020, Du e Tung⁸¹ relatam que a eficácia da TFD depende de vários fatores, sendo um resultado combinado de diferentes elementos e processos, em que a melhoria de um fator ou etapa pode potencializar a TFD. Neste sentido, as reações enzimáticas são utilizadas no acúmulo e liberação do fotossensibilizador (FS) e na geração de oxigênio. Como resultado, a eficácia da TFD é significativamente aumentada através da produção de oxigênio mediada pela enzima e pela liberação de FS. Dessa forma, os tipos de enzimas usados na TFD devem ser investigados. Até o momento, as enzimas mais associadas com TFD são MMP-2, catepsina B, HAase e catalase. No entanto, outros tipos de enzimas como a lipase e a colagenase são alvo de estudos que avaliaram a sua eficácia quando conjugadas com a TFD. Os autores explicam que devido à amplificação enzimática, uma quantidade relativamente grande de FS pode ser produzida in situ. Como resultado, a seletividade da TFD não depende apenas da posição de irradiação de luz e da localização do FS, mas também da expressão dos biomarcadores associados ao microrganismo alvo. Por fim, os autores concluem que a introdução de novas enzimas pode ampliar o efeito da fotoinativação microbiana.

4 MATERIAL E MÉTODO

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 Eletro Eletrônica Limitada, São Paulo, Brasil);
- Água Mili-Q - (Mega Purity, Billerica, USA);
- 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 *C. albicans* resistente a fluconazol, ATCC 96901 - (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA);
- Cloreto de Potássio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Cloreto de Sódio - (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil);
- Cloroformio – (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA);
- Cubetas para leitura em espectrofotômetro - (Semperlab, Araraquara, 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 cloranfenicol - (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, USA);
- 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 90 X 15 mm - (Pleion, Barueri, São Paulo, Brasil);
- Ponteira para micropipeta (100- 10000 µL) - (Kasvi, Pequim, China);
- Ponteira para micropipeta (20-200 µL) - (Axygen, Curitiba, Paraná, Brasil);
- Ponteira para micropipeta 5 mL - (Axygen, Curitiba, Paraná, Brasil);
- 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 2 mL (Axygen, Curitiba, Paraná, Brasil);
- Tubo tipo FALCON cônico (15 mL) - (Biogen, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Tubo tipo FALCON cônico (50 mL) - (Biogen, São Paulo, São Paulo, Brasil);
- Tubos de vidro 10x2x5 - (Semperlab, Araraquara, 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 Luz LED, 660 nm, (LXHL-PR09, Luxeon III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California USA), 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 Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, Brasil);
- Banho seco para microtubos – (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA);
- Centrífuga para microtubos - (Eppendorf Research, Hamburgo, Alemanha);
- Dissecador de amostras – (RVC 2–18 CD plus, Christ, Osterode am Harz, Germany);
- Espectrofotômetro - (Kasvi, Pequim, China);
- Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033. Série: 9819 - (Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Freezer -20° - (CVU30, Consul, São Paulo, Brasil);
- Freezer -80° - (REVCO, Thermo Scientific, USA);
- Leitor de microplacas tipo ELISA - (EZ Read 400, Biochrom, Cambridge, UK);
- Nanoespectrofotômetro – (DS-11, DeNovix, United States).

4.2 Método

4.2.1 Determinação da curva de crescimento dos microrganismos

Foram utilizadas três cepas *Candida albicans* neste estudo, uma cepa padrão ATCC 96901 (American Type Culture Collection, Rockville, EUA) resistente ao fluconazol e dois isolados clínicos (R14, R70) coletados de pacientes portadores do vírus HIV com lesões orais de candidose pseudomembranosa e doados pelo Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José do Campos, São Paulo.

As cepas permaneceram armazenadas em freezer -80° até o início dos experimentos, onde foram descongeladas e reativadas em placas de Petri contendo meio de cultura Sabourand Dextrose Ágar (SDA) suplementado com cloranfenicol (0.05 g/L) e incubados a 37° C por 48 h. Após esse período, 5 colônias de cada cepa foram coletadas e transferidas para 5 mL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado com glicose

(100mM), e incubadas a 37° C por 16 h, configurando o período *overnight*. Após as 16 h de incubação dos microrganismos, 0.5mL do pré-inóculo de cada cepa foram transferidos para tubos do tipo Falcon correspondentes contendo 9.5 mL do meio de cultura YNB complementado com 100 mM de glicose (diluição de 1:20). O inóculo foi incubado à 37° C e então foram realizadas leituras em espectrofotômetro (540 nm) e plaqueamento para determinação de UFC/mL, a cada uma hora, até o momento em que a curva apresentou estágio estacionário. Foram realizados três ensaios independentes para determinar a curva de crescimento dos microrganismos. Após montagem dos gráficos de linha, foi possível determinar a fase de maior crescimento exponencial (ou logarítmica) e determinar o meio dessa fase (*mid-log*) para cada cepa, como pode ser observado na Figura 1.

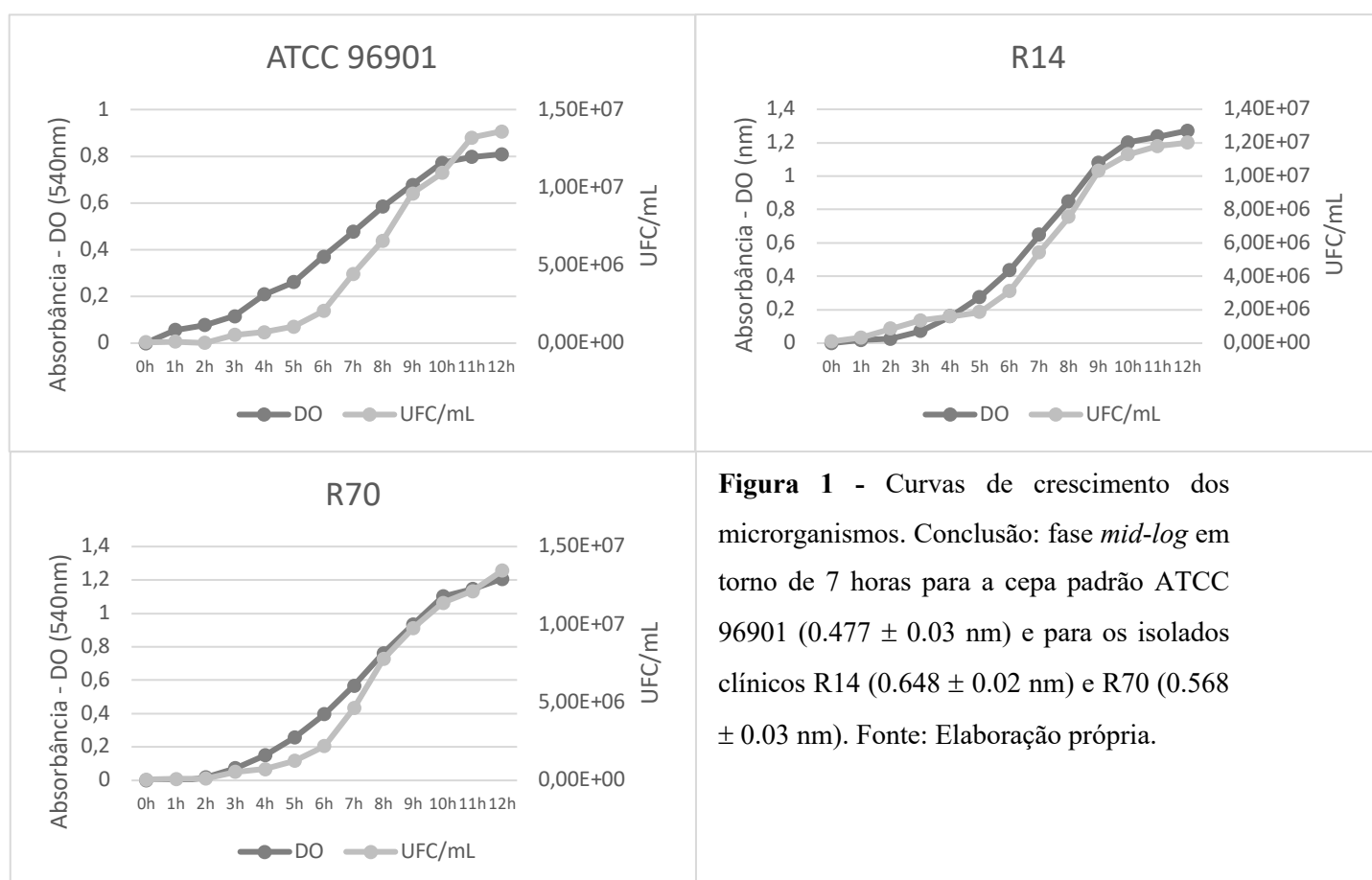


Figura 1 - Curvas de crescimento dos microrganismos. Conclusão: fase *mid-log* em torno de 7 horas para a cepa padrão ATCC 96901 (0.477 ± 0.03 nm) e para os isolados clínicos R14 (0.648 ± 0.02 nm) e R70 (0.568 ± 0.03 nm). Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados clínicos

Após determinar as curvas de crescimento dos isolados clínicos, foi realizado o MIC destas cepas a fim de confirmar a sua resistência ao fluconazol. Para isso, o fluconazol (F8929, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em água esterilizada ultrapura³⁶. Como branco, foi utilizado 100 µL de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, EUA) duas vezes concentrado mais 100 μL de água esterilizada ultrapura (sem células e agente antifúngico). Como controle, apenas as suspensões celulares foram testadas sem agente antifúngico. Foram inoculadas diluições seriadas de fluconazol (variando de 2 a 1024 $\mu\text{g/mL}$) em placas de 96 poços com suspensão de microrganismo ajustada para obter uma concentração final de inóculo de 0.5×10^3 a 2.5×10^3 UFC/mL em meio RPMI 1640 duas vezes concentrado, tamponado em pH 7,0 com tampão de ácido 3-N-morfolino propanosulfônico 0,65 M (MOPS, Research Products., Mount Prospect, Illinois, EUA)³³.

As placas foram incubadas a 35°C e observadas visualmente quanto à presença ou ausência de crescimento após 24 h. Além da análise visual, a densidade óptica de cada poço da placa foi medida em leitor de placa (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom®) a 540 nm após 24 horas de incubação. Foi também realizado o plaqueamento em SDA em duplicata e a contagem de colônia viáveis pra determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM). A CIM foi calculada com base na densidade de crescimento e foram consideradas as menores concentrações de fármaco que resultaram em redução no crescimento em comparação com o controle de crescimento livre do fármaco. E foi considerada CFM a concentração mínima que resultou em ausência de colônias. Assim, a resistência das células de *C. albicans* (R14 - 64 $\mu\text{g/mL}$ e R70 - 32 $\mu\text{g/mL}$) foi confirmada de acordo com o método de microdiluição em caldo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁸².

4.2.3 Formação dos biofilmes de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (ATCC e isolados clínicos)

Foi realizado o inóculo da cepa de *C. albicans* de referência (ATCC 96901, Rockville, MD) e de dois isolados clínicos (R14 e R70), todos resistentes ao fluconazol, conforme descrito no item 4.1 e em estudo anterior⁸³. As etapas de preparação dos pré-inóculos e inóculos dos microrganismos foram realizadas conforme descrito no item 4.1. Terminado o período de incubação do inóculo, a densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada em uma concentração aproximada de 10^6 UFC/mL, por meio de espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm¹².

Para a formação de biofilme em modelo de fundo de placa de cultura²⁸, uma alíquota de 1 mL da suspensão celular (10^6 UFC/mL) foi adicionada em cada orifício de

uma placa de 24 poços, em triplicata, e em seguida foi adicionado 1 mL de meio de RPMI 1640 tamponado com MOPS. A placa de cultura foi incubada a 37 °C sob agitação (75 rpm) por 90 min, configurando a fase de adesão. Passado o período de adesão, as amostras foram lavadas duas vezes de forma cuidadosa com 1 mL de solução PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄; pH 7.4) esterilizada para a remoção das células não aderidas e metabólitos. Em seguida, foi adicionado 1mL de meio de cultura RPMI tamponado em cada orifício. As placas foram mantidas a 37° C sob agitação durante 24 h. Após esse tempo, realizou-se a troca do meio de cultura por meio de aspiração, e lavagem dos orifícios da placa com 1 mL de solução PBS esterilizada (duas vezes). Depois da lavagem, 1 mL de RPMI foi adicionado em cada orifício e as placas foram mantidas a 37° C sob agitação por mais 24 h, totalizando o período de 48 h de incubação. Então, os biofilmes formados foram submetidos aos tratamentos.

