



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



**Tábata Viana de Sousa**

**O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol**

**Araraquara**

**2022**



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



**Tábata Viana de Sousa**

**O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual Paulista  
(Unesp), Faculdade de  
Odontologia, Araraquara para  
obtenção do título de Mestre em  
Reabilitação Oral

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Ana Cláudia Pavarina**

**Araraquara**

**2022**

S725p

Sousa, Tábata Viana de

O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol / Tábata Viana de Sousa. -- Araraquara, 2022

78 p. : tabs., fotos

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

Orientadora: Ana Cláudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia. 2. *Candida albicans*. 3. Peróxido de Hidrogênio. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

**Tábata Viana de Sousa**

**O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol**

**Comissão julgadora**

**Dissertação para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral**

Presidente e orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

3º Examinador: Profa. Dra. Natália Mayumi Inada

4º Examinador: Profa. Dra. Janaína Habib Jorge

5º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 07 de março de 2022

## DADOS CURRICULARES

### Tábata Viana de Sousa

NASCIMENTO: 11/09/1996- Ribeirão Preto, São Paulo

FILIAÇÃO: Márcia Flores Viana de Sousa  
Carlos Alberto Fernandes de Sousa

**2015 – 2019:** Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

**2016 – 2017:** Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

**2017 – 2018:** Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

**2018 – 2019:** Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

**2021– 2021:** Estágio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”-UNESP.

**2020 – 2022:** Curso de Mestrado em Reabilitação Oral com ênfase em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a **Deus**, que me manteve forte em todo o período de graduação, pós-graduação e me ajudou a passar por todos os momentos, mesmo quando tudo parecia tão difícil, ele me deu forças para continuar a trilhar esse caminho da pós-graduação, que não foi fácil, mas foi muito gratificante e só foi possível graças a ele.*

*Agradeço imensamente aos meus pais **Carlos e Márcia**, que não mediram esforços para me ajudar e me apoiar, e em todos os momentos estiveram comigo, me aconselhando, comemorando e vivendo essa etapa sempre juntos, agradeço pelas inúmeras vezes que me buscaram em Araraquara, e por deixarem suas prioridades de lado para me dar a oportunidade de viver o meu sonho. Vocês foram essenciais para esse trabalho existir, sem vocês eu não teria conseguido. Obrigado por tudo, amo vocês!*

*Agradeço a minha irmã **Thauany** que sempre esteve comigo, que foi e é minha companheira de vida, que participou de todos os momentos, me ouviu apresentar os trabalhos inúmeras vezes, mesmo sendo jovem para entender alguns conceitos, sempre ouviu até o final das apresentações. Obrigada por todas as ligações, conversas e carinho. Te amo!*

*Agradeço o meu namorado **Felipe Henrique** pela paciência que teve nesses dois anos, quando eu estava preocupada, obrigada por sempre me ouvir e me dar conselhos. Obrigada por ficar comigo em Araraquara nos finais de semana, me esperando até tarde. Você foi muito importante nesse período, e obrigada por deixar minha vida mais leve. Amo você.*

*Meu eterno agradecimento a minha orientadora **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Pavarina**, que esteve comigo desde o meu segundo ano de graduação até o fim do mestrado, eu não seria a profissional que sou hoje se não tivesse o seu apoio. Sou muito grata por sua orientação, ensinamentos, carinho e conselhos, muito obrigada por acreditar em mim, e por todos esses anos me orientando nessa jornada.*

*Agradeço a minha companheira de laboratório e amiga, **Cláudia Jordão** que me ensinou muito, e me ajudou em todos os momentos que precisei, obrigada por*

*todos os conselhos, risadas e dicas, você deixou essa jornada muito mais leve, serei eternamente grata por tudo.*

*Agradeço aos meus amigos que estiveram comigo, nesse período, **Amanda Bellini, César Abreu, Vitória Bonan, Luana Dias, Ana Luíza e a todos os colegas de laboratório**, obrigada por todos os momentos juntos, risadas e companheirismo, vocês deixaram essa caminhada muito mais leve e divertida.*

*Agradeço aos demais professores do **Departamento de Materiais Dentários e Prótese** por todos os ensinamentos durante todo esse período que estive na Unesp-FOAR, todos foram essenciais para me tornar a profissional que sou hoje.*

*À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)** que foi minha segunda casa por tantos anos, me tornou a profissional que sou hoje. Lá eu pude realizar o meu sonho, e conheci pessoas incríveis. Minha eterna gratidão a essa instituição de ensino incrível e tão acolhedora.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral**, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr/UNESP, por toda contribuição nesse período.*

*Aos professores membros da banca **Profa. Dra. Natália Mayumi Inada, Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan**, pela disponibilidade em estar presente e por toda contribuição com seus ensinamentos. Obrigada!*

*Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior– Brasil (CAPES)** pela bolsa de Mestrado concedida no período de março/2020 a março/2022. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.*

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

*Agradeço a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2020/09332-0)** pelo apoio financeiro na aquisição de materiais essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa.*

*E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para execução deste trabalho, muito obrigada!*

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher.”

Cora Coralina \*

---

\*CORALINA C. Vintém de cobre: Meias confissões de Aninha. São Paulo: Global Editora; 1997.

Sousa TV. O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

## RESUMO

*Candida albicans* e a matriz são componentes fundamentais para o desenvolvimento de biofilmes, e os ensaios devem visar ambos os componentes. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) combinado à terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), mediada por Photodithazine® (P) e LED (L) sobre biofilme de *Candida albicans* sensível ao fluconazol (CaS) ATCC 90028 e resistente (CaR) ATCC 96901. Os biofilmes foram cultivados por 48 horas e foram expostos a  $H_2O_2$  (10mM) por 5 min, seguido pela aplicação de P e L isoladamente ou combinados ( $H_2O_2$ +P+L+,  $H_2O_2$ +P-L+,  $H_2O_2$ , P+L+, PL -, P+L-, P-L+; n=12). Após o tratamento, os biofilmes foram avaliados por unidade formadora de colônia/mL, componentes da matriz extracelular [polissacarídeos solúveis em água (WSP) e em álcali (ASP), proteínas, eDNA], biomassa (total e insolúvel) e proteínas. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi realizada. Os dados foram analisados por um teste ANOVA de três vias com o teste post-hoc de Bonferroni. A exposição dos biofilmes a 10 mM de  $H_2O_2$  por 5 minutos seguido de aPDT reduziu as proteínas solúveis e insolúveis da matriz, eDNA, ASP, WSP e o peso seco insolúvel e solúvel dos biofilmes de CaS e de CaR. A MEV revelou redução no número de células do biofilme e dispersão das hifas do grupo  $H_2O_2$ +P+L+ em relação ao P-L- (controle). Em suma, a associação com  $H_2O_2$  aumentou a eficácia da aPDT e reduziu os componentes da matriz extracelular do biofilme; logo essa associação se mostra promissora para possíveis aplicações in vivo, já que in vitro foi obtido resultados bastante satisfatórios.

**Palavras-chave:** Fotoquimioterapia. *Candida albicans*. Peróxido de hidrogênio.

Sousa TV. Hydrogen peroxide enhances the efficacy of photodynamic therapy against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* biofilms [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

## ABSTRACT

*Candida albicans* and matrix are essential for the development of biofilms, and assays should therefore target both components. The aim of this study was evaluated the effectiveness of the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) combined with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), mediated by Photodithazine® (P) and LED (L) on biofilms formed by fluconazole susceptible (CaS) and resistant (CaR) *Candida albicans* strains. Biofilms were grown for 48 hours and were exposed to  $H_2O_2$  (10mM) for 5 min, followed by application of P and L either singly or combined ( $H_2O_2$ +P+L+,  $H_2O_2$  +P-L+,  $H_2O_2$ , P+L+, P-L-, P+L-, P-L+; n=12). After the treatment, biofilms were evaluated by colony-forming unit/mL, extracellular matrix components [polysaccharides soluble in water (WSP) and in alkali (ASP), proteins, eDNA,], biomass (total and insoluble) and proteins. Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed. The data were analyzed by a three-way ANOVA test with Bonferroni's post-hoc test. In both strains, the treatment of biofilms with 10 mM  $H_2O_2$  for 5 minutes followed by aPDT reduced soluble and insoluble matrix proteins, eDNA, ASP, WSP and insoluble and soluble dry weight of CaS and CaR biofilms. SEM revealed a reduction in the number of biofilm cells and hyphae dispersion in the  $H_2O_2$ +P+L+ group in relation to the P-L- (control). In short, the association with  $H_2O_2$  increased the effectiveness of aPDT and reduced the extracellular matrix components of the biofilm; therefore, this association shows promise for possible applications in vivo, since in vitro results were promissory.

**Keywords:** Photochemotherapy. *Candida albicans*. Hydrogen peroxide.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>3 PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Publicação 1 .....</b>	<b>17</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* é um fungo comensal presente na microbiota da cavidade oral e em outros locais do corpo humano<sup>1-3</sup>. Em situações de desequilíbrio do sistema imunológico, esse fungo pode causar infecções devido à sua grande capacidade de adaptação a diferentes nichos no hospedeiro<sup>3</sup>. *C. albicans* tem sido associado a manifestações clínicas de infecção que variam desde lesões mucocutâneas superficiais, como Candidose Orofaríngea (OPC), até formas disseminadas da infecção<sup>4,5</sup>. A virulência desse fungo está associada à sua capacidade de formar biofilmes que são comunidades organizadas de células incorporadas em uma matriz de polímeros extracelulares<sup>6</sup>.

Para o tratamento da OPC, alguns medicamentos de aplicações tópica, sistêmica, tais como os derivados azóis, poliênicos e as equinocandinas tem sido encontrado no mercado<sup>7,8</sup>. Os azóis tem a função de inibir a produção de ergosterol, o que pode levar a instabilidade na membrana, já os poliênicos se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica, levando à lise celular; e, as equinocandinas inibem a biossíntese da parede celular dos fungos, o que gera danos à mesma<sup>9</sup>. A medicação sistêmica tem sido utilizada com frequência em indivíduos com saúde geral comprometida e também em episódios de infecções recorrentes, utilizando medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B<sup>10</sup>. Porém, a utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC tem resultado no desenvolvimento de resistência em espécies de *Candida*. A tolerância antifúngica dos biofilmes de *Candida* é multifatorial e está associada à estimulação de bombas de efluxo de fármacos, ao estado fisiológico das células e a proteção exercida pela MEC por meio de  $\beta$ -glucanos que se ligam ao fluconazol e à anfotericina B<sup>11,12</sup>. O polissacarídeo  $\beta$ -1,3 glucano tem sido associado ao mecanismo de resistência<sup>13,14</sup>. Além do  $\beta$ -glucano, foi relatado que o DNA extracelular (eDNA) também é um constituinte importante da MEC e promove integridade estrutural dos biofilmes e ambos atuam na proteção do biofilme bacteriano contra difusão de antibióticos<sup>15,16</sup>. Levando em consideração o aumento na incidência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos medicamentos utilizados, estudos têm buscado estratégias para inviabilização de microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais.

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido avaliada para a inativação de microrganismos<sup>17</sup>. Para que ocorra o processo fotodinâmico é necessária 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 oxigênio<sup>17,18</sup>. Primeiramente, a célula-alvo é tratada com o FS, em um processo chamado fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para ocorrer a iluminação do alvo sensibilizado. A combinação da luz de comprimento de onda adequado com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular<sup>17</sup>. Esse mecanismo faz com que tenha a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies reativas<sup>17</sup>. Os dois caminhos podem levar a morte celular do microrganismo<sup>17,18</sup>. Hoje em dia vem sendo empregada em aPDT, os FS de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas que apresentam elevada banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e6, solúvel em água que apresenta um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete<sup>19</sup>. Ele apresenta alta banda de absorção no espectro eletromagnético (650 a 680 nm), o que o permite atravessar com maior profundidade as membranas biológicas, melhorando a ação da terapia fotodinâmica<sup>19</sup>.

A aPDT mediada pelo PDZ gerou uma redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após esse tratamento. Ao avaliar o biofilme, aPDT promoveu redução na viabilidade celular equivalente a 0,9 log<sub>10</sub> (UFC/mL) para *C. albicans* e 1,4 e 1,5 log<sub>10</sub> (UFC/mL) para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente<sup>20</sup>. Outro estudo, utilizando modelo murino de candidose, avaliou a eficácia da aPDT, mediada pelo PDZ e LED na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol (ATCC e isolados clínicos)<sup>21</sup>. A aPDT promoveu redução na ordem de 1,15 a 1,96 log<sub>10</sub>, dependendo da cepa avaliada (R15, ATCC 96901, respectivamente), já na outra cepa (R10) não houve decréscimo na quantidade de UFC, logo foi menos susceptível à aPDT. Quando os animais foram tratados durante cinco dias consecutivos com aPDT (100mg/L de PDZ com LED) ou com antifúngico tópico

Nistatina (NIS), a aPDT foi bastante efetiva na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3,2 log<sub>10</sub>, respectivamente. Além disso, os animais tratados com aPDT resultaram em remissão completa das lesões orais, já quando os animais foram tratados com Nistatina houve remissão parcial das mesmas<sup>22</sup>. Em outro estudo<sup>23</sup> utilizando o mesmo modelo murino de infecção foi observado que a cepa resistente ao fluconazol (ATCC 96901) foi menos susceptível à aPDT uma vez que a redução de *C. albicans* observada nos animais tratados com aPDT ou NIS foi de 1,3 e 1,1 log<sub>10</sub>, respectivamente, enquanto o aspecto macroscópico da lesão permaneceu igual aos animais que não receberam tratamento. Quando as terapias foram associadas, a redução no número de colônias foi mais acentuada, equivalente a 2,6 e 2,1 log<sub>10</sub>, para os grupos NIS+aPDT e aPDT+NIS, respectivamente, e foi observada remissão da lesão em aproximadamente 90%, 24 horas após o tratamento (em comparação ao grupo controle). De maneira geral, os estudos citados<sup>22,23</sup> demonstraram a susceptibilidade das espécies de *Candida spp.* à aPDT em biofilme, entretanto, a completa inativação das células fúngicas não ocorreu. A sobrevivência desses microrganismos pode ser atribuída à complexa estrutura dos biofilmes, fornecendo proteção aos mesmos e resistência aos fármacos, o que torna os biofilmes de *Candida spp.* menos susceptíveis à aPDT quando comparados com culturas planctônicas. Além disso, cepas resistentes ao fluconazol também são menos susceptíveis ao tratamento fotodinâmico<sup>24</sup>.

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é usado mundialmente para limpar feridas, remover tecido morto ou como agente debridante oral, devido às suas propriedades oxidantes<sup>25</sup>. A resposta de *C. albicans* ao estresse oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicou a formação de biofilme com uma matriz polimérica extracelular espessa com níveis aumentados de polissacarídeos e eDNA na matriz de biofilme<sup>26</sup>. Por outro lado, a utilização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia potencializar o efeito da aPDT. A combinação do FS azul de metileno (60 µM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) melhora a eficácia da aPDT em culturas planctônicas de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) e fungo (*C. albicans*). Segundo os autores Garcez et al.<sup>25</sup>, utilizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes do tratamento fotodinâmico ou adicionar o FS na solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> melhora a absorção do FS pelo microrganismo e potencializa a morte microbiana<sup>25</sup>. A associação destas duas substâncias também foi efetiva na inativação de culturas planctônicas e na inibição de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (até 57% de redução de biomassa utilizando 250 mM de azul de metileno dissolvido em 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>27</sup>. A utilização da

clorexidina ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associada a aPDT (azul de toluidina a 100 µg/mL) foi mais eficaz na erradicação de *S. aureus* em discos titânio em comparação com quaisquer dos tratamentos isoladamente<sup>28</sup> e o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, seguido da aPDT (riboflavina + LED) aumentou a morte de bactérias periodontopatogênicas em suspensão e reduziu as contagens bacterianas em modelo de biofilme<sup>29</sup>. Por outro lado, a associação de peróxido de hidrogênio com a nanopartícula de β-ciclodextrina conjugada como FS não resultou em um efeito intensificado da aPDT sobre o *S. mutans*<sup>30</sup>. Segundo os autores, o estresse oxidativo promovido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode alterar a estrutura do biofilme, favorecendo a penetração de FS e luz nos níveis mais profundos do biofilme. Além disso, as ROS produzidas pelo peróxido de hidrogênio podem sensibilizar células e componentes da matriz para que fiquem mais suscetíveis à explosão de ROS da aPDT. No entanto, essa suposição precisa ser investigada, uma vez que não há relatos até o momento de estudos que avaliaram o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associado à aPDT na matriz extracelular de biofilmes de *C. albicans*. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a aplicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode potencializar a ação da aPDT (mediada por PDZ e LED) em biofilmes suscetíveis (ATCC 90028) e resistentes ao fluconazol (ATCC 96901).

## 2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a eficácia da associação do peróxido de hidrogênio à terapia fotodinâmica antimicrobiana, mediada pelo Photodithazine® e LED, sobre a matriz extracelular de biofilmes de *C. albicans* susceptível (ATCC 90028) e resistentes ao fluconazol (ATCC 96901).

### 3 PUBLICAÇÃO

#### 3.1 Publicação 1\*

##### **Hydrogen peroxide enhances the efficacy of photodynamic therapy against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* biofilms**

Tábata Viana de Sousa<sup>a</sup>; Cláudia Carolina Jordão<sup>a</sup>, César Augusto Abreu-Pereira<sup>a</sup>, Ana Luiza Gorayb Pereira<sup>a</sup>; Paula Aboud Barbugli<sup>a</sup>; Ana Claudia Pavarina<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Department of Dental Materials and Prosthodontics, School of Dentistry at Araraquara, Univ Estadual Paulista - UNESP, Rua Humaitá, 1680, 14801-903, Araraquara, SP, Brazil.

##### **\*Correspondence to:**

Department of Dental Materials and Prosthodontics, School of Dentistry at Araraquara, Univ Estadual Paulista - UNESP.

