



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



Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez

Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

Araraquara

2020



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



Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez

Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, na Área de Prótese.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara

2020

T828d Trigo Gutierrez, Jeffersson Krishan
Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de
Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia
Fotodinâmica antimicrobiana / Jeffersson Krishan Gutierrez Trigo. --
Araraquara, 2020
220 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Fotoquimioterapia. 2. Bactérias. 3. Fungos. 4. Luz. 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.

Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez

Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Reabilitação Oral

Presidente e orientador Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

3º Examinador Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda

4º Examinador Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

5º Examinador Profa. Dra. Morgana R. Guimarães Stabili

Araraquara, 17 de dezembro de 2020.

DADOS CURRICULARES

Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez

NASCIMENTO: 05/12/1983, La Paz-Bolívia

FILIAÇÃO: Angel Elias Trigo Velasco (Pai)
Maria Concepción Gutierrez Hanco (Mãe)

2003-2009 Graduação em Odontologia *Universidad Mayor de San Andrés*, La Paz-Bolívia

2014-2016 Mestrado em Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia de Araraquara. FOAr-UNESP

2017-2020 Doutorado em Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia de Araraquara. FOAr-UNESP

A Deus porque sem ele nada é possível.

A minha amada família: meus Pais Angel e Maria, meus irmãos Beremiz e Hans. O amor de família nos manterá unidos sempre aconteça o que acontecer.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor, sacrifício e confiança que sempre tiveram, têm e terão em mim. Aos meus irmãos pela parceria, cumplicidade e suporte que sempre me deram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima pela paciência, dedicação e paixão com que ele ensina.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco pelo conhecimento compartilhado no laboratório dele.

Ao Italo Calori pela parceria e amizade feita durante a execução da pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, e todos os que são parte dessa família.

À equipe de pesquisa, Vinicius, Yuliana, Amanda, Geovana, Letícia, muito obrigado.

A todos os amigos que fiz nesta caminhada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processos nº 2013/07276-1 e 18/02513-9 pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico processo nº 142184/2018-7 pela concessão da bolsa de estudo na primeira etapa do curso.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento nº 88887.481502/2020-00 e 88887.513641/2020-00. Agradeço ainda pela concessão da bolsa para a realização do estágio no exterior (Processo nº 88887.363662/2019-00).

Ao Instituto de Química de Araraquara, pelo uso do Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Campo, assim como ao técnico de microscopia Diego Tita.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho, gratidão.

“Na vida sempre teremos situações complicadas, o nosso dever é enfrentá-las com convicção e responsabilidade”

Angel Trigo, meu pai.

Trigo Gutierrez, JK. Desenvolvimento, caracterização e efeitos fotodinâmicos de Curcumina em micela copolimérica fotoativada para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Os nanocarregadores têm sido utilizados com sucesso para a veiculação de curcumina (CUR). No entanto, a demorada liberação do composto limita seu uso tópico como fotossensibilizador (FS) para Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), na qual ainda são necessários longos tempos de pré-iluminação e iluminação. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema micelar fotoativado para liberação de CUR. As micelas foram sintetizadas pelo método de adição direta utilizando o polímero fotossensível formado por poli-etileno glicol como polímero e ácido 3-nitro-4-bromometilbenzoico como cromóforo e ácido fenoxiacético como extremo apolar (PEG-ANB-AFA), denominado polímero fotossensível (PFS). Adicionalmente, como controles, foram sintetizadas micelas convencionais de Pluronic® F127 ou P123. Os testes de caracterização por espectroscopia de absorção e fluorescência incluíram: determinação da Concentração Micelar Crítica, constante de ligação e supressão de fluorescência. As micelas de PFS apresentaram maior eficiência de encapsulamento (88,79%), enquanto que, para as micelas convencionais, foram observados valores de 77,52% para F127 e 72,58% para micelas de P123. O PFS apresentou fotodegradação gradativa com irradiação UV a 355 nm, fato que facilitou a liberação da CUR de dentro das micelas, o que melhorou a demorada liberação do sistema convencional. Os tamanhos na faixa nanométrica de 40,42; 22,90 e 20,78 nm para as micelas de PFS, F127 e P123 respectivamente, e índice de polidispersão de até 0,392 u.a. foram determinadas por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz, e por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo foram observadas micelas esféricas. A potencial zeta aniônica (de -0,139 a -0,613 mV) dos três sistemas foi determinada por meio do potencial zeta. Os efeitos fotodinâmicos do FS na micela fotoativada bem como em micelas convencionais e CUR livre em aPDT contra culturas planctônicas de *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram diminuição de 1 Log₁₀ comparado com os respectivos grupos controle (diferença significativa $p < 0,05$). Já em culturas planctônicas *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) a micela fotoativada demonstrou maior efeito fotodinâmico antimicrobiano que os sistemas convencionais diminuindo a contagem de colônias 2 Log₁₀ comparado com o grupo controle (diferença significativa $p < 0,05$). Adicionalmente, a aPDT promoveu diminuição da biomassa dos biofilmes de MRSA e *C. albicans*, comparados com seus respectivos grupos controle (diferença significativa $p < 0,05$). Finalmente, as micelas foto-ativadas não apresentaram toxicidade em queratinócitos orais. Desta forma, a aPDT mediada pela CUR em micelas foto-ativadas pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções microbianas.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. Bactérias. Fungos. Luz.

Trigo Gutierrez, JK. Development, characterization, and photodynamic effects of Curcumin in light-triggered copolymer micellar system for antimicrobial Photodynamic Therapy [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Nanocarriers have been used successfully for delivery of curcumin (CUR); however, slow release from nanosystems hinders its use as topical photosensitizer (PS) in antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), which requires long pre-irradiation times. Light-triggered nanosystems are an interesting option, since they allow remote temporal control of drug release. Thus, in this research a photo-responsive micelle (PRM) was synthesized to carry CUR. The PRM were synthesized by direct addition method using the photoresponsive polymer formed by poly (ethylene glycol), 3-nitro-4-bromobenzilic acid as chromophore and phenoxiacetic acid as apolar segment. Moreover, conventional micelles synthesized from commercial Pluronic® P123 and F127 as control micelles. The characterization of the micelles by fluorescence and absorbance spectroscopy were Critical Micellar Concentration, binding of PRM to CUR, and fluorescence quenching. The Entrapment Efficiency (EE%) was also higher in PRM (88.79%), on the other hand, a similar EE% were observed between F127 and P123 micelles (77.52 and 72.58% respectively). Furthermore, degradation of the absorption spectra of PRM was observed, allowing CUR being released from the PRM, thus the slow release from the nanosystem was improved. Dynamic light scattering, and Scanning Electronic Microscopy, showed the micelles size on the nanometric scale (40.42, 22.90, and 20.78 for PRM, F127 and P123 micelles, respectively), and high homogeneity of the systems (to 0.392). The Field Emission Scanning Electronic Microscopy showed spherical shape micelles. The zeta potential of the three systems were anionic (from -0.139 to -0.613 mV). The aPDT mediated CUR-loaded PRM as well as conventional micelles and free CUR against planktonic cultures of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Candida albicans*, and *Pseudomonas aeruginosa* were evaluated. In *C. albicans*, and *P. aeruginosa* aPDT mediated by PRM, conventional micelles and free CUR promoted diminution of 1 Log in colony count compared with the control group ($p < 0.05$). In MRSA the aPDT mediated by PRM promotes diminution of 2 Log compared to the control group ($p < 0.05$). While in groups aPDT treated with conventional micelles and free CUR diminution of 1 Log compared with the control group was observed ($p < 0.05$). Moreover, the aPDT mediated by CUR in PRM decreased the biomass in single biofilm of MRSA and *C. albicans* –significant difference of $p < 0.05$ compared to their respective control groups. Furthermore, the PRM did not show toxic effect on Normal Oral Keratinocytes cells. Thus, PRM could be an alternative to treat microbial infections.

Keywords: Photochemotherapy. Bacteria. Fungi. Light.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 CUR como FS	20
3.2 Sistemas Nanoestruturados.....	27
3.3 Micelas Carregadas com CUR.....	28
3.4 Sistemas Fotoativados	31
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Síntese do Polímero Fotossensível (PFS)	34
4.1.1 Reação do PEG₁₅₀₀ com o ácido 3-nitro-4- bromometilbenzoico (PEG-ANB)	34
4.1.2 Reação do PEG-ANB com ácido fenoxiacético (PEG-ANB-AFA)	35
4.1.3 Espectro de Ressonância Magnética (NMR) do PFS	36
4.2 Síntese e Caracterização das Micelas	36
4.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)	37
4.2.2 Determinação da constante de ligação (K_b) do PFS à CUR	37
4.2.3 Síntese das micelas	38
4.2.4 Eficiência de Encapsulamento (EE%)	38
4.2.5 Supressão da fluorescência	39
4.2.6 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta	40
4.2.7 Análise da morfologia das micelas (MEV-FEG)	40
4.2.8 Fotodegradação do PFS	41
4.2.9 Fotoliberação da CUR	41
4.2.10 Liberação da CUR das micelas convencionais	42
4.3 Avaliação Antimicrobiana Fotodinâmica das Formulações	43
4.3.1 Micro-organismos e condições de crescimento	43

4.3.2 aPDT em culturas planctônicas de <i>C. albicans</i> , SARM e <i>P. aeruginosa</i>	46
4.3.3 aPDT na biomassa de biofilme simples	49
4.4 Ensaio de Citotoxicidade	50
4.5 Análise Estatística	51
 5 RESULTADO	 52
5.1 Síntese do Polímero Fotossensível (PFS)	52
5.2 Síntese e Caracterização das Micelas	52
5.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)	52
5.2.2 Determinação da constante de ligação (K_b) do PFS à CUR	58
5.2.3 Síntese das micelas	60
5.2.4 Eficiência de Encapsulamento (EE%)	60
5.2.5 Supressão de fluorescência	60
5.2.6 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta	61
5.2.7 Análise da morfologia das micelas (MEV-FEG)	64
5.2.8 Fotodegradação do PFS	65
5.2.9 Fotoliberação da CUR	66
5.2.10 Liberação das micelas convencionais	66
5.3 Avaliação antimicrobiana Fotodinâmica das formulações.....	66
5.3.1 aPDT em culturas planctônicas de <i>C. albicans</i> , SARM e <i>P. aeruginosa</i>	66
5.3.2 aPDT na biomassa de biofilme simples	69
5.4 Ensaio de Citotoxicidade.....	71
 6 DISCUSSÃO	 73
 7 CONCLUSÃO	 81
 REFERÊNCIAS	 82
 APÊNDICES	 92

ANEXO 220

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são considerados uma das formas de vida mais bem sucedidas na terra¹ e definidos como comunidades microbianas altamente organizadas, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, e protegida por uma matriz polimérica extracelular (MPE) produzida pelos próprios micro-organismos constituintes da comunidade^{2,3}. Devido à interação das células microbianas e a presença da MPE, o biofilme possui propriedades diferentes dos micro-organismos que se encontram em forma livre ou planctônica¹. Na forma de biofilme, os micro-organismos obtêm retenção de água e resistência a dessecação, captação e armazenamento de nutrientes, adesão ao sítio de infecção, proteção física contra o sistema de defesa do hospedeiro e os agentes antimicrobianos externos^{2,4}, sendo necessárias maiores concentrações de antimicrobianos para promover a sua inativação⁵⁻⁷. Adicionalmente, o uso de antibióticos na indústria pecuária, o uso indiscriminado de antimicrobianos, entre outros fatores, têm contribuído com o surgimento de cepas microbianas resistentes às terapias medicamentosas convencionais⁸.

O desenvolvimento de cepas microbianas resistentes às terapêuticas convencionais tem levado à aparição das denominadas superbactérias⁹, uma delas é a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* que é considerada um dos micro-organismos mais perigosos para a saúde humana, devido a sua capacidade de evadir o sistema imune do hospedeiro e resistir às terapias antibióticas¹⁰ (metilina), sendo denominado de *S. aureus* resistente à metilina (SARM) ou *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)¹⁰. MRSA tem sido associado a infecções fatais tanto em ambientes hospitalares quanto em comunidades, sendo que essa bactéria é responsável por 20% do total das infecções causadas por *S. aureus*⁹.

Em enfermidades, como fibrose cística e enfermidade obstrutiva crônica dos pulmões, foram identificadas colônias de MRSA associadas ao bacilo Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*, e ambas bactérias são consideradas os maiores patógenos oportunistas associados a infecções hospitalares¹¹. A fibrose cística aumenta a viscosidade das secreções e secreções digestivas, causando infecções recorrentes. Essas infecções acometem as vias respiratórias, principalmente os pulmões, e estão frequentemente associadas a biofilme de *P. aeruginosa*, o que diminui a função pulmonar e eleva as taxas de morbidade e mortalidade¹². Apesar de antibióticos inalados serem mais efetivos no início da infecção, até o momento

não há consenso de qual estratégia antibiótica é a melhor para a erradicação da infecção¹³. Além disso, *P. aeruginosa* resistentes a múltiplos antibióticos são responsáveis por 22% de pneumonias e 14,7% de infecções da corrente sanguínea¹⁴. As bactérias Gram-negativas resistentes a terapias medicamentosas convencionais são responsáveis por 29,3% das infecções da saúde humana¹⁵.

Além das bactérias acima mencionadas, outro micro-organismo altamente relacionado com infecções sistêmicas e hospitalares são os fungos do gênero *Candida*¹⁶, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente que vive como comensal em diversas regiões do organismo na maioria dos indivíduos saudáveis¹⁷. No entanto, pessoas com prolongados períodos usando antibióticos, pacientes imunossuprimidos, esse fungo se transforma em um patógeno oportunista¹⁸, podendo colonizar mucosas, invadir tecidos e causar infecções (candidíase). *C. albicans* é um fungo polimórfico, apresentando-se como células leveduriformes (blastóporos) comensais até células filamentosas, denominadas pseudohifas (septadas) ou hifas (não septadas)¹⁸. Este polimorfismo celular representa uma transição para a patogenicidade das células de *C. albicans*, pois, na forma filamentar as barreiras imunológicas do hospedeiro podem ser superadas, favorecendo o aparecimento das infecções¹⁹. Em pacientes imunocomprometidos, a infecção bucal pode se prolongar para o trato gastrointestinal ou para a corrente sanguínea, gerando um quadro de fungemia. A maioria dos casos de fungemia são provocados pelo gênero *Candida* (candidemia)²⁰, e essa infecção sistêmica apresenta elevada taxa de mortalidade, é responsável por longos períodos de internação dos pacientes, além de ser uma das principais infecções nosocomiais²⁰. Adicionalmente, o uso de antifúngicos tem levado também ao desenvolvimento de resistência de *C. albicans* e à emergência de espécies não-*albicans*, as quais apresentam menor susceptibilidade aos antifúngicos²¹.

Diante dos problemas com o uso dos antimicrobianos convencionais, terapias alternativas capazes de inibir o crescimento microbiano têm sido estudadas, como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)^{22,23} que foi descoberta há mais de 100 anos a inativação de *Paramecia caudatum*²⁴. O princípio da aPDT envolve um agente químico capaz de absorber luz, conhecido como fotossensibilizador (FS), uma luz de comprimento de onda adequado equivalente ao comprimento de onda de absorção do FS e oxigênio²⁵. O FS absorve inicialmente a luz, o que excita o seu estado fundamental para o estado singleto de curta duração. O FS no estado

singleto pode retornar ao seu estado fundamental com a emissão de luz ou passar para o estado de tripleto. No estado tripleto, o FS pode retornar ao estado fundamental, com emissão de luz, ou reagir com moléculas vizinhas na presença de oxigênio molecular por meio de dois tipos de reações fotoquímicas (tipo I e tipo II)^{26,27}.

Na reação tipo I, ocorre transferência de elétrons entre o FS no estado tripleto e um substrato que, na presença de oxigênio, produz espécies reativas de oxigênio (EROS) como íons superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($HO^\cdot$) e radicais hidroperoxila ($HOO^\cdot$) que são tóxicos às células alvo. O fotoprocesso tipo II é um mecanismo de transferência de energia que envolve a troca de elétrons entre o estado de tripleto do FS e o oxigênio, que passa do seu estado molecular fundamental (3O_2) para o estado excitado singleto, capaz de reagir com moléculas biológicas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos^{27,28}. Assim o mecanismo de inativação da aPDT baseia-se no efeito oxidativo das estruturas microbianas após aplicação do FS e iluminação²⁹. Recentemente, tem-se proposto também a reação do tipo III, com formação de radicais livres na ausência de oxigênio²⁵.

Alguns FS utilizados com sucesso contra micro-organismos incluem porfirinas, clorinas, ftalocianinas e compostos naturais como a curcumina (CUR)^{26,30}. CUR é um polifenol (diferuloylmetano) derivado da *Curcuma longa* L, presente no açafrão e com propriedades terapêuticas anticancerígenas, antioxidante, anti-inflamatórias e antimicrobianas inatas³¹. Estudos *in vitro*³²⁻³⁴ e *in vivo*³⁵ tem demonstrado a eficácia da CUR como FS usando luz azul³²⁻³⁵. No entanto, a natureza hidrofóbica, instabilidade e baixa biodisponibilidade da CUR³⁶ limitam sua aplicabilidade clínica, uma vez que, para sua diluição, são necessários solventes orgânicos, tais como dimetil-sulfóxido, que em concentrações elevadas apresenta toxicidade celular^{37,38}.

Uma alternativa para veicular substâncias hidrofóbicas como a CUR consiste na utilização de sistemas de liberação de fármacos, tais como: nanopartículas sólidas de lipídeo, ciclodextrinas, partículas poliméricas, micelas poliméricas, entre outros³⁹. Alguns desses sistemas de liberação foram usadas com sucesso para entrega de CUR contra micro-organismos⁴⁰⁻⁴³. Os nanosistemas permitem a veiculação da CUR em sistemas aquosos, compatíveis para uso clínico, além de protegerem a molécula até esta alcançar o tecido alvo para tratamento, o que

melhora a estabilidade química da substância e sua biodisponibilidade, além de permitir a liberação sustentada da substância⁴⁴.

Dentre essas nanoformulações, micelas poliméricas representam um sistema de liberação de fármacos com vantagens, tais como partículas de tamanho pequeno, direcionamento para alvos específicos, além de melhorar a solubilidade de drogas hidrofóbicas⁴⁴. O poli (etileno-glicol) (PEG) é amplamente usado para síntese de micelas, uma vez que, por ser um polímero não iônico, reduz a agregação das formulações e produz, assim, sistemas de liberação de fármacos com maior estabilidade durante o armazenamento e aplicação⁴⁵. Portanto, CUR em micelas copoliméricas de PEG podem ser um sistema promissor contra micro-organismos responsáveis por infecções nosocomiais.

Apesar das pesquisas com nanoformulações serem promissoras para veiculação de fármacos hidrofóbicos, poucas dessas pesquisas são direcionadas à fotoinativação microbiana^{38,47,48}, possivelmente devido à demorada liberação dos fármacos desses sistemas, o que conseqüentemente dificulta sua aplicação em aPDT⁴⁹. Isso ocorre porque há a necessidade de um longo período de pré-irradiação para que o FS seja liberado do sistema e fotossensibilize as células alvo.

As nanoformulações estímulo responsivas representam uma alternativa para melhorar a liberação de fármacos dos nanosistemas, pois permitem que o nanosistema alcance o tecido alvo, onde ocorre a liberação do fármaco por meio de um estímulo externo, como luz, ultrassom, pH, calor, entre outros^{50,51}. Nas formulações fotoativadas, são adicionados iniciantes (cromóforos, como azobenzeno, cumarina ou *o*-nitrobenzil) que coadjuvam para que a liberação seja mais rápida⁵⁰. Dentre os mecanismos de liberação por luz, podem ser mencionadas a fotoisomerização, quebra de ligações cruzadas, a oxidação induzida por fotossensibilização, a absorção plasmônica de superfície, a mudança de hidrofobicidade fotoquímica^{50,51}.

Os derivados de nitrobenzil (NB) são cromóforos que ganharam atenção considerável como conectores de fotoclivagem tanto para hidrogéis⁵² quanto para copolímeros em bloco⁵³. Pois, podem ser facilmente conjugados com polímeros e biomoléculas as quais apresentam certa estabilidade em condições fisiológicas e podem ser degradados rapidamente por meio da foto-clivagem⁵⁴. No entanto, ao nosso conhecimento, não existem relatos nos quais os compostos PEG e NB tenham sido utilizados para veiculação de CUR.

Embora existam relatos de fotoinativação microbiana com nanopartículas ativadas por luz^{55,56}, a maioria desses estudos empregaram culturas planctônicas. Como os biofilmes possuem maior resistência às terapias antimicrobianas, a pesquisa de nanoformulações ativadas por luz aplicadas a aPDT contra biofilmes microbianos torna-se um desafio importante. A ativação de nanoformulações por luz para liberação do FS é bastante interessante para uma aplicação tópica da aPDT, pois permite reduzir o tempo de incubação da nanoformulação no local da infecção ou contaminação, além de um controle remoto-temporal para liberação do FS.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver um sistema de micelas ativado por luz para aumentar a liberação de CUR no alvo específico e avaliar sua ação antimicrobiana fotodinâmica. Os objetivos específicos foram:

Desenvolver um polímero fotosensível, capaz de ser ativado por luz e formar um sistema micelar para a incorporação de CUR, além de caracterizar o sistema e compará-lo com micelas convencionais;

Avaliar o potencial fotodinâmico antimicrobiano dos sistemas micelares desenvolvidos em culturas planctônicas de SARM, *P. aeruginosa* e *C. albicans*;

Avaliar a biomassa de biofilmes simples de SARM, *P. aeruginosa* e *C. albicans* incubados com FS nas micelas desenvolvidas e livre;

Avaliar a citotoxicidade das formulações micelares desenvolvidas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CUR como FS

Devido ao desenvolvimento de resistência microbiana aos antibióticos, a aPDT tem sido avaliada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (SASM), MRSA, assim como contra cepas padroes de *S. aureus*. Foram observadas diminuições na contagem de colônias de 4 Log₁₀⁵⁷, um outro estudo⁵⁸ demonstrou a relação dose-dependência na eficácia da aPDT em biofilmes de simples de SASM ou MRSA crescidos durante 48h, uma vez que a CUR em concentração de 80 µM promoveu diminuição de 3 Log₁₀ em SASM, ao passo que as concentrações de 20 µM e 40 µM promoveram diminuição de aproximadamente 1 Log₁₀. Por outro lado, em SARM a concentração de 20 µM de CUR associada a luz azul promoveu a diminuição de aproximadamente um Log₁₀, já a aPDT usando concentrações maiores de FS (40 e 80 µM) promoveram diminuição de 2 Log₁₀ na bactéria. Adicionalmente foi reportada a diminuição da atividade metabólica de até 94,32% e 89,35% em SASM e SARM, respectivamente⁵⁸.

Essa menor eficácia da aPDT em SARM foi atribuída à estrutura capsular de polissacarídeo na superfície da bactéria, a qual limita a penetração do FS dentro do micro-organismo reduzindo os efeitos dos EROS, tornando o micro-organismo menos suscetível à foto-inativação^{58,59}. Um outro fator que poderia influenciar a eficácia da aPDT é o tempo de crescimento do biofilme, uma vez que em biofilme simples de SARM crescido em cavidade de osso bovino durante 14 dias, foi necessária uma concentração de 1,5 g/L de CUR associada a 20,1 J/cm² para promover diminuição maior de 3 Log₁₀ comparado com o grupo controle⁶⁰.

Um fator importante na aPDT é o tipo de micro-organismo avaliado, sendo que bactérias Gram-negativas são mais difíceis de fotoinativar do que as bactérias Gram-positivas. CUR a 75 µM foi usada em culturas livres de *S. aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium, e *P. aeruginosa*⁶¹. Em *S. aureus* e *A. hydrophila* foi observado maior efeito fotodinâmico (redução maior a 3 Log₁₀). Por outro lado, nas bactérias Gram-negativas foram observadas reduções menores aos 3 Log₁₀⁶¹. Esse fato foi observado também em um estudo no qual a CUR foi usada contra *Enterococcus faecalis* e *P. aeruginosa*, no qual após a aPDT foi observada diminuição na contagem de colônias de 95,0% e 81,1% para *E. faecalis* e *P. aeruginosa*⁶². Ainda em biofilme simples de *P. aeruginosa* promoveu a redução de

até 4,62 Log₁₀ após fluência de 10 J/cm² ⁶³. Além disso, por meio do teste cristal violeta foi observada inibição de formação de biofilme em até 70%. Finalmente, foi observada diminuição da atividade metabólica do biofilme até 78% após a aPDT⁶³.