4.2.4 Realização dos tratamentos

4.2.4.1 Preparo da enzima DNase

A solução de DNase (Sigma) foi preparada previamente a cada experimento em acetato de sódio 0.1 M. Para isto, 80 µL de DNase foi diluída em 920 µL de acetato de sódio, tendo uma concentração de 20 (unidades/mL)⁷⁶. Após 48h de formação dos biofilmes, foi removido o meio de cultura e as células aderidas foram lavadas com PBS por duas vezes. As soluções de DNase foram então adicionadas aos biofilmes. As placas foram incubadas a 37° C por 5 min de acordo com estabelecido previamente em estudo anterior.²⁸. Os controles negativos para a formação de biofilme foram tratados apenas com solução PBS. Foram realizados três ensaios independentes com quatro repetições (n=12) para cada uma das três cepas avaliadas.

4.2.4.2 Fotossensibilizador e fonte de luz

Para a TFD, a fotossensibilização dos biofilmes foi realizada com Photodithazine® (PDZ, produzido por VETA-GRAND Co., Rússia). O PDZ foi fornecido pelo Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP). O PDZ tem um pico de absorção em 660 nm e foi aplicado na concentração de 200 mg/L. Assim, antes de cada experimento, a solução-mãe de PDZ (5000 mg/L) foi diluída em solução de PBS para obter a concentração final de

200 mg/L. Esse fotossensibilizador foi irradiado com dispositivo Diodo Emissor de Luz (LED) vermelho (660 nm) na dose de 50 J/cm². Este aparelho de LED é composto por LEDs vermelhos (LXHL-PR09, Luxeon® III Emissor, Lumileds Lighting, San Jose, Califórnia, EUA) distribuídos homogeneamente, com uma potência constante de 30 mW/cm² (grupos P+L+ e P+L+DNase). Para determinar se apenas a aplicação da Luz LED, o FS ou a enzima possuem algum efeito, amostras adicionais foram apenas iluminadas (grupos P-L+; P-L+DNase), outras foram incubadas apenas com o PDZ (grupo P+L- ou P+L-DNase) e outras foram tratadas apenas com a enzima (P-L-DNase). O grupo controle foi composto por amostras que não receberam tratamento nem com o FS e nem Luz (P-L-).

4.2.4.3 Realização dos tratamentos

Os biofilmes de *C. albicans* da cepa padrão (ATCC 96901) e de dois isolados clínicos (R14 e R70) foram submetidos aos tratamentos conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Grupos experimentais. Araraquara – Brasil, 2020.

Grupo	Descrição dos tratamentos
<i>P+L+</i>	Os biofilmes foram incubados com PDZ [200 mg/L por 20 min (pré-incubação)], e iluminados com Luz LED (28 min, 50 J/cm ²) ²⁸ .
<i>P+L+ DNase</i>	Os biofilmes foram tratados com a enzima DNase I (20 units/mL) por 5 min. A DNase foi removida e então os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina e a TFD foi realizada (conforme descrito para o grupo P+L+) ²⁸ .
<i>P+L-</i>	Os biofilmes foram incubados com PDZ [200 mg/L por 20 min (pré-incubação)].
<i>P+L- DNase</i>	Os biofilmes foram tratados com DNase I (20 units/mL) por 5 min. Então, os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina e incubada com PDZ (200 mg/L, 20 min).
<i>P-L+</i>	Os biofilmes foram apenas iluminados com Luz LED vermelha (28 min, 50 J/cm ²).
<i>P-L+ DNase</i>	Os biofilmes foram tratados com a enzima DNase I (20 units/mL) por 5 min. Então, os biofilmes serão lavados duas vezes com solução salina e iluminados com Luz LED vermelha (28 min, 50 J/cm ²).
<i>P-L-DNase</i>	Os biofilmes foram tratados com a enzima DNase I (20 units/mL) por 5 min. Então, os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina.
<i>P-L-</i>	Amostras não receberam aplicação de DNase, PDZ nem iluminação com Luz LED (grupo de controle).

4.2.5 Avaliação da eficácia dos tratamentos

A avaliação da eficácia dos tratamentos foi realizada por meio dos seguintes métodos: contagem de colônias (plaqueamento), quantificação de: peso seco total e insolúvel, proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e em álcali (ASP), e DNA extracelular (eDNA).

Dessa forma, após os tratamentos descritos, os biofilmes foram lavados 3 vezes com NaCl 0.89% esterilizado. Em seguida, foi adicionado 1 mL de NaCl 0.89% em cada orifício e os biofilmes foram cuidadosamente desprendidos do fundo dos orifícios da placa com o auxílio da ponteira de uma pipeta de 100 μ L e colocados em um microtubo esterilizado, em seguida mais 1 mL de NaCl 0.89% foi adicionado nos poços, onde mais uma vez o poço foi raspado com o auxílio de uma pipeta e depois o volume foi coletado e adicionado ao microtubo de 2 mL. Por fim, os biofilmes foram então submetidos à sonicação (30 s; 7 w; 190 J)^{84,85}. Após a sonicação do volume de 2 mL, 0.1 mL foi separado para a diluição seriada e plaqueamento para realizar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e mais 0.1 mL foi separado para análise do peso seco total. O restante do volume (1.8 mL) foi centrifugado a 5.500 xg por 10 min a uma temperatura de 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 2 mL, onde posteriormente, o volume inicial (1.8 mL) foi separado em alíquotas para análise dos componentes solúveis do biofilme [WSP (1 mL), Proteínas (0.15 mL) e eDNA (0.65 mL)]. O precipitado celular, com os componentes insolúveis da MEC, foi mantido no microtubo, onde foi ressuscitado em 1 mL de água Mili-Q, tendo alíquotas separadas para quantificação de proteínas totais (0.05 mL) e determinação do peso seco insolúvel e dos polissacarídeos solúveis em álcali – ASP (0.95 mL).

4.2.5.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As diluições em série (10^{-1} a 10^{-6}) foram realizadas para cada amostra em microtubos esterilizados contendo 900 μ L de NaCl 0.89%. Então, foi plaqueado 25 μ L de cada uma das diluições, em duplicata, em placas de SDA com cloranfenicol, e as placas foram incubadas por 48 h para que fosse realizada a contagem das colônias. Após a contagem, 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:

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

q

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3, 4, 5 ou 6), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas.

4.2.5.2 Análise do peso seco^{36,86}

4.2.5.2.1 Peso seco total

Da alíquota previamente separada, 100 µL de cada amostra foram pipetados e colocados em um papel alumínio previamente pesado e etiquetado, bem como 100 µL da solução de NaCl a 0.89% utilizada em cada ocasião. As amostras foram secas em um forno a 100°C, e novamente pesadas na balança de precisão. A diferença entre o peso inicial e o peso final foi calculada e, em seguida, descontado o valor do peso da solução de NaCl a 0.89%. A valor final foi considerado o peso seco total da amostra.

4.2.5.3 Quantificação de proteínas^{87,88}

4.2.5.3.1 Solúveis

Foram diluídos 15 µL da alíquota da suspensão do biofilme para determinar a quantidade proteínas solúveis. Então, 5 µL da amostra diluída foram utilizados, em triplicata (15 µL) para a determinação de proteínas solúveis nos biofilmes usando o método de Bradford⁸⁷.

O método de Bradford⁸⁷ é baseado na adsorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250. Para isso, foram realizadas diluições seriadas de albumina de soro bovino (BSA) para obtenção de uma curva padrão, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Valores para a curva padrão do 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
1.0	200 μ L	500 μ L
1.4	750 μ L	300 μ L

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, em uma placa de 96 poços foram adicionadas alíquotas de 5 μ L, em triplicata, para cada ponto da curva e para cada amostra a ser analisada. Após, foi adicionado 250 μ L do reagente de Bradford e a placa foi incubada por 20 minutos a 37° C sob agitação orbital de 75 rpm. Em seguida, as respectivas absorbâncias a 595 nm foram determinadas em espectrofotômetro. Os dados das amostras de biofilmes foram convertidos em concentrações de proteínas, usando a equação da reta gerada (inclinação 0.020 -0.026; R^2 próximo de 1).

4.2.5.3.2 Insolúveis

Foi transferido o volume de 50 μ L para um microtubo contendo 100 μ L de esferas de vidro e 200 μ L de H₂O Milli-Q. Em seguida, as amostras foram submetidas à disrupção mecânica usando beadbeater (3vezes/ 30s), aquecidas sob agitação (100 xg / 100°C / 60 minutos). Após, houve a centrifugação das amostras (quickspin; 10.000 xg/min). O sobrenadante foi transferido para um microtubo esterilizado. Então, 5 μ L da amostra diluída foram utilizados, em triplicata (15 μ L) para a determinação de proteínas insolúveis nos biofilmes usando o método de Bradford⁸⁷, conforme descrito anteriormente.

4.2.5.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)^{36,89}

O volume de 1 mL do sobrenadante foi homogeneizado e transferido para um tubo do tipo falcon de 15 mL. A este tubo com 1mL de sobrenadante foi adicionados 2.5 volumes de etanol 95% (2.5 mL). O conteúdo do tubo foi homogeneizado e armazenado

em freezer (-20° C) durante 18 horas para ocorrer a precipitação dos polissacarídeos solúveis em água.

Após a precipitação, todas as amostras foram removidas do freezer, homogeneizadas e centrifugadas (9.500 xg/20 min/4° C). Os sobrenadantes foram descartados. As amostras foram então lavadas 3 vezes com etanol 75% gelado. Os tubos com as amostras foram agitados (usando vórtex), centrifugados e o sobrenadante foi dispensado. Posteriormente às lavagens, o precipitado foi seco ao ar e ressuspensão em 0.25 mL de água. Foi realizada uma nova agitação para homogeneizar o precipitado na solução. As amostras foram então submetidas a quantificação de carboidratos totais pelo método fenol-ácido sulfúrico⁸⁹. Este método utiliza glicose para a curva padrão (Quadro 3) e foi realizado dentro de uma capela de exaustão de gases.

Quadro 3 – Valores para a curva padrão do teste de quantificação de polissacarídeos solúveis em água – WSP pelo método fenol-ácido sulfúrico.

Tubo	0 µg	0.75 µg	1.25 µg	2.5 µg	5 µg	10 µg	15 µg	20 µg	25 µg
Água (µL)	200	199.25	198.75	197.5	195	190	185	180	175
Glicose 1%	0	0.75	1.25	2.5	5	10	15	20	25

Fonte: Elaboração própria.

Para análise de WSP, foram adicionados 200 µL de fenol 5% a cada tubo de vidro (13 mm) contendo 200 µL de cada amostra (triplicata por amostra). Os tubos foram agitados cuidadosamente. Então, foi adicionado 1mL de ácido sulfúrico a cada tubo, e os mesmos foram agitados imediatamente. Depois de 20 minutos de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de luz de 490nm. Os dados das amostras de biofilmes foram convertidos em concentrações de polissacarídeos, usando a equação da reta gerada (slope 0.048 – 0.051; R² próximo de 1).

4.2.5.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)^{36,89}

4.2.5.5.1 Peso seco insolúvel

Uma alíquota de 0.95 mL da suspensão de biofilme foi colocada imediatamente em gelo. Após a alíquota ser refrigerada, o tubo foi centrifugado (13000 xg/10 min/4° C). O sobrenadante foi cuidadosamente removido do tubo e descartado. Então, o precipitado foi seco em um concentrador de amostras por aproximadamente 3 h. Os precipitados obtidos foram pesados em balança analítica para determinação do peso seco insolúvel.