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, São Paulo, 14801-903 Brasil

Phone: +55 (16) 3301-6544

E-mail: [ana.pavarina@unesp.br](mailto:ana.pavarina@unesp.br)

##### **Abstract**

*Candida albicans* and matrix are essential for the development of biofilms, and assays should therefore target both components. The aim of this study was evaluated the effectiveness of the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) combined with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), mediated by Photodithazine® (P) and LED (L) on biofilms formed by fluconazole susceptible (CaS) and resistant (CaR) *Candida albicans* strains. Biofilms were grown for 48 hours and were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10mM) for 5 min, followed by application of P and L either singly or combined (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+P+L+, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +P-L+, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, P+L+, P-L-, P+L-, P-L+; n=12). After the treatment, biofilms were evaluated by colony-forming unit/mL, extracellular matrix components [polysaccharides soluble in water (WSP) and in alkali (ASP), proteins, eDNA,], biomass (total and insoluble) and proteins. Scanning Electron Microscopy (SEM) was also performed. The data were analyzed by a three-way ANOVA test with Bonferroni's post-hoc test. The biofilm components of CaS and CaR were affected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combined with aPDT.

---

\* Artigo formatado segundo as normas do periódico *Photochemistry and Photobiology B* para o qual pretende-se submeter.

CaS and CaR presented a significant reduction in cell viability, biomass, components of cell reduction (both types of polysaccharides, eDNA) and proteins (in the soluble and insoluble portion of biofilms) compared to the control (P-L-). Through scanning electron microscopy, it was possible to visualize a reduction in the number of cells and the hyphae became more dispersed. In short, the association with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased the effectiveness of aPDT and reduced the extracellular matrix components of the biofilm; therefore, this association shows promise for possible applications in vivo, since in vitro results were promissory.

**Keywords:** Photochemotherapy, *Candida albicans*, hydrogen peroxide.

## 1-) Introduction

*Candida albicans* is a commensal fungus present in the microbiota of the oral cavity and in the human body [1, 2, 3]. This fungus can cause infections in situations of immune system imbalance, due to its remarkable ability to adapt in different niches in the host [1]. The virulence of *C. albicans* is associated with its ability to form biofilms, which are organized communities of cells embedded in a matrix of extracellular polymers [4]. Biofilm development begins with the adherence of planktonic cells to an abiotic surface, followed by cell proliferation, hyphae development, extracellular matrix (ECM) production and biofilm maturation [5]. ECM of *C. albicans* biofilms polysaccharides, proteins, lipids and nucleic acids. [6] These components essential for protecting cells from attack by the host's immune system and antifungals [7].

Indiscriminate use of topical or systemic antifungals the azole class fungal infections has resulted in the development of resistance in *Candida* species [8,9]. The antifungal tolerance of *C. albicans* biofilms is multifactorial and associated with the activation of drug efflux pumps, physiological state and the protection by the ECM through  $\beta$ -glucans that bind to fluconazole and amphotericin B [8, 9]. The increase in the incidence of resistant-pathogens to conventional antifungal agents, the toxicity of the drugs and tolerance of biofilms, strategies to treat microorganisms resistant to conventional treatments.

In this context, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been evaluated for the inactivation of microorganisms and treatment of candidiasis [10, 11, 12]. The photodynamic process consists of using a photosensitizing agent (PS), the application of light that corresponds to the absorption band of the FS in the presence of oxygen [13, 14]. First, the target cell must be treated with PS, and then after photosensitization, the cell must be illuminated with a light source of a wavelength suitable for the FS. The interaction of light with FS, associated with

oxygen, results in reactive species cell inactivation [13]. This mechanism involves the absorption of photons from the light source by the FS which gets its electrons to an excited state. In the presence of oxygen, the FS excited by light can react with neighboring molecules through the transfer of electrons or hydrogen (type I reaction) or by the transfer of energy to oxygen (type II reaction), leading to the production of reactive oxygen species (ROS) [13]. Both pathways can cause cell death of the microorganism [13, 14]. Chlorin are second-generation FS that have been commonly used in aPDT. Photodithazine® (PDZ) is a water-soluble e6 chlorin with a high quantum yield of singlet oxygen formation [15] and has a high absorption band in the electromagnetic spectrum (650 to 680 nm), which penetrate biological membranes with better depth, improving the action of photodynamic treatment [15].

PDZ-mediated aPDT caused a significant reduction in the viability of planktonic cultures of *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*, while five strains of *C. albicans* were completely inactivated after this treatment [10]. When evaluated in biofilm, aPDT promoted a reduction in cell viability correspondent to 0.9 log<sub>10</sub> (CFU/mL) for *C. albicans* and 1.4 and 1.5 log<sub>10</sub> (CFU/mL) for *C. tropicalis* and *C. glabrata*, respectively [10]. The same strategy applied to a murine model of candidiasis was effective inactivating *C. albicans* susceptible to fluconazole showing a reduction of 3 log<sub>10</sub> [11], but not fluconazole-resistant strains [12]. Specifically, the strains R15 and ATCC 96901 showed a decrease in CFU values of 1.15 to 1.96 log<sub>10</sub>, respectively. But the R10 strain was not susceptible to photodynamic treatment [12]. aPDT mediated by PDZ was as effective as the topical antifungal nystatin in treating induced candidiasis in mice inoculated with a fluconazole-resistant strain (ATCC 96901), reducing viability by approximately 1.2 log<sub>10</sub> [16]. In general, the studies demonstrated the susceptibility of *Candida spp.* biofilms to aPDT; however, complete inactivation of fungal cells was not shown [10]. The survival of microorganisms can be attributed to the complex structure of biofilms extracellular matrix. The ECM can reduce the photosensitizer and light penetration in the deeper levels of the biofilm, resulting in a decrease in the effectiveness of the photodynamic treatment, which makes *Candida spp.* less susceptible to aPDT when compared to planktonic cultures of these species [17]. In addition, fluconazole-resistant strains are also less susceptible to photodynamic treatment [10, 11, 12, 16].

In vitro studies reported an increase in the antimicrobial efficacy of aPDT when hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was applied before or together with a FS, followed by light application [18,19]. The combination of FS methylene blue (60 µM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) increased the effectiveness of aPDT in planktonic bacteria cultures (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) and *C. albicans* [18]. The use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> before photodynamic treatment

improved the absorption of FS by the microorganism and potentiated microbial inactivation [18]. The use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with aPDT mediated by toluidine blue (100 µg/mL) was effective in the death of *S. aureus* in titanium discs [19]. According to authors, the oxidative stress promoted by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can change the structure of the biofilm, agreeing the penetration of FS and light in the deeper levels of the biofilm. In addition, the ROS produced by hydrogen peroxide can sensitize cells and matrix components so that they are more susceptible to the aPDT ROS explosion. However, this assumption needs to be investigated, since there are no reports at the time of studies that evaluated the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with aPDT in the extracellular matrix of *C. albicans* biofilms. Thus, the purpose of the present study was to evaluate whether the application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can potentiate the action of aPDT (PDZ and LED mediated) in susceptible (ATCC 90028) and fluconazole resistant (ATCC 96901) biofilms.

## 2-) Material and Method

### 2.1. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

The MIC test for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was performed to define the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to be used in the treatment of CaS and CaR strains. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) broth microdilution method [20] was used as a reference. For this, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was suspended in PBS (Phosphate-buffered saline) (1x, pH 7.4) in dilutions ranging from 1 mM to 1M. As a contamination control, 100 µL of RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (2×concentrate) and 100 µL of PBS (without cells and without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were added to the well. As a growth control, only cell suspensions were tested without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For the MIC test, serial dilutions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ranging from 1 mM to 1M) were incubated in 96-well plates with microorganism suspension adjusted to obtain a final inoculum concentration of 0.5x10<sup>3</sup> to 2.5x10<sup>3</sup> CFU/ mL in RPMI medium. The plates were incubated at 35°C and visually observed for the presence or absence of growth after 24 h. In addition to visual reading, the optical density of each plate well was measured in a plate reader (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom®) at 492 nm after 24 hours of incubation. Plating on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) was also performed in duplicate to obtain the Minimum Fungicide Concentration (MFC) and perform the death curve at different times of 0.5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 1h, 2h, 12h, 15h, 18h and 24h. The MIC was calculated based on the growth density and the lowest concentrations that promoted a 50% reduction in growth compared to the drug-free growth

control were considered. The MFC was considered the minimum concentration that resulted in the absence of colonies. The survival curves were used to determine the time that the biofilm should be treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> before aPDT.

## 2.2. Biofilm formation

Biofilms were formed with strains of *C. albicans* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA) susceptible to fluconazole (ATCC 90028; CaS) and resistant to fluconazole (ATCC 96901; CaR). Strains that were stored in a -80° freezer were thawed and reactivated in Petri dishes containing Sabourand Dextrose Agar (SDA) culture medium supplemented with chloramphenicol (0.05 g/L) and incubated at 37°C for 48 h. After this period, 5 colonies of each strain were collected and transferred to 5 mL of Yeast Nitrogen Base (YNB) medium supplemented with glucose (100 mM) and incubated at 37° C. After 16 h of incubation, 0.5 mL of the pre-inoculum was transferred to corresponding Falcon tubes containing 9.5 mL of YNB culture medium supplemented with 100 mM glucose (1:20 dilution). The inoculum was incubated at 37° C for 8 hours and then the optical density was read in a spectrophotometer (540 nm) to verify if the microorganism gotten the exponential growth phase (mid-log) which corresponds to  $0.55 \pm 0.08$  nm for the strain of CaS and  $0.477 \pm 0.03$  nm for CaR, around 7 hours [21]. Next, the OD<sub>540nm</sub> of the inoculums was adjusted to 10<sup>6</sup> CFU/mL. CaS and CaR biofilms were grown separately in a 24-well culture plate. For this, an aliquot of 1 mL of the cell suspension (10<sup>6</sup> CFU/mL) with 1 mL of RPMI 1640 medium (Mediatech Inc., Herdon, VA, USA) buffered with MOPS (Research Products, Mount Prospect, Illinois, USA) were added into each well of the plate. This plate was incubated at 37 °C under agitation (75 rpm) for 90 min for cell adhesion. Next, the culture medium was removed and each well was washed twice with 1 mL sterile PBS solution to remove non-adhered cells and metabolites. Next, 1mL of buffered RPMI culture medium was added. The plates were kept at 37°C under agitation for 24 h. After this time, the culture medium was changed, and the plate wells were washed with 1mL sterile PBS solution (twice). After washing, 1 mL of RPMI was added to each well and the plates were kept at 37°C under agitation for another 24 h, totaling the 48h period of biofilm formation. The biofilms formed were washed twice with PBS and exposed to the treatments described in Table 1. The biofilms were formed in triplicates and the experiments were performed on three independent occasions (n = 12) for each of the strains evaluated.

**Table 1** – Name of experimental groups and description of treatments performed.

<b>Groups</b>	<b>Description of the treatments</b>
<b>P-L-</b>	Biofilm was not treated with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> or aPDT (control group).
<b>P-L+</b>	Biofilm was only illuminated with red LED (660nm) for 12 min (50 J/cm <sup>2</sup> ).
<b>P+L-</b>	Biofilm was incubated with PDZ (200 mg/L) for 20 min.
<b>P+L+</b>	Biofilm was incubated with PDZ (200 mg/L for 20 min), and then illuminated with LED (12 min, 50 J/cm <sup>2</sup> ).
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Biofilm was treated with 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> for 5 min.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+</b>	Biofilm was treated with 10 Mm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> for 5 min. It was then incubated with PDZ (200 mg/L) for 20 min and then illuminated with LED (12 min, 50 J/cm <sup>2</sup> ).
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+</b>	Biofilm was treated with 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> for 5 min and then illuminated with LED (12 min, 50 J/cm <sup>2</sup> ).

### 2.3. aPDT treatment in association with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 2.3.1. Photosensitizer and light source

Photodithazine® (PDZ, VETA-GRAND Co., Russia) was used for photosensitization in biofilms. PDZ has an absorption peak at 660 nm. Prior to the experiments, the PDZ stock solution (5000 mg/L) was diluted in PBS solution to obtain a final concentration of 200 mg/L. The pre-incubation time used was 20 minutes and the PDZ was irradiated with a red light-emitting diode (LED) device (660 nm) at a dose of 50 J/cm<sup>2</sup> [22, 23]. This LED is composed of red LEDs (LXHL-PR09, Luxeon® III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA) evenly distributed with a constant power of 30 mW/cm<sup>2</sup>. The following formula was used to calculate the lighting time: Light dose (J / cm<sup>2</sup>) = I (W / cm<sup>2</sup>) x t (sec). Thus, taking into account the light dose and output power of each LED device, the plates were irradiated for 12 min.

#### 2.3.2. Experimental groups

The CaS and CaR biofilms were subjected to the treatments described above in Table 1.

Hydrogen peroxide was used at a concentration of 10 mM (according to the previously established MIC) for 5 minutes. After this period, the wells were washed with PBS, and the proposed photodynamic treatment was performed (Table 1).

### 2.3.3. Evaluation of the effectiveness of treatments

After the treatments, biofilms were evaluated by colony-forming UFC/mL, extracellular matrix components [polysaccharides soluble in water (WSP) and in alkali (ASP), eDNA and proteins], biomass (total and insoluble) and total proteins.

The biofilms were washed three times with sterile 0.89% NaCl to remove dispersed cells and matrix components, conserving only those components that were adhered to the biofilm. Next, 2 mL of 0.89% NaCl was added to each well and the biofilms were carefully removed from the wells with the help of a pipette tip and transferred to a sterilized microtube. After this process, the biofilms were subjected to sonication (30s; 7w; 190J) and processed for analysis as previously described. [8, 24, 25]. Next, 0.1 mL was used for determination of  $\log_{10}$  (CFU / mL) and 0.1 mL for quantification of total biomass (total dry weight) [21, 26]. The remainder of the volume (1.8 mL) was centrifuged (5,500 xg / 10 min / 4 °C), and the supernatant (1.8 mL) was aliquoted for analysis of soluble matrix components: soluble' proteins (0.150 mL) [27, 28], water soluble polysaccharide (WSP) (1 mL) [21, 29] and eDNA (0.650 mL) [21, 26]. The pellet (insoluble components of ECM plus fungal cells) was resuspended in 1 mL of Mili-Q water, and aliquots were separated to quantify 'insoluble' proteins (0.05 mL) [27, 28] insoluble biomass (insoluble dry weight) and alkali-soluble polysaccharide (ASP) (0.95 mL) [21, 29].

### 2.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

CaS and CaR biofilms were grown on round polystyrene surfaces obtained from the bottom of 24-well plates [30]. Prior to biofilm formation, the discs were sterilized in a microwave for 3 minutes at 650 W and dried in a laminar flow chamber with UV light for 30 minutes on each side [31]. Next, they were introduced into new 24-well plates for biofilm formation as described above. After 48 h of biofilm growth, the medium was detached, and the wells were washed twice with 1 mL of sterile PBS (1X concentrate) and subjected to treatments (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+, P+L+). In addition was evaluated the control group (P-L-). Next, the discs were fixed with 2.5% glutaraldehyde (60 min/room temperature), washed twice with PBS (1X concentrate) and dehydrated. The dehydration process was carried out with a series of washes with 70% and 90% ethanol for 60 min each, followed by 5 washes of 30 min with ethanol 99%. Samples were stored in a desiccator with silica for 7 days to ensure moisture-free samples. Next, the samples were subjected to metallization and analyzed in a scanning electron microscope at 1000X and 4000X magnification. [32, 33].

## 2.5. Statistical analysis

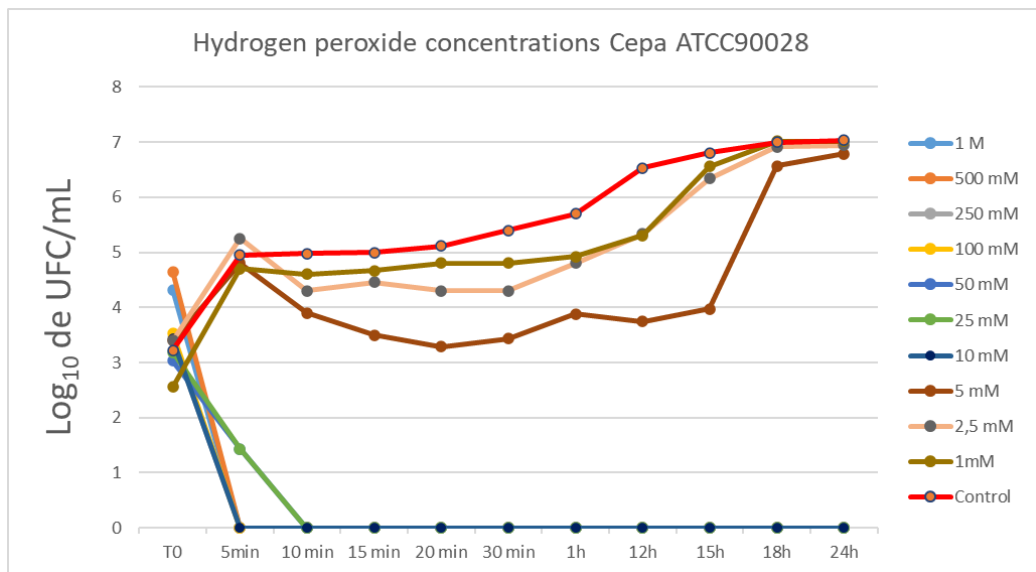
The normality and homoscedasticity of the data for each of the biofilm components (dependent variables) were evaluated using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Next, after the data met the assumptions, a three-way ANOVA test was performed followed by a Bonferroni post-test to verify the interaction between the treatment factors (Light, PDZ and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; independent variables). The significance level adopted was 5% ( $\alpha=0.05$ ). Analyses were performed using the SPSS software (IBM® SPSS® Statistics, version 27, Chicago, IL, USA).

## 3. Results

### 3.1. Minimum Inhibitory Concentration to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and CaS Survival Curve

For CaS, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> susceptibility test revealed that the MIC<sub>50</sub> value was 10 mM. In the survival curve (Figure 1), a reduction of 3 log<sub>10</sub> was observed using the concentration of 10 mM at 5 minutes. Considering the fungal viability (CFU/mL) obtained at 0 mM as 100% of growth, reductions superior than 50% were observed for concentrations from 10 mM. For the lowest concentration of hydrogen peroxide tested, 1 mM, a reduction of 7.96% of viable colonies was observed in relation to the control; while for the concentration of 2.5 mM, the reduction was 27.62%; for 5 mM it was 23.25%; for 10 mM the reduction was 75.67%; for 25 mM it was 89.86%; for 50 mM it was 84.25%; 250 mM was 92.67%; 500 mM was 92.36%; and for the 1M concentration, the reduction was 98.28%. The MFC was not reached because even at the highest concentration (1 M) of hydrogen peroxide evaluated the reduction was 98.28%, not 100%.