A CUR como FS foi observada a erradicação do fungo *C. albicans* crecido em cultura planctônica depois da aPDT mediada pela CUR 20 µM. Além disso, foi observada relação dose-dependência na diminuição da atividade metabólica em biofilme de *C. albicans*, sendo que a concentração menor (5 µM) diminuiu a atividade metabólica até 29,55 %, enquanto a concentração de 40 µM promoveu diminuição de 87,22 %³². Em outro estudo⁶⁴, a CUR a 20 µM associada a 5,28 J/cm² de irradiação erradicou o crescimento microbiano de *C. albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida glabrata*⁶⁴.

Um outro estudo avaliou a eficácia da aPDT contra biofilme simples de uma cepa padrão *C. albicans*, um isolado clínico de paciente com HIV e um outro isolado clínico de paciente com líquen plano oral usando CUR em concentração de 60 µM. Os resultados usando microscopia confocal mostraram maior eficácia do tratamento no biofilme formado por cepa padrão, por outro lado o biofilme formado por isolado clínico de paciente com HIV foi menos suscetível à aPDT. A atividade metabólica dos micro-organismos no biofilme foi avaliada por meio do teste colorimétrico XTT observando diminuição da atividade metabólica fúngica em 90,87%, 66,44% e 86,74 para ATCC, isolado de HIV e líquen plano, respectivamente⁶⁵.

Adicionalmente tem sido reportada a combinação da CUR a 5 mg/L com luz UV-A em culturas planctônicas de *E. coli* e *Listeria innocua*, os resultados demonstraram maior eficácia da aPDT na bactéria Gram-positiva (5 Log), enquanto na bactéria Gram-negativa a diminuição foram 3 Log. Adicionalmente foi reportado que apenas a luz UV-A não diminuiu a viabilidade microbiana. Um achado interessante nessa pesquisa foi que o aumento da concentração de CUR derivou em menor efeito antimicrobiano uma vez que 50 mg/L diminuíram menos de 1 log₁₀. O experimento também foi realizado a temperatura de 4°C ou 25°C usando apenas a concentração de 5 mg/L e posterior irradiação com luz UV-A durante 10 minutos, em ambas temperaturas houve diminuição de quase 5 log₁₀ em *E. coli*, por outro lado, a bactéria *L. innocua* apresentou redução maior a 5 log₁₀ após 5 minutos de irradiação⁶⁶.

Os parâmetros usados nos diferentes estudos encontram-se resumidos no quadro 1.

Quadro 1 – CUR livre como FS em aPDT (continua)

Microrganismo	Tipo de Cultura	[CUR]	PIT (min)	Parâmetros de Luz (J/cm²)	Desfecho	Ref.
SASM	Planctônica	100 µg/mL	20	8 ou 20	Redução 4 Log ₁₀	57
MRSA						
<i>S. aureus</i> (ATCC)						
SASM	Biofilme simples (48h)	20, 40 e 80 µM	20	5,28	Redução 3 Log ₁₀ e 94% de atividade metabólica	58
MRSA					Redução 2 Log ₁₀ e 89% de atividade metabólica	
MRSA	Biofilme simples (14 dias)	1,5 g/L	Não reportado	20,1	3,6 Log ₁₀	60
<i>C. albicans</i>	Planctônica	Até 20 µM	20	37,5	Erradicação de colônias	32

Quadro 1 – CUR livre como FS em aPDT (continua)

Microrganismo	Tipo de Cultura	[CUR]	PIT (min)	Parâmetros de Luz (J/cm²)	Desfecho	Ref.
<i>S. aureus</i>	Planctônica	75 µM	10	139, 278 e 417	Erradicação da bactéria	61
<i>Aeromonas hydrophila</i>					3.33 Log ₁₀	
<i>E. coli</i> ,					Até erradicação	
<i>Salmonella</i> entérica serotipo Typhymurium					Até 2,82 Log ₁₀	
<i>P. aeruginosa</i>					Até 0,33 Log ₁₀	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Planctônica e biofilme	40 µM	5	72	Redução de contagem de colônias em 95%	62
<i>P. aeruginosa</i>					Redução de 81,1% na contagem de colônias	

Quadro 1 – CUR livre como FS em aPDT (conclui)

Microrganismo	Tipo de Cultura	[CUR]	PIT (min)	Parâmetros de Luz (J/cm²)	Desfecho	Ref.
<i>P. aeruginosa</i>	Biofilme	6,75 mM	10	5 e 10	Até 4,62 Lgo ₁₀ e 70% de biomassa	63
<i>C. albicans</i>	Planctônica	Até 20 µM	Até 20	5,28	Erradicação de colônias	64
<i>Candida glabrata</i>						
<i>Candida dubliniensis</i>						
<i>C. albicans</i> (isolado clínico de paciente com HIV)	Biofilme	60 µM	20	7,92	Diminuição da atividade metabólica 66,44%	65
<i>C. albicans</i> (ATCC)					Diminuição da atividade metabólica 90,87%	
<i>C. albicans</i> (isolado líquem plano)					Diminuição da atividade metabólica 86,74%	
<i>E. coli</i>	Planctônica	5 mg/L	5	160	3 Log ₁₀	66
<i>Listeria innocua</i>					5 Log ₁₀	

Fonte: Elaboração do autor.

Já em estudos de aPDT mediada pela CUR em nanosistemas, nanopartículas poliméricas aniônicas de poliácido láctico co-glicólico (PLGA) associado a polivinil

álcool (PVA) promoveram diminuição de 6,2 Log₁₀ e 2,9 Log₁₀ em culturas planctônicas de *Staphylococcus saprophyticus* subespécie *bovis* e *E. coli*, respectivamente. A modificação da carga superficial das nanopartículas melhorou o seu efeito fotodinâmico antimicrobiano, pois foi observada erradicação do crescimento de *S. saprophyticus* subsp. *bovis*, e diminuição de 5,9 Log₁₀ em *E. coli*⁶⁷. Em outro estudo nanopartículas de PLGA-PVA carregadas com CUR a 50 µg/mL, veiculadas em um spray formado de micropartículas associadas a 13,2J/cm² de luz azul, promoveram redução de 6,1 Log₁₀ em *S. saprophyticus* subespécie *bovis* e 1,6 Log₁₀ em *E. coli*⁶⁸.

Um enxuague bucal feito em base a uma microemulsão de óleo/água carregada com CUR a 30 e 60 µg/mL foi testada contra biofilmes simples de MRSA, *E. coli*, e *C. albicans* crescido durante 7 dias. Diferente de os estudos acima mencionados, nesse reporte foi observao maior efeito fotodinâmico antimicrobiano na bactéria Gram-negativa (~5,6 Log₁₀), enquanto que na bactéria Gram positiva foi observada diminuição de ~5,1 Log₁₀, e a menor diminuição foi observada no fungo (3,497 Log₁₀)⁶⁹.

A eficácia da CUR livre foi comparada com micelas sintetizadas a partir das moléculas N,N-(di-3aminopropil)-N-metilamina (DAPMA), espermidina (SPD) ou espirmina (SPM), foram utilizadas para carregar CUR (1µM, 500 nM, 250 nM, 100 nM e 50 nM) contra culturas planctônicas de *P. aeruginosa*. As micelas demonstraram maior efeito fotodinâmico comparado com a CUR livre, pois foram necessárias concentrações menores do FS para produzir efeito fotodinâmico antimicrobiano, enquanto que a CUR livre até 200 µM associada a 6, 18 e 30 J/cm² de luz azul não foi efetiva na foto-inativação de *P. aeruginosa*⁷⁰.

Em um estudo recente foi avaliada a eficácia fotodinâmica da CUR nano particulada combinada indocina verde (ICG) contra *Enterococcus faecalis* cultivado como biofilme durante 14 dias em canais de dentes pré-molares humanos. Para a realização da aPDT os autores usaram duas fontes de luz: uma, laser 810 nm a 200 mW (31,2 J/cm²) foi usada para ativar a ICG e outra LED 500 mW/cm², em 450 nm de comprimento de onda foi usada para ativar a nanocurcumina (60 J/cm²). Os tratamentos de aPDT/Laser+LED e aPDT/LED+Laser diminuíram a viabilidade microbiana em 82,74% e 83,84%, respectivamente. A aPDT/LED promoveu diminuição de 75,52% do crescimento do biofilme, enquanto que nas amostras

submetidas a aPDT/Laser foi observada diminuição de 69,40% de viabilidade microbiana. Os autores não observaram diferença significativa com as luzes bem isoladas ou combinadas. Além de promover a remoção parcial do biofilme, aPDT promoveu deformação microbiana devido à adição da MET que incrementa a produção de EROS e subsequente estresse oxidativo no micro-organismo⁷¹. Os sistemas abordados nesta seção encontram-se no quadro 2.

Quadro 2 – CUR em nanosistemas usados em aPDT (continua)

Microrganismo	Tipo de Cultura	[CUR] e tipo de nanosistema	PIT	Parâmetros de Luz (J/cm²)	Desfecho	Ref.
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>Bovis</i>	Planctônica	Nanopartículas Poliméricas aniônicas/catiônicas	30	105,6	6,2 Log ₁₀ /erradicação	67
<i>E. coli</i>					2,9/5,9 Log ₁₀	
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>Bovis</i>	Planctônica	50 µg/mL Nanopartículas Poliméricas em Spray	40	13,2	6,1 Log ₁₀	68
<i>E. coli</i>					1,6 Log ₁₀	

Quadro 2 – CUR em nanosistemas usados em aPDT (conclui)

Microrganismo	Tipo de Cultura	[CUR] e tipo de nanosistema	PIT	Parâmetros de Luz (J/cm²)	Desfecho	Ref.
MRSA	Biofilme simples (7 dias)	Microemulsão (60 µg/mL)	5	32,4	5,18 Log ₁₀	69
<i>E. coli</i>					3,96 Log ₁₀	
<i>C. albicans</i>					3,49 Log ₁₀	
<i>P. aeruginosa</i>	Planctônica	Micelas de espermina (50 e 100 nM)	Overnight	30 J/cm ²	Erradicação	70
<i>E. faecalis</i>	Biofilme 14 dias	Nannocurcúmina associada a a indochina verde		31,2 (810 nm) e 60 (azul)	Diminuição de crescimento bacteriano até 83,84%	71

Fonte: Elaboração do autor.

3.2 Sistemas Nanoestruturados

Ciclodextrinas são moléculas formadas por oligosacarídeos cíclicos que possuem superfície externa hidrofílica e uma porção central lipofílica, são usados na entrega de fármacos pobremente solúveis em água, além disso melhoram a biodisponibilidade⁷².

Lipossomas são sistemas de liberação de fármacos formados por vesículas concêntricas lipídicas rodeadas por meio aquoso, são sistemas de liberação capazes de carregar tanto moléculas hidrofóbicas quanto moléculas hidrofílicas⁷³.

As nanopartículas poliméricas são sistemas de liberação de fármacos formados por polímeros biodegradáveis tais como ácido polilático co-glicólico, polilático, policaprolactona, entre outros. As nanopartículas poliméricas são

biocompatíveis, possuem tamanho de até 1000 nm, proveem liberação controlada e sostenida do fármaco. O fármaco pode estar adsorvido na superfície da nanopartícula (nanoesfera) o pode se encontrar dentro da nanopartícula (nanocápsula)⁷⁴.

Micelas são sistemas de liberação de fármacos que apresentam uma porção hidrófoba (*core*) que protege os compostos hidrófobos encapsulados e outra porção hidrófila denominada *shell* que provê estabilidade coloidal, prevem a opsonização e adsorção de proteínas que poderiam quebrar a micela antes de chegar no alvo^{75,76}. Uma característica das micelas é seu auto-montado em solução aquosa⁷⁷, esse procedimento está associado à quantidade de surfactante e as propriedades da droga encapsulada⁷⁸.

Micelas poliméricas tem características como baixo peso molecular, boa estabilidade, baixa taxa de dissociação, melhor retenção do composto encapsulado e elevada acumulação no sitio alvo^{75,76}. Dentre os polímeros usados na síntese de micelas os compostos comerciais Pluronic ®. ^{76,78} são polímeros tri-bloco poli (óxido de etileno) POE y poli (óxido de propileno) PPO, não iônicos e solúveis em água, comercialmente conhecidos como Poloxamer (ICI) ou Pluronic (BASF). A nomeação dos copolímeros tri-bloco Pluronic começa com uma letra: L de líquido, P de pasta ou F de flocos. Em seguida os primeiros dois números que são indicativos do peso molecular da porção hidrofóbica PPO e o último número significa o peso porcentual da fração hidrofílica PEO^{79,80}. Pluronic de diferentes pesos moleculares tem usos na indústria farmacêutica para síntese de nanopartículas, cosméticos e emulsões entre outros⁸⁰.

3.3 Micelas Carregadas com CUR

Alguns Pluronic como F127 ou F68 foram utilizados na síntese de micelas carregadas com CUR apresentando formas esféricas^{81,82}. Uma das principais características das micelas é a eficiência de encapsulamento (EE%) do composto. Os valores de EE% estão relacionadas com o tipo do polímero usado na síntese, concretamente com o tamanho do segmento hidrofóbico⁸¹⁻⁸³. Adicionalmente os Pluronic podem ser misturados com compostos como Tween-80, maltodextrina, alginato de sódio e quitosana, afim de melhorar algumas propriedades da micela como a EE%⁸⁴.

Outros estudos⁸⁵⁻⁸⁸ combinaram o Pluronic F127 foi associado com o composto Solutol® HS15 (CM-F) e as suas características foram comparadas com uma outra micela sintetizada a partir de D-alfa-tocoferil polietilenoglicol 1000-succinato (DPGS) associado a Solutol HS15 (CM-T)⁸⁵, L-Alanina⁸⁶, poli (caprolactona)⁸⁷. Essa mistura promoveu modificações nas características de formação das micelas, assim como nas suas propriedades nanométricas⁸⁵. Apesar de ter maior EE% nas micelas a liberação da CUR foi demorada (até 85% em 144h)⁸⁶. Em micelas de P123 associadas a D-alfa polietilenoglicol-tocoferil glicosuccinato (TGPS) a liberação foi associada com o três razões: o primeiro, os tipos de carregador, micelas com baixa Concentração Micelar Crítica (CMC) tendem a formar micelas que podem se depolimerizar em meio aquoso, segunda razão o core hidrofóbico fortemente aderido a CUR, terceiro: o lento processo de dissolução da CUR em PBS pH 7,4 atribuído a hidrofobicidade da droga⁸⁷.

A caracterização dos sistemas revisados encontra-se resumidos no quadro 3.

Quadro 3 – Sistemas micelares e sua caracterização (continua)

Micelas	Tipo de síntese	EE%	Tamanho, IPD e potencial zeta	Liberação	Desfecho	Ref.
F127/F68	Hidratação de camada	95,57 % e 70,24	20-80 nm	63%/80% em 10 dias	Anticâncer	81,82
P123	Hidratação de camada	95%	16 até 24 nm, 0,016-0,18	17% em 70 h	Anticancer	83

Quadro 3 – Sistemas micelares e sua caracterização (conclui)

Micelas	Tipo de síntese	EE%	Tamanho, IPD e potencial zeta	Liberação	Desfecho	Ref.
F127/P123/Maltodextrina/Tween-80/alginato de sódio/ quitosana	Hidratação de camada	50 ppm	Não reportado	Não reportado	Atividade antimicrobiana/diminuição de glicose e creatinina em ratos albino	84
F127/Solutol®H S15	Hidratação de camada	88,66 %	13,64 nm, 0,176 e -0,598 mV	12% em 10h	Modelo animal de refluxo intestinal	85
DPGS /Solutol® HS15		83,61 %	15,95 nm, 0,190 e -1 mV	7% em 10 h		
F12/L-Alanina/amida	Nanoprecipitação	91,3 %	68,4 nm, 0,275	85% em 144 h	Anticancer	86
F127/PCL	Diálise do solvente	96,59 %	Até 195 nm, -17mV	60,11% em 108 h	Anticancer	87
P123/TGPS	Hidratação da camada fina	Até 99,3 %	10,83 nm, 0,114	80% em 24h	Oftalmologia	88

Fonte: Elaboração do autor.

3.4 Sistemas Fotoativados

Os sistemas fotoativados produzem mecanismos tais como a fotoisomerização, oxidação induzida a absorção plasmônica, a mudança de hidrofobicidade fotoquímica e fotodegradação polimérica⁵⁹.

A fotoisomeração⁵⁹ é o processo de alteração conformacional de uma dupla ligação da sua orientação *trans* para a forma *cis* sob irradiação. A molécula mais utilizada para essa finalidade é o azobenzeno, que apresenta uma ligação -N=N- com anel fenil em cada lado, e cuja forma planar *trans* é mais hidrofóbica que a forma não planar *cis*⁵⁹.

Na oxidação induzida por fotossensibilização, o processo é semelhante ao que ocorre na PDT: um composto fotossensível é ativado por um comprimento de onda adequado, gerando radicais livres (especialmente oxigênio singleto) que promovem dano a estruturas, especialmente nanopartículas de lipídeos foto-oxidáveis, liberando o fármaco⁵⁹.

A absorção plasmônica de superfície utiliza nano-estruturas de ouro, as quais absorvem comprimentos de onda próxima ao infravermelho (NIR, 700 a 950 nm), o qual apresenta maior penetração nos tecidos biológicos⁸⁹, além de converterem essa energia em calor (efeito fototérmico). Assim, nano-estruturas de ouro são incorporadas em cápsulas poliméricas juntamente com o fármaco. A ativação por luz NIR é convertida em energia térmica, que promove um aumento considerável de temperatura no sistema (600 a 800°C) e, conseqüente, estresse térmico e mecânico no sistema, promovendo a liberação do fármaco.

O mecanismo de mudança de hidrofobicidade fotoquímica consiste no balanço hidrofóbico e hidrofílico de moléculas anfifílicas (como micelas), uma vez que, quando o sistema é ativado e se torna hidrofílico, ocorre a desintegração do sistema e a liberação do fármaco. Para isso são desenvolvidas substâncias que sofrem um rearranjo estrutural para formar espécies hidrofílicas sob exposição de luz, sendo que a maioria são moléculas orgânicas ativadas por luz UV. Porém alguns cromóforos orgânicos podem ser ativados por fótons duplos de luz NIR de baixa energia e sofrer a mesma transformação química como quando são ativados por luz UV⁹⁰.

Outra forma de liberação de fármacos é por fotodegradação polimérica, no qual o sistema, quando ativado por luz, é desintegrado tanto em escala nanométrica (desintegração do nanocarregador) como em escala molecular (fragmentação

polimérica), com a vantagem de gerar resíduos menores que podem ser eliminados do corpo, evitando toxicidade em longo prazo. Alguns polímeros sofrem degradação por alterações fisiológicas internas, como pH, temperatura e espécies reativas de oxigênio. Para controlar a liberação remota desses sistemas, estímulos externos como luz, ultrassom e magnetismo podem ser utilizados^{59,60}.

O foto-descruzamento de ligações permite também a liberação do fármaco por rompimento de ligação cruzadas sensíveis a luz, tornando a partícula mais porosa, com a vantagem de manter essas porções fotosensíveis junto à partícula após exposição luminosa, eliminando assim a possível toxicidade de subprodutos fotocivados^{59,60}. O quadro 4 resume a caracterização dos sistemas fotoativados revisados.

Quadro 4 – Sistemas fotoativados (continua)

Sistema	Tipo de fotoliberação	Composto e EE%	Tamanho, IPD e potencial zeta	Liberação	Desfecho	Ref.
Lipossomas	Fotoisomerização (365 nm)	CUR 88%	140 nm, -23 mV	96% após 6h	Não reportado	91
Conjugado- do- enxofre- oleil amina	Oxidação induzida (638 nm)	CUR/Ftalocianina de Zinco 60%,78%	127,9 nm, 0,05 de IPD	90% CUR e 80% Ftalocianina após 4 minutos	Atividade anticancer	92
Nanopartículas mesoporosas	Absorção Plasmônica (805 nm)	Doxorubicina	300 nm,-17 mV	30% em 20 minutos	Efeito anticancerígeno	93
Lipossomas	Absorção Plasmônica (780 nm)	CUR 65,8%	100 nm, +22mV	39,7% em 10 minutos	Efeito anticancer	94

Quadro 4 – Sistemas fotoativados (conclui)

Sistema	Tipo de fotoliberação	Composto e EE%	Tamanho, IPD e potencial zeta	Liberação	Desfecho	Ref.
Micelas deHPH-EEP-DNQ	Mudança de hidrofobicidade (365 nm)	Vermelho Nilo (até200 mg/mL)	186 nm, 0,127 IPD	Não claro	Efeito anticancer	95
Micelas C18-NB-PEG	Mudança de hidrofobicidade (365 nm)	Vermelho Nilo 800 nM	12 nm	Não reportado	Efeito anticancer	96
Micelas EG-g-PHEMA-g-PSPMA	Fotoisomerização (365 nm)	Pireno (34,9%)	115 nm	70%	Não realizado	97
Micelas mPEG-poli(tirosina)-g-NB	Mudança de hidrofobicidade (365 nm)	Vermelho Nilo	250 nm, 0,013 de IPD	76,7% após 60 minutos	Não realizado	98
Micelas CMQ-NBS-Ret	Mudança de hidrofobicidade (365 nm)	Vermelho Nilo 95,6%.	242 nm,0,097IPD e -29,2mV	96,9% após 10 minutos	Liberação de pesticida	99
Micelas PEG-ANB	Mudança de hidrofobicidade (365 nm)	2,4-D	51 nm	95,5% em 9 minutos	Liberação de pesticida	100

Fonte: Elaboração do autor.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Síntese do Polímero Fotossensível (PFS)

As etapas de síntese e caracterização do PFS foram realizadas no Núcleo de Pesquisas em Terapia Fotodinâmica do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pelo pós-doutorando Italo Rodrigo Calori.

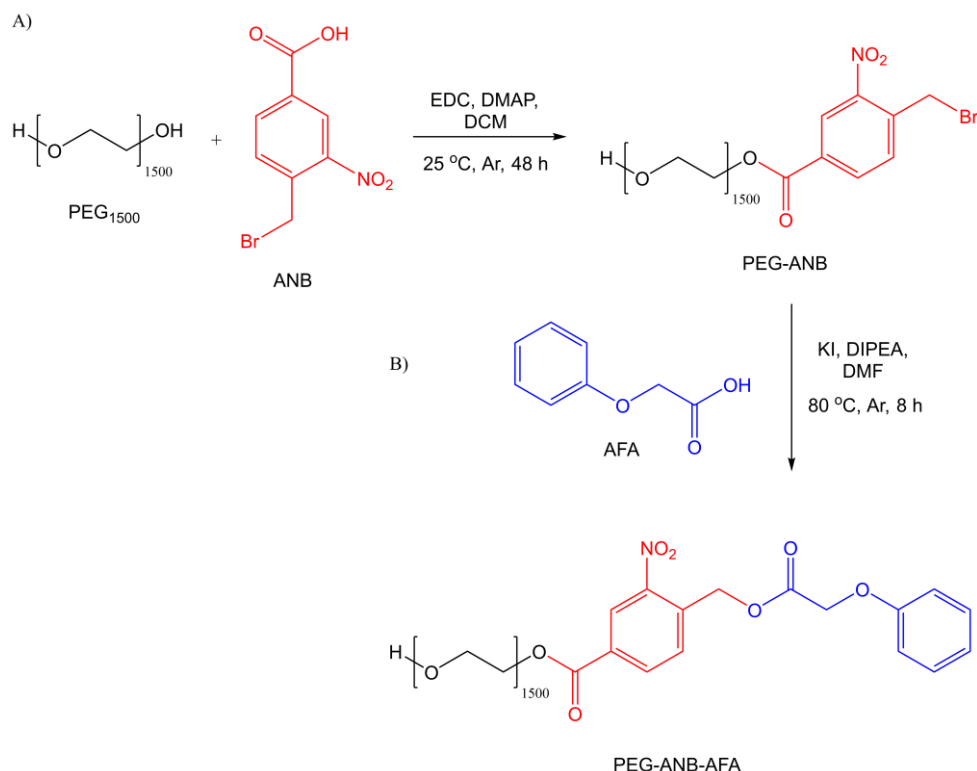
4.1.1 Reação do PEG₁₅₀₀ com o ácido 3-nitro-4-brommoetilbenzoico (PEG-ANB)

Para a síntese do PFS, o polietileno-glicol de peso molecular de 1500 daltons (PEG₁₅₀₀, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) foi selecionado devido à sua semelhança química com os polímeros surfactantes Pluronic® P123 e F127 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), utilizados para síntese de micelas comerciais convencionais (micelas controles, síntese dos sistemas se encontram na seção 4.2). A conjugação do polímero PEG₁₅₀₀ com o ácido 3-nitro-4-bromoetilbenzóico (ANB, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) foi realizada por meio de uma reação de esterificação de Steglich¹⁰¹ na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) como ativadores de carbonilo (Figura 1-A). A uma solução de ANB (0,35 g, 1,33 mmol) em diclorometano (DCM, 20 mL, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) mantida em um balão reacional de uma boca (Special Glass, Poá, SP, Brasil) ao abrigo da luz e atmosfera de argônio (Ar), foram adicionados EDC (0,33 g, 2,1 mmol) e DMAP (0,12 g, 2,0 mmol), e a solução foi mantida à temperatura ambiente por um período de 1 h sob agitação vigorosa. Em seguida, uma solução do polímero PEG₁₅₀₀ (1,0 g, 0,67 mmol) em DCM (30 mL) foi adicionada gota a gota por um período de 45 min com o auxílio de um funil de adição (Special Glass, Poá, SP, Brasil) e a solução resultante foi mantida em agitação vigorosa por 48 h à temperatura ambiente, sob atmosfera de Ar. Após o período reacional, a solução foi lavada 3 vezes com 10 mL de uma solução 10% de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) e a fase orgânica foi reunida e secada com sulfato de cálcio (CaSO₄) anidro (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil). Em seguida, a solução foi filtrada e o solvente, eliminado por pressão reduzida para fornecer um produto pastoso amarelo. O produto foi purificado por recristalização com éter dietílico (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), e deixado em um dessecador (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil)

por 24 h para eliminação de traços do solvente, obtendo-se um sólido cristalino amarelado.