De acordo com o peso obtido, foram adicionados a cada tubo 300 μ L de 1N NaOH para cada 1 mg do peso seco do precipitado. Os microtubos foram incubados por 2h em banho seco (300 xg/37° C). Terminado o período, as amostras foram centrifugadas (13.000 xg/10 min/4° C) e os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados com o auxílio de uma pipeta e transferidos para microtubos de 2 mL, preservando somente o precipitado. Novamente, o mesmo volume de 1N NaOH (300 μ L de 1N NaOH/1 mg do peso seco) foi transferido para os tubos contendo precipitados. Os tubos foram agitados (com vórtex) para romper os precipitados e os mesmos passos acima foram repetidos para a extração de ASP, ou seja, após a incubação, as amostras foram centrifugadas (13.000 xg /10 min), o sobrenadante mais uma vez foi cuidadosamente coletado e adicionado ao mesmo microtubo de 2 mL citado anteriormente. Por fim, os precipitados foram novamente ressuspensos na quantidade inicial de NaOH e centrifugados (13.000 xg/10 min/4° C), os sobrenadantes foram novamente transferidos para os microtubos correspondentes (com os sobrenadantes previamente coletados nas etapas anteriores).

Após a extração do ASP, os mesmos ficaram em solução de 1N NaOH, e foram precipitados. Para tal, foram adicionados 3 volumes de etanol 95% gelado e as amostras foram levadas ao freezer (-20° C) pelo período de pelo menos 18 h. Passadas as 18 h, houve a precipitação dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), então, os tubos foram ser removidos do freezer, agitados e centrifugados (9.500xg / 2 0 min / 4° C). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas 3 vezes com etanol 75% gelado. As amostras de ASP foram lavadas da mesma forma que as amostras WSP.

Posteriormente à lavagem, o precipitado foi seco ao ar e ressuspense em 1N NaOH (no mesmo volume total da extração original). Em seguida, os volumes foram completados com água mili-Q esterilizada até completar o volume de 200 μ L. Por fim, as amostras estavam prontas para a quantificação de carboidratos totais usando o método com fenol e ácido sulfúrico⁸⁹, onde foi previamente construída uma curva utilizando glicose e solução de NaOH para a curva padrão (Quadro 4) em uma capela de exaustão de gases.

Quadro 4 – Valores para a curva padrão do teste de quantificação de polissacarídeos solúveis em álcali – ASP pelo método fenol-ácido sulfúrico.

Tubo	0 µg	0.75 µg	1.25 µg	2.5 µg	5 µg	10 µg	15 µg	20 µg	25 µg
Água (µL)	160	159.25	158.75	157.5	155	150	145	140	135
Glicose 1%	0	0.75	1.25	2.5	5	10	15	20	25
NaOH	40	40	40	40	40	40	40	40	40

Fonte: Elaboração própria.

O volume usado por amostra foi determinado com base no volume disponível para análise (30 a 40 µL). Assim, foi adicionado água MiliQ para completar o volume até 200 µl e as leituras da absorbância foram realizadas dentro da curva padrão previamente realizada.

4.2.5.6 Análise de eDNA^{36,90}

A quantificação de eDNA foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rice et al.⁹⁰ (2007). Para isso, foi acrescentado às alíquotas de 0.65 mL o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e, em seguida, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas em movimentos curtos e repetidos de vai-e-vem (30 vezes). Então, as amostras foram centrifugadas (13.000 xg / 20 min / 4° C) e a fase aquosa transferida para um microtubo de 2 mL. Neste novo microtubo, foi adicionado 1 volume clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e em seguida foi realizada a centrifugação (13.000 xg / 20 min / 4° C) das amostras e a transferência da fase aquosa para um novo tubo de 1.5 mL. A fase aquosa de cada amostra foi misturada com 3 volumes de etanol 99% e 1/10 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5.2) e armazenada à -20° C/18 h. O eDNA precipitado com etanol foi coletado por centrifugação (13.000 xg / 20 min / 4° C), e lavado 3 vezes com etanol 70% gelado, secado ao ar, e então dissolvido em 20 µl de tampão TE. A quantidade de eDNA foi determinada usando nano espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm.

4.2.6 Análise estatística

4.2.6.1 Variáveis de estudo

As variáveis dependentes deste estudo são os componentes da matriz que foram avaliados (UFC/mL, Peso seco total e insolúvel, Proteínas totais e insolúveis, WSP, ASP e eDNA), sendo essas variáveis manifestas e quantitativas contínua. As variáveis independentes foram representas pelos fatores que constituem o tratamento (Luz, PDZ e DNase).

4.2.6.2 Tabulação e organização dos dados

A contagem de colônias foi realizada após 48 horas do plaqueamento. Então os dados foram tabulados e convertidos em UFC/mL, conforme descrito no item 4.2.5.1.

Em relação às biomassas totais e insolúveis, após tabulação, os dados foram convertidos de gramas (g) para miligramas (mg).

Para a quantificação de proteínas, tanto as solúveis quanto as insolúveis, os valores obtidos nas leituras foram convertidos em microgramas (μg).

Os valores obtidos na extração dos polissacarídeos solúveis em água e álcali, a partir das leituras em espectrofotômetro, foram convertidos em microgramas (μg).

Por fim, para a análise de eDNA, os valores obtidos nas leituras de nano espectrofotômetro foram convertidos em nanogramas (ng).

4.2.6.3 Testes estatísticos

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. Em seguida, após os dados atenderem aos pressupostos, foi realizado o teste ANOVA three-way seguido de pós-teste de Bonferroni (APÊNDICE A) para verificação de interação entre os fatores de tratamento (Luz, PDZ e DNase; 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).

5 RESULTADOS

Os dados foram avaliados de acordo com cada variável dependente (componentes da matriz) e para cada cepa (ATCC 96901, R14 e R70), conforme descrito nas Tabelas 1, 2 e 3. Também foi observada a interação entre os fatores (Luz, PDZ e DNase), Tabela 4.

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da contagem de colônias viáveis (UFC/mL) e dos componentes da matriz extracelular dos biofilmes da cepa ATCC 96901 após os tratamentos realizados. #Aponta redução significativa em relação ao grupo controle (P-L-).

Componente		Sem PDZ				Com PDZ			
		Sem Luz		Com Luz		Sem Luz		Com Luz	
		Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
UFC/mL	Sem DNase	9.955E+06	1.456E+06	7.650E+06	1.670E+06	1.000E+07	1.610E+06	1.380E+06 [#]	7.360E+05
	Com DNase	4.080E+06 [#]	5.880E+05	4.880E+06 [#]	4.880E+06	5.100E+06	1.130E+06	1.300E+05 [#]	9.960E+04
Peso seco total (mg)	Sem DNase	5.017	1.877	4.233	1.383	4.200	1.256	4.333	1.702
	Com DNase	5.000	1.625	4.783	1.635	4.433	1.212	4.100	1.350
Peso seco insolúvel (mg)	Sem DNase	0.996	0.202	0.834	0.119	0.826	0.062	0.711	0.048
	Com DNase	0.968	0.115	0.501 [#]	0.071	0.827	0.074	0.386 [#]	0.093
Proteínas totais (µg)	Sem DNase	0.024	0.002	0.023	0.002	0.023	0.002	0.022	0.001
	Com DNase	0.021	0.001	0.022	0.001	0.022	0.001	0.021	0.001
Proteínas insolúveis (µg)	Sem DNase	0.010	0.001	0.009	0.001	0.010	0.001	0.009	0.001
	Com DNase	0.010	0.001	0.011	0.001	0.010	0.001	0.009	0.001
WSP (µg)	Sem DNase	0.060	0.001	0.054	0.002	0.059	0.002	0.049 [#]	0.001
	Com DNase	0.054	0.001	0.056	0.001	0.053	0.001	0.040 [#]	0.001
ASP (µg)	Sem DNase	0.111	0.013	0.133	0.012	0.109	0.008	0.170	0.018
	Com DNase	0.110	0.003	0.136	0.007	0.109	0.009	0.105	0.015
eDNA (ng)	Sem DNase	63.382	9.990	35.027 [#]	7.985	55.207	8.712	29.209 [#]	5.703
	Com DNase	40.880	9.418	37.376 [#]	7.700	53.909	9.207	18.825 [#]	3.933

Fonte: Elaboração própria

5.1 Cepa ATCC 96901

5.1.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Não houve interação entre os três fatores de tratamento ($p=0.519$). Dessa forma, foram analisadas as interações entre duplas de fatores de tratamentos, onde foi observado que houve interação entre Luz x DNase ($p<0.001$); PDZ x DNase ($p=0.008$) e PDZ x Luz ($p<0.001$).

Quando avaliada a viabilidade da ATCC 96901 após os tratamentos (UFC/mL), foi observado que o tratamento com DNase seguido da terapia fotodinâmica (P+L+DNase) apresentou a maior redução de UFC/mL quando comparado com os outros tratamentos. O grupo P+L+ também apresentou redução significativa, entretanto em menor escala, comparado ao grupo P+L+DNase. Ao observar o grupo controle (P-L-) e os grupos P+L+ e P+L+DNase, os valores de UFC/mL foram transformados em $\log_{10}$ para facilitar a comparação, onde foi observada a redução de 0.89 e 1.92 $\log_{10}$ de UFC/mL, respectivamente. O tratamento apenas com a enzima (P-L-DNase) também reduziu significativamente a contagem de UFC/mL em relação ao grupo P-L- (0.39 $\log_{10}$). Os grupos tratados, na presença da enzima, apenas com Luz (P-L+DNase) apresentou redução estatisticamente significativa, com redução de 0.31 $\log_{10}$ de UFC/mL em comparação com o controle (P-L-).

5.1.2 Análise do peso

5.1.2.1 Peso seco total

Não houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores do tratamento ($p=0.408$). Dessa forma, foram analisadas as interações entre duplas dos componentes de tratamentos, onde novamente não foi observada interação entre Luz x DNase ($p=0.936$); PDZ x DNase ($p=0.669$) e PDZ x Luz ($p=0.521$). Então, a interação dos componentes de tratamento foi analisada de forma individual, onde mais uma vez não foi encontrada interação entre o componente [Luz ($p=0.117$), PDZ ($p=0.337$) ou DNase ($p=0.669$)] e a variável dependente (Peso total). Desta forma, não houve interação entre os fatores de tratamento e o peso total dos biofilmes da cepa ATCC 96901 avaliados. Diante disso, é possível concluir que, para a cepa ATCC, os tratamentos não interferiram na biomassa total dos biofilmes.

5.1.2.2 Peso seco Insolúvel

Não houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0.826$). Dessa forma, foram analisadas as interações entre duplas dos fatores de tratamentos, onde foi observada interação apenas entre Luz x DNase ($p<0.001$); as demais duplas não apresentaram interação para o peso seco insolúvel: PDZ x DNase ($p=0.666$) e PDZ x Luz ($p=0.418$).

Ao avaliar o peso seco insolúvel, foi observado que o tratamento P+L+DNase apresentou redução estatisticamente significativa. O tratamento de associação entre a Luz e a enzima (P-L+DNase) também apresentou redução significativa da biomassa insolúvel. Os demais grupos se comportaram de forma semelhante ao grupo controle (P-L-)

5.1.3 Análise de proteínas

5.1.3.1 Proteínas totais

Não houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0.325$). Em seguida, foram analisadas as interações entre duplas dos fatores de tratamentos, onde novamente não foi observada interação entre Luz x DNase ($p=0.150$); PDZ x DNase ($p=0.278$) e PDZ x Luz ($p=0.600$). Então, a interação dos fatores de tratamento foi analisada de forma individual, sendo observada a interação apenas da DNase ($p<0.001$) com a variável dependente (Proteínas totais).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de proteínas solúveis dos tratamentos realizados.

5.1.3.2 Proteínas insolúveis

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0.013$). Entretanto, apesar da interação entre os fatores, os grupos se comportaram de maneira semelhante, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento avaliados.

5.1.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p<0.001$). A aplicação da DNase seguida da TFD (P+L+DNase) foi significativamente diferente dos outros grupos de tratamento e apresentou os menores valores. O tratamento com terapia fotodinâmica convencional (P+L+) também apresentou redução significativa na quantidade de WSP, e foi significativamente diferente do grupo P-L-.

5.1.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p < 0.001$). Entretanto, apesar da interação entre os fatores de tratamento, os grupos se comportaram de maneira semelhante, onde não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento.

5.1.6 Análise de eDNA

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p < 0.001$). Foi observado que a quantidade de eDNA foi significativamente menor no grupo de tratamento P+L+DNase em relação ao grupo controle (P-L-). A aplicação da TFD (P+L+) ou da Luz associada ou não à DNase (P-L+ e P-L+DNase) também apresentaram redução significativa nos valores de eDNA em relação ao grupo controle (P-L-), entretanto numa menor escala.