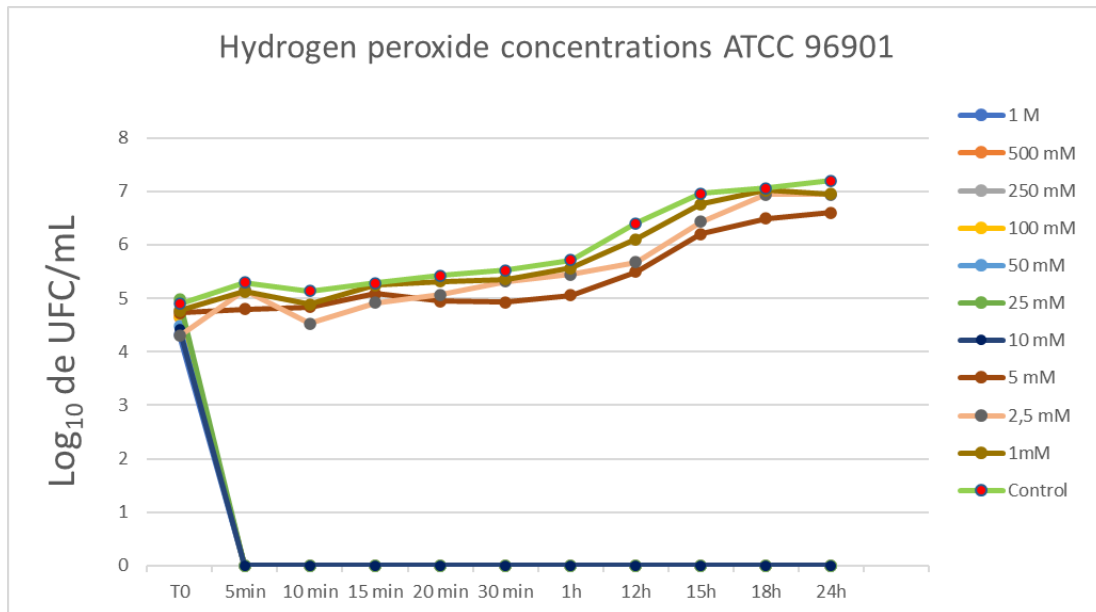
**Figure 1-** Average Viable colony count (CFU/mL) at different times and different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for CaS



### 3.2 Minimum Inhibitory Concentration to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and CaR Survival Curve

For CaR, the hydrogen peroxide susceptibility test revealed that the MIC<sub>50</sub> value was 10 mM. In the survival curve a reduction of 3.5 log<sub>10</sub> was observed using the concentration of 10 mM in the time of 5 minutes. Thus, considering the viable colony count obtained at 0 mM as 100% of fungal growth, reductions greater than 50% were observed for concentrations up to 10 mM. For the lowest concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tested (1 mM), we obtained a reduction of 1.25% of viable colonies in relation to the control; for the 2.5 mM concentration the reduction was 5.31%; 5 mM reduced 23.25%, for 10 mM the reduction was 83.38%, 25 mM promoted a reduction of 86.28%; 50 mM reduced by 85.65%; 250 mM in 88.93%; 500 mM in 92.83%; and, the highest concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tested (1M) promoted a reduction of 93.61%. The MFC was not reached because at the highest concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tested (1M), a reduction of 93.61% was observed, not 100%.

**Figure 2-** Average Viable colony count (CFU/mL) at different times and different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for CaR



### 3.3. Quantification of biofilm components after treatments

In the analysis of colony viability (CFU/mL) of CaS and CaR, a statistically significant interaction was observed between the three treatment factors ( $p < 0.001$ ) for all groups, with a significant reduction in relation to the control group P-L- ( $p < 0.001$ ). For CaS, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showed the greatest reduction (0.9 log<sub>10</sub>), being statistically different from the other groups ( $p \leq 0.044$ , reduction of 14.39%) (Table 2). For CaR in the P+L+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, a significant reduction was also observed ( $p < 0.001$ , 18.2% reduction) in relation to the control group (P-L-) equivalent to 1.09 log<sub>10</sub>. The other groups were statistically similar ( $p \geq 0.066$ ) to the P-L- control group (Table 3).

In the analysis of total dry weight and insoluble dry weight, a significant interaction was found between the three treatment factors (Light, PDZ and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for CaS and CaR ( $p < 0.001$ ). For CaS, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showed the greatest reduction in total dry weight ( $p < 0.001$ ; reduction of 51.62%) when compared to the P-L- group and was statistically similar to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group ( $p = 0.267$ ) (Table 2). For CaR, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showed the highest total weight reduction ( $p = 0.001$ ; 61.31% reduction) in relation to the P-L- group. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+, P+L+ and P-L+ groups also showed a significant reduction ( $p < 0.001$ ) in relation to the control group (P-L-), however, to a smaller amount (Table 3).

In the analysis of the insoluble dry weight of CaS, it was observed that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showed the greatest reduction ( $p < 0.001$ , 67.55% reduction) in relation to the control group (P-L-), being statistically different from the other groups ( $p < 0.001$ ). The group treated only with peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was statistically similar ( $p = 0.352$ ) to the P+L+ group (Table 2). For CaR, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showed a significant reduction in relation to the P-L- group ( $p = 0.001$ ; reduction of 55.10%), being statistically different from the other groups ( $p < 0.001$ ). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+ and P+L+ groups showed an average reduction of 47% in insoluble biomass, being similar to each other ( $p \geq 0.769$ ) (Table 3).

In the ASP analysis, a significant interaction was observed between the three treatment factors for CaS and CaR ( $p < 0.001$ ). For CaS, the P+L+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group showed the greatest reduction in ASP levels ( $p < 0.001$ ; 39.52% reduction) compared to the control group (P-L-), followed by the P-L+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> groups ( $p = 0.001$ ), which were statistically similar ( $p \geq 0.854$ ) to each other (Table 2). For CaR, the P+L+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group showed the greatest reduction in ASP levels ( $p < 0.001$ ; 70.57% reduction) compared to the control group (P-L-), followed by the P+L+ groups (58.85 %) and P-L+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (55.71%), which were statistically similar ( $p = 1.000$ ) to each other and different from the control group ( $p < 0.001$ ) (Table 3).

In the WSP analysis, a significant interaction was also observed between the three treatment factors for CaS ( $p < 0.001$ ) and CaR ( $p = 0.002$ ). For CaS, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ and P+L+ groups showed a significant reduction in WSP values ( $p \leq 0.007$ ) after the treatments, with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showing a reduction of 25.92% in relation to the P-L- group (Table 2). For CaR, in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group, there was a significant reduction (46.09%) in WSP levels ( $p < 0.001$ , 46.09% reduction) in relation to the P-L- group, followed by the P+L+ and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> groups, which showed a reduction of 39.06%, being statistically similar to each other ( $p = 1.000$ ) and different from the P-L- group ( $p < 0.004$ ). Biofilms treated with light alone (P-L+) or with the association of light with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+) showed a significant reduction ( $p \leq 0.012$ ) in ASP levels when compared to the control group (P-L-) being statistically similar to each other ( $p = 1.000$ ) (Table 3).

In the analysis of the eDNA of the biofilm matrix, the results showed that there was a significant interaction between the three treatment factors for CaS ( $p < 0.001$ ) and CaR ( $p = 0.006$ ). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showed the greatest reduction ( $p < 0.001$ ) in relation to P-L- group, followed by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+ and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> groups, which were statistically similar ( $p \geq 0.190$ ) to each other (Table 2). For CaR, the P+L+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group showed the highest significant reduction ( $p < 0.001$ ; 57.51% reduction) compared to the control group (P-L-), followed by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+,

P+L+ and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> groups that also showed a significant reduction ( $p \leq 0.001$ ) in eDNA levels in relation to the P-L- group, with a reduction of 45.84%, 35.47% and 27.39%, respectively.

In both strains evaluated, there was a significant interaction between the three treatment factors in the analysis of proteins in the soluble (CaR,  $p < 0.001$ ; CaS,  $p = 0.002$ ) and the insoluble portion of the biofilm (CaR,  $p < 0.001$ ; CaS,  $p < 0.001$ ). In the analysis of soluble proteins in CaR, the P+L+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group was significantly different from the P-L- group ( $p < 0.001$ ; reduction of 5.7%) (Table 3). However, the other groups were statistically similar to the control (Table 3). In the CaR biofilm, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showed the highest reduction rate of insoluble proteins (44.44%) than the P-L- group. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, P-L+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, P+L+, and P-L+ groups also showed a significant reduction ( $p \leq 0.001$ ) of 38.88% than the control group and were statistically similar ( $p \geq 0.891$ ) to each other (Table 3). In the CaS biofilm, the soluble protein values were statistically similar between the evaluated groups (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+) and different from the control group (P-L-;  $p < 0.001$ , 25% reduction) (Table 2). Furthermore, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group showed the most significant decrease in insoluble proteins than the P-L- group, followed by the P+L+ group ( $p < 0.001$ ). The percentage of drop in the values of insoluble proteins of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group versus the P-L- group was 45.45% (Table 2).

**Table 2** – Mean values, standard deviations and rate and reduction (%) of CaS biofilms after treatments: viable colony count (CFU/mL); Dry Weight (mg); Insoluble Dry Weight (mg); Soluble proteins ( $\mu\text{g}$ ); Insoluble proteins ( $\mu\text{g}$ ); Water-soluble polysaccharides (WSP;  $\mu\text{g}$ ); Alkali soluble polysaccharides (ASP;  $\mu\text{g}$ ); extracellular DNA (eDNA; ng)

Groups		MEC componentes							
		UFC/mL ( $\log_{10}$ )	Total weight (mg)	Insoluble weight (mg)	Soluble proteins (mg)	Insoluble proteins ( $\mu\text{g}$ )	ASP ( $\mu\text{g}$ )	WSP ( $\mu\text{g}$ )	eDNA (ng)
P-L-	Mean and standard deviation	6.303 $\pm$ 0.052	4.858 $\pm$ 0.474	3.094 $\pm$ 0.093	0.024 $\pm$ 0.003	0.011 $\pm$ 0.002	0.253 $\pm$ 0.043	0.054 $\pm$ 0.007	194.856 $\pm$ 31.364
	Reduction %	7.282 <sup>#</sup>	26.575 <sup>#</sup>	32.579 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	36.364 <sup>#</sup>	15.020	20.370 <sup>#</sup>	36.523 <sup>#</sup>
P+L+	Mean and standard deviation	5.844 $\pm$ 0.086	3.567 $\pm$ 0.293	2.086 $\pm$ 0.108	0.018 $\pm$ 0.006	0.007 $\pm$ 0.001	0.215 $\pm$ 0.069	0.043 $\pm$ 0.006	123.688 $\pm$ 15.392
	Reduction %	7.282 <sup>#</sup>	26.575 <sup>#</sup>	32.579 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	36.364 <sup>#</sup>	15.020	20.370 <sup>#</sup>	36.523 <sup>#</sup>
P-L+	Mean and standard deviation	6.060 $\pm$ 0.078	3.783 $\pm$ 0.279	2.107 $\pm$ 0.130	0.018 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.003	0.215 $\pm$ 0.045	0.0045 $\pm$ 0.008	147.622 $\pm$ 9.899
	Reduction %	3.855 <sup>#</sup>	22.128 <sup>#</sup>	31.900 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	-	15.0198	16.667	24.240 <sup>#</sup>
P+L-	Mean and standard deviation	6.156 $\pm$ 0.069	4.467 $\pm$ 0.454	2.314 $\pm$ 0.037	0.025 $\pm$ 0.004	0.013 $\pm$ 0.002	0.256 $\pm$ 0.041	0.059 $\pm$ 0.002	183.091 $\pm$ 31.364
	Reduction %	2.332 <sup>#</sup>	8.049	25.210 <sup>#</sup>	-	-	-	-	6.038
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mean and standard deviation	5.910 $\pm$ 0.125	3.017 $\pm$ 0.600	2.007 $\pm$ 0.044	0.018 $\pm$ 0.002	0.008 $\pm$ 0.002	0.177 $\pm$ 0.037	0.047 $\pm$ 0.005	140.333 $\pm$ 16.588
	Reduction %	6.235 <sup>#</sup>	37.896 <sup>#</sup>	35.133 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	27.273 <sup>#</sup>	30.040 <sup>#</sup>	12.963	27.981 <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P+L+	Mean and standard deviation	5.396 $\pm$ 0.161	2.350 $\pm$ 0.778	1.004 $\pm$ 0.055	0.018 $\pm$ 0.002	0.006 $\pm$ 0.001	0.153 $\pm$ 0.038	0.040 $\pm$ 0.009	100.364 $\pm$ 7.230
	Reduction %	14.390 <sup>#</sup>	51.626 <sup>#</sup>	67.550 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	45.455 <sup>#</sup>	39.526 <sup>#</sup>	25.926 <sup>#</sup>	48.493 <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P-L+	Mean and standard deviation	5.611 $\pm$ 0.155	2.983 $\pm$ 0.846	1.129 $\pm$ 0.051	0.018 $\pm$ 0.002	0.008 $\pm$ 0.002	0.173 $\pm$ 0.026	0.044 $\pm$ 0.010	125.508 $\pm$ 11.152
	Reduction %	10.979 <sup>#</sup>	38.596 <sup>#</sup>	63.510 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	27.273 <sup>#</sup>	31.621 <sup>#</sup>	18.519	35.589 <sup>#</sup>

<sup>#</sup> Statistically significant reduction ( $p < 0.05$ ) in relation to the control group (P-L-).

- It indicates that there was no statistically significant reduction in relation to the control group (P-L-)

**Table 3**– Mean values, standard deviations and rate and reduction (%) of CaR biofilms after treatments: viable colony count (CFU/mL); Dry Weight (mg); Insoluble Dry Weight (mg); Soluble proteins ( $\mu\text{g}$ ); Insoluble proteins ( $\mu\text{g}$ ); Water-soluble polysaccharides (WSP;  $\mu\text{g}$ ); Alkali soluble polysaccharides (ASP;  $\mu\text{g}$ ); extracellular DNA (eDNA; ng)

Groups		MEC componentes							
		UFC/mL ( $\log_{10}$ )	Total weight (mg)	Insoluble weight (mg)	Soluble proteins (mg)	Insoluble proteins ( $\mu\text{g}$ )	ASP ( $\mu\text{g}$ )	WSP ( $\mu\text{g}$ )	eDNA (ng)
P-L-	Mean and standard deviation	5.965 $\pm$ 0.391	5.041 $\pm$ 1.134	1.176 $\pm$ 0.167	0.403 $\pm$ 0.008	0.018 $\pm$ 0.002	0.350 $\pm$ 0.380	0.128 $\pm$ 0.025	200.193 $\pm$ 31.395
	Reduction %	8.533	38.147 <sup>#</sup>	47.279 <sup>#</sup>	0.993	38.889 <sup>#</sup>	58.857 <sup>#</sup>	39.063 <sup>#</sup>	35.472 <sup>#</sup>
P+L+	Mean and standard deviation	5.456 $\pm$ 0.412	3.118 $\pm$ 0.429	0.620 $\pm$ 0.265	0.399 $\pm$ 0.003	0.011 $\pm$ 0.001	0.144 $\pm$ 0.052	0.078 $\pm$ 0.010	129.180 $\pm$ 10.490
	Reduction %	8.533	38.147 <sup>#</sup>	47.279 <sup>#</sup>	0.993	38.889 <sup>#</sup>	58.857 <sup>#</sup>	39.063 <sup>#</sup>	35.472 <sup>#</sup>
P-L+	Mean and standard deviation	5.836 $\pm$ 0.291	3.041 $\pm$ 0.606	0.680 $\pm$ 0.280	0.398 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.001	0.310 $\pm$ 0.251	0.084 $\pm$ 0.034	158.992 $\pm$ 29.381
	Reduction %	2.163	39.675 <sup>#</sup>	42.177 <sup>#</sup>	1.241	38.889 <sup>#</sup>	11.4286	34.375 <sup>#</sup>	20.581
P+L-	Mean and standard deviation	5.694 $\pm$ 0.639	3.441 $\pm$ 0.776	0.820 $\pm$ 0.427	0.391 $\pm$ 0.012	0.012 $\pm$ 0.002	0.490 $\pm$ 0.218	0.104 $\pm$ 0.033	198.715 $\pm$ 14.024
	Reduction %	4.543	31.740 <sup>#</sup>	30.272 <sup>#</sup>	2.978	33.333 <sup>#</sup>	-	18.750	0.738
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P+L+	Mean and standard deviation	4.870 $\pm$ 0.205	1.950 $\pm$ 0.546	0.528 $\pm$ 0.152	0.380 $\pm$ 0.005	0.010 $\pm$ 0.001	0.103 $\pm$ 0.187	0.069 $\pm$ 0.025	85.056 $\pm$ 10.300
	Reduction %	18.206 <sup>#</sup>	61.315 <sup>#</sup>	55.102 <sup>#</sup>	5.707 <sup>#</sup>	44.444 <sup>#</sup>	70.571 <sup>#</sup>	46.094 <sup>#</sup>	57.513 <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mean and standard deviation	5.739 $\pm$ 0.301	3.041 $\pm$ 0.488	0.612 $\pm$ 0.210	0.397 $\pm$ 0.005	0.011 $\pm$ 0.001	0.314 $\pm$ 0.187	0.078 $\pm$ 0.046	145.352 $\pm$ 18.829
	Reduction %	3.789	39.675 <sup>#</sup>	47.959 <sup>#</sup>	1.489	38.889 <sup>#</sup>	10.286	39.063 <sup>#</sup>	27.394 <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P-L+	Mean and standard deviation	5.664 $\pm$ 0.283	3.066 $\pm$ 0.311	0.622 $\pm$ 0.181	0.388 $\pm$ 0.018	0.011 $\pm$ 0.001	0.155 $\pm$ 0.108	0.080 $\pm$ 0.023	108.413 $\pm$ 12.683
	Reduction %	5.046	39.179 <sup>#</sup>	47.109 <sup>#</sup>	3.722	38.889 <sup>#</sup>	55.714 <sup>#</sup>	37.500 <sup>#</sup>	45.846 <sup>#</sup>

<sup>#</sup> Statistically significant reduction ( $p < 0.05$ ) in relation to the control group (P-L-).