4.1.2 Reação do PEG-ANB com ácido fenoxiacético (PEG-ANB-AFA)

O extremo hidrofóbico do polímero constituído por ácido fenoxiacético (AFA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) foi conjugado nas terminações do polímero PEG-ANB por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN_2) para a obtenção de um éter como produto final (Figura 1-B). Em um balão reacional de duas bocas (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil) conectado a um sistema de refluxo contendo a solução de PEG-ANB (0,50 g, 2,87 mmol) em dimetilformamida (DMF, 15 mL) foram adicionados AFA (0,52 g, 3,44 mmol), N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA, 600 μ L, 3,44 mmol, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) e iodeto de potássio (KI, 57 mg, 0,34 mmol, Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil) e a solução resultante foi mantida em agitação vigorosa a 80 °C, sob atmosfera de Ar. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada fina empregando-se placa de sílica gel (JT Baker® Chemical Co. Phillipsburg, NJ, USA) como fase estacionária e uma mistura de diclorometano (DCM, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA): metanol (MeOH, JT Baker® Chemical Co. Phillipsburg, NJ, USA) (80:20, v/v) como fase móvel. Após 8 h de reação, o solvente foi eliminado a pressão reduzida, e o produto bruto foi solubilizado em DCM e lavado 3 vezes com 5 mL de uma solução 10% de $NaHCO_3$ e a fase orgânica foi reunida e secada com $CaSO_4$ anidro. O produto foi purificado por recristalização com éter dietílico e deixado em um dessecador (Uniglas Orem, UT, USA) por 24 h para eliminação de traços do solvente, obtendo-se um sólido cristalino avermelhado.

Figura 1 - Rota sintética do polímero fotossensível (PFS)

Conjugação de ANB ao PEG₁₅₀₀ (A) e de AFA ao PEG-ANB (B). PEG: polietileno-glicol; ANB: 3-nitro-4-bromoetilbenzóico; EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; DMAP: 4-dimetilaminopiridina; DCM: diclorometano; AFA: ácido fenoxiacético; KI: iodeto de potássio; DIPEA: N,N-Diisopropiletilamina; DMF: dimetilformamida.

Fonte: Elaborado pelo Dr. Italo Rodrigo Calori.

4.1.3 Espectro de Ressonância Magnética (NMR) do PFS

Para verificar o espectro de ressonância magnética de hidrogênio (¹H NMR) do PFS, 100 µg de PFS foram diluídas em 700 mL de clorofórmio deuterado (clorofórmio-d, CDCl₃, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) transferidos para um tubo de vidro ressonância magnética (JT Baker® Chemical Co. Phillipsburg, NJ, USA). O espectro foi obtido usando um espectrofotômetro de NMR (Bruker AVANCE III HD, Billerica, MA, USA).

4.2 Síntese e Caracterização das Micelas

As etapas de síntese e caracterização das micelas foram realizadas no Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), sob supervisão do Prof. Antonio Claudio Tedesco e acompanhamento do pós-doutorando Italo Rodrigo Calori.

4.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC foi realizada para se determinar a menor concentração de polímero necessária para formação de micelas quando em solução aquosa. Em uma cubeta de quartzo (10 mm de caminho óptico -JT Baker® Chemical Co. Phillipsburg, NJ, USA) contendo solução aquosa de pireno (1×10^{-6} M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), utilizado como pigmento de prova, foram feitas adições sucessivas (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 12; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 80; 100 μ L) de uma solução estoque de polímero PFS (1% w/v em água). Após cada adição, a fluorescência foi verificada com excitação/emissão de 330/378 nm, (Fluorog-3, Horiba Instruments, Edison, NJ, USA). A CMC foi determinada nas seguintes temperaturas: 22 °C, 25 °C, 30 °C, e 35 °C. A CMC do PFS também foi determinada na presença de CUR (5×10^{-6} M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em solução água: acetonitrila (ACN-Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil) em proporção 99,7:0,3%, respectivamente, usando a mesma metodologia e parâmetros de temperatura, porém com excitação/emissão de 460/520 nm.

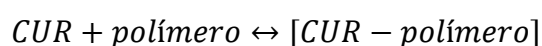
A mesma metodologia foi usada para a síntese e determinação dos valores de CMC com Pluronic® P123 e F127 (micelas controles), a partir de soluções aquosas de 1% e 4% respectivamente, nas temperaturas de 25 °C e 37 °C na presença e ausência de CUR.

4.2.2 Determinação da constante de ligação (K_b) do PFS à CUR

A constante de ligação (K_b) foi determinada pela titulação (1; 1,5; 2,5; 2,5; 2,5; 5; 5; 10; 10; 15; 20; 30; 40 e 50 μ L) de solução estoque de PFS a 1% w/v dentro de uma cubeta de quartzo contendo 2 mL de solução de CUR a 5×10^{-6} M diluída em solução água: ACN em proporção 99,7:0,3%, respectivamente. Imediatamente após cada adição, a absorção da solução foi verificada em 425 nm (Ultraspec 7000, GE Lifesciences, Marlborough, Mass, USA).

Amostras adicionais de solução aquosa de Pluronic P123 e F127 a 1% e 4%, respectivamente, foram usadas para determinar a K_b de cada composto à CUR. Cada procedimento foi executado em temperatura ambiente.

Os valores de K_b podem ser descritos pelo equilíbrio de CUR com o polímero mediante la fórmula¹⁰²:



Para a determinação da constante de equilíbrio (KS) foi usada a seguinte equação¹⁰³:

$$K_b = \frac{[Complexo: CUR \leftrightarrow Polímero]}{[CUR][Polímero]}$$

Nesta fórmula, K_b é a constante de ligação, [Complexo: CUR $\leftrightarrow$ Polímero] equivale à interação da solução CUR e polímero [CUR] corresponde à concentração de CUR e [Polímero] à concentração do polímero. Asumindo a formação 1:1 entre CUR e polímero a KS foi determinada pela equação¹⁰³:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{KS\Delta\epsilon[CUR]} \left(\frac{1}{[polímero]} + \frac{1}{\Delta\epsilon[CUR]} \right)$$

Onde, ΔA são as mudanças de absorção, $\Delta\epsilon$ é coeficiente de extinção molar no comprimento de onda de 425 nm e [CUR] e [polímero] são as concentrações de curcumina e polímero respectivamente.

4.2.3 Síntese das micelas

Os valores obtidos no teste de CMC foram utilizados para sintetizar as micelas a 25 °C. Em todos os casos de síntese, usou-se o método de adição direta, uma vez que, a partir da CMC, o sistema é auto-organizado (micelização). Na síntese de micelas fotoativadas, 114 μ L de uma solução aquosa de PFS a 1% foram adicionados em 1.886 μ L de uma solução de CUR a $5,3 \times 10^{-6}$ M, preparada em proporção solução água:ACN em proporção 99,7:0,3%, respectivamente. Na síntese de micelas de F127, foram adicionados 130 μ L de solução polimérica a 4% em 1.870 μ L de solução água:ACN (99,63:0,37) de CUR [$5,33 \times 10^{-6}$ M]; já para micelas de P123, foram adicionados 520 μ L de solução aquosa de polímero em 1.480 μ L de solução água:ACN (99,53:0,47) de CUR a $6,75 \times 10^{-6}$ M. A mesma metodologia foi utilizada em ausência de CUR para a síntese de micelas vazias.

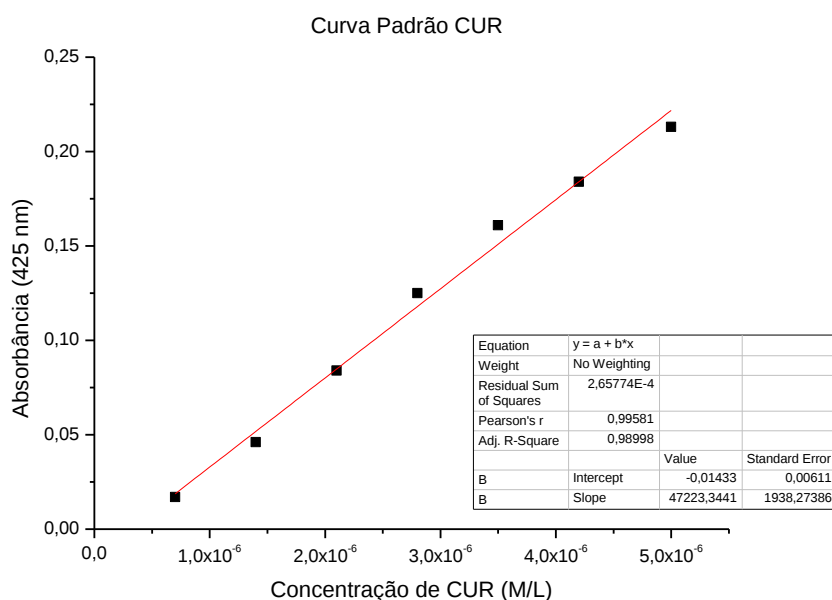
4.2.4 Eficiência de Encapsulamento (EE%)

Uma curva de calibração (Figura 2) foi realizada para se correlacionar a absorbância das formulações micelares com a concentração de CUR. Para isso, a absorbância de soluções de CUR em acetronitrila a 7×10^{-7} , $1,4 \times 10^{-6}$, $2,1 \times 10^{-6}$, $2,8 \times 10^{-6}$, $3,5 \times 10^{-6}$, $4,3 \times 10^{-6}$, 5×10^{-6} M foram lidas a 425 nm (Eppendorf 58104, Hamburg, Germany). Para determinar a EE% de cada formulação micelar (PFS ou convencionais) contendo CUR a 5×10^{-6} M, a absorção de cada solução micelar

sintetizada foi lida em 425 nm (A0); logo depois, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos a 25 °C. Em seguida, o precipitado resultante foi resuspenso em ACN e a absorbância foi novamente lida (A1); a diferença do valor de A1-A0 foi usado na equação de regressão ($R^2 \geq 0,99$) obtida a partir da curva de calibração para determinar a concentração da CUR. A EE% foi determinada pela seguinte equação⁸²:

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade de CUR encapsulada}}{\text{Quantidade total de CUR}} * 100$$

Figura 2 - Curva padrão da CUR para determinar a EE%



Fonte: Elaboração do autor.

4.2.5 Supressão da fluorescência

Esse teste foi realizado para verificar se a CUR se encontra dentro das micelas, uma vez que um agente é utilizado para suprimir a fluorescência da CUR livre, de maneira que, quanto maior a supressão, menor a quantidade de CUR dentro das micelas. Uma solução estoque de iodeto de sódio (NaI) a 2 mM, utilizado como agente supressor de fluorescência, foi titulada (10, 10, 10, 10, 20, 20, 30, 30, 40, 50, 50, 100 e 200 µL) individualmente em 2 mL de cada solução micelar (micelas feitas com PFS, Pluronic F127 ou P123) carregadas com CUR. Imediatamente depois cada adição, foi verificada a fluorescência (excitação/emissão

de 330/520 nm). Uma amostra adicional de solução CUR a 5×10^{-6} M em água:ACN também foi avaliada para a supressão da fluorescência. A supressão de fluorescência foi determinada pela equação de Stern-Volmer¹⁰⁴:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q]$$

Onde: F_0 e F são as intensidades de fluorescência da CUR em ausência ou presença do supressor, respectivamente; K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, e $[Q]$ é a concentração do supressor.

Quando linearidade não foi observada a equação de Stern-Volmer foi modificada da seguinte forma⁴¹:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{faK'_D[Q]} + \frac{1}{fa}$$

Onde $\Delta F = F_0 - F$ é a diferença entre a intensidade de fluorescência inicial e a fluorescência da CUR nas micelas, $[Q]$ é a concentração do supressor a qualquer ponto da titulação, f é a fração total de CUR relativa ao supressor e K'_D é a constante de Stern-Volmer.

4.2.6 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho hidrodinâmico e o índice de polidispersão (IPD) foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering, DLS, Malvern PCS Instruments, UK). Para esse teste, amostras sem diluir de cada suspensão micelar contendo CUR ou pireno, no caso das micelas de PFS, e micelas com e sem CUR, no caso das micelas de Pluronic F127 ou P123, foram aliqüotadas em 2 mL em cubetas para DLS. A determinação das propriedades nanométricas fora feita a 25 °C e ângulo de espalhamento de 173°. A potência eletrostática das formulações foi determinada pelo potencial zeta.

4.2.7 Análise da morfologia das micelas (MEV-FEG)

Soluções micelares diluídas em água (1:100) de cada formulação foram individualmente gotejadas em *stub* condutores e secadas à temperatura ambiente. Depois, as amostras foram cobertas com ouro usando o aparelho *sputter-coater* (BAL-TEC SCD 050, Bridgend, UK). A morfologia das micelas foi analisada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG,

Malvern PCS Instruments, UK e software de operação PC-SEM v 2,1,0,3) do Instituto de Química de Araraquara, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.

4.2.8 Fotodegradação do PFS

Amostras de micelas feitas com PFS contendo pireno 1×10^{-6} M ou CUR 5×10^{-6} M foram submetidas a irradiação de laser UV (355 nm, Continuum, Quantum Composers, Bozeman, MT, USA) em potência de 25 mW/cm^2 (Figura 3). As amostras foram irradiadas com doses de luz de 9; 18; 27; 54; 72 e 90 J/cm^2 ¹⁰⁰, correspondentes a 6, 12, 18, 36, 48 e 60 minutos, durante esse período de tempo para cada uma das doses de luz foram emitidos 45, 90, 136, 271, 362, 452, pulsos respectivamente. Após cada irradiação, o espectro de absorbância do PFS foi verificado na faixa de 200 até 700 nm.

Figura 3 - Aparelho Laser UV 355 nm



Fonte: Arquivo do autor.

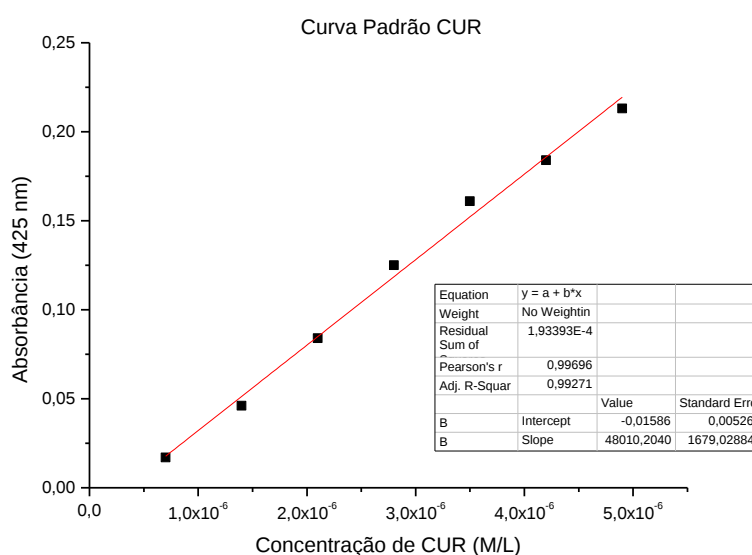
4.2.9 Fotoliberação da CUR

Uma curva de calibração foi realizada para se correlacionar a absorbância com cada concentração de CUR. Amostras individuais de micelas preparadas com PFS contendo CUR a 5×10^{-6} M foram irradiadas com laser UV 355 nm usando os parâmetros mencionados no teste de fotodegradação do PFS. Após cada irradiação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos a 25°C ⁸². Imediatamente, foi feita a leitura de absorção do sobrenadante, então a CUR

liberada foi quantificada em uma curva de calibração ($R^2 \geq 0,99$, figura 4). A liberação foi determinada pela fórmula:

$$CUR \text{ liberada (\%)} = \left(\frac{\text{Quantidade de CUR liberada}}{\text{Quantidade Total de CUR}} \right) * 100$$

Figura 4 - Curva padrão da CUR para o teste de fotoliberação



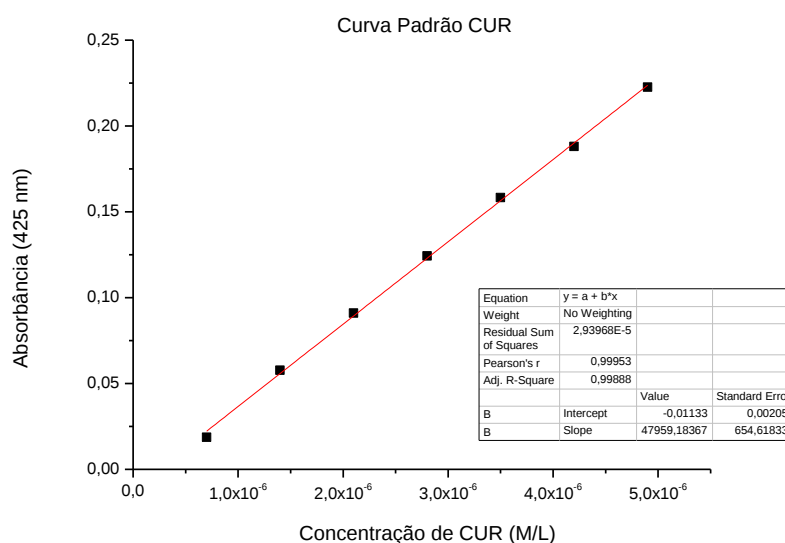
Fonte: Elaboração do autor

4.2.10 Liberação da CUR das micelas convencionais

Para esse teste, uma curva de calibração de CUR também foi realizada. Amostras das micelas convencionais de F127 e P123 contendo CUR foram levadas para sacos de diálise (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e levadas a agitação magnética a 100 rpm a 37 °C. A cada intervalo de tempo predeterminado (0, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 h), uma alíquota do dialisado foi retirada e centrifugada por 10 minutos a 5.000 rpm e 25 °C⁵⁶, o sobrenadante foi solubilizado em ACN⁶¹ e sua absorbância foi lida em 425 nm. O valor de absorbância foi usado na equação de regressão da curva padrão ($R^2 > 0.99$, figura 5).

A liberação da CUR das micelas convencionais foi determinada usando a seguinte equação⁸²:

$$CUR \text{ liberada (\%)} = \left(\frac{\text{Quantidade de CUR liberada}}{\text{Quantidade Total de CUR}} \right) * 100$$

Figura 5 - Curva padrão da CUR para o teste de liberação de CUR das micelas

Fonte: Elaboração do autor.

4.3 Avaliação Antimicrobiana Fotodinâmica das Formulações

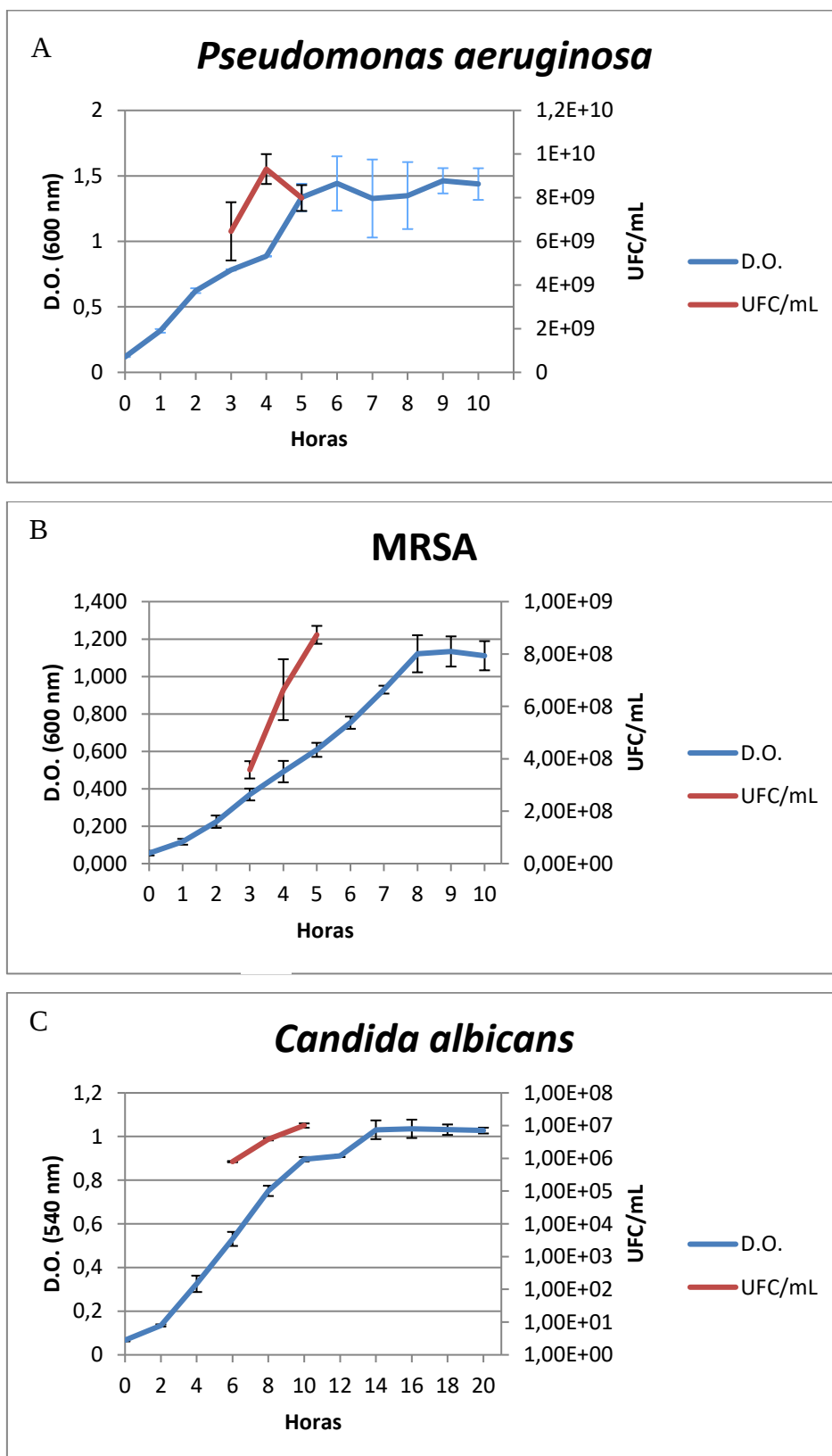
4.3.1 Micro-organismos e condições de crescimento

Cepas padrões de *C. albicans* (SC5314), MRSA (ATCC 33591) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) foram semeadas em meio de cultura específico para cada micro-organismo, sendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD) com 0,05 g/mL de cloranfenicol, Mannitol Salt Agar (MNA, Difco, Detroit, Michigan, USA) e Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, Detroit, Michigan, USA), respectivamente, os quais foram incubados a 37 °C por 48 h. Em seguida, alçadas com 5 colônias de cada micro-organismo foram transferidas para o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, com glutamina e fenol vermelho, sem bicarbonato, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tamponado com ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e suplementado com D-glicose 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 7,0, para *C. albicans*, Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, Detroit, Michigan, USA) para MRSA e para *P. aeruginosa*. Esses meios foram incubados a 37 °C por 16 horas para o fungo e 18 horas as bactérias, constituindo-se assim o pré-inóculo.