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão da contagem de colônias viáveis (UFC/mL) e dos componentes da matriz extracelular dos biofilmes da isolado clínico R14 após os tratamentos realizados. [#]Aponta redução significativa em relação ao grupo controle (P-L-).

Componente		Sem PDZ				Com PDZ			
		Sem Luz		Com Luz		Sem Luz		Com Luz	
		Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
UFC/mL	Sem DNase	5.923E+06	2.278E+05	4.740E+06	1.422E+05	5.317E+06	3.115E+05	5.900E+05 [#]	1.968E+05
	Com DNase	4.817E+06	1.163E+05	4.973E+06	1.280E+05	5.378E+06	1.670E+05	1.333E+05 [#]	7.691E+04
Peso seco total (mg)	Sem DNase	4.900	1.123	4.400	1.299	4.400	1.833	4.550	1.566
	Com DNase	4.967	1.496	4.733	1.646	4.533	1.738	4.233	1.061
Peso seco insolúvel (mg)	Sem DNase	1.555	0.203	1.733	0.134	1.506	0.180	1.283	0.145
	Com DNase	1.345	0.091	1.320	0.169	1.436	0.245	1.024 [#]	0.128
Proteínas totais (µg)	Sem DNase	0.027	0.003	0.025	0.002	0.025	0.001	0.024	0.001
	Com DNase	0.025	0.001	0.025	0.002	0.025	0.002	0.026	0.002
Proteínas insolúveis (µg)	Sem DNase	0.008	0.001	0.007	0.001	0.007	0.001	0.008	0.001
	Com DNase	0.007	0.001	0.008	0.001	0.008	0.001	0.007	0.001
WSP (µg)	Sem DNase	0.054	0.002	0.048	0.001	0.054	0.002	0.043 [#]	0.002
	Com DNase	0.049	0.002	0.049	0.001	0.054	0.001	0.034 [#]	0.002
ASP (µg)	Sem DNase	0.122	0.004	0.122	0.005	0.140	0.008	0.124	0.005
	Com DNase	0.123	0.004	0.123	0.004	0.123	0.004	0.121	0.004
eDNA (ng)	Sem DNase	60.061	11.512	47.659	13.184	57.060	13.572	48.463	10.454
	Com DNase	45.588	11.941	37.246 [#]	9.307	49.211	8.464	22.364 [#]	7.066

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Isolado Clínico R14

5.2.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Foi verificada a interação entre os três fatores de tratamento ($p < 0.001$). Quando avaliada a viabilidade do isolado clínico R14 após os tratamentos (UFC/mL) foi observado que o tratamento com DNase seguida da terapia fotodinâmica (P+L+DNase) apresentou redução significativa nos valores de UFC/mL quando comparado em relação ao grupo controle (P-L-). Essa redução foi de $1.65 \log_{10}$ para o grupo P+L+DNase. O tratamento com a TFD convencional (P+L+) também foi significativamente diferente do controle (P-L-), com redução de $1 \log_{10}$.

5.2.2 Análise do peso

5.2.2.1 Peso seco total

Não houve interação estatisticamente significante entre os três fatores de tratamento ($p = 0.558$). Dessa forma, foram analisadas as interações entre duplas dos fatores de tratamentos, onde novamente não foi observada interação entre Luz x DNase ($p = 0.881$); PDZ x DNase ($p = 0.634$) e PDZ x Luz ($p = 0.634$). Então, a interação dos fatores de tratamento foi analisada de forma individual, onde mais uma vez não foi encontrada interação entre o componente [Luz ($p = 0.471$), PDZ ($p = 0.296$) ou DNase ($p = 0.859$)] e a variável dependente (Peso total).

Desta forma, não houve interação entre os fatores de tratamento e o peso total dos biofilmes provenientes do isolado clínico R14, sendo possível concluir que, independente do tratamento, os valores de biomassa total não apresentaram diferença relevante.

5.2.2.2 Peso seco insolúvel

Não houve interação estatisticamente significante entre os três fatores de tratamento ($p = 0.921$). Dessa forma, foram analisadas as interações entre duplas dos fatores de tratamentos, onde foi observado que houve interação entre Luz x DNase ($p = 0.005$); PDZ x DNase ($p = 0.035$) e PDZ x Luz ($p < 0.001$). A aplicação dos três fatores de tratamento (P+L+DNase), assim como na cepa padrão, apresentou a maior redução em mg da biomassa insolúvel do biofilme em comparação ao grupo P-L-.

5.2.3 Análise de proteínas

5.2.3.1 Proteínas totais

Não houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0,808$). Em seguida, foram analisadas as interações entre duplas dos fatores de tratamentos, onde novamente não foi observada interação entre Luz x DNase ($p=0.012$); PDZ x DNase ($p=0.012$) e PDZ x Luz ($p=0.377$). Para o isolado clínico R14, foi observado que, apesar da interação entre os fatores, não houve redução dos níveis de proteínas.

5.2.3.2 Proteínas insolúveis

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0.001$). Para as proteínas insolúveis do isolado clínico R14, assim como nas proteínas da matriz, o teste detectou que, apesar da interação entre os fatores, não houve redução significativa dos níveis de proteínas.

5.2.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p<0.001$). O tratamento com os três fatores (P+L+DNase) apresentou os menores valores de polissacarídeos solúveis em água, sendo estatisticamente diferente do grupo controle (P-L-). O tratamento com TFD convencional (P+L+) também apresentou redução significativa na quantidade de WSP, porém em menor escala quando comparada com o grupo (P+L+DNase).

5.2.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p<0.001$). Entretanto, foi observado que, assim como na cepa padrão, os grupos de tratamento apresentaram níveis semelhantes de ASP.

5.2.6 Análise de eDNA

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p<0.001$). Foi observado que a quantidade de eDNA foi significativamente menor no grupo de tratamento P+L+DNase. Também foi observada redução significativa nos níveis de eDNA para os biofilmes tratados com Luz e DNase (P-L+DNase).

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão da contagem de colônias viáveis (UFC/mL) e dos componentes da matriz extracelular dos biofilmes do isolado clínico R70 após os tratamentos realizados. [#]Aponta redução significativa em relação ao grupo controle (P-L-).

Componente		Sem PDZ				Com PDZ			
		Sem Luz		Com Luz		Sem Luz		Com Luz	
		Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
UFC/mL	Sem DNase	5.227E+06	9.275E+05	5.700E+06	4.808E+05	4.977E+06	1.508E+06	2.533E+06 [#]	8.662E+05
	Com DNase	3.208E+06	9.799E+05	2.533E+06 [#]	8.662E+05	6.607E+06	9.473E+05	2.633E+05 [#]	1.558E+05
Peso seco total (mg)	Sem DNase	4.867	0.947	4.467	1.070	4.400	0.698	4.383	1.350
	Com DNase	4.750	0.973	4.500	1.202	4.533	1.116	4.333	1.328
Peso seco insolúvel (mg)	Sem DNase	1.286	0.192	1.159	0.205	1.253	0.126	1.240	0.194
	Com DNase	1.082	0.139	0.960	0.152	1.189	0.125	0.771 [#]	0.060
Proteínas totais (µg)	Sem DNase	0.030	0.001	0.029	0.001	0.028	0.001	0.028	0.001
	Com DNase	0.027	0.000	0.027	0.000	0.028	0.001	0.028	0.001
Proteínas insolúveis (µg)	Sem DNase	0.004	0.001	0.004	0.001	0.005	0.001	0.005	0.001
	Com DNase	0.003	0.000	0.004	0.000	0.005	0.001	0.004	0.000
WSP (µg)	Sem DNase	0.054	0.001	0.049	0.001	0.053	0.001	0.045 [#]	0.001
	Com DNase	0.049	0.002	0.049	0.001	0.055	0.001	0.035 [#]	0.002
ASP (µg)	Sem DNase	0.123	0.001	0.125	0.003	0.146	0.003	0.125	0.002
	Com DNase	0.124	0.002	0.126	0.002	0.126	0.003	0.122	0.002
eDNA (ng)	Sem DNase	68.707	11.694	56.888	15.410	63.985	12.113	46.575	10.505
	Com DNase	43.207 [#]	9.788	46.643	11.515	51.954	11.434	10.913 [#]	3.712

FONTE: Elaboração Própria.

5.3 Isolado Clínico R70

5.3.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Foi verificado que não houve interação entre os três fatores de tratamento ($p=0.071$). Em seguida, foram analisadas as interações entre duplas dos fatores de tratamentos, sendo observada a interação ($p<0.001$) entre Luz x DNase, PDZ x DNase e PDZ x Luz.

Em relação à viabilidade do isolado clínico R70, foi observado que tratamento P+L+DNase apresentou a maior redução em $\log_{10}$ (1.29) em relação às outras combinações de tratamento, seguido do tratamento de TFD convencional (P+L+) que apresentou redução de 0.68 $\log_{10}$, quando comparado ao grupo (P-L-). O tratamento apenas com Luz e DNase (P-L+DNase) também apresentou redução estatisticamente significativa de UFC/mL em relação ao grupo controle (P-L-).

5.3.2 Análise do peso

5.3.2.1 Peso seco total

Não houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0.712$). Dessa forma, foram analisadas as interações entre duplas dos fatores de tratamentos, onde novamente não foi observada interação entre Luz x DNase ($p=0.971$); PDZ x DNase ($p=0.854$) e PDZ x Luz ($p=0.632$). Então, a interação dos fatores de tratamento foi analisada de forma individual, onde mais uma vez não foi encontrada interação entre os componentes [Luz ($p=1.00$), PDZ ($p=0.339$) ou DNase ($p=0.303$)] e a variável dependente (Peso total). Desta forma, assim como na cepa padrão e no isolado R14, não houve interação entre os fatores de tratamento e o peso seco total dos biofilmes provenientes do isolado clínico R70, sendo possível concluir que, independente do tratamento, os valores de biomassa total não apresentaram diferença.

5.3.2.2 Peso seco Insolúvel

Foi observada a interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0.002$). A aplicação dos três fatores de tratamento (P+L+DNase) resultou em uma maior redução, em mg, da biomassa insolúvel do biofilme em comparação ao grupo (P-L-). Os demais grupos se comportaram de forma estatisticamente semelhante.

5.3.3 Análise de proteínas

5.3.3.1 Proteínas totais

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0.014$). Para o isolado clínico R70 também foi observado que, apesar da interação entre os fatores, não houve redução dos níveis de proteínas totais.

5.3.3.2 Proteínas insolúveis

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p=0.004$). Para as proteínas insolúveis do isolado clínico R70, assim como nas proteínas da matriz, o teste detectou que, apesar da interação entre os fatores, não houve redução significativa dos níveis de proteínas.

5.3.4 Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p<0.001$). O tratamento da cepa R70 com os três componentes (P+L+DNase) apresentou resultados estatisticamente diferentes do grupo controle (P-L-) com os menores valores de polissacarídeos solúveis em água. O grupo de tratamento TFD convencional (P+L+) também apresentou redução significativa na quantidade de WSP, porém em menor escala.

5.3.5 Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p<0.001$). Foi observado que, assim como na cepa padrão (ATCC) e no isolado R14, que os tratamentos apresentaram níveis de ASP estatisticamente semelhantes.

5.3.6 Análise de eDNA

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ($p<0.001$). Foi observado que a quantidade de eDNA foi significativamente menor no grupo de tratamento P+L+DNase. O grupo tratado exclusivamente com DNase também apresentou redução significativa nos valores de eDNA.

Tabela 4 - Resumo dos resultados das interações dos três fatores de tratamento (Luz, PDZ e DNase) para cada componente da matriz extracelular e cepa avaliada (ATCC 96901, R14 e R70). Os valores estatisticamente significativos estão em negrito ($\alpha = 0.05$).