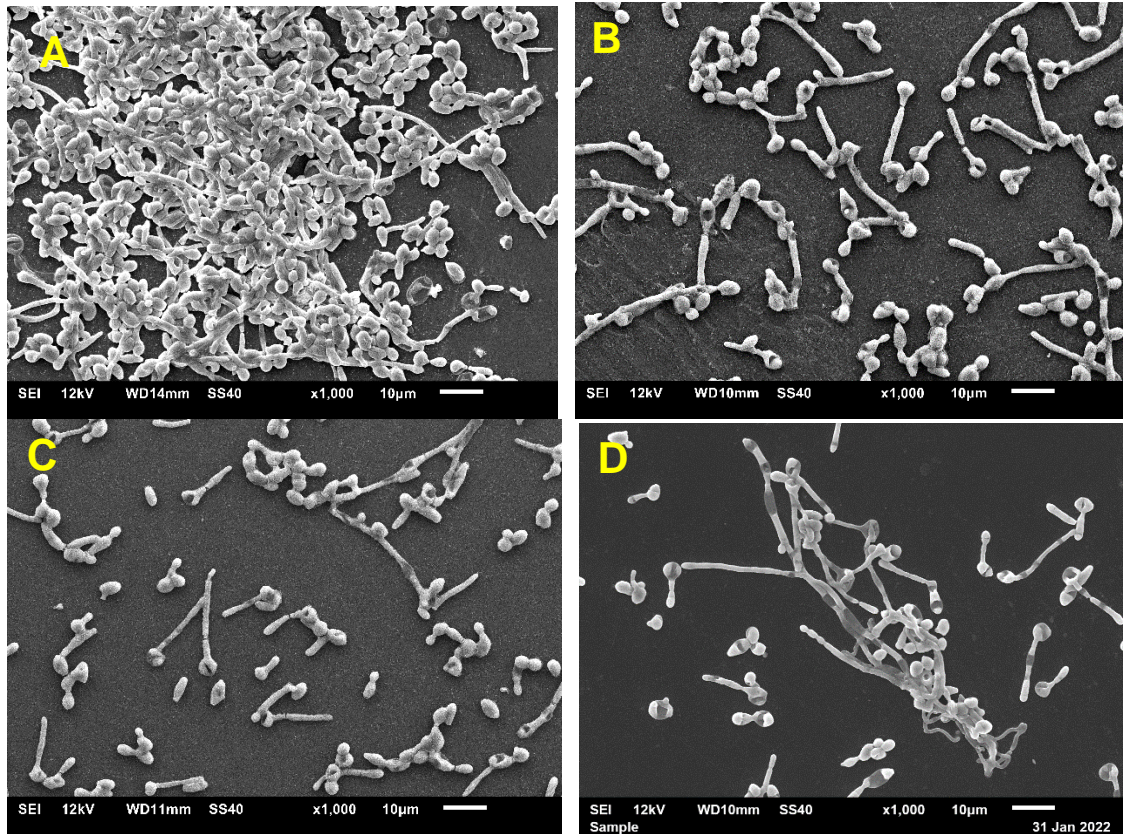
- It indicates that there was no statistically significant reduction in relation to the control group (P-L-).

### 3.4. Scanning Electron Microscopy (SEM) Images

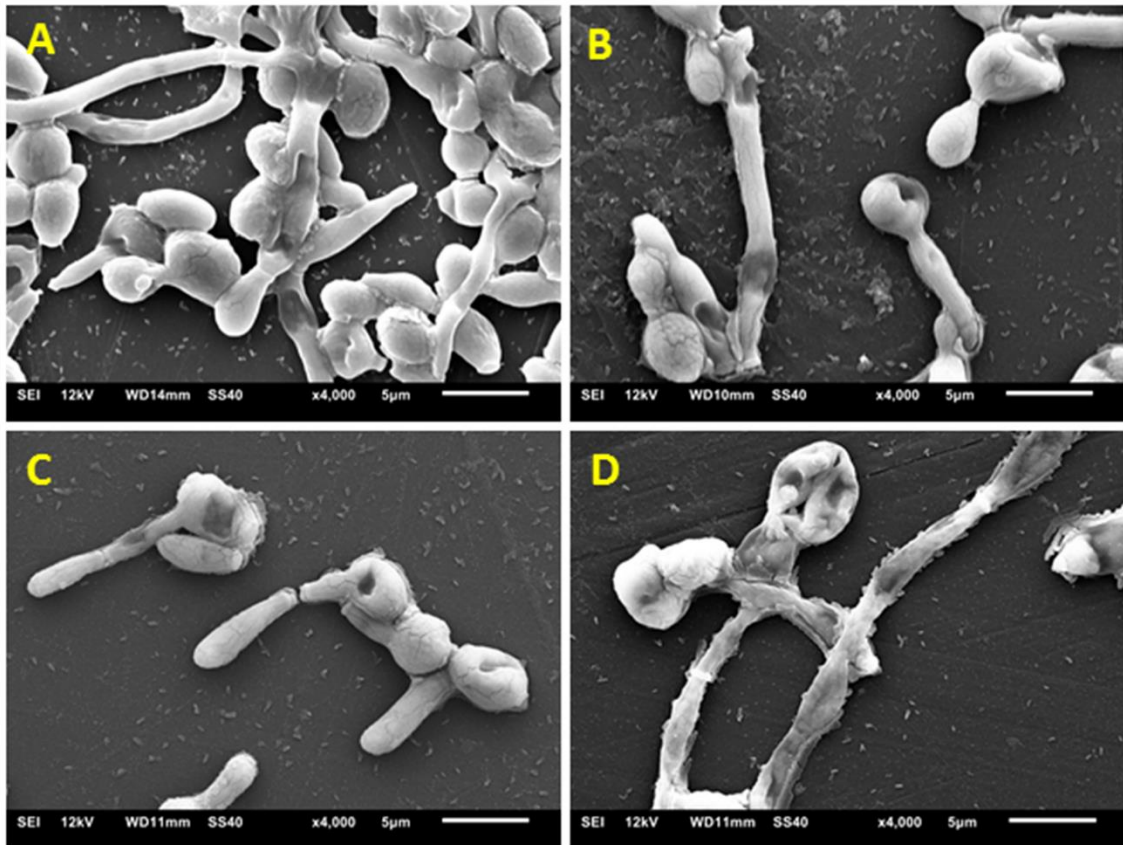
SEM was performed to examine the biofilm structure of CaS (Figure 3A-D and 4A-D) and CaR (Figure 5A-D and 6A-D) strains in the control group (3A, 4A, 5A and 6A) compared to the treated groups: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3B, 4B, 5B and 6B), P+L+ (3A, 4B, 5C and 6D) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> P+L+ (3D, 4D, 5D and 6D). Special attention was given to cell morphologies and spatial organization of the biofilm on the substrate as well as the presence of matrix connecting and protecting cells in these biofilms.

In the CaS images, it was possible to observe the difference in the morphology of the biofilm after the treatments (3B-D) compared to the group without treatment (3A). It is possible to visualize a reduction in the number of cells and the hyphae became more dispersed. In addition, there was a clear change in the characteristics of the extracellular matrix of the biofilm (Figures 3B, 3C and 3D). In figure 4 (B-D) we can visualize at a higher magnification the structural alteration of the matrix caused by the treatments with the appearance of small porosities and rupture. After treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> P+L+, the matrix suffered breakdown and the yeasts and hyphae were exposed/unprotected (Figure 4D).

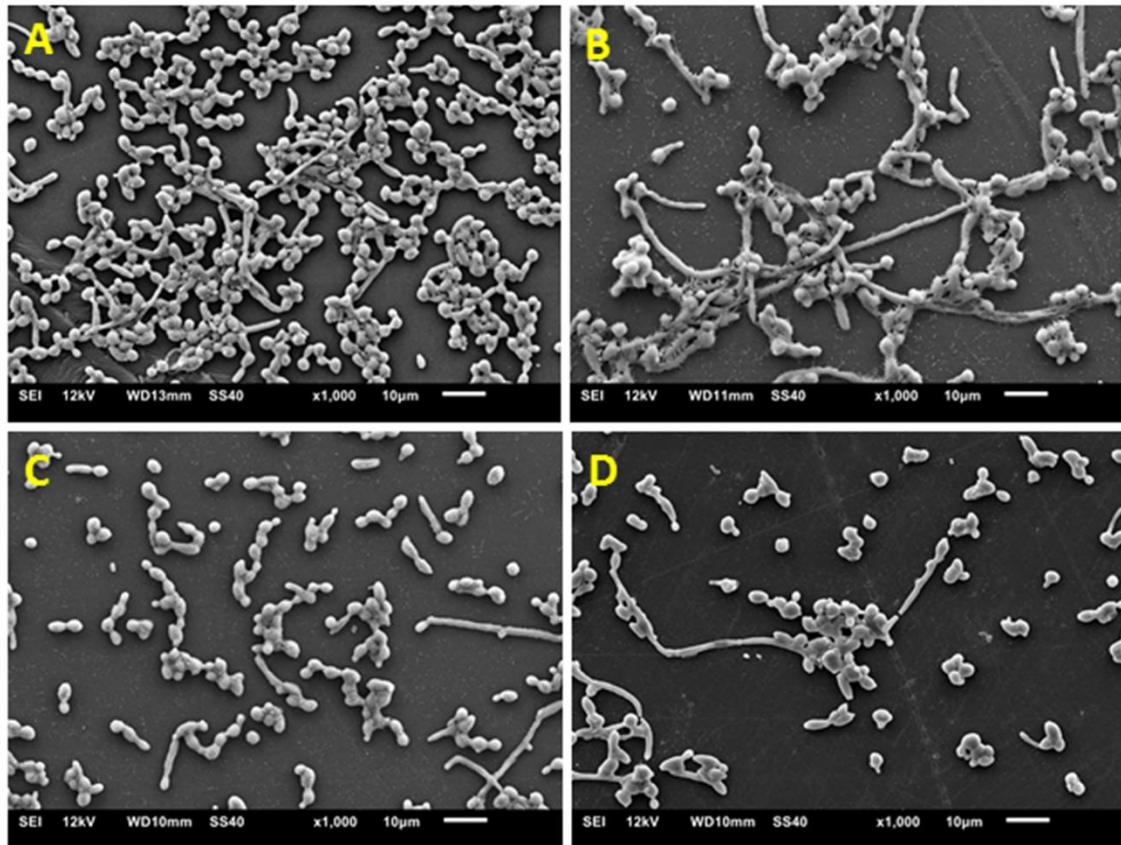
The CaR biofilm (Figure 5A) has a large amount of yeast and more dispersed hyphae, compared to the CaS biofilm (Figure 4A). The treatments reduced the number of biofilm cells (Figures 5C-5D). At higher magnification (Figures 6C-D) it is possible that the biofilm matrix shows some kind of alteration, however on a smaller scale when compared to a CaS.



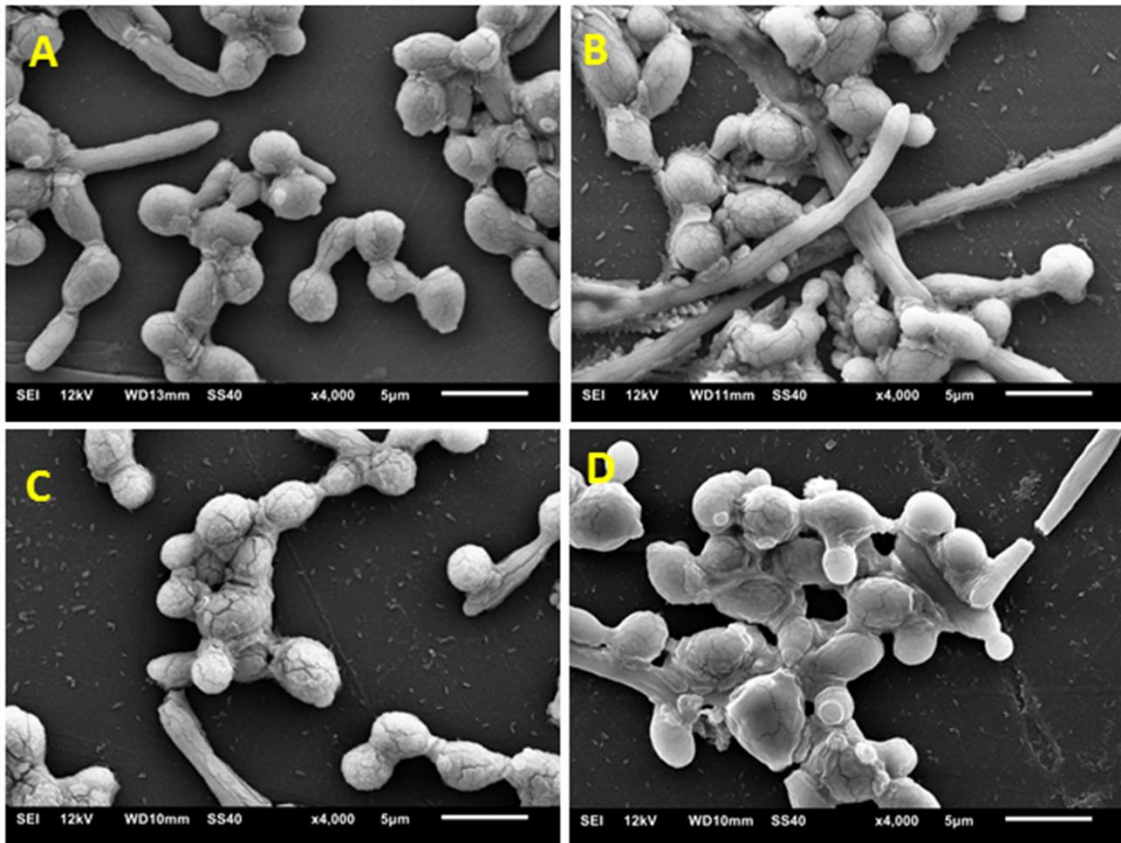
**Figure 3-** Representative Images obtained by SEM at 1000x magnification in CaS biofilms. (A) Biofilm for control, without any treatment (P-L-); (B) Biofilm treated with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min, showing a reduction in the number of cells and the hyphae became more dispersed; (C) Group treated with photodynamic therapy (P+L+), showed a reduction in the number of cells; (D) Group treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with photodynamic therapy (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> P+L+), it is possible to see a large reduction in the number of cells.



**Figure 4-** Representative Images obtained by SEM at 4000x magnification in CaS biofilms. (A) Biofilm for control without any treatment (P-L-); (B) Biofilm treated with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min structural alteration of the matrix occurred; (C) Group treated with photodynamic therapy (P+L+) showed a reduction in the number of cells; (D) Group treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with photodynamic therapy (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+) it is possible to see a structural alteration of the matrix and disarticulation of the matrix.



**Figure 5-** Representative Images obtained by SEM at 1000x magnification in CaR biofilms. (A) Biofilm for control without any treatment (P-L-); (B) Biofilm treated with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min structural alteration of the matrix occurred; (C) Group treated with photodynamic therapy (P+L+) showed a reduction in the number of cells; (D) Group treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with photodynamic therapy (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+) it is possible to see a structural alteration of the matrix and disarticulation of the matrix.



**Figure 5-** Representative Images obtained by SEM at 4000x magnification in CaR biofilms. (A) Biofilm for control without any treatment (P-L-); (B) Biofilm treated with 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min structural alteration of the matrix occurred; (C) Group treated with photodynamic therapy (P+L+) showed a reduction in the number of cells; (D) Group treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with photodynamic therapy (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+) it is possible to see a structural alteration of the matrix and disarticulation of the matrix.

## 5. Discussion

Fungal cells in biofilms of *Candida* species have reduced susceptibility to aPDT compared to planktonic cultures [10]. The survival of microorganisms in biofilms can be attributed to the protective function of the extracellular matrix, a complex structure capable of protecting microorganisms from the action of photodynamic treatment [17]. Thus, new approaches that could disrupt the extracellular matrix and, at the same time, kill microorganisms incorporated into biofilms would be needed. Here, the association of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with aPDT was evaluated as an alternative to disturb the biofilm and improve the effectiveness of aPDT on CaS and CaR biofilms. The results showed that, for both strains evaluated, the use of 10 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in association with aPDT (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+) significantly reduced cell viability, biomass (total

and insoluble), WSP, ASP, eDNA, and proteins (in the soluble and insoluble portions) of CaS and CaR biofilms compared to the control group (P-L-).

An increase in the antimicrobial effect of aPDT associated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been demonstrated in several studies [34, 18, 35]. However, there is no agreement in the literature on the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the time of its application. The present study determined the MIC<sub>50</sub> value of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the planktonic cultures of CaS and CaR. The concentration of 10 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoted a reduction in the spectrophotometric reading by 50%. The control (untreated cell suspension) presented readings equivalent to 0.497 and 0.532 for CaS and CaR, respectively. The reading of the well treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 10mM was 0.242 and 0.258 for CaS and CaR, respectively. In the survival curve, using the concentration of 10 mM (MIC<sub>50</sub>) in the application time of 5 min, there was a significant reduction in the viable colony count (~3 log<sub>10</sub>) for both strains evaluated. The results obtained showed that a concentration greater than 10 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can cause reductions in the microbial count greater than 50%, which would not follow the objective of the present study, which is to use H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to disturb the matrix and not for its antifungal action. Furthermore, in a previous study, 10 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not cytotoxic to fibroblasts [36]. These findings explain the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> used in the present study and the application time used.

The application of 10 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> before aPDT (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+) promoted a significant reduction in cell viability compared to the control group (P-L-); however, the decrease in the viability of cells was not as expressive, equivalent to 0.9 log<sub>10</sub> and 1.09 log<sub>10</sub> for CaS and CaR, respectively. The reduction in viability was similar to that observed in previous studies in which the isolated application of aPDT mediated by PDZ promoted a decrease of 0.9 log<sub>10</sub> in biofilms of clinical isolates of *C. albicans* susceptible to fluconazole [10] and 0.8 log<sub>10</sub> in the biofilm of CaR ATCC 96901 [37]. In previous studies, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations associated with photodynamic treatment were significantly higher, and the killing efficacy was superior when the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was increased [34, 38, 35]. The application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) associated with aPDT mediated by toluidine blue on mixed biofilms (*C. albicans*+*Streptococcus mutans*) promoted a reduction in cell viability equivalent to 3 log<sub>10</sub> [34]. Treatment of contaminated root canals with 100 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 min, followed by aPDT mediated by methylene blue (50 μM), promoted a reduction of 5 log<sub>10</sub> in the biofilm of *Enterococcus faecalis* [38]. In another study, the combination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33.3 mM) and aPDT mediated by Chlorin e6- reduced ~2.5 log<sub>10</sub> in a saliva-derived microcosm biofilm model [35]. The synergistic antimicrobial effects may be due to better absorption of the photosensitizer after exposure of microorganisms to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resulting in increased intracellular reactivity of reactive

oxygen species and, consequently, greater effectiveness in inactivation [18]. Thus, ROS induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could prime the microbial cells, and, more importantly, the extracellular matrix components could be primed too and affect their tridimensional organization.