Após esse período, o pré-inóculo foi diluído na razão de 1:10 e 1:20, para isso 0,5 e 1 mL de cada suspensão foram aliquotadas em tubos individuais contendo 9,5 e 9 mL, respectivamente, de meio RPMI ou TSB, constituindo-se assim o inóculo. Na

sequência, foi feita a leitura inicial da densidade óptica (DO) para cada suspensão microbiana (DO0). Os comprimentos de onda utilizados foram de 540 nm para o fungo e 600 nm para as bactérias. Os tubos foram então levados para estufa de crescimento a 37 °C até os micro-organismos atingirem a metade fase exponencial (*mid-log*), quando então foi feita uma nova leitura da DO (DO1) e o valor obtido foi subtraído da DO0 ($\Delta DO = DO1 - DO0$). A suspensão de *P. aeruginosa* foi diluída em meio TSB em razão 1:100, enquanto que a suspensão da bactéria SARM foi diluída em meio de cultura TSB em razão 1:10. Assim as concentrações das suspensões foram padronizadas em (média $\pm$ desvio-padrão, DP) $5,16 \times 10^7 (\pm 4,45 \times 10^6)$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) para *P. aeruginosa*, $3,72 \times 10^7 (\pm 2,80 \times 10^6)$ UFC/mL para SARM e $4,35 \times 10^6 (\pm 7,49 \times 10^5)$ UFC/mL para *C. albicans*. Para a determinação da fase *mid-log*, a curva de crescimento de cada micro-organismo foi previamente determinada realizando-se sucessivas leituras de DO e plaqueamento das amostras em ágar para UFC/mL a cada 1 hora, até se verificar constância e/ou declínio dos valores de DO (fase estacionária e/ou morte). A Figura 6 (A, B e C) mostra as curvas de crescimento dos microrganismos usados neste estudo.

Figura 6 - Curvas de crescimento dos microrganismos



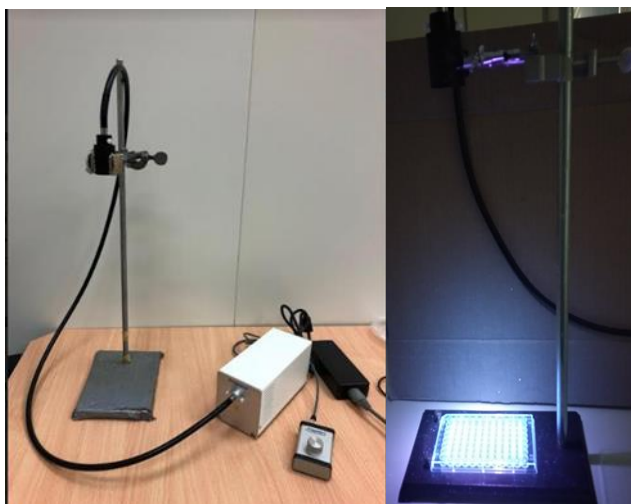
(A): *P. aeruginosa*, (B): MRSA e (C): *C. albicans*.

Fonte: Elaboração do autor.

4.3.2 aPDT em culturas planctônicas de *C. albicans*, MRSA e *P. aeruginosa*

Para a fotólise das micelas fotoativadas, foi usado um aparelho de luz UV 369 nm com uma potência de 25 mW/cm² (Prizmatix, San Francisco, Ca, USA). Posicionado a 40 cm da base para uma distribuição uniforme da luz, conforme ilustrado na Figura 7.

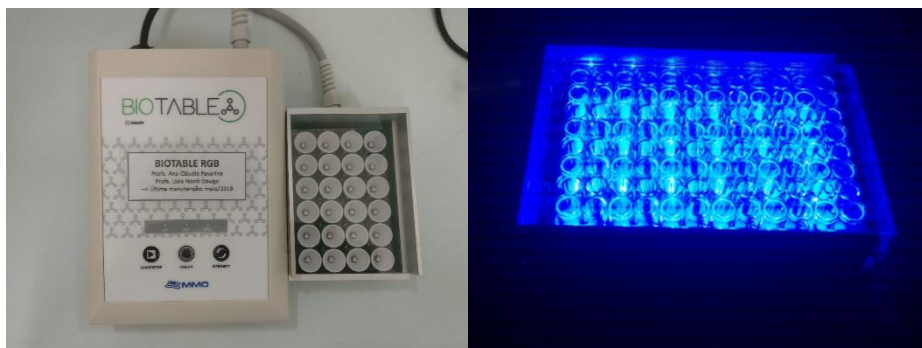
Figura 7 - Aparelho LED de luz UV a 369 nm



Fonte: Arquivo do autor.

Um aparelho de luz LED tipo biotable *red-green-blue* (RGB, MMOptics, São Carlos, SP, Brazil) com potência de luz azul (450 nm) de 16; 33,84 e 47 mW/cm² foi usada para a irradiação das culturas microbianas (Figura 8).

Figura 8 - Aparelho LED RGB com luz azul a 450 nm



Fonte: Arquivo do autor.

Alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana padronizada foram individualmente transferidas para poços de uma placa de cultura de 96 poços de

fundo plano. Para realização da aPDT (grupo Mf+U+V+), o mesmo volume (100 µL) de solução micelar de PFS com CUR (Mf) foi pipetado sobre esses poços. As amostras foram incubadas por 20 minutos (tempo de pré-irradiação, TPI) no escuro para fotossensibilização. Em seguida, para liberação da CUR as amostras foram iluminadas com luz UV (U de 369 nm, durante 60 minutos, 90 J/cm²). Posteriormente as amostras foram iluminadas por LED azul (V) a 33,84 J/cm², correspondente a 12 minutos (aPDT). A fluência de luz foi calculada por meio da fórmula:

Fluência (J/cm²) = Intensidade (W/cm²) x Tempo (segundos).

Em outro grupo, as suspensões microbianas com Mf foram incubadas durante 20 minutos no escuro e posteriormente iluminadas somente com LED azul a 33,84 J/cm² (grupo Mf+V+). Amostras adicionais foram tratadas somente com Mf no escuro pelo mesmo período de tempo de fotossensibilização e iluminação (32 minutos, grupo Mf+V-). Para avaliar o efeito do FS liberado, as culturas microbianas com Mf foram iluminadas com luz UV (grupo F+U+). Para avaliar o efeito de ambas as luzes, culturas de micro-organismos, após incubação com PBS, foram iluminadas apenas com luz UV (90 J/cm², grupo M-U+) ou luz LED (33,84 J/cm², grupo M-V+) ou não receberam nenhum tratamento (somente PBS por 32 minutos, grupo controle M-U-V-). O efeito da Mf vazia (sem CUR) foi também avaliada, incubando-a com culturas microbianas por 92 minutos (grupo M+L-), equivalente aos tempos de pré-irradiação e de iluminação com luzes UV e azul.

As micelas convencionais (Pluronic F127 ou P123, Mc) foram também avaliadas na presença (aPDT) e ausência de luz. Amostras adicionais com CUR livre associadas a luz visível e em ausência da mesma foram também avaliadas (grupos CUR+V+ e CUR+V-, respectivamente). As condições experimentais encontram-se resumidas no Quadro 5.

A viabilidade microbiana após a aPDT foi avaliada mediante quantificação de colônias. Para isso, 100 µL das suspensões microbianas foram transferidos para tubos individuais com 900 µL de PBS, os quais foram agitados por 1 minuto. Posteriormente, diluições seriadas até 10⁻⁴ para *C. albicans* e 10⁻⁶ para as bactérias foram realizadas, e alíquotas de 25 µL de cada uma dessas diluições foram semeadas em duplicata em placas de SDA, TSA e MNA para *C. albicans*, *P. aeruginosa* e MRSA, respectivamente, que foram incubadas a 37 °C por 48 h. Após esse período, as colônias foram contadas e os números de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) foram calculados pela seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{média de N}^\circ \text{ de colônias da duplicata} \times D}{0,025 \text{ mL}}$$

Onde: D equivale à diluição das amostras na qual as colônias foram contadas e 0,025 mL equivale ao volume de amostra pipetado (25 µL).

Quadro 5 - Condições experimentais avaliadas para cada espécie microbiana

Grupo	Condição experimental
Mf+U+V+	Grupo aPDT (micela fotoativada, luz UV e luz visível azul)
McCP123+V+	Grupo aPDT (micela convencional P123 e luz visível azul)
McCF127+V+	Grupo aPDT (micela convencional F127 e luz visível azul)
CUR+V+	Grupo aPDT (CUR livre e luz visível azul)
MfC+V+	Grupo micela fotoativada e luz visível azul
MfC+U+	Grupo micela fotoativada com CUR e luz UV
Mfb+U+	Grupo micela fotoativada vazia e luz UV
M-V+	Grupo sem FS com luz visível azul
M-U+	Grupo sem FS com luz UV
CUR+V-	Grupo FS livre sem luz visível azul
MfC+L-	Grupo fotoativada com CUR sem luz
McCP123+L-	Grupo convencional P123 com CUR sem luz
McCF127+L-	Grupo convencional F127 com CUR sem luz
Mfb+L-	Grupo micela fotoativada sem CUR (branca)
McbP123+L-	Grupo micela convencional P123 sem CUR (branca)
McbF127+L-	Grupo micela convencional F127 sem CUR (branca)
Controle	Grupo sem micelas sem luz

Fonte: Elaboração do autor.

4.3.3 aPDT na biomassa de biofilme simples

Suspensões microbianas na metade da fase exponencial foram aliqüotadas (200 µL) em placas de culturas de 96 poços, em seguida as placas foram incubadas em estufa de crescimento a 37°C durante 90 minutos (fase de adesão). Após esse período o meio de cultura foi aspirado com micropipeta, o biofilme foi lavado duas vezes com 200 µL de PBS, na sequencia, o mesmo volume de soluções micelares carregadas ou não com CUR diluídas em meio de cultura específico foram pipetadas nos biofilmes, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, após esse tempo o meio de cultura foi retirado e 200 µL de micelas em meio fresco foram adicionados. As placas foram novamente incubadas usando os parâmetros mencionados durante mais 24 horas, completando assim o crescimento de 48 horas do biofilme.

Após o crescimento do biofilme o FS em meio de cultura foi retirado e o o biofilme lavado duas vezes com PBS, em seguida, as placas incubadas com micelas fotossensíveis foram irradiadas durante 60 minutos com luz UV 369 nm para liberação da CUR, logo depois, as placas foram irradiadas durante 24 minutos com luz azul. As amostras incubadas com micelas convencionais ou CUR livre foram apenas irradiadas com luz azul durante 24 minutos. Amostras adicionais de FS em micelas e CUR livre, assim como micelas vazias permaneceram no escuro durante os tempos de irradiação.

A redução da biomassa do biofilme após aPDT foi avaliada por meio de coloração cristal violeta. Para isso os biofilmes o PBS dos biofilmes foi retirado, depois os biofilmes foram fixados com metanol 90% (LabSynth) durante 20 minutos, após o metanol foi tirado e os biofilmes deixados na secagem a temperatura ambiente. Na sequencia, solução de Cristal Violeta 1% foi despejado em cada poço durante 5 minutos, após esse período de tempo o corante foi aspirado e os biofilmes de fungo foram lavados 3 vezes, enquanto os biofilmes de bactérias foram lavados 5 vezes com PBS, afim de retirar o excesso de corante. Posteriormente às lavagens os biofilmes foram deixados a secar. O corante remanescente foi diluído usando solução aquosa de ácido acético 33% (LabSynth).

O conteúdo de cada poço foi então transeferido a uma nova placa de cultura de 96 poços para leitura da absorbância do cristal violeta a 570 nm.

4.4 Ensaio de Citotoxicidade

Queratinócitos orais espontaneamente imortalizados (NOK-si) foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM-GIBCO BRL, Grand Island, NJ, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM (GIBCO BRL, Grand Island, NJ, USA) e penicilina 100 IU/mL-estreptomicina 100 mg/mL (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), as células foram incubadas em estufa de crescimento a 37°C, com 5% de CO₂ e 80% de humidade (Series II water jacket CO₂ incubator, Thermo Fisher Scientific, Marietta OH, USA). Após atingir a confluência, uma quantidade de 20.000 células (quantificadas em contador de células Countess II FL, Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) foram transferidas a placa de cultura escura de 96 poços (Corning, Glendale, AZ, USA). As placas de cultura foram incubadas durante 24 horas para a formação da monocamada celular.

Posteriormente, cada um dos formulados micelares carregados com CUR, assim como CUR livre, foram incubados com as culturas celulares durante os tempos de pré-irradiação e de iluminação da aPDT correspondente a cada solução micelar ou CUR livre. Amostras adicionais foram incubadas com MFS sem CUR e com as micelas convencionais (não fotoativadas), assim como o veículo da CUR (ACN). Triton X-100 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) foi utilizado como controle positivo, enquanto que o controle negativo consistiu em células com meio de cultura.

Após a incubação, as culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS, em seguida 50 µL de solução de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT- Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) diluído em RPMI sem fenol foi adicionada imediatamente nos poços das placas de cultura que foram incubadas durante 4 horas. Após esse período, a solução MTT foi aspirada de cada um dos poços e álcool isopropílico (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil) foi adicionado nos poços para diluir os cristais de MTT. Finalmente, a absorbância do MTT foi medida em leitor de microplacas (EZ Read 400, Biochrom, Cambridge, UK) a 570 nm.

4.5 Análise Estatística

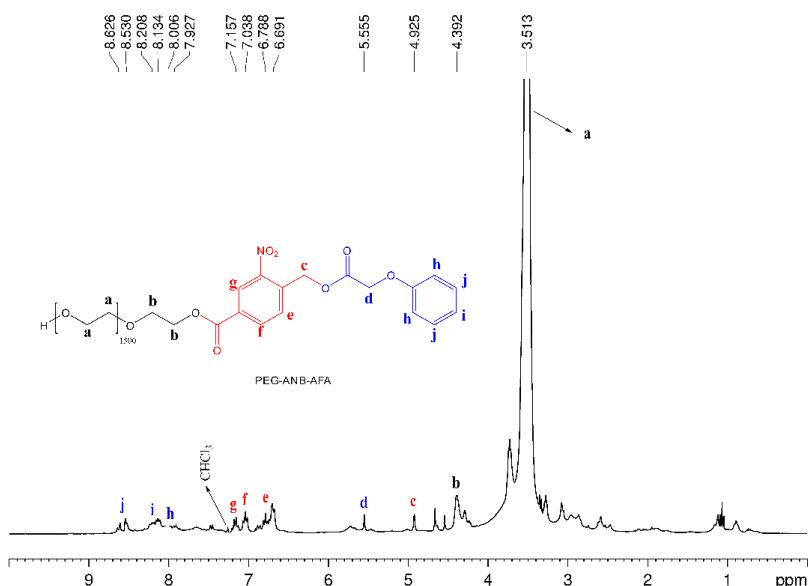
Esse é um estudo experimental *in vitro* com duas variáveis quantitativas dependentes (UFC/mL e absorbância) e uma variável independente (formulação micelar). Os dados da caracterização das micelas são apresentados descritivamente. Todos os experimentos com culturas planctônicas, biomassa de biofilme e de toxicidade celular foram realizados em quadruplicatas cada e em três ocasiões distintas (n=12). Inicialmente, foi feita uma análise exploratória dos dados (estatística descritiva) com medidas de resumo (tendência central e de dispersão). Posteriormente, os dados foram analisados por meio do teste paramétrico ANOVA com correção de welch (quando necessário) e *pos-hoc* de Tukey ou Games-Howell. Em todos os casos o nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADO

5.1 Síntese do Polímero Fotossensível (PFS)

Para a caracterização do PFS final, empregou-se a técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN). Na Figura 9 é mostrado o espectro de ^1H RMN do produto PEG-ANB-AFA, o qual foi adquirido usando clorofórmio deuterado (clorofórmio-d, CDCl_3) como solvente. Os sinais de prótons observados são: PEG₁₅₀₀ a 3,513 ppm, a ligação esteárica entre o PEG e o ANB apresenta sinal em 4,392 ppm, finalmente o sinal a 4,925 ppm corresponde à ligação do complexo PEG-ANB com o AFA.

Figura 9 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H NMR) do PFS



Fonte: Elaborado pelo Dr. Italo Rodrigo Calori.

5.2 Síntese e Caracterização das Micelas

5.2.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A intensidade de fluorescência do PFS na presença de pireno ou CUR em diferentes temperaturas avaliadas encontram-se na Figura 10, na qual o ponto de inflexão da curva representa a transição de monômeros para micelas.

Figura 10. Intensidade de fluorescência do PFS para determinação da CMC
(continua)

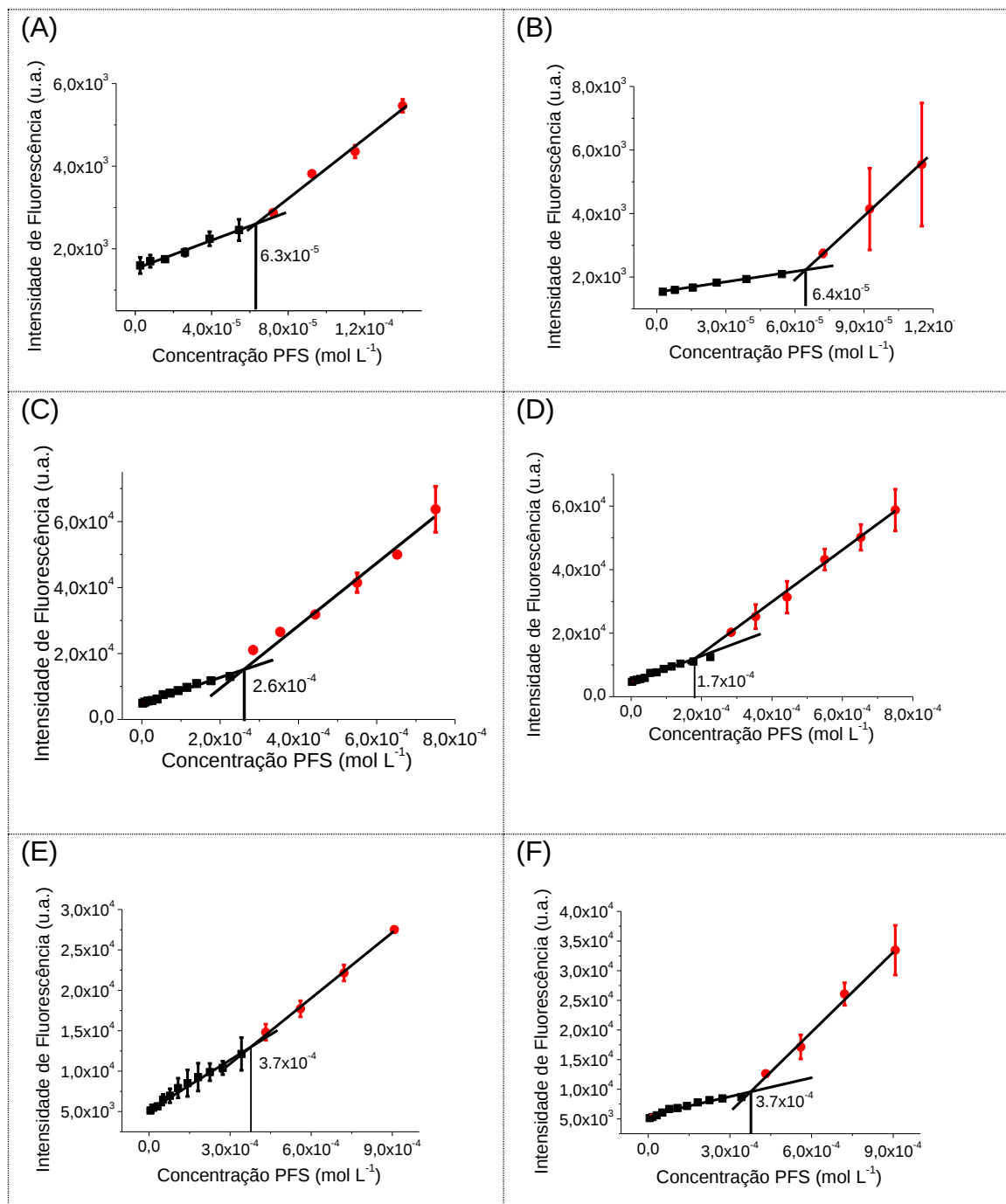
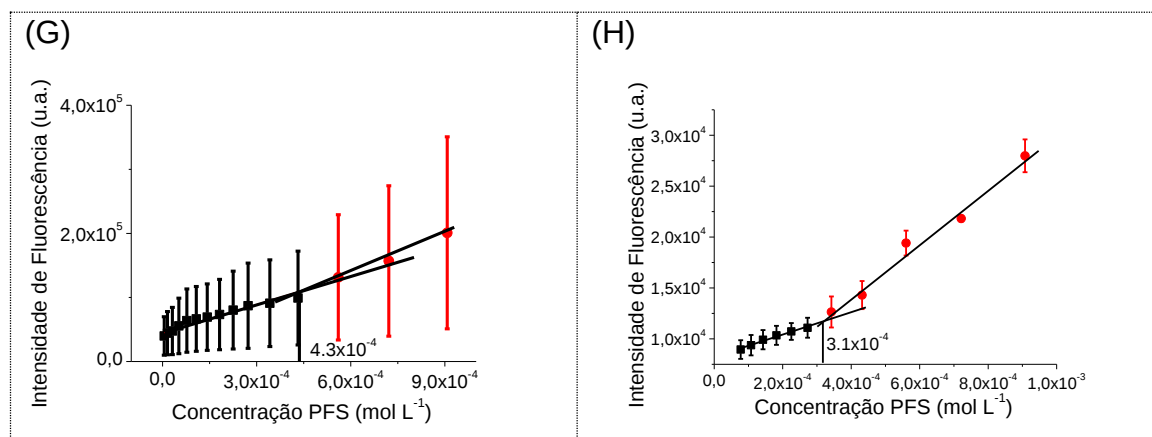


Figura 10. Intensidade de fluorescência do PFS para determinação da CMC (conclui)



CMC do PFS com pireno em temperaturas de (A) 22°C, (C) 25°C, (E) 30°C, (G) 35°C e Intensidade de Fluorescência do PFS com CUR em temperaturas de (B) 22°C, (D) 25°C, (F) 30°C e (H) 35°C.

Fonte: Elaboração do autor.

A Figura 11 mostra a intensidade de fluorescência dos Pluronic® F127 e P123 com pireno e CUR. Os valores de CMC do PFS, F127 e P123 tanto com pireno como com CUR para cada temperatura avaliada encontram-se resumidos na Tabela 1.