Componente		Fator			Interação			
		Luz	PDZ	DNase	Luz x PDZ	Luz x DNase	PDZ x DNase	Luz x PDZ x DNase
UFC/mL	ATCC 96901	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.008	0.519
	R14	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001
	R70	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.051
Peso seco total (mg)	ATCC 96901	0.337	0.117	0.699	0.521	0.936	0.669	0.418
	R14	0.471	0.296	0.859	0.634	0.881	0.634	0.558
	R70	0.339	0.303	1.000	0.632	0.971	0.854	0.712
Peso seco insolúvel (mg)	ATCC 96901	<0.001	<0.001	<0.001	0.418	<0.001	0.666	0.826
	R14	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.005	0.035	0.921
	R70	<0.001	0.785	<0.001	0.155	0.002	0.313	0.002
Proteínas totais (µg)	ATCC 96901	0.205	0.207	<0.001	0.600	0.150	0.278	0.325
	R14	0.463	0.188	0.464	0.377	0.012	0.012	0.808
	R70	0.390	0.017	<0.001	0.004	0.015	<0.001	0.014
Proteínas insolúveis (µg)	ATCC 96901	0.278	0.344	0.143	0.070	0.076	0.381	0.013
	R14	0.856	0.397	0.413	0.146	0.878	0.749	0.001
	R70	0.072	<0.001	<0.001	0.009	0.207	0.490	0.004
WSP (µg)	ATCC 96901	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	R14	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.001
	R70	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ASP (µg)	ATCC 96901	<0.001	0.704	<0.001	0.318	<0.001	<0.001	<0.001
	R14	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.008	<0.001	<0.001
	R70	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
eDNA (µg)	ATCC 96901	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	0.019	0.202	<0.001
	R14	<0.001	0.134	<0.001	0.102	0.114	0.311	0.014
	R70	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.362	0.195	<0.001

FONTE: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Diante da baixa susceptibilidade de biofilmes de *C. albicans* resistentes à antifúngicos de classe azólica^{43,48} e à TFD convencional (fotossensibilizante e luz na presença de oxigênio)^{22,64}, a associação com enzimas tem sido sugerida como uma alternativa promissora, podendo potencializar o efeito antimicrobiano da TFD⁸¹.

Neste estudo, a utilização de DNase a 20 mg/mL combinada TFD reduziu a viabilidade celular, o peso insolúvel e as concentrações de WSP e eDNA de biofilmes de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (ATCC 96901 e isolados clínicos R14 e R70), onde foi avaliada a interação entre os fatores de tratamento (Luz, PDZ e DNase), demonstrando que, quando ocorreu a redução dos componentes da MEC avaliados, houve interação de forma conjunta ou isolada desses fatores (Tabela 4).

O grupo tratado com os três componentes avaliados (Luz, PDZ e DNase; P+L+DNase) apresentou maior redução na viabilidade correspondendo a 1.92; 1.65 e 1.29 log₁₀, para a cepa ATCC 96901, R14 e R70, respectivamente, quando comparados aos seus grupos controle (P-L-). Esses resultados demonstram que a DNase potencializa a ação da TFD independentemente da característica de resistência da cepa avaliada, uma vez que a enzima atua na hidrólise do eDNA da matriz do biofilme de *C. albicans*^{8,78}. Dessa forma, podemos sugerir que DNase facilita a penetração de PDZ na MEC dos biofilmes, potencializando o efeito da TFD e promovendo a inativação das células-alvo.

O grupo tratado exclusivamente com a TFD (P+L+) também foi estatisticamente diferente do grupo P-L-, entretanto apresentou menor redução na viabilidade celular quando comparado com o grupo P+L+DNase, correspondendo a 0.89; 1.00 e 0.68 log₁₀ para a cepa ATCC 96901, R14 e R70 em relação ao grupo controle (P-L-), respectivamente. Esses resultados podem ser justificados pelo fato do oxigênio singlete e dos radicais hidroxila possuírem meia-vida bastante curta, onde apenas as moléculas e estruturas mais próximas à área de aplicação do FS ou de exposição à luz são efetivamente alcançadas quando não há a presença da enzima DNase para facilitar a penetração de PDZ no biofilme²⁸. Foi relatado que a TFD mediada por PDZ promove redução na viabilidade de cepas de *C. albicans* susceptíveis ao fluconazol^{23,59,64}. Biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans*, quando tratados com 125mg/L de PDZ e irradiados com Luz LED (37.5 J/ cm²), apresentaram uma redução de 0.9 log₁₀²⁰. Quando aplicado o PDZ a 150 mg/L associado a uma dose de luz de 37.5 J/cm² a redução na viabilidade celular de *C. albicans* susceptível a fluconazol foi de 1.2 log₁₀⁵⁹. Em outro estudo, foi relatado que o PDZ a 200

mg/L associado a uma dose de luz de 50 J/cm² proporcionou redução de 1.32 log₁₀ na viabilidade celular de *C. albicans* ATCC 90028²⁸. Utilizando a concentração de PDZ a 100 mg/L associado à Luz LED (37,5 J/cm²), Alves et al⁶⁴., observaram a redução de 1.01 log₁₀ em *C. albicans* susceptível a fluconazol (ATCC 90028) e de 0.81 log₁₀ para cepas resistentes ao fluconazol (ATCC 96901). De maneira geral, nos estudos citados acima, a redução na viabilidade foi maior para as cepas susceptíveis do que para as resistentes. Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os relatados na literatura, onde pode ser observado que cepas resistentes ao fluconazol apresentam menor susceptibilidade à aplicação isolada da TFD.

O grupo que recebeu tratamento apenas com Luz LED a 37.5 J/cm² (P-L+) apresentou redução estatisticamente significante na contagem de UFC/mL quando comparado ao grupo P-L- para os biofilmes formados a partir da cepa ATCC 96901 e do isolado R14. O isolado R70 apresentou comportamento estatisticamente semelhante ao grupo controle (P-L-). Entretanto, a aplicação isolada da luz apresentou valores de UFC/mL mais elevados para todas as cepas avaliadas quando comparados com o grupo P+L+DNase. Foi relatado redução na contagem de colônias viáveis ao aplicar a luz vermelha sob culturas planctônicas⁵⁵. Além disso, foi relatado que o tratamento com luz vermelha e azul, sem a presença de um fotossensibilizador, preveniu o desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans*, reduzindo significativamente os valores de UFC/ mL e a biomassa, proporcionando a redução de componentes da MEC³⁷. Entretanto, em modelo de biofilme maduro, esse método possui limitações na sua efetividade devido a características antimicrobianas não seletivas e a dificuldade encontrada pela luz em penetrar camadas mais profundas do biofilme, reduzindo a sua eficácia^{37,60}.

A aplicação isolada da DNase ou a associação da enzima com a luz (P-L+DNase) reduziu a viabilidade celular para as cepas ATCC e R70 em comparação ao controle (P-L-). Foram observadas pequenas variações entre os grupos controle na presença de DNase, entretanto, a redução da viabilidade celular observada nesses grupos, foi em menor escala quando comparada ao grupo que utilizou a DNase combinada à TFD (P+L+DNase) ou a aplicação isolada da TFD (P+L+). Esses resultados corroboram com o estudo de Panariello que observou redução na viabilidade celular de biofilmes de *C. albicans* susceptíveis a fluconazol (ATCC 90028) tratados com DNase isoladamente (P-L-DNase) ou em associação com a luz (P-L+ DNase)²⁸. Os resultados obtidos neste

estudo sugerem que a DNase atua nos componentes da MEC do biofilme, independentemente da sua característica, interferindo na sua estrutura e adesão⁸⁶.

Em relação às biomassas, o peso seco total, que é constituído por células e componentes da MEC, foi estatisticamente semelhante para todos os grupos das três cepas avaliadas (ATCC 96901, R14 e R70). Os dados obtidos demonstraram que as três cepas avaliadas apresentaram redução significativa do peso seco insolúvel no grupo P+L+DNase, os demais grupos apresentaram comportamento semelhante. Em estudo anterior, não foi observada diferença significativa no peso seco total de biofilmes de *C. albicans* ATCC 96901 após serem submetidos ao tratamento com DNase²⁸. Em outro estudo, foi observada redução nos valores do peso seco total do biofilme quando a cepa ATCC 96901 foi tratada com o antifúngico fluconazol³⁵. Esses diferentes resultados observados podem ser justificados devido ao fato de existir diferentes características entre as cepas de isolados da mesma espécie⁵¹.

A quantidade das proteínas da MEC permaneceu semelhante entre os grupos de tratamento, principalmente as solúveis. Foi observado que as proteínas não são abundantes na MEC de biofilmes de *C. albicans* resistente ao fluconazol, corroborando com um estudo anterior que também observou que as proteínas não possuem níveis predominantes na MEC de biofilmes de *C. albicans* susceptíveis e resistentes ao fluconazol²⁸. Esses resultados são opostos ao de um estudo anterior que utilizou isolados clínicos provenientes de uma infecção sistêmica por *Candida* (K1)³¹, e foi demonstrado que as proteínas estão presentes em grande quantidade nos biofilmes, representando mais da metade da composição da MEC em biofilmes de *C. albicans*. As proteínas aderem aos polissacarídeos da MEC⁵³, podendo operar como uma estrutura digestiva externa que interrompe os biopolímeros extracelulares como fonte de energia¹⁸. Diante disso, nota-se a existência de uma inter-relação entre as proteínas e outros componentes da MEC, como os polissacarídeos solúveis em álcali, uma vez que em todas as cepas avaliadas e para todos os tratamentos, os níveis de proteínas e ASP se comportaram de maneira semelhante.

Em relação aos polissacarídeos solúveis em água (WSP), foi observada a interação entres os três fatores de tratamento, onde houve significativa redução de seus níveis no grupo P+L+DNase para todas as cepas avaliadas em comparação ao grupo controle (P-L-). Esses resultados corroboram com os observados em outros estudos onde a enzima DNase também reduziu os níveis de WSP^{5,6,28}. O complexo manana-glucano (MGCx)

presente na matriz do biofilme de *Candida* é formado por WSPs (α -mannanas) associados a ASPs (β -glucanos)³³, de forma que as α -mannanas são os polissacarídeos mais abundantes na matriz do biofilme fúngico, totalizando aproximadamente 87% da quantidade total de polissacarídeos, seguido pelo 1,6- β -glucano (12%) e uma pequena porcentagem de 1,3- β -glucano (1%)⁹². As interações nesse complexo são responsáveis pela resistência antifúngica do biofilme¹⁴. A estabilidade desses polissacarídeos da matriz é responsável por manter a integridade do complexo MGCx, de modo que uma redução em qualquer polissacarídeo da matriz pode aumentar a susceptibilidade do biofilme aos agentes antifúngicos³². Estudos que avaliaram os componentes da MEC do biofilme após a realização de terapias antifúngicas apontaram que, em cepas susceptíveis de *Candida*, os níveis de WSP não foram reduzidos após a realização de tratamento antifúngico, por outro lado, foi observada redução nos níveis de WSP em biofilmes resistentes após o tratamento^{28,92}. Dessa forma, uma vez que ocorre a redução na quantidade de WSP na MEC de biofilmes, diminui a sua contribuição nas interações do complexo MGCx, favorecendo a ação antimicrobiana^{32,39}. No presente estudo a redução de WSP foi acentuada quando o biofilme foi tratado com DNase, o que potencializou o efeito antimicrobiano da TFD, e ocasionou uma maior susceptibilidade dos biofilmes à terapia antifúngica^{36,40}. Assim, podemos sugerir que a DNase hidrolisa as cadeias de eDNA e interfere na organização dos complexos de exopolissacarídeos solúveis e eDNA, o que, conseqüentemente, reduz a quantidade de polissacarídeos aos quais as moléculas de eDNA estão ligadas²⁸. Portanto, ressalta-se que a TFD se mostrou eficaz na redução da quantidade de WSP presentes na MEC, onde sua associação com a enzima DNase potencializou esse efeito redutor sobre α -mannanas.

Os níveis de eDNA presentes na MEC foram significativamente reduzidos quando a enzima foi associada com a aPDT (P+L+DNase) quando comparado ao grupo controle (P-L-). Esses resultados corroboram com os obtidos por Panariello et al.²⁸ e reforçam a possibilidade do eDNA estar ligado ou circundado por componentes do complexo MGCx na matriz extracelular do biofilme, uma vez que a enzima DNase em associação a aPDT reduziu as concentrações de WSP e eDNA da MEC. O eDNA e os polissacarídeos solúveis em água estão relacionados estruturalmente, podendo apresentar ligações fortes ou fracas, o que interfere no processo de hidrólise dos polissacarídeos pelas enzimas^{31,93}. Assim, a enzima DNase, ao desorganizar essa relação, ajuda na redução de WSP em que as moléculas de eDNA estavam ligadas⁶⁰. Desta maneira, os resultados encontrados neste

estudo corroboram com estudo anterior em que também foi realizado o pré-tratamento com DNase por 5 min seguido de TFD e foi observada uma redução significativa do conteúdo de eDNA em biofilmes de *C. albicans* susceptível ao fluconazol²⁸. Essa redução no conteúdo de eDNA pode ser considerada como um fator importante para a inativação de biofilmes resistentes, uma vez que o eDNA está relacionado à integridade da MEC do biofilme e a sua resistência aos antifúngicos convencionais³¹.