The biochemical analysis of the ECM of the biofilm showed that the application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previously to aPDT (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+) affects the ECM components, significantly reducing the amount of polysaccharides (WSP, ASP), eDNA, and matrix proteins for both strains evaluated. These results are extremely relevant considering the importance of ECM in maintaining the structural integrity of the biofilm and protecting microbial cells. The ECM hinders the action of antimicrobials and limits the penetration of the photosensitizer, influencing the effectiveness of the photodynamic treatment [17]. Another important finding is that the treatment effectively reduced the ECM components of the biofilm for both strains evaluated (CaS and CaR).

For the CaS strain, there was a reduction of 25.926% and 39.52% in WSP and ASP, respectively, compared to the control group (P-L-). The CaR strain showed an even more expressive reduction equivalent to 46.094% and 70.571% for WSP and ASP, respectively, compared to the control group. WSP comprises  $\alpha$ -mannans, and ASP includes 1,6- $\beta$ -glucan and 1,3- $\beta$ -glucan. The  $\alpha$ -mannans are the most abundant polysaccharides in the fungal biofilm matrix (87%), followed by the 1,6- $\beta$ -glucan (13%) and a small percentage of 1,3- $\beta$ -glucan, which together form the mannan-glucan complex (MGC) [39, 3, 49]. The interaction between each matrix polysaccharide ( $\alpha$ -mannans, 1,6- $\beta$ -glucan, and 1,3- $\beta$ -glucan) are responsible for maintaining the MGC, which is crucial for biofilm resistance [39, 41]. In addition, the 1,3- $\beta$ -glucan present in the biofilm is also accountable for drug sequestration and fluconazole resistance [39, 32]. Previously, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly reduced the amount of ASP from mixed biofilms of *C. albicans*+*S. mutans* [34]. These results corroborate those obtained in the present study, where the isolated application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes a reduction in ASP (30.04% in CaS and 10.28% in CaR). Thus, treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can disturb the structure of the ECM, weakening the biofilm [34]. Here, the reduction of polysaccharides was potentiated after the combination therapy, suggesting disorganization in the MGCx complex and increased biofilm susceptibility to photodynamic treatment and potentially to antifungals.

Here, the levels of eDNA present in the ECM were reduced by 48.493% for CaS and 57.513% for CaR when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was associated with aPDT (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+), compared to the control group (P-L-). Moreover, a significant effect of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, photodynamic treatment, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with LED on eDNA was also observed; however, it was minor compared to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group. These results are extremely relevant considering the contribution of extracellular DNA in maintaining the structural integrity of the biofilm and in modulating the

host's immune response [8]. Only aPDT was responsible for reducing 36.523% and 35.472% to CaS and CaR, respectively, compared to P-L-. The eDNA is a fungal and bacterial biofilm matrix component that allows it to adhere to distinct surfaces and binds with other biopolymers, giving biofilms structural integrity and stability [39, 3]. Furthermore, eDNA was shown to act as a regulator of antifungal resistance in *C. albicans* biofilms when the biofilm was treated with amphotericin B and echinocandins [42]. Therefore, reducing eDNA content is an essential factor for the inactivation of resistant biofilms. The eDNA and water-soluble polysaccharides are structurally related through bonds [3, 22]. Furthermore, eDNA may be linked or surrounded by other components of the MGCx complex of the extracellular matrix of the biofilm. This hypothesis is because H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with aPDT reduced the amount of ASP, WSP, and eDNA for both strains evaluated. Therefore, considering the reduction observed in the amount of eDNA and polysaccharides in CaS and CaR biofilms, we can suggest that the biofilm was structurally compromised and that its susceptibility to antifungal therapies increased.

Another important finding of the present study was that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group presented an important anti-biofilm activity by causing a significant reduction in the biomass (total and insoluble). The total biomass contains all biofilm components (cells and matrix' soluble and insoluble components), and the insoluble biomass comprises all the insoluble components (including cells). For CaS the reduction in total dry weight was 51.626% and in insoluble dry weight was 67.550% compared to the control group (P-L-). For CaR, a reduction of 61.315% for total dry weight and 55.102% for insoluble weight compared to the control group (P-L-) occurred. Thus, the observed decrease in biomass can be explained by the reduction of the components of the extracellular matrix (WSP, ASP, eDNA, and soluble proteins) and of the biofilm (insoluble proteins and cells) after the application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+.

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group of CaS and CaR biofilms presented changes in the extracellular matrix confirmed by SEM images obtained. It was observed differences in *Candida* biofilm morphology after the treatments, the appearance of small porosities and ruptures, ECM was disarticulated and the yeasts and hyphae exposed/unprotected. The results corroborate with the analysis of the matrix components, where there was a reduction of them, as well as of the structure.

In addition, a significant reduction in biomass was observed in the treatment control groups, however, on a smaller scale. In a previous study, no significant reduction was observed in the total biomass of *C. albicans* biofilms submitted to PDZ-mediated aPDT (200 mg/mL) [22]. Biofilms were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5%) for 1 min, and a reduction of 89% and 68% in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm biomass was observed,

respectively, after 1 min of application [43]. The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the biofilm may be related to the small size of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molecule and the facility with which it can diffuse into biofilms [44] and initiate the intracellular production of ROS that can cause oxidative stress that was potentiated by the action of aPDT. These reactive oxygen species can interact and degrade DNA, RNA, proteins, and lipids, reducing total and insoluble biomass [45].

The amount of soluble proteins (from ECM) and total proteins were also significantly reduced in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group compared to the control group. The soluble protein of the CaR matrix showed a reduction of approximately 5% only for the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group, while the soluble proteins of CaS showed a reduction of around 25% compared to the control group for all groups evaluated. “Insoluble proteins” were significantly reduced after the treatments evaluated for CaS and CaR when the association of treatments (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+) was evaluated and in the groups in which the isolated application of aPDT or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was performed. In a previous study, a significant reduction in soluble proteins from standard strains (*C. albicans* SN 425) and insoluble proteins from mutant strains (CNJ 2302;  $\Delta/\Delta$ efg1 and CJN 2330;  $\Delta/\Delta$ tec1) was observed after application of aPDT mediated by blue toluidine twice daily during biofilm formation [17]. In the biofilm, proteins are attached to carbohydrates and amino acids [46] and can degrade extracellular biopolymers that operate as a font of energy [13]. The polysaccharides, eDNA, and biofilm matrix proteins are interlinked in the ECM of fluconazole sensitive and resistant strains [21]. Thus, the reduction observed in proteins can be explained by the chain reduction observed in the other components of the extracellular matrix after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> followed by aPDT.

In the present study, after the isolated application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and aPDT (P+L+ group), a significant reduction in CFU values in CaS and CaR and a reduction in the biofilm and extracellular matrix components were also observed, which varied according to the strain evaluated. However, this effect was less pronounced when compared to the combination of therapies (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ group). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been used for disinfection and sterilization due to its ability to form ROS [45]. These reactive species include hydroxyl radicals, singlet oxygen, and superoxide radicals. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can penetrate the bacterial membrane and initiate the intracellular production of these reactive species that can interact and degrade bacterial DNA, RNA, proteins, and cell membrane lipids [44, 45]. In addition, exposure of microorganisms to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> before aPDT increases the absorption of the photosensitizer by cells, resulting in increased production of reactive oxygen species close to vital cellular structures and potentiating microbial death [18]. The aPDT also promotes the formation of reactive species that can act on nonspecific microbial targets simultaneously (e.g., causing lipid peroxidation, nucleic acid

oxidation, and protein oxidation). Therefore, with the association of these two therapies, there is a potentiation in the production of reactive species and the effects of photodynamic treatment [45]. When photodynamic therapy is applied directly to the biofilm and ROS are produced, the reduced sizes of these molecules facilitate their propagation through the different layers of the biofilm through simple and/or facilitated diffusion [47]. In addition, ROS would be likely not to be sequestered by the extracellular matrix [47].

When biofilms of ATCC 90028 (susceptible strain) were incubated with DNase for 5 min, followed by incubation with PDZ for 20 min and exposure to LED light (660 nm, 50 J/cm<sup>2</sup>) there was a reduction of 2.16 Log<sub>10</sub> in cell viability (CFU/mL) and eDNA amounts compared to the control group [48]. When the same DNase enzyme was used associated with aPDT in the treatment of biofilms of *C. albicans* ATCC 96901 (resistant strain) there was a reduction of 1.92 log<sub>10</sub> in CFU/mL and in the extracellular matrix components (WSP, eDNA and insoluble biomass) observed by the authors [49]. It could be observed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated with aPDT presented a significant reduction of matrix components compared to DNase, furthermore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has a lower cost and is an easily accessible product.

Importantly, the EPS matrix in mature biofilm limits the penetration of antibiotics or antiseptics and photosensitizers, influencing the efficiency of aPDT treatment. In addition, EPS matrix components can interact with photosensitizers, resulting in their rapid degradation [22]. The application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can disturb the organization of the ECM, allowing the detachment of biofilm, and its association with aPDT potentiated the effect of the treatment compared to the use of isolated therapies. The aPDT parameters used in the present study were successfully applied clinically [23], which means that this amount of treatment time is clinically acceptable.

In conclusion, the reduction of ECM components of the biofilm observed here is relevant since it may open paths that facilitate the diffusion of photosensitizer or antifungal agents in the biofilm, overcoming resistance derived from ECM components. Furthermore, the significant reduction observed in extracellular polysaccharides, proteins and eDNA indicates that these components of the ECM are intertwined with eDNA. Therefore, exposure of 48h-biofilms to 10mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min followed by application of aPDT disrupts the biofilm matrix of susceptible and resistant-fluconazole *C. albicans*, being a promising approach.

## References

1. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62:10–24.
2. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016 May;18(5):310-21.
3. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, Lounes Hadj Sahraoui A, Fontaine J, Sanchez H, Hatfield RD, Ntambi JM, Nett JE, Mitchell AP, Andes DR. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.* 2014; 5: e01333-14.
4. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR, Johnson AD. 2012. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 2012; 148: 126-38.
5. Blakeship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(6): 588-94.
6. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLoS Pathog.* 2016 Sep 29;12(9): e1005828.
7. Pierce JV, Kumamoto CA. Variation in *Candida albicans* EFG1 Expression Enables Host-Dependent Changes in Colonizing Fungal Populations. *mBio.* 2012; 3: e00117-12.
8. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 2010;169(5):323-331.
9. 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):3259-3266.

10. 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.
11. Carmello JC, Alves F, G. Basso F, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EGO. Treatment of Oral Candidiasis Using Photodithazine®- Mediated Photodynamic Therapy In Vivo. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0156947.
12. 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.
13. Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? *Drug Dev Res*. 2019, Feb;80(1):48-67.
14. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163:112.
15. Banfi SCE, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, Gariboldi M, Monti E. Photodynamic effects of porphyrin and chlorine photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2004; 12, 4853-4860.
16. Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, de Sousa Costa CA, Mima EGO, Pavarina AC. Antimicrobial Photodynamic Therapy in Combination with Nystatin in the Treatment of Experimental Oral Candidiasis Induced by *Candida albicans* Resistant to Fluconazole. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12(3).
17. Garcia BA, Panariello BHD, Freitas-Pontes KM, Duarte S. *Candida* biofilm matrix as a resistance mechanism against photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Dec; 36:102525.
18. Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghasanli NA, Itri R, Hamblin MR, and Ribeiro MS- Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide; *Photochem Photobiol Sci*. 2011 April 30; 10(4): 483–490.

19. Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H, Lei L, Huang X. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface; Photodiagnosis Photodyn Ther, 2019 Mar;25:382-388.
20. 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).
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnsberg 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

28. 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.
29. 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.
30. Zago CE, Silva S, Sanitá PV, Barbugli PA, Dias CMI, Lordell VBo, Vergani CE. Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between *Candida albicans* and 65 67 Methicillin-Susceptible (MSSA ) and -Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One*. 2015; 10: e0123206.
31. Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Dent Assoc*. 2012; 143:270-277.
32. Nett JE, Crawford K, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 3505-3508.
33. Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA, Reinicke EL, Sanchez H, Andes DR. Role of Matrix  $\beta$ -1,3 Glucan in Antifungal Resistance of Non-albicans *Candida* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57: 1918–1920.
34. Li Y, Du J, Huang S, Wang S, Wang Y, Cai Z, Lei L, Huang X. Hydrogen peroxide potentiates antimicrobial photodynamic therapy in eliminating *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* dual-species biofilm from denture base. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Dec 16; 37:102691.
35. Nie M, Silva RCE, de Oliveira KT, Bagnato VS, de Souza Rastelli AN, Crielaard W, Yang J, Deng DM. Synergetic antimicrobial effect of chlorin e6 and hydrogen peroxide on multi-species biofilms. *Biofouling*. 2021 Jul;37(6):656-665.

36. Sales LS, Guimarães GN, Wijesinghe GK, Moreira KMS, Joia F, Stipp RN, Rodrigues LKA, Nobre-Dos-Santos M, Steiner-Oliveira C. Addition of hydrogen peroxide to methylene blue conjugated to  $\beta$ -cyclodextrin in photodynamic antimicrobial chemotherapy in *S. mutans* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Dec; 28:226-233.
37. 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 May;32(4):815-826.
38. - Garcez AS, Hamblin MR. Methylene Blue and Hydrogen Peroxide for Photodynamic Inactivation in Root Canal - A New Protocol for Use in Endodontics. *Eur Endod J*. 2017 Nov 20;2(1):1-7.
39. Nett, J.; Lincoln, L.; Marchillo, K.; Massey, R.; Holoyda, K.; Hoff, B.; VanHandel, M.; Andes, D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007, 51, 510–520.
40. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, Mitchell AP, Andes DR. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 31;112(13):4092-7.
41. VEDIYAPPAN G, ROSSIGNOL T, D'ENFERT C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May;54(5):2096-111.
42. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses*. 2012 Jan;55(1):80-5.
43. Toté K, Horemans T, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2010 May;76(10):3135-42.

44. Baldeck JD, Marquis RE. Targets for hydrogen-peroxide-induced damage to suspension and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol*. 2008 Oct;54(10):868-75.
45. Raval YS, Mohamed A, Zmuda HM, Patel R, Beyenal H. Hydrogen-Peroxide-Generating Electrochemical Scaffold Eradicates Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Glob Chall*. 2019 Mar 6;3(6):1800101.
46. Bales PM, Renke EM, May SL, Shen Y, Nelson DC. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e67950.
47. Bapat P, Singh G, Nobile CJ. Visible Lights Combined with Photosensitizing Compounds Are Effective against *Candida albicans* Biofilms. *Microorganisms*. 2021 Feb 26;9(3):500.
48. Panariello BHD, Klein MI, Alves F, Pavarina AC. DNase increases the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Sep; 27:124-131.
49. Abreu-Pereira CA, Klein MI, Lobo CIV, Gorayb Pereira AL, Jordão CC, Pavarina AC. DNase enhances photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* biofilms. *Oral Dis*. 2022 Feb 8.

#### 4 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados foi possível concluir que:

O peróxido de hidrogênio (10 mM) aplicado por 5 minutos seguido de aPDT afetou os componentes da matriz extracelular e reduziu a viabilidade celular dos biofilmes de CaS e CaR. Houve redução das proteínas solúveis e insolúveis, eDNA, ASP, WSP e o peso seco insolúvel e solúvel de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol. Assim o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potencializou o efeito antimicrobiano da aPDT.

## REFERÊNCIAS\*

- 1- Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016; 18(5): 310-21.
- 2- 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;5(4): 01333-14.
- 3- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi A, Fusco-Almeida AM, Mendes Gianini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products, and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62(1): 10-24.
- 4- Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(922): 455-9.
- 5- 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.
- 6- Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 2012; 148(1-2): 126-38.
- 7- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi A, Fusco-Almeida AM, Mendes Gianini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products, and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62(1): 10-24.
- 8- -Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(3): 283-8.
- 9- -Taff HT, Mitchell KF, Edward JÁ. Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Futur Microbiol.* 2013, 8(10): 1325-37.
- 10-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.
- 11- Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnsberg 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.
- 12-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.
- 13-Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2): 510-20.

---

\* 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>

- 14-Vediyappan G, Rossignol T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(5): 2096-111.
- 15-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.
- 16--Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 85-105.
- 17-Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? *Drug Dev Res*. 2019; 80(1): 48-67.
- 18-Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163(1):1-12.
- 19--Banfi SCE, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, Gariboldi M et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorine photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12(8), 4853-60.
- 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-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.
- 22-Carmello JC, Alves F, G. Basso F, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EGO. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®- mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS ONE*. 2016; 11(6): e0156947.
- 23- Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, de Sousa Costa CA, Mima EGO, Pavarina AC. Antimicrobial photodynamic therapy in combination with Nystatin in the treatment of experimental oral candidiasis induced by *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019; 12(3): 140.
- 24-Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2001; 144(2): 274–8.
- 25-Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghasanli NA, Itri R, Hamblin MR et al. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol Sci*. 2011; 10(4): 483–90.
- 26- Pemmaraju SC, Padmapriya K, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. Impact of oxidative and osmotic stresses on *Candida albicans* biofilm formation. *Biofouling*. 2016; 32(8): 897-909.
- 27- Yang SM, Lee DW, Park HJ, Kwak MH, Park JM, Choi MG. Hydrogen peroxide enhances the antibacterial effect of methylene blue-based photodynamic therapy on biofilm-forming bacteria. *Photochem Photobiol*. 2019; 95(3): 833-8.
- 28-Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Mar; 25: 382-8.