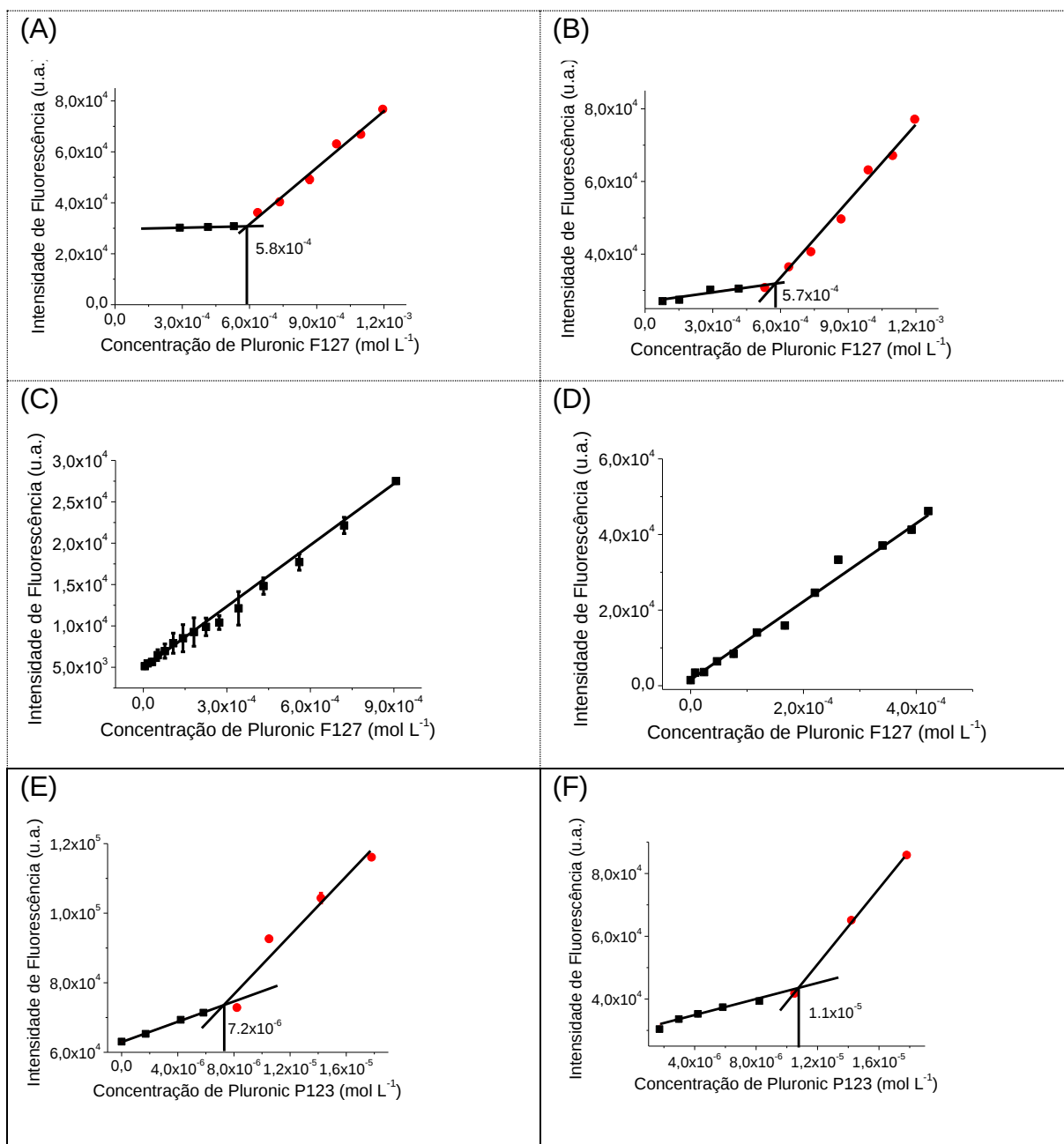
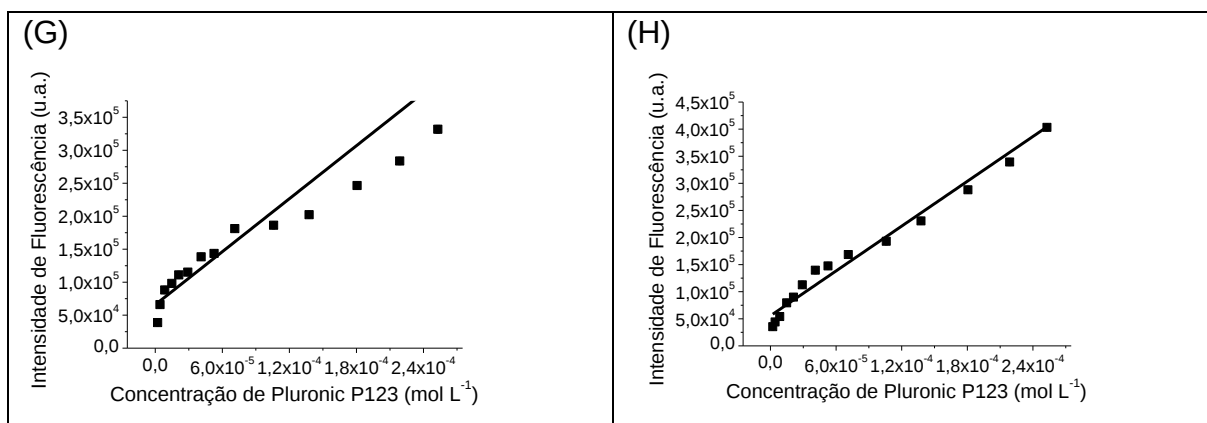
Figura 11. Intensidade de Fluorescência dos Pluronic F127 (continua)

Figura 11. Intensidade de Fluorescência dos Pluronic F127 (conclui)

Intensidade de Fluorescência dos Pluronic F127 na presença de CUR em temperaturas de (A) 25 °C e (C) 37 °C e na ausência de CUR (B) 25 °C e (D) 37 °C; P123 com CUR a (E) 25 °C e (G) 37 °C; e sem CUR a (F) 25 °C e (H) a 37 °C.

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 1 - Valores médios ($\pm$ desvio-padrão, $n=3$) de CMC expressado em $\times 10^{-4}$ mol L⁻¹ do PFS em presença de pireno ou CUR em temperaturas de 22, 25, 30 e 35 °C

PFS ($\times 10^{-4}$ mol L ⁻¹)			Pluronic			
Temperatura	Pireno	CUR	F127		P123	
			Sem CUR	Com CUR	Sem CUR	Com CUR
22 °C	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	...	...	...	...
25 °C	2,6 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,8	0,58 $\pm$ 0,016	0,57 $\pm$ 0,005	0,007 $\pm$ 0,009	0,011 $\pm$ 0,003
30 °C	3,7 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 2,9	...	...	...	...
35 °C	4,3 $\pm$ 3,7	3,1 $\pm$ 0,9	...	...	...	...
37°C	...	...	?	?	?	?

...: condição não realizada.

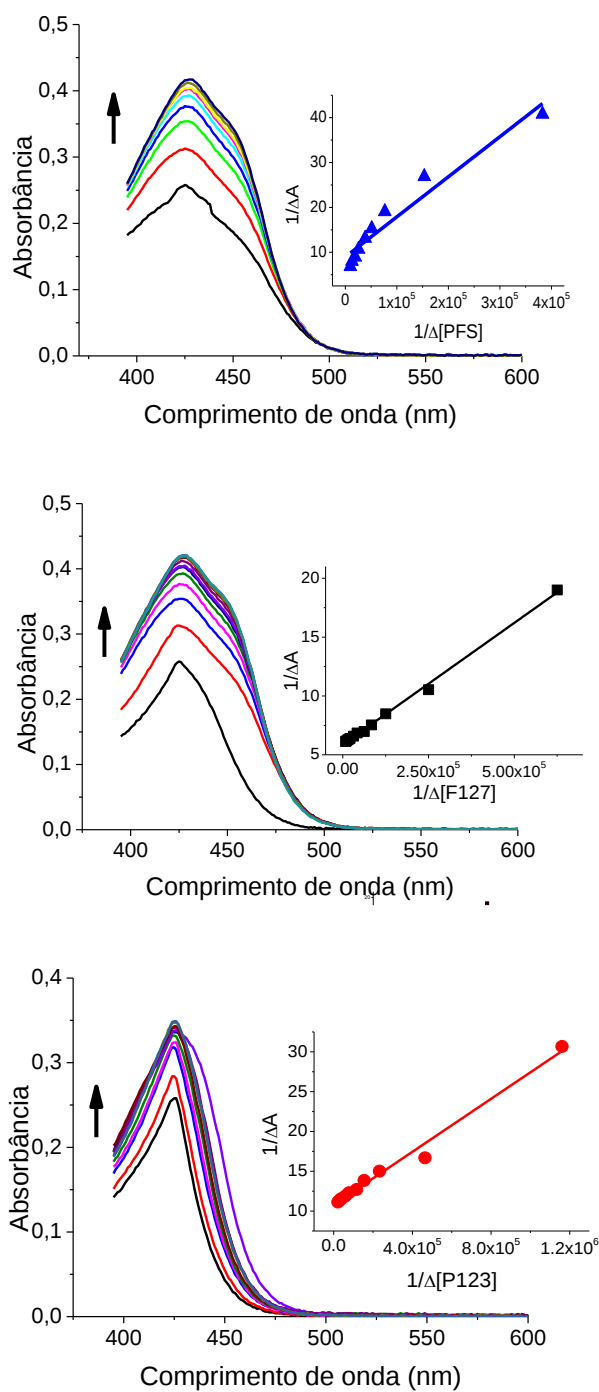
?: não foi possível determinar com exatidão o valor.

Fonte: Elaboração do autor.

5.2.2 Determinação da constante de ligação (K_b) do PFS à CUR

A K_b indica a interação do polímero com o composto hidrófobo (CUR), de maneira que, quanto maior o valor expresso em mol/L, maior ligação entre o polímero e a CUR. Após cada adição de solução polimérica, a absorbância da CUR aumentou até chegar no platô, indicando a máxima interação da CUR com o PFS ou Pluronic. A figura 12 mostra o aumento de absorção após cada adição de polímero, além disso, é mostrado a linearidade de cada um dos sistemas (A: PFS, B:F127 e C:P123). Na Tabela 2, mostram-se os valores de K_b de todos os polímeros avaliados com a CUR. Observou-se uma melhor ligação da CUR com o PFS, comparado com os valores achados nos Pluronic®, dentre os quais o P123 teve melhor ligação com a CUR e o F127 teve menor valor de K_b .

Figura 12. Constante de ligação da CUR com PFS, F127 e P123



Absorbância da CUR após adições sucessivas dos polímeros e gráfico de dispersão de CUR com os polímeros: ▲ PFS, ■ F127 e ● P123

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 2 - Valores de constante de ligação (K_s , expressados em mol/L) da CUR com PFS, F127 e P123

Polimero	K_b ($\times 10^5$ mol/L)	R^2
PFS	1,00	0,9358
Pluronic F127	2,83	0,9996
Pluronic P123	6,82	0,9851

Fonte: Elaboração do autor.

5.2.3 Síntese das micelas

5.2.4 Eficiência de Encapsulamento (EE%)

A EE% das micelas sintetizadas com PFS tiveram um valor médio $\pm$ DP de 88,79% $\pm$ 0,851, dado que foi maior comparadas com os valores de EE% das micelas convencionais, as quais apresentaram valores médios $\pm$ DP de 77,52% $\pm$ 1,593 e 72,58% $\pm$ 1,155 nas micelas de F127 e P123, respectivamente.

5.2.5 Supressão de fluorescência

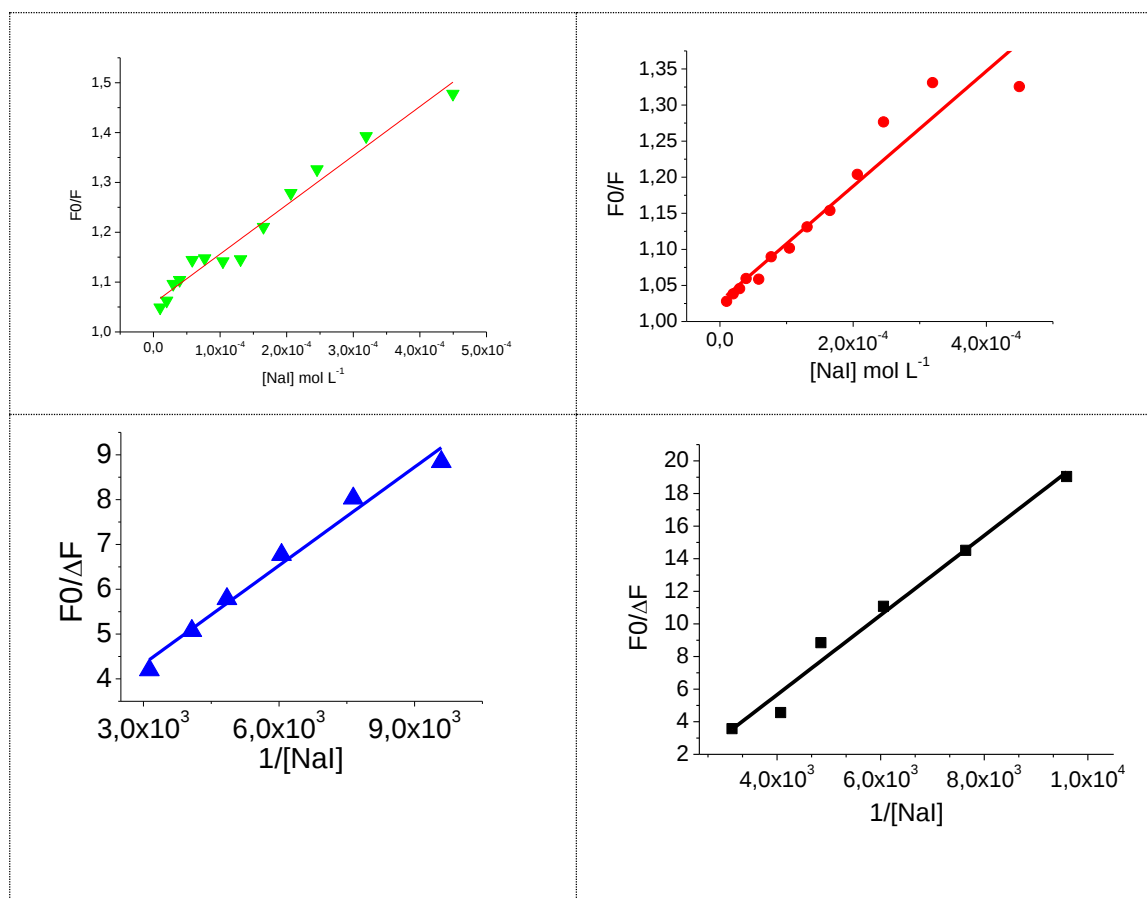
No teste de supressão de fluorescência, o grau de inclinação da indica o valor a KSV (Figura 13). A CUR livre apresentou valor maior de KSV, resultado esperado uma vez que não tem a proteção do sistema. As micelas de P123 apresentaram valor de KSV de 797, resultado que foi o maior dentre os sistemas, por outro lado, nas micelas de PFS e F127 não foi observada linearidade, motivo pelo qual foi calculada a fracao livre. Assim, as micelas de PFS tiveram valos de KSV de 506, enquanto as micelas de F127 apresentaram valor de KSV de 175. Os valores de KSV dos sistemas assim como o R^2 são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Valores de KSV e R^2 da CUR livre e em micelas

Forma da CUR	K_{sv} ($\times 10^5$ mol/L)	R^2
Livre	986	0,9697
PFS	506	0,9763
Pluronic F127	175	0,9877
Pluronic P123	797	0,9375

Fonte: Elaboracao do autor.

Figura 13. Supressão de Fluorescência (Stern-Volmer) da CUR nas micelas avaliadas.



Supressão de fluorescência: ▼ CUR livre, ▲ PFS, ■ F127 e ● P123

Fonte: Elaboração do autor.

5.2.6 Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

Na Tabela 4 encontram-se resumidos os valores de DLS e potencial eletrostático das formulações micelares tanto fotoinduzida quanto convencionais. As micelas sintetizadas com o PFS apresentaram tamanho médio de 31,98 e 40,42 nm na presença e ausência da CUR, respectivamente. Esses valores foram maiores do que nas micelas convencionais, que apresentaram tamanhos médios de 19,32 e 16,15 nm nas micelas de F127 e P123, respectivamente, na ausência de CUR; já as micelas carregadas com o FS apresentaram tamanhos de 22,90 nm nas micelas de F127 e 20,78 nm nas micelas de P123.

As micelas de P123 apresentaram-se mais homogêneas, uma vez que os valores de IPD foram de 0,148 e 0,249 para as micelas vazias e carregadas,

respectivamente. Por outro lado, os valores de IPD para as micelas de F127 foram os mais altos dentre as três formulações, uma vez que os índices observados foram de 0,392 nas micelas vazias e 0,333 nas micelas carregadas com CUR. Finalmente as micelas vazias sintetizadas com PFS apresentaram valores de 0,231 e as micelas de PFS com CUR, valores de 0,271.

No caso da determinação da carga superficial das micelas, para as três formulações foram observados valores negativos.

Tabela 3 - Valores médios ($\pm$ desvio-padrão, $n = 9$) de tamanho, IPD e potencial zeta das micelas fotoativadas de PFS e convencionais de F127 ou P123 Na presença e ausência de CUR

	Micela fotoativada			Micelas convencionais					
	PFS			Pluronic F127			Pluronic P123		
	Tamanho (nm)	IPD (u.a.)	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	IPD (u.a.)	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	IPD (u.a.)	Potencial Zeta (mV)
Sem CUR	31,9 $\pm$ 0,4	0,231 $\pm$ 0.481	-0,15 $\pm$ 0,05	19,3 $\pm$ 0,9	0,392 $\pm$ 0,245	-0,61 $\pm$ 0,42	16,1 $\pm$ 0,5	0,148 $\pm$ 0,075	-0,22 $\pm$ 0,74
Com CUR	40,4 $\pm$ 0,8	0,271 $\pm$ 0.019	-0,14 $\pm$ 0,01	22,9 $\pm$ 1,2	0,333 $\pm$ 0,119	-0,23 $\pm$ 0,29	20,8 $\pm$ 1,6	0,249 $\pm$ 0,106	-0,24 $\pm$ 0,27

Fonte: Elaboração do autor.

5.2.7 Análise da morfologia das micelas (MEV-FEG)

Nas imagens de MEV-FEG, foram observadas formas esféricas das micelas. Contudo, as três formulações apresentaram-se em aglomerações micelares, motivo pelo que não se pôde determinar o tamanho dos sistemas (Figura 14).

Figura 14 - Imagens de MEV-FEG das micelas sintetizadas (continua)

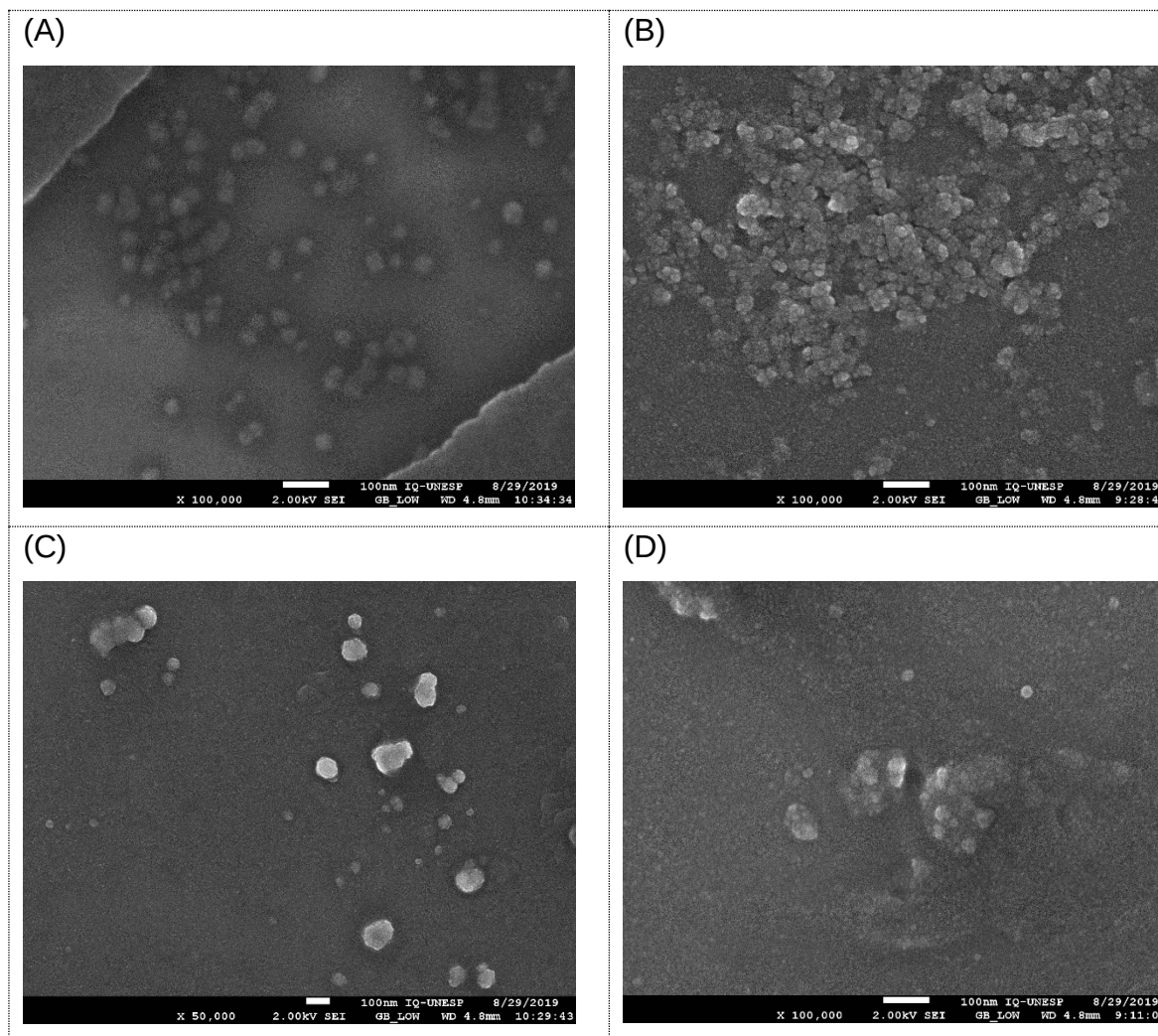
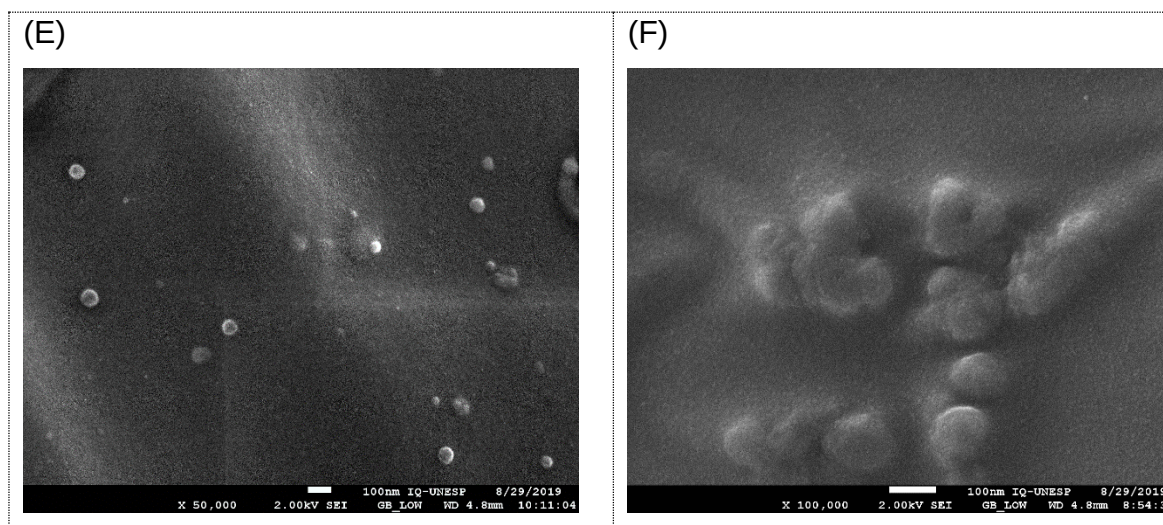


Figura 14 - Imagens de MEV-FEG das micelas sintetizadas (conclui)



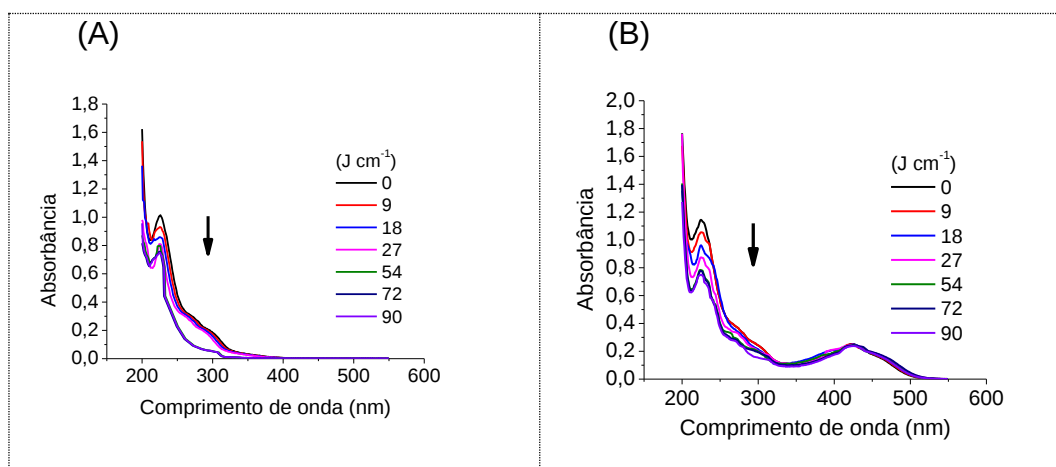
A, C e E: micelas sem CUR sintetizadas com PFS, F127 e P123, respectivamente; B, D e F: micelas carregadas com CUR a partir dos polímeros PFS, F127 e P123, respectivamente.

Fonte: Arquivo do autor.

5.2.8 Fotodegradação do PFS

A redução do sinal máximo de absorvância do PFS indica que este foi degradado após irradiação laser UV 355 nm. A redução na absorvância do PFS foi gradativa conforme a irradiação aumentava (Figura 15). Após 90 J/cm^2 de dose de irradiação a diminuição da absorvância do PFS com pireno foi de $1,00 (\pm 0,02)$ para $0,76 (\pm 0,03)$ (Figura 15A); a redução média do polímero na presença da CUR foi de $1,13 (\pm 0,03)$ para $0,69 (\pm 0,05)$ u.a., depois da mesma fluência (Figura 15B).