Ao analisar a quantidade de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), não foi verificada diferença significativa entre os grupos nas três cepas avaliadas. Esses resultados corroboram com estudo anterior, que também utilizou DNase por 5 minutos previamente ao tratamento com TFD em biofilme de cepa susceptível ao fluconazol onde não foi observado efeito do tratamento sobre o ASP²⁸. Foi relatado que o conteúdo de ASP teve redução quando biofilmes de *C. albicans* susceptíveis foram expostos a 80 µg/mL de fluconazol³⁶ ou a TFD²⁸. Porém, em biofilmes resistentes a fluconazol, os valores de ASP não foram alterados quando expostos ao antifúngico, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Dessa forma, as quantidades de polissacarídeos (ASP e WSP) presentes na MEC dependem de suas interações físicas isoladas e conjuntas ao complexo MCGx³⁹, podendo apresentar concentrações diferentes para cada tipo de cepa^{28,36}. Todos esses achados demonstram que os componentes insolúveis da matriz do biofilme podem ser menos susceptíveis às abordagens antibiofilme⁹².

Ao compararmos cepas avaliadas, foi observado um comportamento semelhante para todas as três cepas avaliadas, com redução da viabilidade celular, do peso seco insolúvel e do conteúdo solúvel da matriz (WSP e eDNA) para o grupo P+L+DNase. O isolado clínico R14, por sua vez, apresentou um resultado de peso seco total diferente das outras duas cepas, apresentando redução de biomassa no grupo P+L+DNase. Foi realizado o teste de CIM para verificar a susceptibilidade das três cepas de *C. albicans* ao fluconazol, e observou-se que as três cepas avaliadas são resistentes ao fluconazol. Esses resultados estão de acordo com os de estudos anteriores, em que não foram encontradas diferenças nos valores de MIC entre os isolados de *C. albicans* de diferentes fontes clínicas⁴⁵. Em um estudo *in vitro* onde isolados clínicos (R10 e R15) de *C. albicans* foram avaliados, verificou-se que o isolado clínico R10 foi mais suscetível ao TFD mediado por Photogem® do que o isolado R15⁵⁴. Em um estudo *in vivo* em modelo murino de candidose, camundongos foram inoculados com os mesmos isolados clínicos (R10, R15) e uma cepa de referência (ATCC 96901) de *C. albicans* resistente para induzir candidose

e foi observado um comportamento semelhante entre a cepa padrão e o isolado R15, por outro lado, o isolado R10 não apresentou redução significativa na viabilidade celular²³ após a TFD mediado por Photogem®. A diferença na susceptibilidade ao fluconazol em isolados clínicos de *Candida* varia de 70% a 100%, e isso ocorre devido a diversos fatores^{38,45}. Dessa forma, podemos sugerir que a susceptibilidade a TFD depende do tipo de cepa bem como também depende do tipo de FS escolhido para a realização do tratamento^{30,54}. Diante dessa variação de comportamento entre cepas da mesma espécie, é preciso destacar que, no presente estudo, o grupo P+L+DNase apresentou redução na viabilidade celular e em importantes componentes da MEC do biofilme (Peso seco insolúvel, WSP e eDNA) para todas as cepas avaliadas, o que pode ser considerado um resultado bastante promissor, uma vez que os isolados clínicos avaliados também eram resistentes ao fluconazol.

Os estudos mostram a importância da MEC na formação e na manutenção da integridade dos biofilmes. Uma única aplicação de DNase previamente à TFD proporcionou a redução de componentes importantes da MEC do biofilme, o que pode ser considerado muito relevante, uma vez que abre precedentes para alternativas que possam facilitar a difusão de antifúngicos no biofilme, afetando a resistência fúngica derivada da MEC do biofilme. Portanto, a exposição de biofilmes maduros à DNase por 5 min seguido de TFD diminui a viabilidade celular e reduziu a quantidade de eDNA, WSP e o peso seco insolúvel de biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans* resistentes a fluconazol, sendo uma alternativa promissora para terapias antibiofilme.

Diante dos resultados observados e de sua concordância com estudos anteriores que também avaliaram a inclusão da DNase na terapia fotodinâmica, sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos para que essa alternativa de tratamento seja validada a partir de modelos *in vivo* e em estudos clínicos randomizados.

7 CONCLUSÃO

1. A enzima DNase interferiu nos componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *C. albicans* resistente ao fluconazol (ATCC 96901 e dos isolados clínicos R14 e R70), potencializando o efeito antimicrobiano da TFD;
2. A viabilidade celular dos biofilmes das cepas avaliadas foi reduzida quando a enzima DNase foi combinada com TFD;
3. A exposição dos biofilmes à enzima DNase seguida de TFD reduziu o eDNA, o WSP e o peso seco insolúvel dos biofilmes das três cepas avaliadas;
4. O peso seco total, as proteínas solúveis e insolúveis e a quantidade de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP) apresentaram valores semelhantes independente do tipo de tratamento realizado.

REFERÊNCIAS*

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002;78(922):455-9.
2. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(11):685-702.
3. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, Mitchell AP. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008;18(14):1017-24.
4. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*. 2007;189(22):7945-7.
5. Martins J da S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(1):71-7.
6. 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;55(1):80-5.
7. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog*. 2016;12(9): e1005828.
8. Rajendran R, Sherry L, Lappin DF, Nile CJ, Smith K, Williams C, et al. Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2014;14 (2):303-9.
9. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006;55(8):999-1008.

* 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>

10. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(2):470-6.
11. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008;4(11): e1000213.
12. da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J.* 2008;19(4):364-9.
13. 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;62(Pt 1):10-24.
14. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2005;93(3):288-93.
15. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(2):73-85.
16. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X, Suffis SD, Su Q, Myers TG, et al. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(8):3308-17.
17. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ; SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):852-6.
18. Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? *Drug Dev Res.* 2019;80(1):48-67.

19. Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? *Drug Dev Res.* 2019;80(1):48-67.
20. 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.
21. Junqueira JC, Martins Jda S, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):877-84.
22. 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;12(18):4853-60.
23. Alves F, Carmello JC, Mima EGO, Costa CAS, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Med Mycol.* 2018;57(5):609-17.
24. 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;52(9):3259-66.
25. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):510-20.
26. Farisa Banu S, Thamotharan S, Gowrishankar S, Karutha Pandian S, Nithyanand P. Marine bacterial DNase curtails virulence and disrupts biofilms of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species. *Biofouling.* 2019;35(9):975-85.
27. Ye J, Shao C, Zhang X, Guo X, Gao P, Cen Y, Ma S, et al. Effects of DNase I coating of titanium on bacteria adhesion and biofilm formation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;78(5):738-47.

28. Panariello BHD, Klein MI, Alves F, Pavarina AC. DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019;27(7):124-31.
29. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. Future Microbiol. 2013;8(10):1325-37.
30. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. Int J Med Microbiol. 2014;304(8):1192-8.
31. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. MBio. 2014;5:e01333-14.
32. 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;112(13):4092-7.
33. 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;9(1):1385372.
34. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, et al. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. J Fungi (Basel). 2017;3(1):14.
35. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. J Appl Microbiol. 2017;122(2):321-30.
36. 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;10(1):e1476644.

37. da Silveira PV, Panariello BHD, de Araújo Costa CAG, Maule SM, Maule SM, Janal MN, et al. Twice-daily red and blue light treatment for *Candida albicans* biofilm matrix development control. *Lasers Med Sci.* 2019;34(3):441-7.
38. McCall AD, Pathirana RU, Prabhakar A, Cullen PJ, Edgerton M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2019;5(1):21.
39. Nett JE, Andes DR. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. *J Fungi (Basel).* 2020;6(1):21.
40. Gonçalves B, Fernandes L, Henriques M, Silva S. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling.* 2020;36(5):621-30.
41. Arévalo MP, Arias A, Andreu A, Rodríguez C, Sierra A. Fluconazole, itraconazole and ketoconazole in vitro activity against *Candida* spp. *J Chemother.* 1994; 6(4):226-9.
42. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(5):558-64.
43. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):668-79.
44. Da Silva WJ, Gonçalves LM, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Exopolissacarídeo matriz de biofilmes desenvolvidos de *Candida albicans* após exposição a agentes antifúngicos. *Braz Dent J.* 2012; 23(3):716–22.
45. Sanitá PV, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;116 (2): 562–9.

46. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness trade- offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol.* 2013; 11(10): e1001692.
47. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol.* 2017;12(7):2173-84.
48. Robbins N, Caplan T, Cowen LE. Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71(4):753-75.
49. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol.* 2018;45(7):70-6.
50. Spettel K, Barousch W, Makristathis A, Zeller I, Nehr M, Selitsch B, et al. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PLoS One.* 2019;14(1):e0210397.
51. Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms.* 2020;8(2):154.
52. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2329-35.
53. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol.* 2010;61(5):411-6.
54. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses.* 2011;54(2):123-30.
55. Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci.* 2015;30(2):885-90.

56. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1): 445-51.
57. Rossoni RD, Barbosa JO, de Oliveira FE, de Oliveira LD, Jorge AO, Junqueira JC. Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2014;29(5):1679-84.
58. Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):685-94.
59. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14(7):1319-28. Erratum in: *Photochem Photobiol Sci*. 2017;16(8):1336-7.
60. 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;10(7): e0131941.
61. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33(5):67-73.
62. Carmello JC, Alves F, G Basso F, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®-mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156947.
63. Carmello JC, Alves F, Mima EGO, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *non-albicans Candida* species using Photodythazine® [corrected]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;17(7):194-99. Erratum in: *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;20(4):288-93.
64. Alves F, de Oliveira Mima EG, Passador RCP, Bagnato VS, Jorge JH, Pavarina AC. Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2017;32(4):815-26.

65. Hidalgo KJ, Carmello JC, Jordão CC, Mima EG, Jorge JH, Pavarina AC. Efeito da aPDT com Nistatina na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol in vivo. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2018, Campinas. Proceedings of the 35th SBPqO Annual Meeting, Braz Oral Res.2018;32:392-9.
66. Hu X, Huang YY, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. Front Microbiol. 2018; 9(1):1299.
67. Ma J, Shi H, Sun H, Li J, Bai Y. Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans* biofilms in vitro. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 27(9):280-7.
68. da Silva FC, Fernandes Rodrigues PL, Santos Dantas Araújo T, Sousa Santos M, de Oliveira JM, Pereira Rosa L, et al. Fluorescence spectroscopy of *Candida albicans* biofilms in bone cavities treated with photodynamic therapy using blue LED (450 nm) and curcumin. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 26(6):366-70.
69. Wiench R, Skaba D, Stefanik N, Kępa M, Gilowski Ł, Cieślar G, et al. Assessment of sensitivity of selected *Candida* strains on antimicrobial photodynamic therapy using diode laser 635 nm and toluidine blue - In vitro research. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 27(1):241-7.
70. Jan A, Liu C, Deng H, Li J, Ma W, Zeng X, Ji Y. In vitro photodynamic inactivation effects of hypocrellin B on azole-sensitive and resistant *Candida albicans*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019; 27(8):419-27.
71. Garcia BA, Panariello BHD, de Freitas Pontes KM, Duarte S. Regimen and different surfaces interfere with photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. J Microbiol Methods. 2020;17(8):106080.
72. Ma W, Liu C, Li J, Hao M, Ji Y, Zeng X. The effects of aloe emodin-mediated antimicrobial photodynamic therapy on drug-sensitive and resistant *Candida albicans*. Photochem Photobiol Sci. 2020;19(4):485-94.