- 29-Kunz D , Wirth J , Sculean A, Eick S. In- vitro-activity of additive application of hydrogen peroxide in antimicrobial photodynamic therapy using LED in the blue spectrum against bacteria and biofilm associated with periodontal disease. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Jun; 26:.306-12.
- 30-Sales LS, Guimarães GN, Wijesinghe GK, Moreira KMS, Joia F, Stipp RN et al.. Addition of hydrogen peroxide to methylene blue conjugated to  $\beta$ cyclodextrin in photodynamic antimicrobial chemotherapy in *S. mutans* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Dec; 28: 226-33.

## APÊNDICE A – MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparo do Peróxido de Hidrogênio

O  $H_2O_2$  (H1009-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adquirido em solução a 30% e foi dissolvido em PBS nas concentrações usadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e tratamento do biofilme.

Fórmula para o preparo do peróxido na concentração de 1M (usada de referência para outras concentrações):

No frasco adquirido da empresa a solução estoque encontrava-se a 9,8M (dado fornecido na bula).

$$\begin{aligned} 1^\circ \quad & 100\% \text{-----} 9,8M \\ & x \text{-----} 1M \\ & \mathbf{x = 10,20\%} \end{aligned}$$

Preparado um volume de 1000 ul de solução a 1M (10,20%) suficientes para preparo das demais concentrações:

$$\begin{aligned} 2^\circ \quad & 100\% \text{-----} 1000 \text{ ul} \\ & 10,20\% \text{-----} x \end{aligned}$$

**X= 102 ul peróxido de hidrogênio 9,8M + 898 ul de PBS para obter uma solução com a concentração de 1M)**

Fórmula para o preparo do peróxido na concentração de 10mM (varia de acordo com a concentração desejada):

$$\begin{aligned} 1^\circ \quad & 100\% \text{-----} 1000mM (1M) \\ & X\% \text{-----} 10mM \\ & \mathbf{X = 1 \%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2^\circ \quad & \text{volume: } 4000 \text{ ul (varia de acordo com o N)} \\ & 100\% \text{-----} 4000 \text{ ul} \\ & 1\% \text{-----} x \end{aligned}$$

**X= 40 ul de peróxido de hidrogênio na concentração de 1M + 3960 ul de PBS para obter uma solução com concentração igual a 10mM (1%)**

## **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ao peróxido de hidrogênio**

No presente estudo foram avaliadas cepas de *C. albicans* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, EUA) susceptível ao fluconazol (ATCC 90028; CaS) e resistente ao fluconazol (ATCC 96901; CaR). O teste CIM ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado para determinação da concentração a ser utilizada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para as cepas de CaS e CaR. O método de microdiluição em caldo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>1</sup> foi utilizado como referência. Para isso, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi dissolvido em PBS (1x, pH 7,4) em diluições variando de 1 mM a 1M. Como controle de contaminação foi adicionado ao poço 100 µL de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (2×concentrado) e 100 µL de PBS (sem células e sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Como controle de crescimento, apenas as suspensões celulares (inóculo 0,5 x10<sup>3</sup> a 2,5x10<sup>3</sup> UFC/mL) foram testadas sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para o teste CIM, diluições seriadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (variando de 1 mM a 1M) foram incubadas em placas de 96 poços com suspensão de microrganismo previamente ajustada para obter uma concentração final de inóculo de 0,5 x10<sup>3</sup> a 2,5x10<sup>3</sup> UFC/mL em meio RPMI.

As placas foram incubadas a 35°C e observadas visualmente quanto à presença ou ausência de crescimento após 24 h. Além da leitura visual, a densidade óptica de cada poço da placa foi medida em leitor de placa (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom®) a 492 nm após 24 horas de incubação. Também foi realizado o plaqueamento em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) em duplicata para a obtenção da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e realização da curva de morte nos diferentes tempos de 0, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 1h, 2h, 12h, 15h, 18h e 24 h.

A CIM foi calculada com base na densidade de crescimento e foram consideradas as menores concentrações que promoveram redução em 50% no crescimento em comparação com o controle de crescimento livre da droga. E foi considerada CFM a concentração mínima que resultou em ausência de colônias. A curva de sobrevivência foi utilizada para determinar o tempo que o biofilme deveria ficar em contato com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Formação dos biofilmes de *C. albicans***

Para a formação dos biofilmes as cepas de CaS e CaR que estavam armazenadas em freezer  $-80^{\circ}$  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  $37^{\circ}$  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 (100 mM), e incubadas a  $37^{\circ}$  C. Após as 16 h de incubação, 0.5 mL 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  $37^{\circ}$  C por mais 8 horas e, então, foi realizada leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (540 nm) para verificar se o microrganismo atingiu a fase exponencial de crescimento fase (mid-log) que corresponde  $0.55 \pm 0.08$  para a cepa ATCC 90028, e em torno de 7 horas para a cepa ATCC 96901  $0.477 \pm 0.03$ . Next, the OD 540nm of the inoculums was adjusted to  $10^6$  CFU/mL. Os biofilmes de CaS e CaR foram cultivados separadamente em fundo de placa de cultura de 24 poços. Para isso, uma alíquota de 1 mL da suspensão celular ( $10^6$  CFU/mL), com 1 mL de meio de RPMI 1640 (Mediatech Inc., Herdon, VA, EUA) tamponado com MOPS (Research Products., Mount Prospect, Illinois, EUA) foram adicionados em cada orifício da placa. Essa placa foi incubada a  $37^{\circ}$  C sob agitação (75 rpm) por 90 min, para a adesão das células. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e cada orifício foi lavado duas vezes com 1 mL solução PBS estéril para a remoção das células não aderidas e metabólitos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio de cultura RPMI tamponado. As placas foram mantidas a  $37^{\circ}$  C sob agitação durante 24 h. Após esse tempo, foi realizado a troca do meio de cultura por meio de aspiração, e lavagem dos orifícios da placa com 1 mL solução PBS estéril (duas vezes). Depois da lavagem, 1 mL de RPMI foi adicionado em cada orifício e as placas foram mantidas a  $37^{\circ}$  C sob agitação por mais 24 h, totalizando o período de 48h de formação do biofilme. Então, os biofilmes formados foram lavados 2 x com PBS e submetidos aos tratamentos descritos na Tabela 1. Os biofilmes foram formados em triplicatas e os experimentos foram realizados em três ocasiões independentes ( $n = 12$ ) para cada uma das cepas avaliadas.

## **Realização dos tratamentos**

### **Fotossensibilizador e fonte de luz**

Para aPDT, a fotossensibilização dos biofilmes foi feita 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<sup>3</sup>. 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/cm<sup>2</sup>. 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 30mW/cm<sup>2</sup>.

Após 48 horas, os biofilmes formados, cada orifício foi lavado 2 x com PBS, e então cada grupo foi submetidos aos tratamentos como descritos na Tabela 1.

O peróxido de hidrogênio foi utilizado na concentração de 10 mM (de acordo com o CIM previamente estabelecido) por 5 minutos. Após esse período os orifícios que receberam o peróxido de hidrogênio foram lavados com PBS, e foi realizado o tratamento fotodinâmico proposto (Quadro 1).

**Quadro 1** - Nome dos grupos experimentais e descrição dos tratamentos realizados de aPDT em associação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

<b>Grupos</b>	<b>Descrição dos tratamentos</b>
<b>P-L-</b>	Biofilme não foi tratado com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nem com aPDT (grupo controle).
<b>P-L+</b>	Biofilme foi apenas iluminado com LED vermelho (660nm) por 12 min (50 J/cm <sup>2</sup> ).
<b>P+L-</b>	Biofilme foi incubado com PDZ (200 mg/L) por 20 min.
<b>P+L+</b>	Biofilme foi incubado com PDZ (200 mg/L por 20 min), e então, iluminado com LED (12 min, 50 J/cm <sup>2</sup> ).
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Biofilme foi tratado com 10 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 5 min.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+</b>	Biofilme foi tratado com 10 Mm de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 5 min. Em seguida, o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> foi removido e o biofilme foi incubado com PDZ (200 mg/L) por 20 min e então, iluminado com LED (12 min, 50 J/cm <sup>2</sup> ).
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+</b>	Biofilme foi tratado com 10 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 5 min. Em seguida, o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> foi removido e o biofilme iluminado com LED (12 min, 50 J/cm <sup>2</sup> ).

Fonte: Elaboração própria.

### **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 peso seco insolúvel, proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis em água (WSP) e em álcali (ASP), e DNA extracelular (eDNA).

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 µL 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 mesmo microtubo de 2 mL. Por fim, as amostras foram levadas para realizar à sonicação por sonda (30 s; 7 w; 190 J) <sup>4,5</sup>. Após a sonicação do volume de 2 mL, 0.1 mL foi utilizado para a diluição seriada e plaqueamento para realizar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e igualmente, 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 ressuspenso 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).

### **Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)**

Diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) foram realizadas para cada amostra em microtubos esterilizados contendo 900  $\mu$ L de NaCl 0.89%. Então, foram plaqueados 25  $\mu$ L de cada uma das diluições, em duplicata, em placas de SDA com cloranfenicol, e as placas foram incubadas por 48 h para que posteriormente 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 seguinte fórmula:

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

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

### **Análise do peso seco**

#### **Peso seco total<sup>2,6</sup>**

Do volume previamente separado, 100  $\mu$ L de cada amostra foram pipetados e colocados em um papel alumínio já pesado e etiquetado, bem como 100  $\mu$ L da solução de NaCl a 0.89% utilizada em cada ocasião. As amostras foram secas em um forno a 100°C por 24 h, 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.

### **Quantificação de proteínas**

#### **Proteínas na porção solúvel<sup>7,8</sup>**

Foram utilizados 15  $\mu$ L da alíquota da suspensão do biofilme para determinar a quantidade de proteínas solúveis. Então, 5  $\mu$ L da amostra diluída foram utilizados, em triplicata (15  $\mu$ L) para a determinação de proteínas solúveis nos biofilmes usando o

método de Bradford<sup>7</sup>. Esse método 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 µL	1 mL
0,03125	15,625 µL	984,37 µL
0,0625	31,25 µL	968,75 µL
0,125	62,5 µL	937,5 µL
0,25	125 µL	875 µL
0,5	250 µL	750 µL
1,0	200 µL	500 µL
1,4	750 µL	300 µL

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, em uma placa de 96 poços foram adicionadas alíquotas de 5 µL, em triplicata, para cada ponto da curva e para cada amostra a ser analisada. Após, foi adicionado 250 µL 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 leitor de placas 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<sup>2</sup> próximo de 1).

#### **Quantificação de proteínas na porção insolúvel do biofilme**

Para a quantificação de proteínas insolúveis foi colocado o volume de 50 µL para um micro tubo contendo 100 µL de esferas de vidro e 200 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Em seguida, as amostras foram submetidas à ruptura mecânica usando beadbeater (3vezes/ 30s), aquecidas sob agitação (100 rpm/100°C/60 minutos). Após isso, foi realizada a centrifugação das amostras (quickspin; 10.000 rpm/min). O sobrenadante foi transferido para um micro tubo esterilizado. Então, 5 µL da amostra diluída foram utilizados, em triplicata (15 µL) para a determinação de proteínas insolúveis nos biofilmes usando o método de Bradford<sup>7</sup>, conforme descrito anteriormente.

#### **Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)<sup>2,9</sup>**

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 foram

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 (10.000 rpm/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 ressuspenso em 0,5 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 sulfúrico<sup>9</sup>. 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% (µL)	0	0,75	1,25	2,5	5	10	15	20	25

Fonte: Elaboração própria.

### **Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)<sup>2,9</sup>**

#### **Peso seco insolúvel**

Um volume de 0.95 mL da suspensão de biofilme foi colocado 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 µL 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 µL 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, eles 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) por pelo menos 18 h. Passadas as 18 h, houve a precipitação dos polissacarídeos solúveis em álcali (ASP), então, os tubos foram removidos do freezer, agitados e centrifugados (9.500xg / 2 0 min / 4° C). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas 3 vezes com 1 ml de etanol 75% gelado. As amostras de ASP foram lavadas da mesma forma que as amostras WSP. Após à lavagem, o precipitado foi seco ao ar e ressuspense em 1N NaOH (no mesmo volume total da extração original). Por fim, as amostras estavam finalizadas para a quantificação de carboidratos totais usando o método com fenol e ácido sulfúrico<sup>9</sup>, 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% (µL)	0	0,75	1,25	2,5	5	10	15	20	25
NaOH (µL)	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.

### **Análise de eDNA <sup>2,10</sup>**

A quantificação de eDNA foi feita de acordo com metodologia descrita por Rice et al.<sup>83</sup>. Para isso, foi acrescentado às alíquotas de 0,65 mL o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e, então as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas através da inversão dos tubos (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, seco ao ar, e então dissolvido em 20 µl de tampão TE (Tris-EDTA buffer solution BioUltra, for molecular biology, pH 8.0). A quantidade de eDNA foi determinada usando nano espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm.

### **Microscopia Eletronica de Varredura (MEV)**

Os biofilmes das cepas CaS e CaR foram cultivados sobre superfícies redondas de poliestireno obtidos do fundo de placas de 24 poços, que foram cortados com ajuda de uma fresa acoplada em um micromotor em baixa rotação<sup>11</sup>. Previamente a formação do biofilme os poços cortados foram esterilizados em micro-ondas por 3 minutos a 650 W<sup>12</sup> e secos em câmara de fluxo laminar com luz UV por 30 minutos cada lado. Então os discos foram inseridos em novas placas de 24 poços, para a formação dos biofilmes como descrito anteriormente. Após 48 h de crescimento dos biofilmes, o meio foi removido, e os poços foram lavados duas vezes com 1 mL de PBS (1X concentrado) estéril e submetidos aos tratamentos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; P+L+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, P+L+, P-L-). Em seguida, as amostras de biofilme foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% (60 min/temperatura ambiente), lavados duas vezes com PBS (1 X concentrado) e desidratado. O processo de desidratação foi realizado com séries de lavagens com etanol 70% e 90% por 60 min cada, seguido de 5 lavagens de 30 min com etanol. As amostras foram armazenadas em dessecador com sílica por 7 dias para garantir

amostras livres de umidade. Em seguida, as amostras foram submetidas a metalização e observadas com um microscópio eletrônico de varredura.<sup>13,14</sup>

## **Análise Estatística**

### **Variáveis de estudo**

As variáveis dependentes deste estudo são os componentes do biofilme e da matriz do biofilme: UFC/mL, peso seco total e insolúvel, proteínas totais e insolúveis, WSP, ASP e eDNA. As variáveis independentes foram representadas pelos fatores que constituem o tratamento: Luz, PDZ e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **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. 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 nano gramas (ng).

### **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 do biofilme (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 para verificação de interação entre os fatores de tratamento (Luz, PDZ e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 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).

## Referências

- 1- 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).
- 2- 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.
- 3- 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.
- 4- Kragh KN, Alhede M, Rybtker M, Stavnsberg 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.
- 5- 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.
- 6- 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.
- 7- 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.
- 8- 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.
- 9- 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.
- 10-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.
- 11-Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Effectiveness of two disinfectant solutions and microwave irradiation in disinfecting complete dentures contaminated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Am Dent Assoc. 2012; 143(3): 270-7.
- 12-Nett JE, Crawford K, Marchillo K, Andes DR. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(8): 3505-8.

- 13-Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA, Reinicke EL, Sanchez H, Andes DR.  
Role of Matrix  $\beta$ -1,3 Glucan in Antifungal Resistance of Non-*albicans*  
*Candida* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(4): 1918–20.

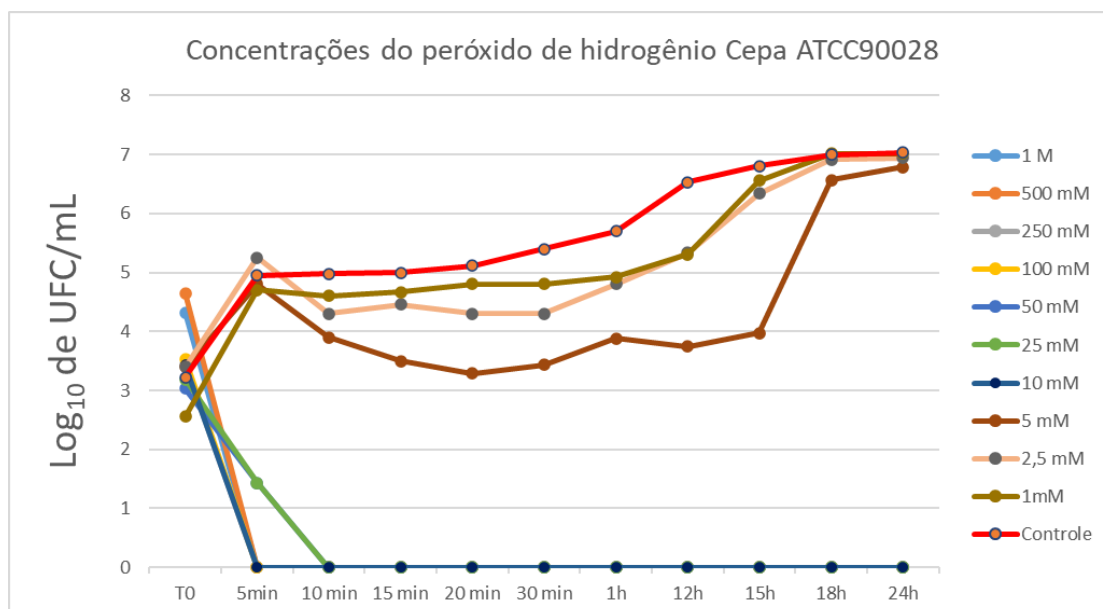
## APÊNDICE B – RESULTADOS

### Cepa ATCC 90028

#### Concentração Inibitória Mínima ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e curva de morte

Para CaS o teste de susceptibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> revelou que o valor de MIC50 foi de 10 mM. Na curva de sobrevivência (Figura 1) foi observada uma redução de 3 log<sub>10</sub> utilizando a concentração de 10 mM no tempo de 5 minutos. Considerando a viabilidade fúngica (UFC/mL) obtidas para 0 mM como 100% do crescimento, foram observadas reduções maiores que 50% para as concentrações a partir de 10 mM. Para a menor concentração do peróxido de hidrogênio testada 1 mM foi observada redução de 7,96% de colônias viáveis em relação ao controle, já para a concentração de 2,5 mM a redução foi de 27,62%, para 5 mM foi de 23,25%, para 10 mM a redução foi de 75,67%, para 25 mM foi de 89,86%; para 50 mM foi de 84,25%; 250 mM foi 92,67%; 500 mM foi 92,36%; e para a concentração de 1M e a redução foi de 98,28%. O MFC não foi atingido pois mesmo na maior concentração de peróxido de hidrogênio avaliada (1 M) a redução foi de 98,28%.