Figura 15 - Fotoresposta do PFS



A) em ausência de CUR e (B) em presença de CUR

Fonte: Elaboracao do autor.

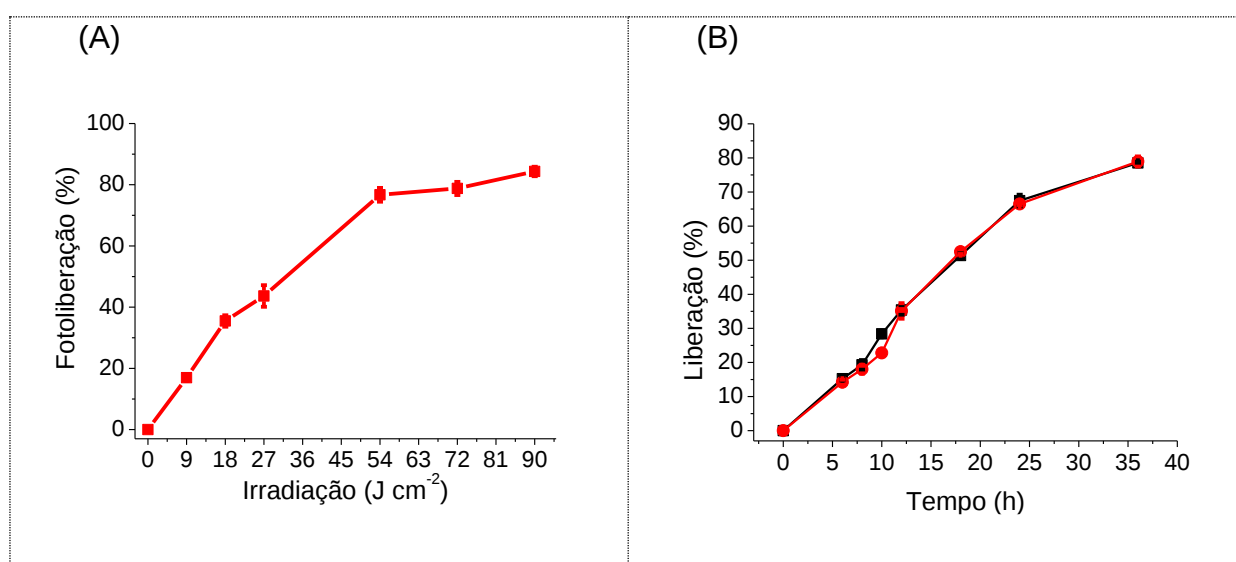
5.2.9 Fotoliberação da CUR

A fotoliberação da CUR é mostrada na Figura 16A. Observou-se uma liberação gradativa ao aumento da dose de irradiação e o total liberado após 90 J/cm² foi em média $\pm$ DP de 81,01% $\pm$ 1,55.

5.2.10 Liberação das micelas convencionais

A liberação de CUR das micelas convencionais de F127 foi, em média $\pm$ DP, de até 78,53% $\pm$ 0,35 em 36 h. Já nas micelas de P123, foi observada uma liberação média de 78,95% $\pm$ 1,48 após o mesmo tempo de avaliação. Neste teste, apenas foram considerados valores que estavam dentro da curva de calibração da CUR, sendo assim apenas os valores a partir das 6 h foram plotados (Figura 16B).

Figura 16 – Porcentagem de liberação de CUR



(A) das micelas fotoativada, a dose de luz corresponde aos tempos de 0, 6, 12, 18, 36, 48 e 60 minutos, (B) das micelas convencionais

Fonte: Elaboração do autor.

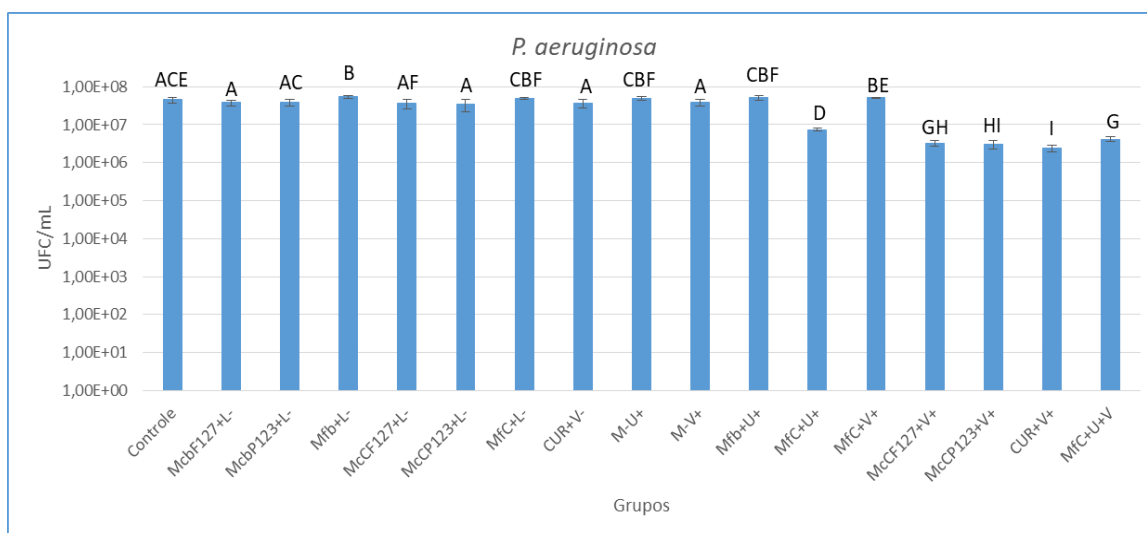
5.3 Avaliação antimicrobiana Fotodinâmica das formulações

5.3.1 aPDT em culturas planctônicas de *C. albicans*, SARM e *P. aeruginosa*

Os resultados de avaliação fotodinâmica das formulações em culturas planctônicas de *P. aeruginosa* estão apresentados na Figura 17. A análise estatística mostrou que o grupo aPDT com micela fotoativada (MfC+U+V+) não apresentou diferença significativa ($p=0,093$) comparado com o grupo aPDT com micela de F127 (McCF127+V+), porém foi observada diferença significativa quando

comparado com os outros grupos ($p \leq 0,048$). Adicionalmente, esse mesmo grupo aPDT com micela de F127 (McCF127+V+) não apresentou diferença estatística significativa ($p=1,00$) quando comparado com o grupo aPDT com micela de P123 (McCP123+V+), todavia, foi observada diferença significativa quando comparado com os outros grupos ($p \leq 0,034$). O grupo aPDT com micela de P123 (McCP123+V+) não teve diferença significativa ($p \geq 0,407$) quando comparado com os grupos aPDT com micela F127 (McCF127+V+) e CUR livre (CUR+V+), porém, foi observada diferença significativa quando comparado com os outros grupos ($p \leq 0,048$). O Grupo aPDT com CUR livre (CUR+V+) não teve diferença significativa ($p=0,407$) quando comparada com o grupo aPDT com micela de P123 (McCP123+V+), no entanto, foi estatisticamente diferente quando comparado com os outros grupos ($p \leq 0,034$). Nos grupos aPDT com micelas convencionais (McCF127, McCP123), aPDT com CUR livre (CUR+V+) e aPDT com micela foto-ativada (MfC+U+V+) foi observada diminuição na contagem de colônias de 1 Log em relação como grupo controle (M-V-U-).

Figura 17 - Valores médios de UFC/mL em culturas planctônicas de *P. aeruginosa* para cada grupo tratado



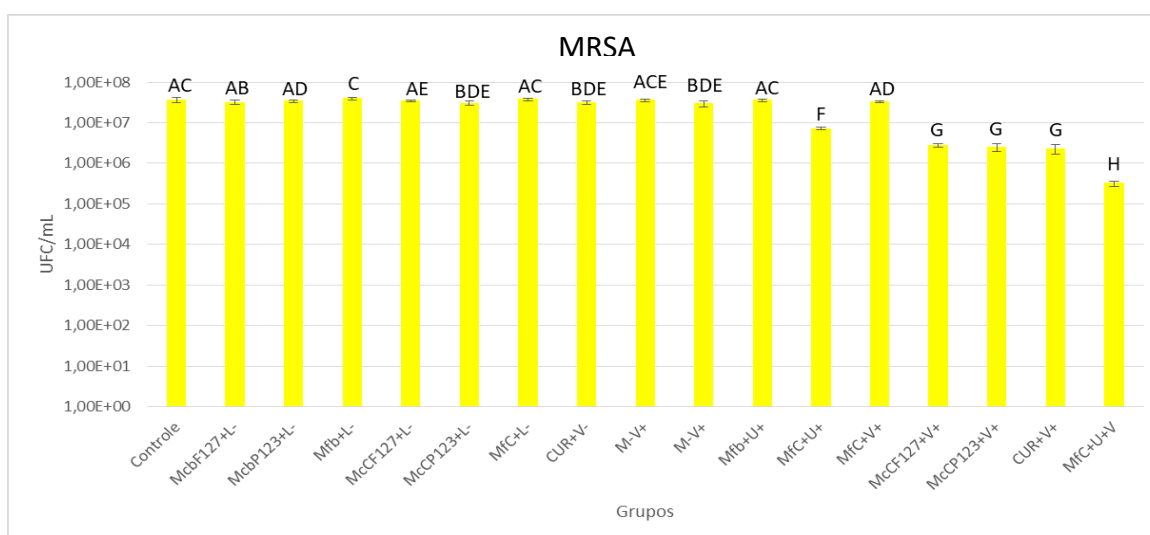
Barras de erro: desvio padrão (n=12). Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração do autor.

A Figura 18 mostra os resultados da aPDT em culturas planctônicas de MRSA. O grupo tratado com micela foto-ativada carregada com CUR associada a

luz UV e posteriormente irradiada com luz azul (MfC+U+V+) foi estatisticamente diferente comparada com os outros grupos ($p < 0,001$). Adicionalmente nesse grupo foi observada diminuição na contagem de colônias de 2 Log em relação ao grupo controle (M-V-U-). Por outro lado, os grupos aPDT com micelas convencionais (McCF127+V+, McCP123+V+) assim como o grupo aPDT com CUR livre (CUR+V+) não tiveram diferença significativa entre si ($p \geq 0,392$), porém foram estatisticamente diferentes comparados com os outros grupos ($p < 0,001$), diminuindo a contagem de colônias em 1 Log em relação com o grupo controle (M-V-U-).

Figura 18 Valores médios de UFC/mL em culturas planctônicas de MRSA para cada grupo tratado



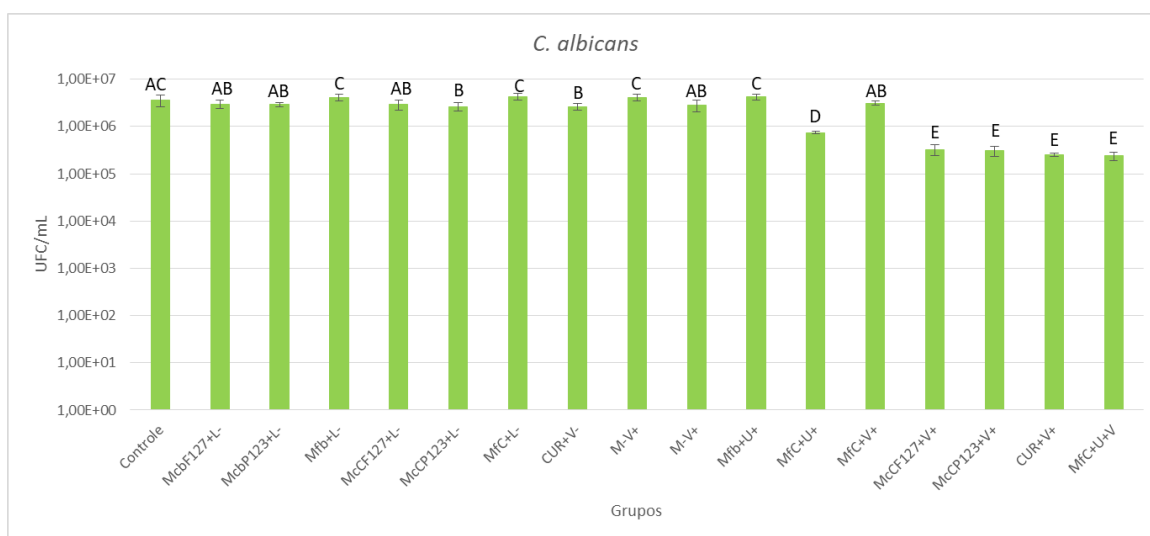
Barras de erro: desvio padrão (n=12). Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração do autor.

A Figura 19, mostra os resultados em culturas planctônicas de *C. albicans*. Os grupos submetidos a aPDT com micelas convencionais (McCF127+V+, McCP123+V+), CUR livre (CUR+V+) e MfC irradiada com luz UV e luz azul (MfC+U+V+) não apresentaram diferença significativa entre si ($p \geq 0,263$), porém foram estatisticamente diferentes comparados com os outros grupos ($p < 0,001$). Comparados com o grupo controle não tratado (M-U-V-) os grupos aPDT com micelas convencionais (McCF127+V+, McCP123+V+), CUR livre (CUR+V+) e MfC irradiada com luz UV e luz azul (MfC+U+V+) diminuíram a contagem de colônias em 1 Log. Por outro lado, o grupo tratado com MfC irradiado com luz UV (MfC+U+) foi

significativamente diferente comparado com os outros grupos ($p < 0,001$), diminuindo a contagem de colônias em menos de 1 Log em relação ao grupo controle (M-U-V-).

Figura 19 - Valores médios de UFC/mL em culturas planctônicas de *C. albicans* para cada grupo tratado

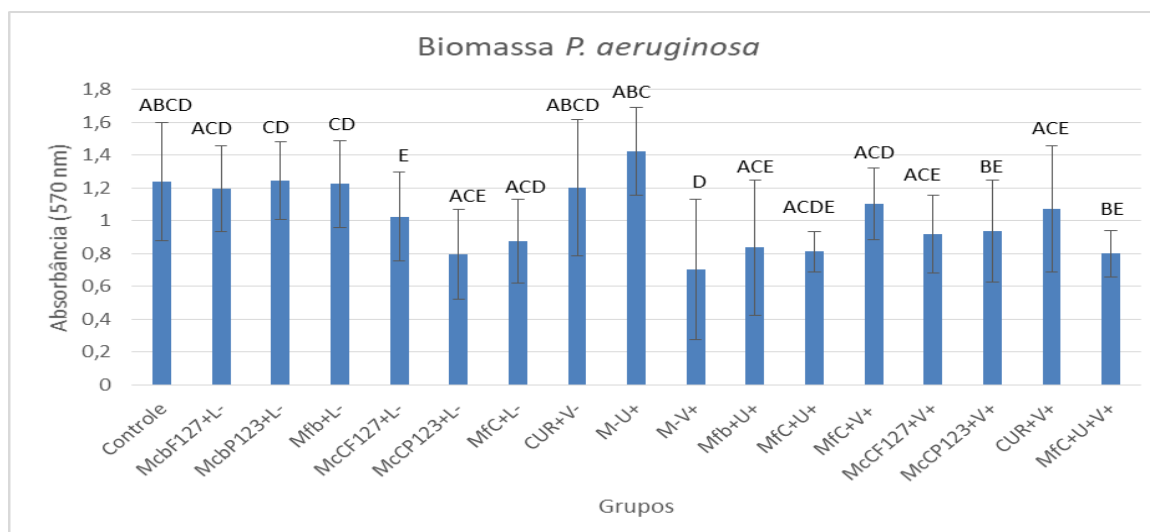


Barras de erro: desvio padrão ($n=12$). Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração do autor.

5.3.2 aPDT na biomassa de biofilme simples

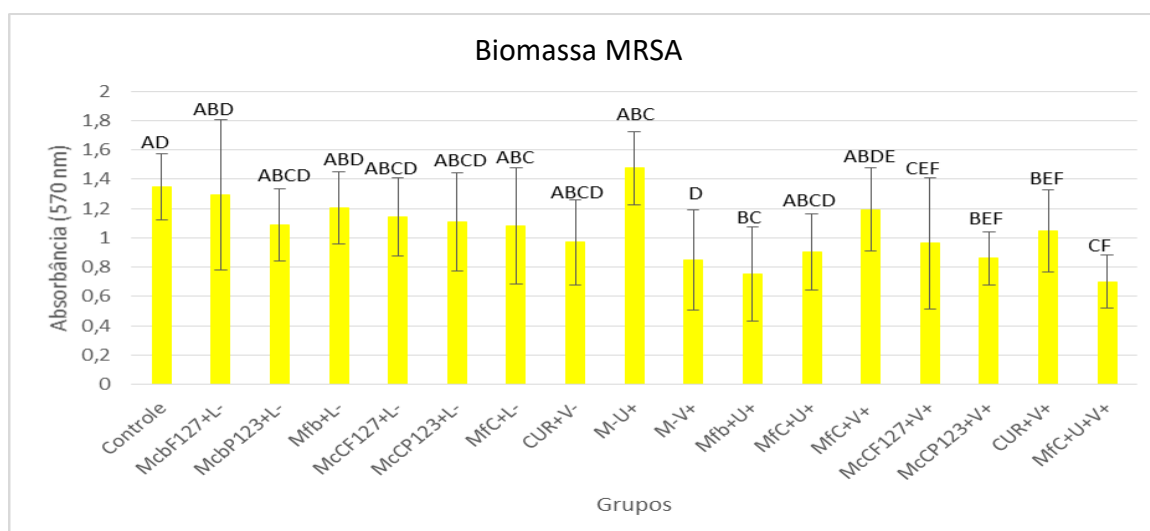
No teste da aPDT em biofilme de *P. aeruginosa* não foi observada diminuição da biomassa nos grupos submetidos a aPDT usando FS livre tanto como com micelas convencionais e fotoativada quando comparados com o grupo controle ($p \geq 0,067$) (Figura 20).

Figura 20. Valores médios de absorbância em biofilmes de *P. aeruginosa*

Barras de erro: desvio padrão (n=12). Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença significativa ($p<0,05$).

Fonte: Elaboração do autor.

Em MRSA foi observada diferença significativa ($p<0,001$) do grupo aPDT mediada pela CUR em micelas fotossensíveis comparada com o grupo controle, observando diminuição da biomassa em 48% no grupo aPDT. Adicionalmente, a aPDT mediada pela CUR livre e micelas convencionais promoveram diminuição da biomassa em até 36% comparadas com o grupo controle ($p\leq 0,001$) (Figura 21).

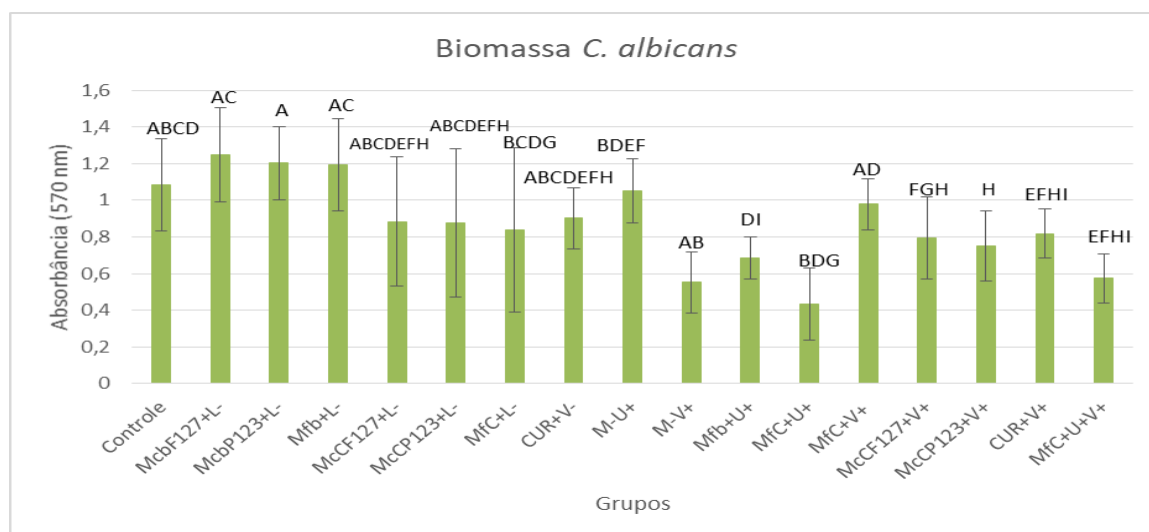
Figura 21. Valores médios de absorbância em biofilmes de MRSA

Barras de erro: desvio padrão (n=12). Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença significativa ($p<0,05$).

Fonte: Elaboração do autor.

Já no fungo foi observada diminuição de 47% da biomassa do grupo aPDT com micela fotoativada comparada com o grupo controle ($p < 0,001$). Além disso, os grupos aPDT mediados pela CUR livre e em micelas convencionais promoveram diminuição da biomassa em até 30% comparadas com o grupo controle ($p \leq 0,010$) (Figura 22).

Figura 22. Valores médios de absorbância em biofilmes de *C. albicans*



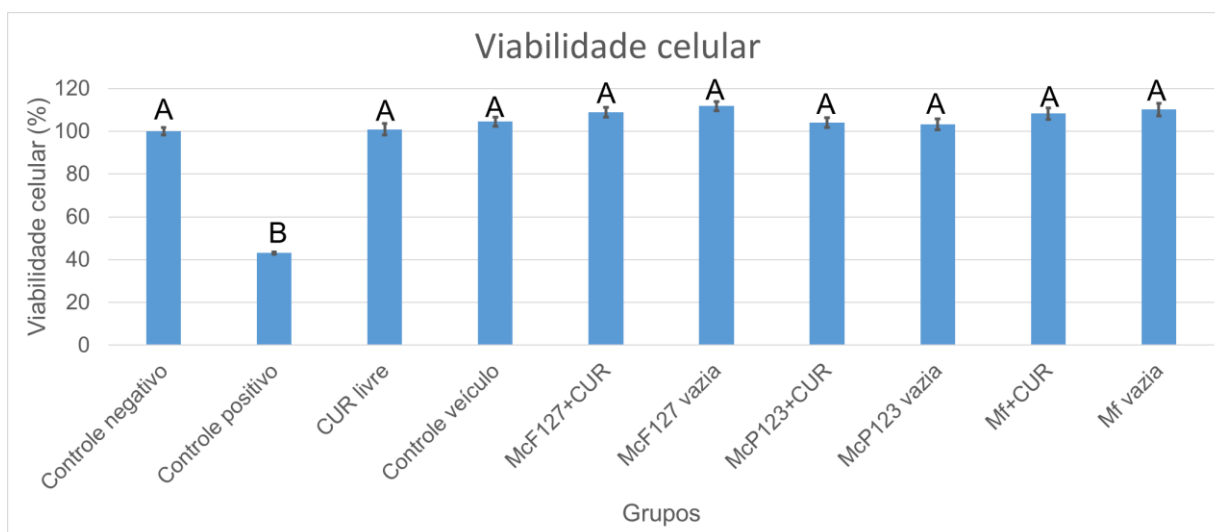
Barras de erro: desvio padrão ($n=12$). Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor.

5.4 Ensaio de Citotoxicidade

Os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram que o grupo controle positivo constituído por Triton X-100 teve diferença significativa comparada com os outros grupos ($p < 0,001$) apresentando menor valor de absorbância do XTT indicando menor quantidade de células viáveis (Figura 21). Por outro lado, considerando a absorbância do grupo controle como 100% de células viáveis, todos os grupos incubados com micelas (convencionais, MFA) na presença e ausência de CUR, assim como a CUR livre e o veículo usado para solubilizá-la (ACN) apresentaram valores similares de absorbância comparados com o grupo controle negativo, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais comparadas com o grupo controle ($p \geq 0,865$).

Figura 21 - Valores médios de absorbância do MTT em culturas celulares NOK para cada grupo tratado



Barras de erro: desvio padrão (n=12). Dados analisados por ANOVA com correção de Welch e pós hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração do autor.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram sintetizadas micelas fotossensíveis, as mesmas apresentaram liberação após a irradiação com luz UV 365 nm. Essa liberação melhorou o efeito fotodinâmico antimicrobiano em culturas planctônicas de MRSA quando comparadas com micelas convencionais de F127n P123 e CUR livre. Adicionalmente, a aPDT mediada pelo sistema fotoativado apresentou maior diminuição da biomassa dos biofilmes de MRSA e *C. albicans*.