73. Alves F, Carmello JC, Alonso GC, Mima EGO, Bagnato VS, Pavarina AC. A randomized clinical trial evaluating Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy as a treatment for denture stomatitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;32(6):102041.
74. Jordão CC, Viana de Sousa T, Inêz Klein M, Mendonça Dias L, Pavarina AC, Carmello JC. Antimicrobial photodynamic therapy reduces gene expression of *Candida albicans* in biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31(9):101825.
75. Dias LM, Klein MI, Jordão CC, Carmello JC, Bellini A, Pavarina AC. Successive applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy effects the susceptibility of *Candida albicans* grown in medium with or without fluconazole. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;32(10):102018.
76. 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;169(5):323-31.
77. Gándara L, Mamone L, Bohm GC, Buzzola F, Casas A. Enhancement of photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms by disruptive strategies. *Lasers Med Sci.* 2017;32(8):1757-67.
78. Chen Z, Wang Z, Ren J, Qu X. Enzyme mimicry for combating bacteria and biofilms. *Account Chem Res.* 2018;51(3):789-99.
79. Karygianni L, Attin T, Thurnheer T. Combined DNase and proteinase treatment interferes with composition and structural integrity of multispecies oral biofilms. *J Clin Med.* 2020;9(4):983.
80. Tan Y, Ma S, Leonhard M, Moser D, Ludwig R, Schneider-Stickler B. Co-immobilization of cellobiose dehydrogenase and deoxyribonuclease I on chitosan nanoparticles against fungal/bacterial polymicrobial biofilms targeting both biofilm matrix and microorganisms. *Mat Sci Eng Mat Biol Appl.* 2020;10(8):110499.
81. Du B, Tung CH. Enzyme-ssisted photodynamic therapy based on nanomaterials. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(5):2506-17.

82. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Fourth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008 (Document M27-S4).
83. Junqueira JC, Vilela SF, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa AC, Rasteiro VM, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54(1):17-24.
84. Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnberg C, Jensen PØ, Tolker-Nielsen T, et al. The inoculation method could impact the outcome of microbiological experiments. *Appl Environ Microbiol*. 2018;14(7):85-95.
85. Carmello JC, Pavarina AC, Oliveira R, Johansson B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2015; 15(4): fov018.
86. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(12):740-55.
87. 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;7(72):248-54.
88. 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;155(6):1997-2003.
89. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956;28(5):350–6.
90. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, Bayles KW. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(19):8113-8.

91. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. Nat Protoc. 2008;3(12):1909-24.
92. Nunes TSBS, Rosa LM, Vega-Chacón Y, Mima EGO. Fungistatic action of N-acetylcysteine on *Candida albicans* biofilms and its interaction with antifungal Agents. Microorganisms. 2020;8(7):980-93.
93. 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;31(11):519-25.

APÊNDICE A – TESTES ESTATÍSTICOS ANOVA THREE WAY

- Cepa ATCC 96901

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: UFC

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	1120407199999999,900 ^a	7	1,60058E+14	128,408	0	0,911
Intercepto	2,80022E+15	1	2,80022E+15	2246,504	0	0,962
Luz	3,44132E+14	1	3,44132E+14	276,083	0	0,758
Photossensibilizante	1,4751E+14	1	1,4751E+14	118,341	0	0,574
DNase	3,29745E+14	1	3,29745E+14	264,541	0	0,75
Luz * Photossensibilizante	2,2022E+14	1	2,2022E+14	176,674	0	0,668
Luz * DNase	6,92241E+13	1	6,92241E+13	55,536	0	0,387
Photossensibilizante * DNase	9,05282E+12	1	9,05282E+12	7,263	0,008	0,076
Luz * Photossensibilizante * DNase	5,2215E+11	1	5,2215E+11	0,419	0,519	0,005
Erro	1,0969E+14	88	1,24648E+12			
Total	4,03032E+15	96				
Total corrigido	1,2301E+15	95				

a. R Quadrado = ,911 (R Quadrado Ajustado = ,904)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Peso_Total

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	11,392 ^a	7	1,627	0,703	0,669	0,053
Intercepto	1954,815	1	1954,815	844,772	0	0,906
Luz	2,16	1	2,16	0,933	0,337	0,01
Photossensibilizante	5,802	1	5,802	2,507	0,117	0,028
DNase	0,427	1	0,427	0,184	0,669	0,002
Luz * Photossensibilizante	0,96	1	0,96	0,415	0,521	0,005
Luz * DNase	0,015	1	0,015	0,006	0,936	0
Photossensibilizante * DNase	0,427	1	0,427	0,184	0,669	0,002
Luz * Photossensibilizante * DNase	1,602	1	1,602	0,692	0,408	0,008
Erro	203,633	88	2,314			
Total	2169,84	96				
Total corrigido	215,025	95				

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Ptn_Total

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	5,784E-5 ^a	7	8,26E-06	3,757	0,001	0,23
Intercepto	0,047	1	0,047	21201,43	0	0,996
Luz	3,01E-06	1	3,01E-06	1,367	0,245	0,015
Photossensibilizante	3,56E-06	1	3,56E-06	1,618	0,207	0,018
DNase	4,12E-05	1	4,12E-05	18,753	0	0,176
Luz * Photossensibilizante	6,11E-07	1	6,11E-07	0,278	0,6	0,003
Luz * DNase	4,64E-06	1	4,64E-06	2,108	0,15	0,023
Photossensibilizante * DNase	2,62E-06	1	2,62E-06	1,193	0,278	0,013
Luz * Photossensibilizante * DNase	2,15E-06	1	2,15E-06	0,979	0,325	0,011
Erro	0	88	2,20E-06			
Total	0,047	96				
Total corrigido	0	95				

a. R Quadrado = ,230 (R Quadrado Ajustado = ,169)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Peso_Ins

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	3,867 ^a	7	0,552	47,077	0	0,789
Intercepto	54,867	1	54,867	4676,032	0	0,982
Luz	2,104	1	2,104	179,284	0	0,671
Photossensibilizante	0,451	1	0,451	38,425	0	0,304
DNase	0,705	1	0,705	60,072	0	0,406
Luz * Photossensibilizante	0,008	1	0,008	0,663	0,418	0,007
Luz * DNase	0,597	1	0,597	50,859	0	0,366
Photossensibilizante * DNase	0,002	1	0,002	0,187	0,666	0,002
Luz * Photossensibilizante * DNase	0,001	1	0,001	0,049	0,826	0,001
Erro	1,033	88	0,012			
Total	59,767	96				
Total corrigido	4,899	95				

a. R Quadrado = ,789 (R Quadrado Ajustado = ,772)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Ptn_Ins						
Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	1,651E-5 ^a	7	2,36E-06	2,583	0,018	0,17
Intercepto	0,009	1	0,009	10035	0	0,991
Luz	1,09E-06	1	1,09E-06	1,193	0,278	0,013
Photossensibilizante	8,26E-07	1	8,26E-07	0,905	0,344	0,01
DNase	2,00E-06	1	2,00E-06	2,189	0,143	0,024
Luz * Photossensibilizante	3,06E-06	1	3,06E-06	3,355	0,07	0,037
Luz * DNase	2,95E-06	1	2,95E-06	3,228	0,076	0,035
Photossensibilizante * DNase	7,08E-07	1	7,08E-07	0,776	0,381	0,009
Luz * Photossensibilizante * DNase	5,87E-06	1	5,87E-06	6,433	0,013	0,068
Erro	8,04E-05	88	9,13E-07			
Total	0,009	96				
Total corrigido	9,69E-05	95				

a. R Quadrado = ,170 (R Quadrado Ajustado = ,104)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: WSP

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	,003 ^a	7	0	235,456	0	0,949
Intercepto	0,269	1	0,269	131820	0	0,999
Luz	0,001	1	0,001	539,36	0	0,86
Photossensibilizante	0,001	1	0,001	378,362	0	0,811
DNase	0,001	1	0,001	284,508	0	0,764
Luz * Photossensibilizante	0,001	1	0,001	260,095	0	0,747
Luz * DNase	3,62E-05	1	3,62E-05	17,75	0	0,168
Photossensibilizante * DNase	0	1	0	76,808	0	0,466
Luz * Photossensibilizante * DNase	0	1	0	91,307	0	0,509
Erro	0	88	2,04E-06			
Total	0,272	96				
Total corrigido	0,004	95				

a. R Quadrado = ,949 (R Quadrado Ajustado = ,945)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: ASP

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	,043 ^a	7	0,006	46,087	0	0,786
Intercepto	1,453	1	1,453	11023,29	0	0,992
Luz	0,017	1	0,017	128,628	0	0,594
Photossensibilizante	1,92E-05	1	1,92E-05	0,145	0,704	0,002
DNase	0,006	1	0,006	47,981	0	0,353
Luz * Photossensibilizante	0	1	0	1,009	0,318	0,011
Luz * DNase	0,005	1	0,005	40,425	0	0,315
Photossensibilizante * DNase	0,007	1	0,007	50,516	0	0,365
Luz * Photossensibilizante * DNase	0,007	1	0,007	53,907	0	0,38
Erro	0,012	88	0			
Total	1,507	96				
Total corrigido	0,054	95				

a. R Quadrado = ,786 (R Quadrado Ajustado = ,769)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: eDNA

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	18537,052 ^a	7	2648,15	40,723	0	0,764
Intercepto	167147,9	1	167147,9	2570,402	0	0,967
Luz	12956,71	1	12956,71	199,248	0	0,694
Photossensibilizante	571,189	1	571,189	8,784	0,004	0,091
DNase	1520,192	1	1520,192	23,378	0	0,21
Luz * Photossensibilizante	1281,019	1	1281,019	19,7	0	0,183
Luz * DNase	372,846	1	372,846	5,734	0,019	0,061
Photossensibilizante * DNase	107,621	1	107,621	1,655	0,202	0,018
Luz * Photossensibilizante * DNase	1727,478	1	1727,478	26,565	0	0,232
Erro	5722,456	88	65,028			
Total	191407,4	96				
Total corrigido	24259,51	95				

a. R Quadrado = ,764 (R Quadrado Ajustado = ,745)

- Isolado Clínico R14

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: UFC

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	432860395833333,200 ^a	7	6.1837E+13	1821.603	0	0.993
Intercepto	1.5237E+15	1	1.5237E+15	44885.35	0	0.998
Luz	1.81445E+14	1	1.8145E+14	5345.014	0	0.984
Photossensibilizante	1.22447E+14	1	1.2245E+14	3607.044	0	0.976
DNase	2.413E+12	1	2.413E+12	71.082	0	0.447
Luz * Photossensibilizante	1.2002E+14	1	1.2002E+14	3535.54	0	0.976
Luz * DNase	1.0127E+12	1	1.0127E+12	29.832	0	0.253
Photossensibilizante * DNase	3.43204E+11	1	3.432E+11	10.11	0.002	0.103
Luz * Photossensibilizante * DNase	5.1801E+12	1	5.1801E+12	152.596	0	0.634
Erro	2.9873E+12	88	3.3947E+10			
Total	1.95955E+15	96				
Total corrigido	4.35848E+14	95				

a. R Quadrado = ,993 (R Quadrado Ajustado = ,993)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Peso_Total

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	5,553 ^a	7	0.793	0.355	0.925	0.027
Intercepto	2022.17	1	2022.17	906.08	0	0.911
Luz	1.17	1	1.17	0.524	0.471	0.006
Photossensibilizante	2.47	1	2.47	1.107	0.296	0.012
DNase	0.07	1	0.07	0.032	0.859	0
Luz * Photossensibilizante	0.51	1	0.51	0.229	0.634	0.003
Luz * DNase	0.05	1	0.05	0.023	0.881	0
Photossensibilizante * DNase	0.51	1	0.51	0.229	0.634	0.003
Luz * Photossensibilizante * DNase	0.77	1	0.77	0.345	0.558	0.004
Erro	196.397	88	2.232			
Total	2224.12	96				
Total corrigido	201.95	95				

a. R Quadrado = ,027 (R Quadrado Ajustado = -,050)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Peso_Ins

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	3,742 ^a	7	0.535	18.954	0	0.601
Intercepto	188.184	1	188.184	6672.987	0	0.987
Luz	0.35	1	0.35	12.398	0.001	0.123
Photossensibilizante	0.741	1	0.741	26.281	0	0.23
DNase	1.357	1	1.357	48.126	0	0.354
Luz * Photossensibilizante	0.934	1	0.934	33.126	0	0.273
Luz * DNase	0.23	1	0.23	8.161	0.005	0.085
Photossensibilizante * DNase	0.129	1	0.129	4.579	0.035	0.049
Luz * Photossensibilizante * DNase	0	1	0	0.01	0.921	0
Erro	2.482	88	0.028			
Total	194.407	96				
Total corrigido	6.223	95				

a. R Quadrado = ,601 (R Quadrado Ajustado = ,570)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Ptn_Total