**Figura 1-** Contagem de colônias viáveis (UFC/mL) em diferentes tempos e diferentes concentrações do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para CaS



Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 1-** Médias, desvios-padrão e taxa e redução (%) da contagem de colônias viáveis (UFC/mL) e dos componentes dos biofilmes para a cepa de CaS após os tratamentos realizados

Groups		MEC componentes							
		UFC/mL (log <sub>10</sub> )	Total weight (mg)	Insoluble weight (mg)	Soluble proteins (mg)	Insoluble proteins (µg)	ASP (µg)	WSP (µg)	eDNA (ng)
P-L-	Mean and standard deviation	6.303 ± 0.052	4.858 ± 0.474	3.094 ± 0.093	0.024 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.253 ± 0.043	0.054 ± 0.007	194.856 ± 31.364
	Reduction %	7.282 <sup>#</sup>	26.575 <sup>#</sup>	32.579 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	36.364 <sup>#</sup>	15.020	20.370 <sup>#</sup>	36.523 <sup>#</sup>
P+L+	Mean and standard deviation	5.844 ± 0.086	3.567 ± 0.293	2.086 ± 0.108	0.018 ± 0.006	0.007 ± 0.001	0.215 ± 0.069	0.043 ± 0.006	123.688 ± 15.392
	Reduction %	3.855 <sup>#</sup>	22.128 <sup>#</sup>	31.900 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	-	15.0198	16.667	24.240 <sup>#</sup>
P-L+	Mean and standard deviation	6.060 ± 0.078	3.783 ± 0.279	2.107 ± 0.130	0.018 ± 0.002	0.011 ± 0.003	0.215 ± 0.045	0.0045 ± 0.008	147.622 ± 9.899
	Reduction %	2.332 <sup>#</sup>	8.049	25.210 <sup>#</sup>	-	-	-	-	6.038
P+L-	Mean and standard deviation	6.156 ± 0.069	4.467 ± 0.454	2.314 ± 0.037	0.025 ± 0.004	0.013 ± 0.002	0.256 ± 0.041	0.059 ± 0.002	183.091 ± 31.364
	Reduction %	6.235 <sup>#</sup>	37.896 <sup>#</sup>	35.133 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	27.273 <sup>#</sup>	30.040 <sup>#</sup>	12.963	27.981 <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mean and standard deviation	5.910 ± 0.125	3.017 ± 0.600	2.007 ± 0.044	0.018 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.177 ± 0.037	0.047 ± 0.005	140.333 ± 16.588
	Reduction %	14.390 <sup>#</sup>	51.626 <sup>#</sup>	67.550 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	45.455 <sup>#</sup>	39.526 <sup>#</sup>	25.926 <sup>#</sup>	48.493 <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P+L+	Mean and standard deviation	5.396 ± 0.161	2.350 ± 0.778	1.004 ± 0.055	0.018 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.153 ± 0.038	0.040 ± 0.009	100.364 ± 7.230
	Reduction %	5.611 ± 0.155	0.846	0.051	0.002	0.002	0.173 ± 0.026	0.044 ± 0.010	125.508 ± 11.152
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P-L+	Mean and standard deviation	5.611 ± 0.155	2.983 ± 0.846	1.129 ± 0.051	0.018 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.173 ± 0.026	0.044 ± 0.010	125.508 ± 11.152
	Reduction %	10.979 <sup>#</sup>	38.596 <sup>#</sup>	63.510 <sup>#</sup>	25.000 <sup>#</sup>	27.273 <sup>#</sup>	31.621 <sup>#</sup>	18.519	35.589 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>Aponta redução estatisticamente significativa (p<0.05) em relação ao grupo controle (P-L-). Fonte: Elaboração própria.

- Aponta que não houve redução em relação ao grupo controle.

### **Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento (peróxido de hidrogênio, terapia fotodinâmica e fotossensibilizador) ( $p < 0.001$ ). Todos os grupos apresentaram redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle P-L- ( $p < 0.001$ ), tendo o grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentado a maior redução (0,9 log 10) e sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ( $p \leq 0.044$ ). A porcentagem de redução do grupo  $H_2O_2P+L+$  em relação ao grupo controle foi de 14,39%.

### **Análise das biomassas dos biofilmes**

#### **Peso seco total**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). O grupo controle (P-L-) apresentou os maiores valores de peso seco total, sendo estatisticamente semelhante ( $p = 0.175$ ) ao grupo P+L-. Os demais grupos, tratados em presença do  $H_2O_2$ , apresentaram redução estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) quando comparados ao grupo controle (P-L-), tendo o grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentado a maior redução. O grupo  $H_2O_2$  também apresentou redução significativa, e foi estatisticamente semelhante ( $p = 0.267$ ) ao grupo  $H_2O_2P+L+$ . A porcentagem de redução do grupo  $H_2O_2P+L+$  em relação ao grupo controle foi de 51,62%.

#### **Peso seco Insolúvel**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). Todos os grupos avaliados foram estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (P-L-). O grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentou a maior redução ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo controle (P-L-), sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ( $p < 0.001$ ). O grupo tratado apenas com o peróxido ( $H_2O_2$ ) foi estatisticamente semelhante ( $p = 0.352$ ) ao grupo P+L+. A porcentagem de redução do peso insolúvel do grupo  $H_2O_2P+L+$  em relação ao controle foi de 67,55%.

### **Análise de proteínas**

#### **Proteínas da porção solúvel do biofilme**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). Os grupos  $H_2O_2P+L+$ , P-L+,  $H_2O_2$  e  $H_2O_2P-L+$

apresentaram redução estatisticamente significativa ( $p \leq 0.008$ ) em relação ao grupo controle (P-L-), sendo ainda estatisticamente semelhantes ( $p \geq 0.998$ ) entre si. A porcentagem de redução das proteínas solúveis nestes grupos em relação ao grupo controle foi de 25%.

### **Proteínas da porção insolúvel do biofilme**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). Os grupos  $H_2O_2P+L+$ ,  $H_2O_2$  e  $H_2O_2P-L+$  foram estatisticamente diferentes do grupo controle (P-L-;  $p < 0.001$ ). O grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentou a maior redução em relação ao grupo controle (P-L-), seguido do grupo P+L+ ( $p < 0.001$ ). Os grupos  $H_2O_2$  e  $H_2O_2P-L+$  também apresentaram redução estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo controle, entretanto numa menor escala. A porcentagem de redução nos valores de proteínas insolúveis do grupo  $H_2O_2P+L+$  em relação ao controle foi de 45,45%.

### **Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). Os grupos  $H_2O_2P+L+$  e P+L+ apresentaram redução significativa nos valores de WSP ( $p \leq 0,007$ ) após os tratamentos, tendo o primeiro apresentado a maior redução quando comparado com o grupo controle (P-L-). A porcentagem de redução nos valores de WSP do grupo  $H_2O_2P+L+$  em relação ao controle foi de 25,92%.

### **Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). O grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentou a maior redução significativa nos níveis de ASP ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo controle (P-L-), seguido pelos grupos  $H_2O_2P-L+$  e  $H_2O_2$  ( $p = 0.001$ ), que foram estatisticamente semelhantes ( $p \geq 0.854$ ) entre si. A porcentagem de redução nos valores de ASP do grupo  $H_2O_2P+L+$  em relação ao controle foi de 39,52%.

### **Análise de eDNA**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). O grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentou a maior redução significativa ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo controle (P-L-), seguido dos grupos

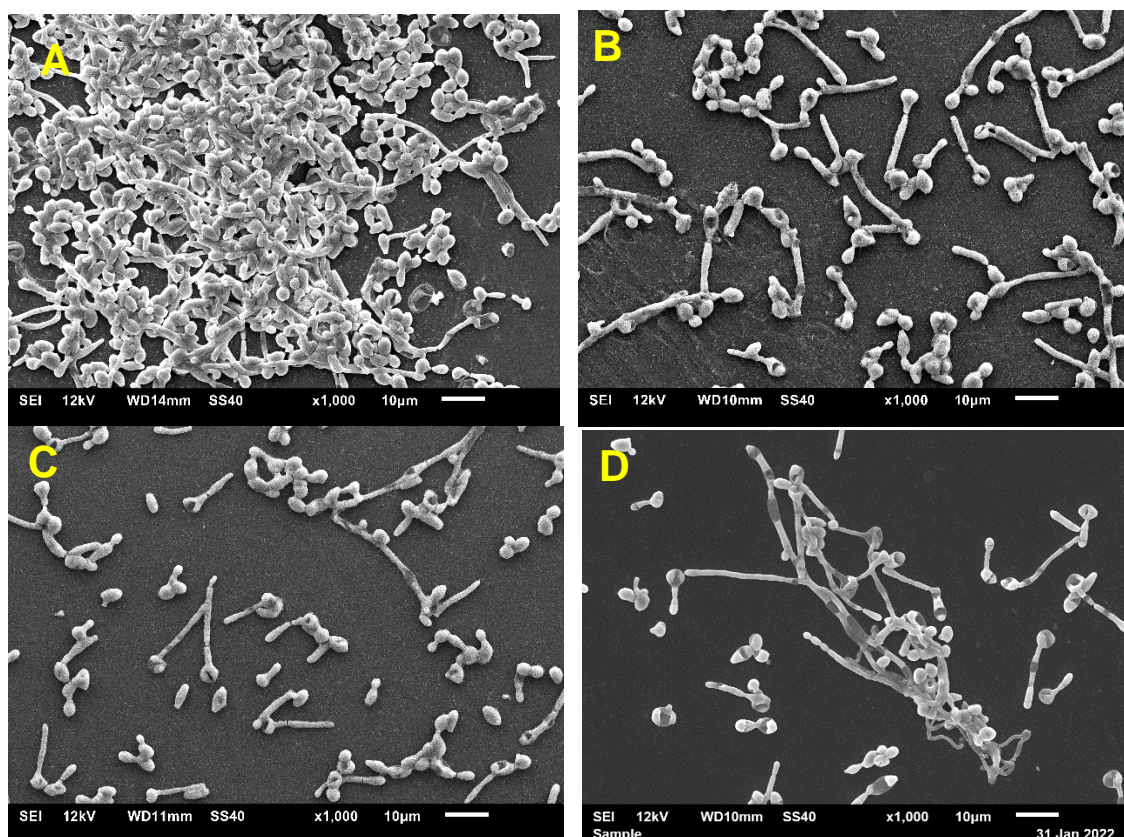
tratados com o peróxido associado à luz ( $H_2O_2$ P-L+) e da sua aplicação isolada ( $H_2O_2$ ), que também apresentaram redução nos níveis de eDNA ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo P-L-. Os grupos  $H_2O_2$ P-L+ e  $H_2O_2$ , sendo estatisticamente semelhantes ( $p \geq 0.190$ ) entre si.

### **Resultado da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a cepa ATCC90028**

A MEV foi realizada para examinar a estrutura do biofilme de cepas de CaS (Figura 2A-D e 2A-D), nos grupos sem tratamento nenhum (P-L-) (2A, 2A),  $H_2O_2$  (2B, 2B), P+L+ (2A, 2B), e  $H_2O_2$  P+L+ (2D, 2D). Foi dada especial atenção as morfologias das células e organização espacial do biofilme no substrato bem como a presença da matriz conectando e protegendo as células nestes biofilmes.

Nas imagens de CaS foi possível observar diferença na morfologia do biofilme após a realização dos tratamentos (2B-D) comparado ao grupo sem tratamento (2A). É possível visualizar redução no número de células e as hifas ficaram mais dispersas. Além disso, houve uma clara alteração nas características da matriz extracelular do biofilme (Figuras 2B, 2C e 2D). Na figura 3 (B-D) podemos visualizar num maior aumento a alteração estrutural da matriz provocada pelos tratamentos com aparecimento de pequenas porosidades e rompimentos. Após o tratamento com  $H_2O_2$  P+L+ ocorreu uma desarticulação da matriz e as leveduras e hifas ficam expostas/desprotegidas (Figura 3D).

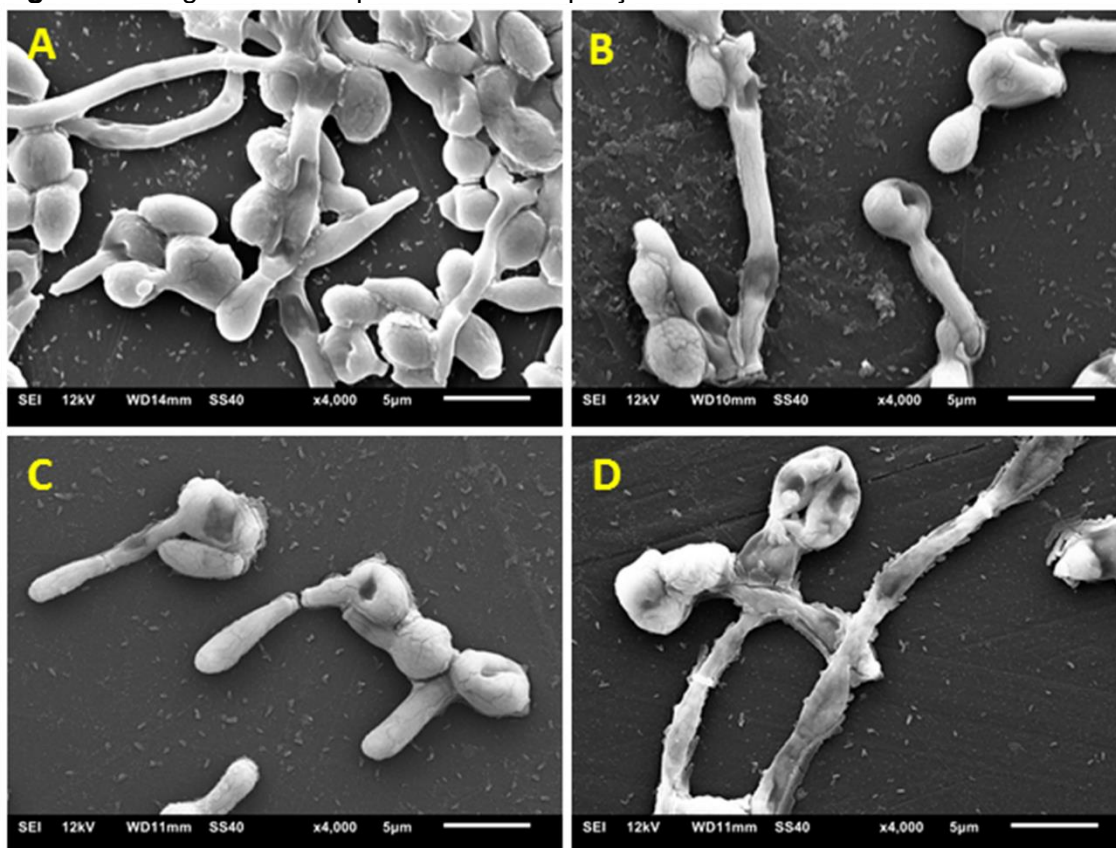
**Figura 2-** Imagens obtidas por MEV em ampliação de 1000x em biofilmes de CaS



(A) biofilme para controle, sem nenhum tratamento (P-L-); (B) biofilme tratado com 10 mM de  $H_2O_2$  por 5 min, apresentando uma redução no número de células e as hifas ficaram mais dispersas); (C) grupo tratado com a terapia fotodinâmica (P+L+), apresentou redução no número de células; (D) grupo tratado com  $H_2O_2$  associado com a terapia fotodinâmica ( $H_2O_2$  P+L+), é possível ver uma grande redução no número de células.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 3-** Imagens obtidas por MEV em ampliação de 4000x em biofilmes de CaS



(A) biofilme para controle, sem nenhum tratamento (P-L-); (B) biofilme tratado com 10 mM de  $H_2O_2$  por 5 min, apresentando uma redução no número de células e as hifas ficaram mais dispersas); (C) grupo tratado com a terapia fotodinâmica (P+L+), apresentou redução no número de células; (D) grupo tratado com  $H_2O_2$  associado com a terapia fotodinâmica ( $H_2O_2$  P+L+), é possível ver uma grande redução no número de células e desarticulação da matriz.

Fonte: Elaboração própria.

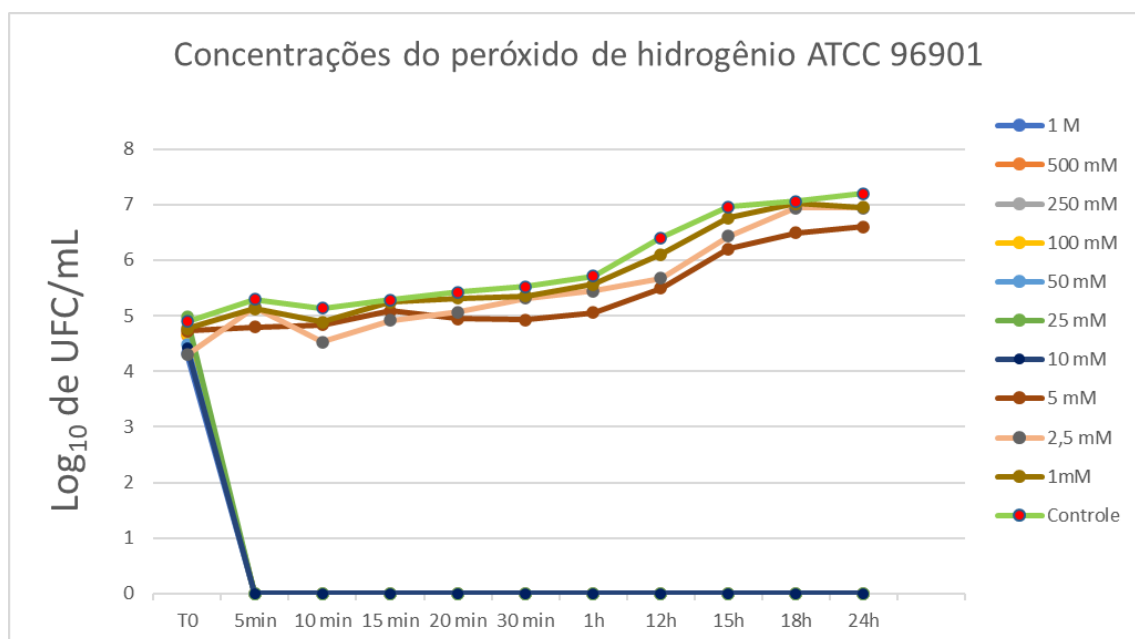
### Cepa ATCC 96901

#### Concentração Inibitória Mínima ao $H_2O_2$ e curva de sobrevivência da CaR

Para CaR o teste de susceptibilidade ao peróxido de hidrogênio revelou que o valor de MIC<sub>50</sub> foi de 10 mM. Na curva de sobrevivência foi observada uma redução de 3,5  $\log_{10}$  utilizando a concentração de 10 mM no tempo de 5 minutos. Assim, considerando a contagem de colônias viáveis obtidas para 0 mM como 100% do crescimento fúngico, foram observadas reduções maiores que 50% para as concentrações a partir de 10 mM. Para a menor concentração do  $H_2O_2$  testada (1 mM) obtivemos redução de 1,25% de colônias viáveis em relação ao controle; para a concentração de 2,5 mM a redução foi 5,31%; 5 mM reduziu 23,25%, para 10 mM a redução foi de 83,38%, 25 mM propiciou redução de 86,28%; 50 mM reduziu em 85,65%; 250 mM em 88,93%; 500 mM em

92,83%; e, a maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> testada (1M) propiciou uma redução de 93,61%. O MFC não foi atingido pois na maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> testada (1M) foi observada redução de 93,61%.