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	5,363E-5 ^a	7	7.66E-06	2.398	0.027	0.16
Intercepto	0.06	1	0.06	18922.82	0	0.995
Luz	1.74E-06	1	1.74E-06	0.544	0.463	0.006
Photossensibilizante	5.64E-06	1	5.64E-06	1.764	0.188	0.02
DNase	1.73E-06	1	1.73E-06	0.542	0.464	0.006
Luz * Photossensibilizante	2.52E-06	1	2.52E-06	0.787	0.377	0.009
Luz * DNase	2.09E-05	1	2.09E-05	6.543	0.012	0.069
Photossensibilizante * DNase	2.09E-05	1	2.09E-05	6.543	0.012	0.069
Luz * Photossensibilizante * DNase	1.90E-07	1	1.90E-07	0.06	0.808	0.001
Erro	0	88	3.20E-06			
Total	0.061	96				
Total corrigido	0	95				

a. R Quadrado = ,160 (R Quadrado Ajustado = ,093)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Ptn_Ins

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	8,110E-6 ^a	7	1.16E-06	2.338	0.031	0.157
Intercepto	0.005	1	0.005	10653.3	0	0.992
Luz	1.63E-08	1	1.63E-08	0.033	0.856	0
Photossensibilizante	3.59E-07	1	3.59E-07	0.724	0.397	0.008
DNase	3.36E-07	1	3.36E-07	0.678	0.413	0.008
Luz * Photossensibilizante	1.06E-06	1	1.06E-06	2.147	0.146	0.024
Luz * DNase	1.17E-08	1	1.17E-08	0.024	0.878	0
Photossensibilizante * DNase	5.10E-08	1	5.10E-08	0.103	0.749	0.001
Luz * Photossensibilizante * DNase	6.27E-06	1	6.27E-06	12.66	0.001	0.126
Erro	4.36E-05	88	4.96E-07			
Total	0.005	96				
Total corrigido	5.17E-05	95				

a. R Quadrado = ,157 (R Quadrado Ajustado = ,090)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: WSP

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	,004 ^a	7	0.001	262.276	0	0.954
Intercepto	0.223	1	0.223	99681.52	0	0.999
Luz	0.002	1	0.002	902.507	0	0.911
Photossensibilizante	0	1	0	146.713	0	0.625
DNase	0	1	0	118.419	0	0.574
Luz * Photossensibilizante	0.001	1	0.001	460.839	0	0.84
Luz * DNase	1.65E-05	1	1.65E-05	7.377	0.008	0.077
Photossensibilizante * DNase	3.17E-05	1	3.17E-05	14.2	0	0.139
Luz * Photossensibilizante * DNase	0	1	0	185.874	0	0.679
Erro	0	88	2.23E-06			
Total	0.227	96				
Total corrigido	0.004	95				

a. R Quadrado = ,954 (R Quadrado Ajustado = ,951)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: ASP

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	,003 ^a	7	0	19.588	0	0.609
Intercepto	1.49	1	1.49	62717.57	0	0.999
Luz	0.001	1	0.001	21.301	0	0.195
Photossensibilizante	0	1	0	20.207	0	0.187
DNase	0.001	1	0.001	21.597	0	0.197
Luz * Photossensibilizante	0.001	1	0.001	22.958	0	0.207
Luz * DNase	0	1	0	11.172	0.001	0.113
Photossensibilizante * DNase	0.001	1	0.001	28.814	0	0.247
Luz * Photossensibilizante * DNase	0	1	0	11.065	0.001	0.112
Erro	0.002	88	2.38E-05			
Total	1.496	96				
Total corrigido	0.005	95				

a. R Quadrado = ,609 (R Quadrado Ajustado = ,578)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: eDNA

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	11695,090 ^a	7	1670.727	14.06	0	0.528
Intercepto	202750.7	1	202750.7	1706.216	0	0.951
Luz	4735.464	1	4735.464	39.851	0	0.312
Photossensibilizante	271.595	1	271.595	2.286	0.134	0.025
DNase	5192.217	1	5192.217	43.694	0	0.332
Luz * Photossensibilizante	324.07	1	324.07	2.727	0.102	0.03
Luz * DNase	302.033	1	302.033	2.542	0.114	0.028
Photossensibilizante * DNase	123.152	1	123.152	1.036	0.311	0.012
Luz * Photossensibilizante * DNase	746.559	1	746.559	6.283	0.014	0.067
Erro	10457.1	88	118.831			
Total	224902.9	96				
Total corrigido	22152.19	95				

a. R Quadrado = ,528 (R Quadrado Ajustado = ,490)

- Isolado Clínico R70

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: UFC

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	440246662500000,000 ^a	7	6.29E+13	82.909	0	0.868
Intercepto	1.31E+15	1	1.31E+15	1731.929	0	0.952
Luz	1.64E+14	1	1.64E+14	215.592	0	0.71
Photossensibilizante	2.1E+13	1	2.1E+13	27.684	0	0.239
DNase	2.87E+13	1	2.87E+13	37.791	0	0.3
Luz * Photossensibilizante	1.51E+14	1	1.51E+14	199.258	0	0.694
Luz * DNase	1.94E+13	1	1.94E+13	25.556	0	0.225
Photossensibilizante * DNase	5.4E+13	1	5.4E+13	71.147	0	0.447
Luz * Photossensibilizante * DNase	2.53E+12	1	2.53E+12	3.333	0.071	0.036
Erro	6.68E+13	88	7.59E+11			
Total	1.82E+15	96				
Total corrigido	5.07E+14	95				

a. R Quadrado = ,868 (R Quadrado Ajustado = ,858)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: Peso_Total

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	2,925 ^a	7	0.418	0.343	0.932	0.027
Intercepto	1969.282	1	1969.282	1616.072	0	0.948
Luz	1.127	1	1.127	0.925	0.339	0.01
Photossensibilizante	1.307	1	1.307	1.072	0.303	0.012
DNase	0	1	0	0	1	0
Luz * Photossensibilizante	0.282	1	0.282	0.231	0.632	0.003
Luz * DNase	0.002	1	0.002	0.001	0.971	0
Photossensibilizante * DNase	0.042	1	0.042	0.034	0.854	0
Luz * Photossensibilizante * DNase	0.167	1	0.167	0.137	0.712	0.002
Erro	107.233	88	1.219			
Total	2079.44	96				
Total corrigido	110.158	95				

a. R Quadrado = ,027 (R Quadrado Ajustado = -,051)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Peso_Ins

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	2,578 ^a	7	0.368	15.207	0	0.547
Intercepto	119.856	1	119.856	4948.484	0	0.983
Luz	0.696	1	0.696	28.719	0	0.246
Photossensibilizante	0.002	1	0.002	0.075	0.785	0.001
DNase	1.312	1	1.312	54.173	0	0.381
Luz * Photossensibilizante	0.05	1	0.05	2.057	0.155	0.023
Luz * DNase	0.24	1	0.24	9.916	0.002	0.101
Photossensibilizante * DNase	0.025	1	0.025	1.031	0.313	0.012
Luz * Photossensibilizante * DNase	0.254	1	0.254	10.482	0.002	0.106
Erro	2.131	88	0.024			
Total	124.566	96				
Total corrigido	4.71	95				

a. R Quadrado = ,547 (R Quadrado Ajustado = ,511)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Ptn_Total

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	6,882E-5 ^a	7	9.83E-06	8.944	0	0.416
Intercepto	0.076	1	0.076	69442.07	0	0.999
Luz	8.21E-07	1	8.21E-07	0.747	0.39	0.008
Photossensibilizante	6.52E-06	1	6.52E-06	5.935	0.017	0.063
DNase	1.73E-05	1	1.73E-05	15.718	0	0.152
Luz * Photossensibilizante	9.89E-06	1	9.89E-06	8.999	0.004	0.093
Luz * DNase	6.75E-06	1	6.75E-06	6.14	0.015	0.065
Photossensibilizante * DNase	2.06E-05	1	2.06E-05	18.737	0	0.176
Luz * Photossensibilizante * DNase	6.96E-06	1	6.96E-06	6.333	0.014	0.067
Erro	9.67E-05	88	1.10E-06			
Total	0.076	96				
Total corrigido	0	95				

a. R Quadrado = ,416 (R Quadrado Ajustado = ,369)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: Ptn_Ins

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	2,237E-5 ^a	7	3.20E-06	7.992	0	0.389
Intercepto	0.002	1	0.002	4170.225	0	0.979
Luz	1.32E-06	1	1.32E-06	3.31	0.072	0.036
Photossensibilizante	5.64E-06	1	5.64E-06	14.094	0	0.138
DNase	8.20E-06	1	8.20E-06	20.511	0	0.189
Luz * Photossensibilizante	2.90E-06	1	2.90E-06	7.24	0.009	0.076
Luz * DNase	6.47E-07	1	6.47E-07	1.617	0.207	0.018
Photossensibilizante * DNase	1.92E-07	1	1.92E-07	0.48	0.49	0.005
Luz * Photossensibilizante * DNase	3.48E-06	1	3.48E-06	8.694	0.004	0.09
Erro	3.52E-05	88	4.00E-07			
Total	0.002	96				
Total corrigido	5.76E-05	95				

a. R Quadrado = ,389 (R Quadrado Ajustado = ,340)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: WSP

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	,004 ^a	7	0.001	293.129	0	0.959
Intercepto	0.226	1	0.226	130803.1	0	0.999
Luz	0.002	1	0.002	931.598	0	0.914
Photossensibilizante	0	1	0	155.613	0	0.639
DNase	0	1	0	144.82	0	0.622
Luz * Photossensibilizante	0.001	1	0.001	533.101	0	0.858
Luz * DNase	5.23E-05	1	5.23E-05	30.278	0	0.256
Photossensibilizante * DNase	2.93E-05	1	2.93E-05	16.952	0	0.162
Luz * Photossensibilizante * DNase	0	1	0	239.542	0	0.731
Erro	0	88	1.73E-06			
Total	0.229	96				
Total corrigido	0.004	95				

a. R Quadrado = ,959 (R Quadrado Ajustado = ,956)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável

dependente: ASP

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	,005 ^a	7	0.001	138.846	0	0.917
Intercepto	1.553	1	1.553	291191.4	0	1
Luz	0.001	1	0.001	118.827	0	0.575
Photossensibilizante	0.001	1	0.001	135.823	0	0.607
DNase	0.001	1	0.001	133.47	0	0.603
Luz * Photossensibilizante	0.001	1	0.001	234.409	0	0.727
Luz * DNase	0	1	0	80.849	0	0.479
Photossensibilizante * DNase	0.001	1	0.001	176.708	0	0.668
Luz * Photossensibilizante * DNase	0	1	0	91.833	0	0.511
Erro	0	88	5.34E-06			
Total	1.559	96				
Total corrigido	0.006	95				

a. R Quadrado = ,917 (R Quadrado Ajustado = ,910)

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: eDNA

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Eta parcial quadrado
Modelo corrigido	26138,887 ^a	7	3734.127	29.747	0	0.703
Intercepto	226831.9	1	226831.9	1807.026	0	0.954
Luz	6699.935	1	6699.935	53.374	0	0.378
Photossensibilizante	2648.168	1	2648.168	21.096	0	0.193
DNase	10442.98	1	10442.98	83.193	0	0.486
Luz * Photossensibilizante	3760.237	1	3760.237	29.955	0	0.254
Luz * DNase	105.234	1	105.234	0.838	0.362	0.009
Photossensibilizante * DNase	214.1	1	214.1	1.706	0.195	0.019
Luz * Photossensibilizante * DNase	2268.24	1	2268.24	18.07	0	0.17
Erro	11046.44	88	125.528			
Total	264017.2	96				
Total corrigido	37185.33	95				

a. R Quadrado = ,703 (R Quadrado Ajustado = ,679)

Não autorizo a publicação deste trabalho até o dia 30 junho de 2023.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de junho de 2021.

César Augusto Abreu Pereira