**Figura 2-** Contagem de colônias viáveis (UFC/mL) em diferentes tempos e diferentes concentrações do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para CaR



Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 2** – Médias, desvios-padrão e taxa de redução da contagem de colônias viáveis (UFC/mL) e dos componentes da matriz extracelular dos biofilmes para a cepa padrão ATCC 96901 após os tratamentos realizados

Groups		UFC/mL (log <sub>10</sub> )	MEC componentes						
			Total weight (mg)	Insoluble weight (mg)	Soluble proteins (mg)	Insoluble proteins (µg)	ASP (µg)	WSP (µg)	eDNA (ng)
P-L-	Mean and standard deviation	5.965 ± 0.391	5.041 ± 1.134	1.176 ± 0.167	0.403 ± 0.008	0.018 ± 0.002	0.350 ± 0.380	0.128 ± 0.025	200.193 ± 31.395
	Reduction %	8.533	38.147 <sup>#</sup>	47.279 <sup>#</sup>	0.993	38.889 <sup>#</sup>	58.857 <sup>#</sup>	39.063 <sup>#</sup>	35.472 <sup>#</sup>
P+L+	Mean and standard deviation	5.456 ± 0.412	3.118 ± 0.429	0.620 ± 0.265	0.399 ± 0.003	0.011 ± 0.001	0.144 ± 0.052	0.078 ± 0.010	129.180 ± 10.490
	Reduction %	8.533	38.147 <sup>#</sup>	47.279 <sup>#</sup>	0.993	38.889 <sup>#</sup>	58.857 <sup>#</sup>	39.063 <sup>#</sup>	35.472 <sup>#</sup>
P-L+	Mean and standard deviation	5.836 ± 0.291	3.041 ± 0.606	0.680 ± 0.280	0.398 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.310 ± 0.251	0.084 ± 0.034	158.992 ± 29.381
	Reduction %	2.163	39.675 <sup>#</sup>	42.177 <sup>#</sup>	1.241	38.889 <sup>#</sup>	11.4286	34.375 <sup>#</sup>	20.581
P+L-	Mean and standard deviation	5.694 ± 0.639	3.441 ± 0.776	0.820 ± 0.427	0.391 ± 0.012	0.012 ± 0.002	0.490 ± 0.218	0.104 ± 0.033	198.715 ± 14.024
	Reduction %	4.543	31.740 <sup>#</sup>	30.272 <sup>#</sup>	2.978	33.333 <sup>#</sup>	-	18.750	0.738
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P+L+	Mean and standard deviation	4.870 ± 0.205	1.950 ± 0.546	0.528 ± 0.152	0.380 ± 0.005	0.010 ± 0.001	0.103 ± 0.187	0.069 ± 0.025	85.056 ± 10.300
	Reduction %	18.206 <sup>#</sup>	61.315 <sup>#</sup>	55.102 <sup>#</sup>	5.707 <sup>#</sup>	44.444 <sup>#</sup>	70.571 <sup>#</sup>	46.094 <sup>#</sup>	57.513 <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mean and standard deviation	5.739 ± 0.301	3.041 ± 0.488	0.612 ± 0.210	0.397 ± 0.005	0.011 ± 0.001	0.314 ± 0.187	0.078 ± 0.046	145.352 ± 18.829
	Reduction %	3.789	39.675 <sup>#</sup>	47.959 <sup>#</sup>	1.489	38.889 <sup>#</sup>	10.286	39.063 <sup>#</sup>	27.394 <sup>#</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P-L+	Mean and standard deviation	5.664 ± 0.283	3.066 ± 0.311	0.622 ± 0.181	0.388 ± 0.018	0.011 ± 0.001	0.155 ± 0.108	0.080 ± 0.023	108.413 ± 12.683
	Reduction %	5.046	39.179 <sup>#</sup>	47.109 <sup>#</sup>	3.722	38.889 <sup>#</sup>	55.714 <sup>#</sup>	37.500 <sup>#</sup>	45.846 <sup>#</sup>

<sup>#</sup>Aponta redução estatisticamente significativa (p<0.05) em relação ao grupo controle (P-L-). Fonte: Elaboração própria.

- Aponta que não houve redução em relação ao grupo controle.

### **Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). Apenas o grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentou redução estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo controle (P-L-), apresentando redução de 18,2%. Os demais grupos se comportaram estatisticamente semelhante ( $p \geq 0.066$ ) ao grupo controle P-L-.

### **Análise das biomassas dos biofilmes**

#### **Peso Seco Total**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). O grupo controle (P-L-) apresentou os maiores valores de peso total, sendo estatisticamente diferente ( $p \leq 0.013$ ) dos demais grupos avaliados, tendo o grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentado a maior redução de peso total ( $p = 0.001$ ), sendo essa redução de 61,31%. Os grupos  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2P-L+$ ,  $P+L+$  e  $P-L+$  também apresentaram redução significativa ( $p \leq 0.001$ ) de 39%, em média, em relação ao grupo controle P-L-.

#### **Peso Insolúvel**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). Todos os grupos avaliados foram estatisticamente diferentes grupo controle ( $p \leq 0.011$ ; P-L-). O grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentou a maior redução (55,10%) em relação ao grupo controle ( $p = 0.001$ ; P-L-), sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ( $p < 0.001$ ). Os grupos  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2P-L+$  e  $P+L+$  apresentaram uma média de redução de 47% da biomassa insolúvel, sendo semelhantes entre si ( $p \geq 0.769$ ).

### **Análise de proteínas**

#### **Proteínas da porção solúvel do biofilme**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p = 0.002$ ). Apenas o grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentou redução estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo controle (P-L-). Entretanto, a porcentagem de redução das proteínas solúveis nesse grupo foi de apenas 5,70% em relação ao grupo. Os demais grupos se comportaram de forma estatisticamente semelhante ( $p \geq 0.205$ ) ao grupo controle P-L-.

### **Proteínas da porção insolúvel do biofilme**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). O grupo Controle P-L- apresentou os maiores valores de proteínas insolúveis, sendo estatisticamente diferente ( $p < 0.001$ ) dos demais grupos testados. O grupo P+L+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentou a maior taxa de redução dessas proteínas (44,44%) em relação ao grupo controle. Os grupos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+, P+L+ e P-L+ também apresentaram redução significativa ( $p \leq 0.001$ ) de 38,88% em relação ao grupo controle P-L- e foram estatisticamente semelhantes ( $p \geq 0.891$ ) entre si.

### **Análise de polissacarídeos solúveis em água (WSP)**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p = 0.002$ ). Os grupos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ apresentou a maior redução significativa (46,09%) nos níveis de WSP ( $p < 0.001$ ) em relação ao grupo controle (P-L-), seguido pelos grupos P+L+ e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que apresentaram redução de 39,06%, sendo estatisticamente semelhantes entre si ( $p = 1.000$ ) e diferentes do grupo controle ( $p \leq 0.004$ ). Os biofilmes tratados apenas com a luz (P-L+) ou com a associação Luz com o peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+) apresentaram redução significativa ( $p \leq 0.012$ ) nos níveis de ASP, quando comparados ao grupo controle (P-L-), de 34,37% e 37,50% respectivamente, sendo estatisticamente semelhantes entre si ( $p = 1.000$ ).

### **Análise de polissacarídeos solúveis em álcali (ASP)**

Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p < 0.001$ ). O grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P+L+ apresentou a maior redução significativa (70,57%) nos níveis de ASP ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle (P-L-), seguido pelos grupos P+L+ (58,85%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>P-L+ (55,71%), que foram estatisticamente semelhantes ( $p = 1.000$ ) entre si e diferentes do grupo controle ( $p < 0.001$ ). Os grupos P-L+ e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentaram redução mais modesta dos níveis de ASP, em torno de 10% e 11% respectivamente, entretanto foram estatisticamente semelhantes ( $p = 1.000$ ) ao grupo controle. O grupo tratado apenas com o PDZ apresentou valores superiores ao do grupo controle, havendo semelhança estatística ( $p = 0.933$ ).

### **Análise de eDNA**

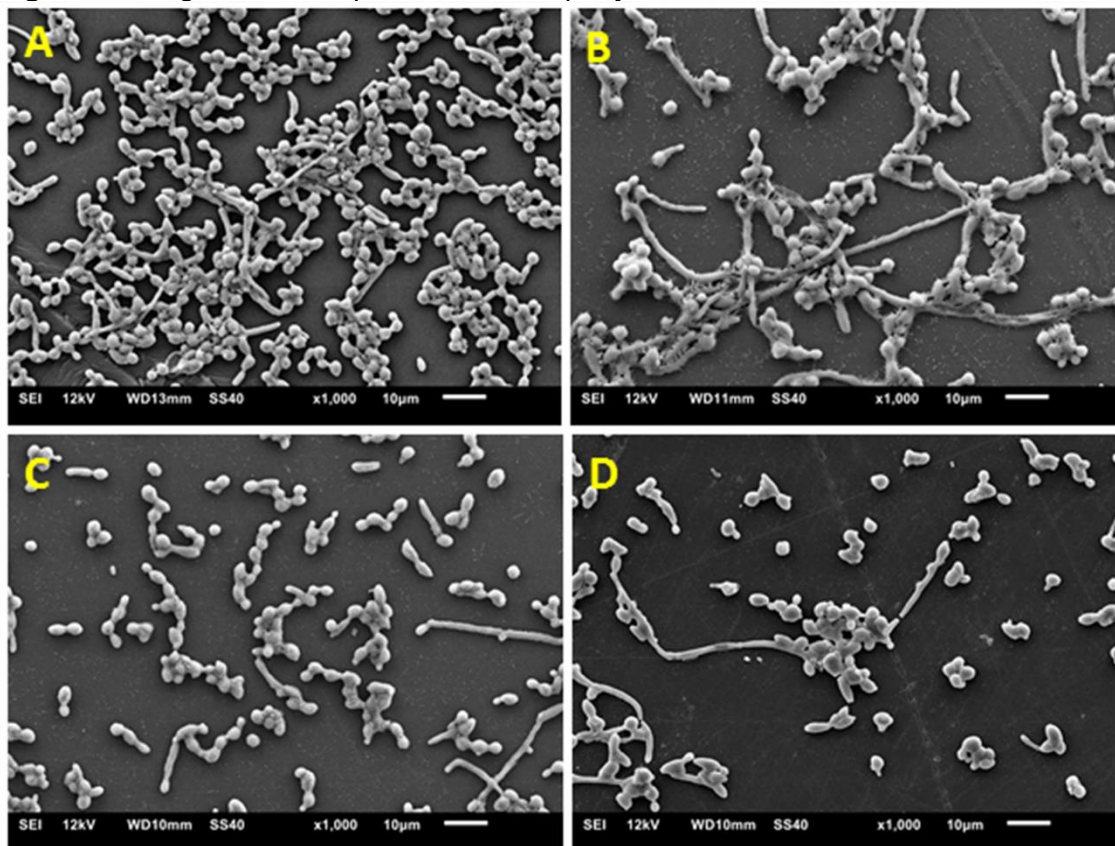
Houve interação estatisticamente significativa entre os três fatores de tratamento ( $p=0.006$ ). O grupo  $H_2O_2P+L+$  apresentou a maior redução estatisticamente significativa (57,51%;  $p<0.001$ ) em relação ao grupo controle (P-L-), seguido dos grupos tratados com o peróxido associado à luz ( $H_2O_2P-L+$ ), da terapia fotodinâmica convencional (P+L+) e sua aplicação isolada ( $H_2O_2$ ), que também apresentaram redução estatisticamente significativa ( $p\leq 0.001$ ) nos níveis de eDNA em relação ao grupo P-L-, sendo essa redução de 45,84%, 35,47% e 27,39%. O grupo tratado apenas com a luz (P-L+) apresentou redução de 20,58% e valor de  $p=0.052$ , sendo, portanto, considerado semelhante ao grupo P-L-.

### **Resultado da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a cepa ATCC96901**

A MEV foi realizada para examinar a estrutura do biofilme da cepa de CaR (Figura 5A-D e 6A-D) nos grupos sem tratamento nenhum (P-L-) (5A e 6A),  $H_2O_2$  (5B e 6B), P+L+ (5C e 6D) e  $H_2O_2P+L+$  (5D e 6D). Foi dada especial atenção as morfologias das células e organização espacial do biofilme no substrato bem como a presença da matriz conectando e protegendo as células nestes biofilmes.

O biofilme CaR (Figura 5A) possui grande quantidade de levedura e hifas mais dispersos, comparados ao biofilme de CAS (Figura 4A). Os tratamentos reduziram o número de células do biofilme (Figuras 5C-5D). Em maior aumento (Figuras 6C-D) é possível que a matriz do biofilme apresenta algum tipo de alteração, entretanto em menor escala quando comparado com a CaS.

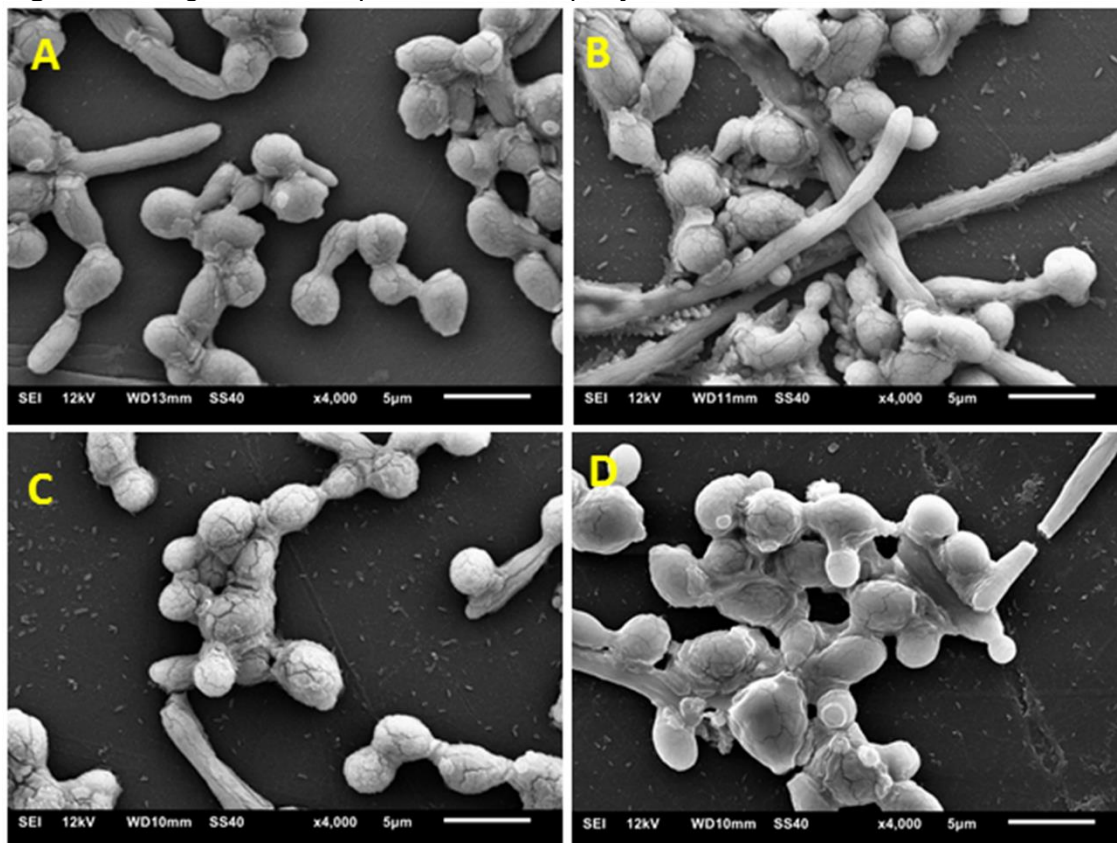
**Figura 5-** Imagens obtidas por MEV em ampliação de 1000x em biofilmes de CaR



(A) Biofilme para controle, sem nenhum tratamento (P-L-) grande quantidade de leveduras e hifas; (B) biofilme tratado com 10 mM de  $H_2O_2$  por 5 min, apresentando uma redução no número de células; (C) grupo tratado com a terapia fotodinâmica (P+L+), apresentou redução no número de células; (D) grupo tratado com  $H_2O_2$  associado com a terapia fotodinâmica ( $H_2O_2$  P+L+), é possível ver células mais dispersas.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 6-** Imagens obtidas por MEV em ampliação de 4000x em biofilmes de CaR



(A) Biofilme para controle, sem nenhum tratamento (P-L-); (B) biofilme tratado com 10 mM de  $H_2O_2$  por 5 min, apresentando uma redução no número de células e as hifas ficaram mais dispersas); (C) grupo tratado com a terapia fotodinâmica (P+L+), apresentou redução no número de células e alteração na matriz; (D) grupo tratado com  $H_2O_2$  associado com a terapia fotodinâmica ( $H_2O_2$  P+L+), é possível ver alteração na matriz extracelular do biofilme.

Fonte: Elaboração própria.

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 12 meses pós a  
data de defesa**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 07 de março de 2022**

**Tábata Viana de Sousa**