A micelização é um processo espontâneo, o que faz com que as micelas sejam um sistema atrativo para carregar CUR. Neste tipo de sistema, é muito importante determinar a transição de monômeros para micelas, ou seja, determinar a CMC. CMC é a concentração acima da qual monômeros e surfactante estão em equilíbrio¹⁰⁵ e que está associada com a estabilidade termodinâmica das micelas^{106,107}.

O valor de CMC observado nas micelas fotoativadas pode ser atribuído ao segmento hidrófobo do polímero (AFA), o qual é responsável pela autoformação das micelas e diminuição da energia livre, diminuindo assim a quantidade de polímero necessária para a micelização¹⁰⁸. Adicionalmente, a presença das ligações esteéricas com o cromóforo *o*-nitrobenzil aumenta a hidrofobicidade do segmento hidrófobo do PFS⁹⁸, como foi reportado em um estudo prévio⁹⁹, no qual foram observadas variações de CMC na faixa de 0,057 mg/mL até 0,019 mg/mL na síntese de conjugados micelares a base de 2-nitrobenzil-succinato carboximetilquitosana⁹⁹.

Além disso, os valores de CMC podem variar de acordo com o peso molecular do polímero usado na síntese das micelas. Em um estudo prévio¹⁰⁰, um conjugado polímero-pesticida fotoativado sintetizado com PEG₄₀₀₀ e PEG₁₀₀₀₀ demonstrou valores de CMC de 0,0124 mg/mL e 0,002336 mg/mL¹⁰¹, respectivamente. Já no presente estudo, foi usado um polímero com uma massa molar menor (PEG₁₅₀₀), fato que poderia explicar as diferenças entre os valores encontrados no presente estudo com os de CMC reportados nesse artigo utilizado como referência¹⁰⁰ para sintetizar o PFS.

Os valores encontrados neste estudo para esses polímeros foram similares com os de uma investigação reportados previamente⁷⁹, mesmo na presença da CUR. O mecanismo de autoformação dos Pluronic® é melhorado com o aumento da temperatura, motivo pelo qual, as maiores temperaturas, são necessárias menores

concentrações de Pluronic® para o processo de micelização ocorrer⁷⁹, uma vez que valores 0,019 e 0,001 mM F127 e P123 foram observados⁷⁹. No presente estudo esses valores encontram-se entre o primeiro e o segundo ponto das figuras 11 C e D em F127 na presença e ausência de CUR e para P123 nas figuras 11 G e H na presença e ausência de CUR, respectivamente. Devido às concentrações das soluções estoques dos Pluronic usadas, não foi possível verificar a transição de monômeros a micelas a 37 °C. Em outro estudo¹⁰⁵ foram reportados valores de CMC na faixa de 0,0068% até 0,0078% para F127. Quando um conjugado de F127 e Gelucire® foi usado para encapsular CUR, foram reportados valores de CMC de 0,0040 e 0,0002%, respectivamente, no entanto essa CMC foi determinada por meio de espectroscopia de absorção UV/Visível¹⁰⁹.

A constante de ligação é um critério usado para avaliar a interação entre a molécula receptora com a molécula de ligação e avalia o processo de complexação¹⁰³. O valor de K_b usando o PFS verificado nesta pesquisa foi maior que reportado em prévio trabalho, no qual a ligação da CUR a lipossomas de fosfatidilcolina¹¹⁰ resultou nos valores de K_b de $2,1 \pm 0,1$ e $2,9 \pm 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para K_b determinada por absorbância e fluorescência, respectivamente. Adicionalmente, o valor de K_b achado nesta pesquisa foi maior do que aquele reportado em um estudo de ligação de micelas a CTAB¹¹¹, no qual houve um valor de K_b de $6,59 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ no entanto, nesse estudo o valor de K_b foi determinado por supressão de fluorescência usando o gráfico de Stern-Volmer seguido pelo método de Encinas e Lissi.

No teste de EE%, foi observado uma maior EE% por parte do PFS, fato que também pode ser atribuído ao segmento hidrófobo do composto, que gerou tanto uma melhor ligação como uma melhor EE% comparado com os Pluronic®. Adicionalmente, a EE% pode ser modificada pela proporção droga:polímero⁸², como observado em um estudo prévio, no qual a variação de 1:5 até 1:50 promoveu aumento da EE% de 34,33 até 95,57% de CUR em micelas sintetizadas com F127⁸². Um outro estudo¹¹², a variação da proporção de Soluplus (composto de polivinil caprolactam, acetato polivinil e polietileno glicol) e Solutol®HS15 (mono poliglicol, ácido 12-hidroxiesteárico e polietileno glicol) em 150:50 e 160:40 resultou em variação de EE% de $85,35 \pm 7,98\%$ e $91,42 \pm 10,24\%$, respectivamente¹¹². Além disso, o peso molecular do polímero usado na síntese pode variar a EE%, como observado em outro estudo que utilizou Pluronic F68 em proporção 1:50 (CUR: polímero), com EE% de 70,24%⁸².

As micelas de PFS ofereceram uma melhor proteção para CUR, uma vez que o valor de KSV no ensaio de supressão de fluorescência foi de 0,214. Além do tipo de sistema de liberação, o valor de KSV pode variar em função do tipo de supressor usado, como reportado em lipossomas contendo CUR¹¹⁰ em que o valor de KSV foi de $10,3 \pm 1,7 \text{ M}^{-1}$ usando iodeto e de $31,6 \pm 2,1 \text{ M}^{-1}$ usando acrilamida¹¹². Em um outro estudo¹⁰³, NaI e acrilamida foram usados em um conjugado de CUR-quitosana, promovendo KSV de $17,54 \pm 2,26 \text{ M}^{-1}$ e $20,6 \pm 4,43 \text{ M}^{-1}$ para iodeto de potássio e acrilamida, respectivamente¹⁰³.

O tamanho hidrodinâmico médio das micelas fotossensíveis foi de 31,98 nm em ausência de CUR e 40,42 nm na presença de CUR. A diferença de tamanho menor reportado no presente estudo, comparado com outra investigação¹⁰⁰, pode ser atribuída à massa molar do extremo hidrófilo da cadeia polimérica. Polímeros com massas molares menores formam micelas com tamanho menor, como observado em micelas de PEG-ANB-2,4-D, sintetizadas com PEG de duas massas molares diferentes: PEG₄₀₀₀ e PEG₁₀₀₀₀, que apresentaram tamanhos de 51 e 61 nm, respectivamente¹⁰⁰. Micelas tribloco de EC_{0.08}-g-PHEMA₃₂-g-PSPMA₁₅ tiveram tamanho de 115 nm comparadas com micelas formadas com EC_{0.08}-g-PHEMA₃₂-g-PSPMA₁₁ que tiveram tamanho de 84,6 nm¹⁰³. Em outro tipo de micelas usando dois pesos moleculares de poli(Tyr)₂₅ e poli(Tyr)₅₀-mPEG-poli(Tyr)₂₅-g-NB e mPEG-poli(Tyr)₅₀-g-NB- carregadas com vermelho nilo foram reportados tamanho de 250,6 e 259,7 respectivamente⁹⁸.

Os resultados de DLS observados nesta pesquisa sintetizados com Pluronic® são similares aos achados em um estudo prévio¹¹³, no qual foram reportados tamanhos na faixa de 20,1 até 22,1 nm em micelas sistetizadas com Poloxamer 407 e tocoferil-PEG100-succinato¹¹³. No entanto, neste estudo foi observado aumento de tamanho das micelas após a encapsulação de CUR, diferente de outro estudo¹¹³ no qual não observaram aumento de tamanho das micelas após a encapsulação.

Valores de IPD até 0,1 são considerados de elevada homogeneidade das nanoformulações¹¹⁴. Os maiores valores de IPD observados neste estudo demonstram uma maior distribuição de tamanho das micelas formadas. Como os valores de IPD podem variar de 0,0 (sistema perfeitamente monodisperso) a 1,0 (sistema altamente polidisperso, com partículas de diferentes tamanhos), sistemas poliméricos com IPD de até 0,3 são considerados aceitáveis, como sistema homogêneo¹¹⁵. Em outro estudo foram observados tamanhos de 70,9 nm

associados com PDI de 0,245 e tamanho de 196 nm com o PDI foi de 0,072 em micelas de PEO-b-poli (ε-caprolactona) para CUR¹¹⁶.

Já nas imagens de MEV-FEG, foram observadas micelas aglomeradas, que podem confundir o tamanho e o IPD do DLS. Contudo, observou-se forma esférica das micelas, similar com estudos reportados previamente^{98,100}. Micelas fotoativadas de PEG-ANB-2,4-D apresentaram tamanho de 35 nm¹⁰⁰, porém a forma e tamanho foram determinados por microscopia eletrônica de transmissão. Micelas foto responsivas de maior tamanho (200 nm) foram observadas em MEV em micelas sintetizadas com mPEG-poli (Tyr)₂₅-g-NB⁹⁸.

No teste de fotodegradação do PFS, observou-se a diminuição da absorção do polímero após irradiação com luz UV 355 nm devida à quebra do grupo éster do composto PEG-o-nitrobenzil¹¹⁷. A fotodegradação do PFS foi similar à reportada previamente, porém não foi observada formação de outro sinal máximo de absorção^{98,100}. Já a fotodegradação do PFS na presença da CUR, a absorção na região UV foi maior devido, provavelmente, à absorção da CUR na região do 265 nm³⁹, fato que poderia explicar a maior fotodegradação do polímero em presença da CUR.

Essa fotodegradação do polímero promoveu uma liberação de CUR de 84,34%, que foi menor comparada com sistemas similares previamente reportados^{99,100}, nos quais valores de liberação de pesticida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) foram de 99,3%⁹⁹ e 96,9%¹⁰⁰ usando luz UV a 365 nm, potência de 150 mW/cm², liberados de uma micela sintetizada com PEG-ANB ligadas ao pesticida, após irradiação de 10 minutos¹⁰⁰.

Como esperado, foi observada liberação de CUR das micelas fotoinduzidas, comparada com a liberação de CUR das micelas convencionais sintetizadas com Pluronic® F127 e P123, que apresentaram liberação de 78,27 e 79,94%, respectivamente, após 36 h de diálise. Nas micelas convencionais, a liberação foi acompanhada até 36 h sem observar a formação de platô, pois o objetivo desta pesquisa não foi avaliar a completa liberação da CUR das micelas convencionais. Além disso a liberação de CUR é demorada, como observado em micelas de F127 e F68 que tiveram valores de 80% e 63%, respectivamente, após 240 h⁸². Outro exemplo disso são as micelas sintetizadas com Soluplus e Solutol®HS15¹¹², que tiveram liberação de 40,26% em 48 h¹¹².

Por outro lado, a mínima fotodegradação da CUR após irradiação com luz UV 365 nm poderia ser atribuída ao comprimento de onda do laser utilizado durante a caracterização do sistema, sendo que na banda de absorção da CUR nos 365 nm, a luz apenas é absorvida. Comparado com um estudo prévio¹¹⁸ em que foi usada luz UV-A com comprimento de onda entre 320-400 nm, usado para irradiar hidrogel de Cassava-gelatina e liberar CUR, a CUR sofreu fotodegradação de quase 20% após irradiação de 30 minutos¹¹⁸.

Devido à preocupação mundial que representa a resistência microbiana, novas alternativas terapêuticas têm sido pesquisadas com o intuito de inativar micro-organismos responsáveis por infecções. Assim, a aPDT mediada pela CUR é uma alternativa interessante para o tratamento de infecções hospitalares causadas por espécies patogênicas como SARM, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Os resultados da aPDT mediada pela CUR em micelas fotoativadas, assim como em micelas convencionais e CUR livre, em culturas planctônicas de *P. aeruginosa* demonstraram diminuição na contagem de colônias de apenas 1 log₁₀ comparado com o grupo controle. Esse resultado pode ser atribuído à baixa concentração de CUR (5x10⁻⁶ M) usada nesta pesquisa. No entanto, a literatura não é clara a respeito da quantidade de CUR necessária para a fotoinativação de *P. aeruginosa*, uma vez que em micelas de espermina carregadas com CUR a 50 e 100 nM associadas a 18 e 30 J/cm² de laser azul promoveram a erradicação de bactérias de *P. aeruginosa*. Por outro lado, não foi observada eficácia da aPDT medida pela CUR livre em concentração de 200 µM associado a 6, 18 e 30 J/cm² de laser azul⁷⁰.

Por outro lado, a concentração de 75 µM de CUR foi incubada durante 10 minutos em culturas planctônicas de *S. aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Salmonella entérica* serotipo Typhymurium e *P. aeruginosa* com posterior irradiação de 139 J/cm², 278 J/cm² e 417 J/cm². Os resultados de foto-inativação em *P. aeruginosa* foram de 0,24, 0,3 e 0,33 log após 139 J/cm², 278 J/cm² e 417 J/cm², respectivamente, resultados menores que o demonstrado no presente estudo. Por outro lado, a bactéria *S. aureus* foi mais suscetível à foto-inativação, uma vez que, após aPDT, o crescimento bacteriano diminuiu até 3 log⁶¹.

Na presente pesquisa, a MFA carregada com CUR após irradiação UV e azul em SARM promoveu a diminuição de 2 log₁₀ comparado com o grupo controle, ao passo que para a aPDT mediada pelas micelas convencionais e CUR livre foi observada diminuição de 1 log₁₀ comparada com o grupo controle. Apesar de ter

observado maior efeito fotodinâmico antimicrobiano na aPDT mediada pela MFA com CUR, a foto-inativação observada nesta pesquisa é menor do que a reportada em um estudo prévio, no qual nanopartículas de polivinil pirrolidona carregadas com CUR a 5 μM associadas a iluminação com uma fonte de luz LED a 435 nm, irradiados com 5, 15 ou 25 minutos, promoveram maior foto-inativação de *S. aureus*¹¹⁹. Adicionalmente, no referido estudo foi observado que, na concentração de 5 μM , maior tempo de pré-irradiação diminuiu a eficácia da aPDT, uma vez que tempos de pré-irradiação de 1, 5 e 15 minutos e posterior irradiação de luz azul (33,8 J/cm²) tiveram valores de UFC/mL de $4,7 \times 10^1$, $7,2 \times 10^1$ e $3,5 \times 10^2$ respectivamente. Contudo, esse efeito de menor eficácia fotodinâmica com maior o tempo de pré-irradiação não foi observado com concentrações de 10 μM e 50 μM ¹¹⁹.

Além disso, a bactéria MRSA usada nesta pesquisa pode ser também responsável pela menor foto-inativação comparada com outro estudo¹¹⁹, uma vez que os micro-organismos resistentes podem ser mais difíceis de fotoinativar devido à presença de polissacarídeo capsular presente na superfície da bactéria resistente, a qual limita a penetração do FS no micro-organismo, reduzindo assim os efeitos das espécies reativas de oxigênio^{58,59,120}. Uma prova disto foi reportado em biofilmes simples de *S. aureus* sensível à metilicina (SASM) e SARM, no qual uma concentração de 80 μM associada a 5,28 J/cm² diminuiu 3 log de SASM e até 2 log de SARM⁵⁸.

Já no teste contra *C. albicans*, a aPDT mediada pela CUR livre e pelas micelas convencionais, assim como pela MFA carregada com CUR associada a luz UV e posterior irradiação azul, promoveu diminuição de 1 log₁₀ comparado com o grupo controle. Apesar de ter sido observada eficácia fotodinâmica antimicrobiana, a redução em log observada foi menor do que o verificado em outro estudo previamente reportado³². Nesse estudo, a concentração de CUR a 5 μM foi efetiva em culturas planctônicas de *C. albicans*, resultado que pode ser atribuído a menor dose de luz usada no presente estudo (33,5 J/cm²) comparado com os 37,5 J/cm² usado previamente. Quando uma dose menor de luz (5,28 J/cm²) foi usada para fotossensibilizar uma concentração maior (20 μM) de CUR, foi observada erradicação do fungo³².

Entretanto, apesar de ter sido observado efeito fotodinâmico antimicrobiano nas três espécies avaliadas, nesta pesquisa não foi verificada a redução de 3 log₁₀, necessária para considerar os resultados biologicamente relevantes^{29,121}.

Adicionalmente, os micro-organismos incubados com MFA e posterior irradiação UV apresentaram diminuição na contagem de colônias menor a 1 log₁₀. Em um estudo prévio⁶⁶, CUR a 5 mg/L incubada durante 5 minutos no escuro e posterior irradiação UV-A diminuiu a contagem de colônias em 3 e 5 log₁₀ de culturas planctônicas de *Escherichia coli* e *Listeria innocua*, respectivamente. Vale a pena ressaltar a diferença no comprimento de onda da luz UV-A usado nos testes de caracterização (laser de 355 nm) e nos testes antimicrobianos (LED de 369 nm), no qual a banda de absorção da CUR é maior. Essa mudança do aparelho foi devida a falta de aparelhos tipo LED com o comprimento de onda de 355 nm, disponíveis no mercado. Devido ao número de replicatas feitas nos testes antimicrobianos, o uso de aparelhos LED nos testes microbiológicos é mais útil, pois oferecem uma maior superfície irradiada^{57,122,123}.

Os biofilmes são comunidades altamente organizadas protegidas por uma matriz polimérica extracelular. Considerando a concentração de FS usado na presente pesquisa, o resultado de diminuição de biomassa em biofilmes de MRSA e *C. albicans* é superior de estudos prévios nos quais foram observadas diminuições de 54%¹²⁴ e 80%¹²⁵ da biomassa de biofilmes simples de MRSA¹²⁴ e VRSA¹²⁵ após aPDT mediada pela CUR em concentrações de 256 µg/mL¹²⁴ e 2500 µg/mL¹²⁵, respectivamente. Por outro lado, um nanocomplexo de sorolipídeo contendo CUR a 9,37 µg/mL diminuiu quando foi adicionada antes e depois da fase de adesão do biofilme¹²⁶, enquanto nesta pesquisa a concentração de CUR a 5 µM foi adicionada depois da fase de adesão, além disso foi feita uma troca de meio 24h depois da fase de adesão.

Já no ensaio de biomassa de biofilme de *P. aeruginosa* a inexistência de diferença pode ser atribuída à concentração de CUR, uma vez que um estudo prévio¹²⁷ observou diminuição de 85% de biomassa após aPDT usando CUR a 200 µg/mL com nanopartículas de prata a 20 µg/mL. Quando esses compostos foram irradiados individualmente nos biofilmes foi observada diminuição de 50% e 60% em CUR e nanopartículas de prata, respectivamente¹²⁷. Um outro estudo⁶³, reportou a diminuição de 40% e 70% da biomassa do biofilme após 5 e 10 J/cm², respectivamente CUR a 6,75 mM⁶³.

No ensaio de citotoxicidade, não foi observada diferença significativa das micelas convencionais com as MFA, respeitando assim o princípio de baixa citotoxicidade inerente à micela (biocompatibilidade)⁷⁶. Essa biocompatibilidade pode

ser associada à cadeia PEG do sistema, o qual é aprovado pela FDA e apresenta baixa citotoxicidade⁷⁶. O composto PEG também faz parte da estrutura dos Pluronic F127 e P123, os quais apresentaram ausência de citotoxicidade, demonstrado pelos valores de viabilidade celular similares com as amostras tratadas com MFA e com o grupo controle negativo, evidenciando a biocompatibilidade desses compostos⁸⁰. Outros tipos de micelas sintetizadas a partir de N,N-di-(3-aminopropil)-N-metilamina, espermidina e espermina também não apresentaram efeito citotóxico em células NOK⁷⁰.

Essa foi uma pesquisa de conceito de prova na qual foram sintetizadas micelas fotoativadas que facilitaram a liberação de CUR para aPDT. Apesar dos resultados obtidos neste estudo in vitro terem demonstrado efeito antimicrobiano contra micro-organismos patogênicos, eficácia na diminuição da biomassa de MRSA e *C. albicans* além de ausência de citotoxicidade em célula mamífera, foi apenas avaliada uma concentração de FS. Futuros estudos deverão ser realizados para encapsular maior quantidade de CUR e diminuir o tempo de liberação e os tempos de pré-irradiação e irradiação na aPDT para se alcançar resultados biologicamente relevantes com aPDT, a fim de aplicá-la in vivo.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações desta pesquisa pode se concluir:

O sistema micelar foto-ativado facilitou a liberação de CUR, adicionalmente foi observada fotoinativação microbiana em culturas planctônicas de *P. aeruginosa*, SARM e *C. albicans*;

O polímero fotossensível desenvolvido sofreu fotodegradação com irradiação UV e foi capaz de formar micelas com tamanho nanométrico, baixo IPD e potencial zeta aniônico;

A aPDT mediada pela CUR em micelas foto-ativadas, apresentou efetividade na diminuição de UFC/mL em culturas planctônicas de *P. aeruginosa*, SARM e *C. albicans*;

A aPDT promoveu diminuição da biomassa dos biofilmes de MRSA e *C. albicans*;

O sistema fotoinduzido não apresentou citotoxicidade em queratinócitos.

REFERÊNCIAS*

1. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(9): 563-75.
2. Fimble A, Lynch S, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med.* 2008; 59: 415-28.
3. Seneviratne G, Zavahir JS, Bandara WMMS, Weerasekara MLMA. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008; 24: 739.
4. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms.* 2017; 5(2): pii E15.
5. Shani S, Friedman M, Steinberg D. The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res.* 2000; (34): 260–67.
6. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903-8.
7. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6): 1771-6.
8. WHO- World Health Organization {homepage na internet}. 10 facts on antimicrobial resistance. Disponível em: http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/en/#.
9. Lammie SL, Hughes JM. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: the need for convergence. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2016; 7: 287-312.
10. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(5): 344-9.
11. Kaye KS, Pogue JM. Infections caused by resistant Gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy.* 2015; 35(10): 949-62.
12. Moore JE, Mastoridis P. Clinical implications of *Pseudomonas aeruginosa* location in the lungs of patients with cystic fibrosis. *J Clin Pharm Ther.* 2017; 42(3): 259-67.
13. Langton H, Hoyer SC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 4: CD004197.
14. Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1): 109-15.

* 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>

15. Keith S, Pogue JM. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy*. 2015; 35(10): 949-62.
16. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4(9): a019778.
17. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *J Appl Microbiol*. 2017; 122(2): 321-30.
18. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49(2): 171-7.
19. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75(2): 213-67.
20. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review. *Eur J Intern Med*. 2016; 34: 21-8.
21. Kontoyiannis DP. Antifungal Resistance: An Emerging Reality and a Global Challenge. *J Infect Dis*. 2017; 216(3): S431-5.
22. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 33: 67-73.
23. Hamblin MR, Abrahamse H. Oxygen-Independent Antimicrobial Photoinactivation: Type III Photochemical Mechanism? *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(2): pii:E53.
24. Raab O, U"ber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infus- orien. *Zeit Biol*. 1900; 39: 524-46.
25. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci*. 2004; 3(5): 436-450.
26. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1704(2): 59-86
27. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011; 55(1): 143-66.
28. Yin R, Agrawal T, Khan U, Gupta GK, Rai V, Huang YY, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs. *Nanomedicine (Lond)*. 2015; 10(15): 2379-404.
29. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014; 5: 405.
30. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016; 473(4): 347-64.
31. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa M. Curcumin and health. *Molecules*. 2016; 21(3): 264.

32. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87(4): 895-903.
33. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(9): 927-34.
34. Quishida CC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci*. 2016; 31(5): 997-1009.
35. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol*. 2013; 51(3): 243-51.
36. Priyadarsini KI. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*. 2014; 19(12): 20091–112.
37. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis*. 2009; 34(1): 1-10.
38. Trigo Gutierrez JK, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui MIC, Sanitá PV, Pavarina AC, et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PLoS One*. 2017; 12(11): e0187418.
39. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014; 35(10): 3365-83.
40. Chen J, He ZM, Wang FL, Zhang ZS, Liu XZ, Zhai DD, et al. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. *Eur J Pharmacol*. 2016; 772: 33-42.
41. Arunraj TR, Rejinold NS, Mangalathillam S, Saroj S, Biswas R, Jayakumar R. Synthesis, characterization and biological activities of curcumin nanospheres. *J Biomed Nanotechnol*. 2014; 10(2): 238-50.
42. Hazzah HA, Farid RM, Nasra M, Hazzah WA, El-Massik MA, Abdallah OY. Gelucire-based nanoparticles for curcumin targeting to oral mucosa: preparation, characterization, and antimicrobial activity assessment. *J Pharm Sci*. 2015; 104(11): 3913-24.
43. Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine RA, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine*. 2015; 11(1): 195-206.
44. Ansari SH, Islam F, Sameem M. Influence of nanotechnology on herbal drugs: A Review. *J Adv Pharm Technol Res*. 2012; 3(3): 142–6. doi: 10.4103/2231-4040.101006.
45. Song Z, Zhu W, Liu N, Yang F, Feng R. Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery. *Int J Pharm*. 2014; 471(1): 312-21.

46. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010; 49(36): 6288–308.
47. Baltazar LM, Krausz AE, Souza ACO, Adler BL, Landriscina A, Musaev T, et al. *Trichophyton rubrum* is inhibited by free and nanoparticle encapsulated curcumin by induction of nitrosative stress after photodynamic activation. *PloS One.* 2015; 10(3): e0120179.
48. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin—effect of selected nanocarrier: studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 47(1): 65-74.
49. Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC, Mima EGO. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. *Molecules.* 2018; 23(8): 2075. doi: 10.3390/molecules23082075.
50. Fomina N, Sankaranarayanan J, Almutairi A. Photochemical mechanisms of light-triggered release from nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(11): 1005-20.
51. Karimi M, Sahandi Zangabad P, Baghaee-Ravari S, Ghazadeh M, Mirshekari H, Hamblin MR. Smart nanostructures for cargo delivery: uncaging and activating by light. *J Am Chem Soc.* 2017; 139(13): 4584-610.
52. Ejaz M, Yu H, Yan Y, Blake DA, Ayyala RS, Grayson SM. Evaluation of redox-responsive disulfide cross-linked poly (hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Polymer.* 2011; 52(23): 5262-70.
53. Anilkumar P, Gravel E, Theodorou I, Gombert K, Thézé B, Ducongé F, et al. Nanometric Micelles with Photo-Triggered Cytotoxicity. *Adv Funct Mater.* 2014; 24: 5246–52.
54. Shen W, Zheng J, Zhou Z, Zhang D. Approaches for the synthesis of o-nitrobenzyl and coumarin linkers for use in photocleavable biomaterials and bioconjugates and their biomedical applications. *Acta Biomater.* 2020; 1(115): 75-91. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.024.
55. Ye Y, Li Y, Fang F. Upconversion nanoparticles conjugated with curcumin as a photosensitizer to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in lung under near infrared light. *Int J Nanomedicine.* 2014; 6(9): 5157-65.
56. Liu J, Yu M, Zeng G, Cao J, Wang Y, Ding T, Yang X, et al. Dual antibacterial behavior of a curcumin-upconversion photodynamic nanosystem for efficient eradication of drug-resistant bacteria in a deep joint infection. *J Mater Chem B.* 2018; 6(47): 7854-61. doi: 10.1039/c8tb02493f.
57. Freitas MAA, Pereira AHC, Pinto JG, Casas A, Ferreira-Strixino J. Bacterial viability after antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2019; 14: 739-48. doi: 10.2217/fmb-2019-0042.

58. Teixeira CGS, Sanitá PV, Ribeiro APD, Dias LM, Jorge JH, Pavarina AC. Antimicrobial photodynamic therapy effectiveness against susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 30: 101760. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101760.
59. Fournier JM, Boutonnier A, Bouvet A. *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1372–4.
60. Araújo TSD, Rodrigues PLF, Santos MS, Oliveira Jm, Rosa LP, Bagnato VS, et al. Reduced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 21: 219-23.
61. Penha CB, Bonin E, Silva AF, Hioka N, Zanqueta EB, Nakamura TU, et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. *LWT - Food Sci Tech.* 2017; 76: 198-202.
62. Khoobi M, Masoule SF, Pourhajibagher M, Safari J. Photodynamic Inactivation of Endopathogenic Microbiota Using Curcumin- mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J Sci, Islamic Republic of Iran.* 2018; 29(3): 205 - 9.
63. Abdulrahman H, Misba L, Ahmad S, Khan AU. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 30: 101645. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101645.
64. Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, Pavarina AC. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2013;58(2): 200-10. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.10.011.
65. Ma J, Shi H, Sun H, Li J, Bai Y. Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans* biofilms in vitro *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 27: 280-7.
66. Oliveira EF, Tosati JV, Tikekar RV, Monteiro AR, Nitin N. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation. *Postharvest Biol Tech.* 2018; 137: 86-94.
67. Agel MR, Baghdan E, Pinnapireddy SR, Lehmann J, Schäfer J, Bakowsky U. Curcumin loaded nanoparticles as efficient photoactive formulations against gram-positive and gram-negative bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019; 178(1): 460-8.
68. Preis E, Baghdan E, Agel MR, Anders T, Poursaghar M, Schneider M, et al. Spray dried curcumin loaded nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019; 142: 531-9.
69. Rocha MP, Ruela ALM, Rosa LP, Santos GPO, Rosa FCS. Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 17: 101962. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101962

70. Rupel K, Zupin L, Brich S, Mardirossian M, Ottaviani G, Gobbo M, et al. Antimicrobial activity of amphiphilic nanomicelles loaded with curcumin against *Pseudomonas aeruginosa* alone and activated by blue laser light. *J Biophotonics*. 2020; 5. doi: 10.1002/jbio.202000350.
71. Pourhajibagher M, Plotino G, Chiniforush N, Bahador A. Dual wavelength irradiation antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and metformin doped with nano-curcumin as an efficient adjunctive endodontic treatment modality. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 29: 101628.
72. Laza-Knoerr AL, Gref R, Couvreur P. (2010). Cyclodextrins for drug delivery. *J Drug Target*. 2010; 18(9): 645–656. doi:10.3109/10611861003622552.
73. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol*. 2015; 6. doi:10.3389/fphar.2015.00286.
74. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B*. 2010; 75(1): 1–18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.00.
75. Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux JC. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery, *J Control Release*. 2005; 109: 169–88.
76. Deshmukh AS, Chauhan PN, Noolvi MN, Chaturvedi KC, Ganguly K, Shukla SS, et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm*. 2017; 532: 249–68.
77. Miyata K, Christie RJ, Kataoka K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *React Func Pol*. 2011; 71: 227–34.
78. Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. Polymeric micelle stability, *Nano today*. 2012; 7: 53–65.
79. Alexandridis P, Holzwarth JF, and Hatton TA. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromol*, 1994; 27: 2414-25.
80. Andrew M Bodratti, Paschalis Alexandridis, Formulation of Poloxamers for Drug Delivery, *J Funct Biomater*. 2018; 9(1):11. doi: 10.3390/jfb9010011
81. Vaidya FU, Sharma R, Shaikh S, Ray D, Aswal VK, Pathak C. Pluronic micelles encapsulated curcumin manifests apoptotic cell death and inhibits pro-inflammatory cytokines in human breast adenocarcinoma cells, *Cancer Rep (Hoboken)*. 2019; 2(1): e1133. doi: 10.1002/cnr2.1133.
82. Sahu A, Kasoju N, Goswami P, Bora U. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications, *J Biomater Appl*. 2011; 25(6): 619-39.
83. Ganguly R, Kunwar A, Dutta B, Kumar S, Barick KC, Ballal A, et al. Heat-induced solubilization of curcumin in kinetically stable pluronic P123 micelles and vesicles: An exploit of slow dynamics of the micellar restructuring processes in the aqueous pluronic system. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017; 152(1): 176-82.

84. Akbar MU, Zia KM, Akash MSH, Nazir A, Zuber M, Ibrahim M. In-vivo anti-diabetic and wound healing potential of chitosan/alginate/maltodextrin/pluronic-based mixed polymeric micelles: Curcumin therapeutic potential. *Int J Biol Macromol*. 2018; 120: 2418-30.
85. Sun Y, Li Y, Shen Y, Wang J, Tang J, Zhao Z. Enhanced oral delivery and anti-gastroesophageal reflux activity of curcumin by binary mixed micelles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2019; 45(9): 1444-50. doi: 10.1080/03639045.2019.1628041.
86. Peng S, Hung WL, Peng YS, Chu IM. Oligoalanine-modified Pluronic-F127 nanocarriers for the delivery of curcumin with enhanced entrapment efficiency. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2014; 25(12): 1225-39. doi: 10.1080/09205063.2014.924059.
87. Raveendran R, Bhuvaneshwar GS, Sharma CP. In vitro cytotoxicity and cellular uptake of curcumin-loaded Pluronic/Polycaprolactone micelles in colorectal adenocarcinoma cells. *J Biomater Appl*. 2013; 27(7): 811-27. doi: 10.1177/0885328211427473.
88. Duan Y, Cai X, Du H, Zhai G. Novel in situ gel systems based on P123/TPGS mixed micelles and gellan gum for ophthalmic delivery of curcumin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015; 128(1): 322-30.
89. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol*. 2001; 19: 316–7
90. Kumar S, Allard JF, Morris D, Dory YL, Lepage M, Zhao Y. Near-infrared light sensitive polypeptide block copolymer micelles for drug delivery. *J Mat Chem*. 2012; 22(15): 7252-57.
91. Liu Y, An X. Preparation, microstructure and function of liposome with light responsive Switch. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019; 178: 238–44.
92. Zhang Z, Wang R, Huang X, Luo R, Xue J, Gao J, et al. Self-Delivered and Self-Monitored Chemo-Photodynamic Nanoparticles with Light-Triggered Synergistic Antitumor Therapies by Downregulation of HIF-1 α and Depletion of GSH. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020; 12: 5680–94.
93. Hernández-Montoto A, Montes R, Samadi A, Gorbe M, Terrés JM, Cao-Milán R, Aznar E, et al. Gold Nanostars Coated with Mesoporous Silica Are Effective and Nontoxic Photothermal Agents Capable of Gate Keeping and Laser-Induced Drug Release. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018; 10(33): 27644-56.
94. Singh SP, Alvi SB, Pemmaraju DB, Singh AD, Manda SV, Srivastava R, et al. NIR triggered liposome gold nanoparticles entrapping curcumin asin situ adjuvant for photothermal treatment of skin cancer. *Int J Biol Macromol*. 2018; 110: 375–82.
95. Chen C, Liu G, Liu X, Pang S, Zhu C, Liping L, et al. Photo-responsive, biocompatible polymeric micelles self-assembled from hyperbranched polyphosphate-based polymers. *Polym Chem*. 2011; 2: 1389.
96. Anilkumar P, Gravel E, Theodorou I, Gombert K, Thézé B, Ducongé F. Nanometric Micelles with Photo-Triggered Cytotoxicity. *Adv Mat*. 2014; 24(33): 5246-52

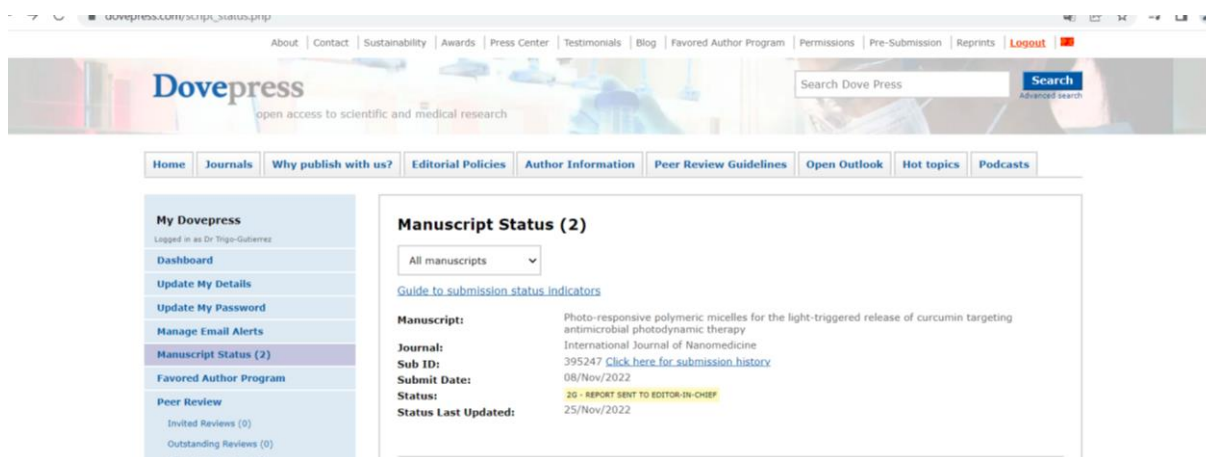
97. Bin Wang, Kefu Chen, Rendang Yang, Fei Yang, Jin Liu. Stimulus-responsive polymeric micelles for the light-triggered release of drugs, *Carbohydr Polym.* 2014; (103) 510–9.
98. Liu X, He J, Niu Y, Li Y, Hu D, Xia X, et al. Photo-responsive amphiphilic poly(α -hydroxy acids) with pendent o-nitrobenzyl ester constructed via copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Pol Adv Tech.* 2015; 26(5): 449-456.
99. Ye Z, Guo J, Wu D, Tan M, Xiong X, Yin Y, et al. Photo-responsive shell cross-linked micelles based on carboxymethyl chitosan and their application in controlled release of pesticide. *Carbohydr Polym.* 2015; 132(5): 520-528.
100. Ding K, Shi L, Zhang L, Zeng T, Yin Y and Yi Y. Synthesis of photoresponsive polymeric propesticide micelles based on PEG for the controlled release of a herbicide. *Polym Chem.* 2016; 7: 899-904.
101. Neises B, Steglich W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1978; 17: 522-4.
102. Hirose K. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants, *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2001; 39: 193.
103. Boruah B, Saikia PM, Dutta RK. Binding and stabilization of curcumin by mixed chitosan–surfactant systems: A spectroscopic study. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2012; 245:18-27.
104. Calori IR, Tedesco AC. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2016; 160: 240-7.
105. Dominguez A, Fernandez A, Gonzalez N, Iglesias E, Montenegro L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, *J Chem Educ.* 1997; 74(10): 1227.
106. Christine A, Dusica M, Adi E. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1999; 16:3–27.
107. Deshmukh AS, Chauhan PN, Noolvi MN, Chaturvedi K, Ganguly K, Shukla SS, et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm.* 2017; 532:249-68.
108. Akbar MU, Zia KM, Nazir A, Iqbal J, Ejaz SA, Akash MSH. Pluronic-Based Mixed Polymeric Micelles Enhance the Therapeutic Potential of Curcumin. *AAPS PharmSciTech.* 2018; 19(6): 2719-39.
109. Patil S, Choudhary B, Rathore A, Roy K, Mahadik K. Enhanced oral bioavailability and anticancer activity of novel curcumin loaded mixed micelles in human lung cancer cells. *Phytomedicine.* 2015; 22: 1103–11.
110. Kunwar A, Barik A, Priyadarsini KI, Pandey R. Absorption and fluorescence studies of curcumin bound to liposome and living cells. *BARC newsletter,* 2007; 285: 213-9.
111. Iwunze MO. Binding and distribution characteristics of curcumin solubilized in CTAB micelle. *J Mol Liq.* 2004; 111: 161–5.

112. Wang L, He D, Wang S, Dai Y, Ju J, Zhao C. Preparation and evaluation of curcumin-loaded self-assembled micelles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2018; 44(4): 563–9.
113. Saxena V, Hussain MD. Polymeric Mixed Micelles for Delivery of Curcumin to Multidrug Resistant Ovarian Cancer. *J Biomed Nanotechnol*. 2013;9: 1146–54.
114. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008; 69: 1–9.
115. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Davarani FH, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018; 10(2): 57. doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.
116. Ma Z, Haddadi A, Molavi O, Lavasanifar A, Lai R, Samuel J. Micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) as vehicles for the solubilization, stabilization, and controlled delivery of curcumin. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 86(2): 300–10.
117. Holmes PC, Jones DG. Reagents for Combinatorial Organic Synthesis: Development of a New *o*-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Solid Phase Synthesis. *J Org Chem*. 1995; 60: 2318–9.
118. Tosati JV, de Oliveira EF, Oliveira JV, Nitin N, Monteiro AR. Light-activated antimicrobial activity of turmeric residue edible coatings against cross-contamination of *Listeria innocua* on sausages. *Food Control*. 2018; (84): 177–85.
119. Winter S, Tortik N, Kubin A, Krammer B, Plaetzer K. Back to the roots: photodynamic inactivation of bacteria based on water-soluble curcumin bound to polyvinylpyrrolidone as a photosensitizer. *Photochem Photobiol Sci*. 2013; 12(10): 1795–802. doi: 10.1039/c3pp50095k.
120. Szpakowska M, Lasocki K, Grzybowski J, Graczyk A. Photodynamic activity of the haematoporphyrin derivative with rutin and arginine substituents (HpD-Rut(2)- Arg(2)) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacol Res*. 2001; 44: 243–6.
121. Kiesslich T, Gollmer A, Maisch T, Berneburg M, Plaetzer K. A comprehensive tutorial on in vitro characterization of new photosensitizers for photodynamic antitumor therapy and photodynamic inactivation of microorganisms. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 840417.
122. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*. 2008; 53: 61–109.
123. Rosa LP, da Silva FC. Antimicrobial photodynamic therapy: a new therapeutic option to combat infections. *J Med Microb Diagn*. 2014; 3: p. 158, 10.4172/2161-0703.1000158.

124. Batista de Andrade Neto J, Pessoa de Farias Cabral V, Brito Nogueira LF, Rocha da Silva C, Gurgel do Amaral Valente Sá L, Ramos da Silva A, et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. *Microb Pathog.* 2021; 155:104892. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104892.
125. Akhtar F, Khan AU. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) Against Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) Biofilm Disruption: A Putative Role of Phagocytosis in Infection Control. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 36: 102552. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102552
126. Rajasekar V, Darne P, Prabhune A, Kao RYT, Solomon AP, Ramage G, et al. A Curcumin-sophorolipid Nanocomplex Inhibits *Candida albicans* Filamentation and Biofilm Development. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021; 200: 111617. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111617.
127. Ghasemi M, Khorsandi K, Kianmehr Z. Photodynamic inactivation with curcumin and silver nanoparticles hinders *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm formation: evaluation of glutathione peroxidase activity and ROS production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(9):149. doi: 10.1007/s11274-021-03104-4.

APÊNDICES

ARTIGO EM REVISÃO E ARTIGO RESULTANTE DA TESE



ORIGINAL RESEARCH

Photo-Responsive Polymeric Micelles for the Light-Triggered Release of Curcumin Targeting Antimicrobial Photodynamic Therapy

Jeffersson Krishan Trigo-Gutierrez^{1*}

Italo Rodrigo Calori^{2,3*}

Geovana de Oliveira Bárbara¹

Ana Claudia Pavarina¹

Renato Sonchini Gonçalves³

Wilker Caetano³

Antonio Claudio Tedesco²

Ewerton Garcia de Oliveira Mima^{1*}

¹ Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, São Paulo 14801-903, Brazil; ² Department of Chemistry, Center of Nanotechnology and Tissue Engineering, Photobiology and Photomedicine Research Group, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São

Paulo 14040-901, Brazil; ³ Department of Chemistry, Research Nucleus of Photodynamic Therapy, State University of Maringá, Maringá, Paraná 87020-900, Brazil.

*These authors contributed equally to this work

Correspondence: Ewerton Garcia de Oliveira Mima

[Include full postal address here.]

Tel [Full international phone number, eg, +1 404 234 5433]

Fax [Full international fax number.]

Email : ewerton.mima@unesp.br

Abstract: Nanocarriers have been successfully used to solubilize, deliver, and increase the bioavailability of curcumin (CUR), but low CUR release rates hinder its use as a topical photosensitizer in antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). A photo-responsive polymer (PRP) was designed for the light-triggered release of CUR with an effective light activation-dependent antimicrobial response. The characterization of our novel PRP was compared with non-responsive micelles comprising Pluronic[™] P123 and F127. According to the findings, the PRP formed photo-responsive micelles in the nanometric scale (< 100 nm) with a lower critical micelle concentration ($3.74 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$, $5.8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$, and $7.2 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ for PRP, F127, P123, respectively, at 25°C) and higher entrapment efficiency of CUR (88.7, 77.2, and 72.3% for PRP, F127, and P123 micelles, respectively) than the pluronics evaluated. The PRP provided enhanced protection of CUR compared to P123 micelles, as demonstrated in fluorescence quenching studies. The light-triggered release of CUR from PRP occurred with UV light irradiation (at 355 nm and 25 mW cm^{-2}) and a cumulative release of 88.34% of CUR within 1 hour compared to 80% from pluronics after 36 hours of irradiation. In vitro studies showed that CUR-loaded PRP was non-toxic to mammal cell, showed photodynamic inactivation of the pathogenic microorganisms *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and decreased biofilm biomass. The findings show that the CUR-loaded PRP micelle is a viable option for aPDT.

Keywords: Photochemotherapy, micelles, light, bacteria, fungi.

Introduction

Antimicrobial resistance is a current global severe health problem.¹⁻³ Along with biofilm-associated illnesses, microbial resistance may cause the premature death of 300 million people over the next 35 years if antimicrobial resistance is not overcome.⁴ Antimicrobial resistance refers to the overuse and misuse of conventional antimicrobial drugs (antibiotics or antifungals)⁵ - the first option in treating human and veterinarian infectious disease.⁵ Moreover, biofilm is a complex community of microbial cells embedded in a self-produced extra-polymeric matrix that forms a physical barrier to protect microbial cells from external agents and the host defense.

Similar to biofilms, microorganisms show different features, from free-floating (planktonic) cells and increased tolerance to antimicrobial agents.^{6,7} One of the most popular multidrug-resistant microorganisms is the Gram-positive bacterium methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which is associated with skin infections, pneumonia, osteomyelitis, sepsis, and bacteremia.⁶ Moreover, such microorganism has been associated with community-acquired and hospital-acquired (nosocomial) infections.⁷ Apart from MRSA, the World Health Organization has also listed *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negative bacterium) as “critical” because it can be deadly for immunosuppressed patients.⁸ Additionally, this bacterium is associated with lung diseases⁹ and nosocomial infection.¹⁰

Besides bacteria, fungi from the *Candida* genus are associated with bloodstream infections.^{11,12} The opportunistic fungus *Candida albicans* (a commensal species of the human body) is responsible for local infections such as oral and vaginal candidiasis^{13,14} and can grow as yeast and filamentous forms (pseudohyphae and hyphae). The filamentous form is pathogenic and responsible for local infections due to the ability to invade the epithelium.¹⁵ The infections caused by these pathogenic microorganisms together require novel and efficient treatment strategies.¹⁶

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been suggested as an alternative and/or adjunctive to conventional antimicrobial drugs in the fight against microbial resistance and biofilms.¹⁷ The aPDT combines a photosensitizer (PS) compound, molecular oxygen ($^3\text{O}^*$), and light to inactivate microorganisms.¹⁷⁻¹⁹ In practical terms, the PS is applied to microorganisms for some time (pre-irradiation time, PIT) for its uptake. Then, the target microorganisms are irradiated with a light of a suitable wavelength (the same absorption wavelength of the PS). The PS is excited producing reactive oxygen species (ROS); or energy transfer to molecular oxygen, forming singlet oxygen ($^1\text{O}_2$),

which is the main reactive species of aPDT. The formation of those cytotoxic species in situ promotes microbial death by oxidative damage.¹⁷⁻¹⁹

The natural compound curcumin (CUR), isolated from the rhizome of *Curcuma longa* L.²⁰, has been used as a PS in aPDT. Besides the history of success against fungi, bacteria, and viruses,²¹⁻²⁴ its instability and low bioavailability²⁵ have imposed drawbacks to its clinical application. Moreover, the hydrophobic nature of the PS can cause intracellular aggregations that quench its photoactivity in PDT as was observed in a previous study.²⁸ Although organic solvents have been used to provide suitable CUR solubilization, their cytotoxic effect hinders their use.^{27,28} As a viable alternative, nanocarriers such as polymeric nanoparticles, emulsions, liposomes, mesoporous nanoparticles, supramolecular complexes, and micelles²⁴ have been proposed to improve CUR solubility and biocompatibility.²⁴

Recent studies showed that some nanocarriers reduced microbial photo-inactivation compared with free CUR.^{27,29} Such reduced efficacy may be due to the slow release of CUR from polymeric nanoparticles,²⁹ which prolongs the PIT and may prevent its clinical use as a topical agent. One hypothesis is that using a photo-responsive nanocarrier as a light-triggered release system for CUR allows a spatial-temporal release during light irradiation, enhancing therapy efficacy.³⁰ A previous study showed biocompatibility and up to 96.3% of photo-release of CUR from hollow mesoporous titania nanoparticles decorated with polyethyleneimine (PEI) and combined with folic acid.³¹

A photo-responsive micelle formed by 4-((2-nitro-5-(((2-nitrobenzyl)oxy)methoxy)benzyl)(nitroso)amino)benzyl methacrylate was used to release nitric oxide and formaldehyde upon light irradiation, at 410 nm for 10 minutes, decreasing the viability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.³²

Regarding aPDT studies with photo-responsive nanoparticles, upconversion nanoparticles conjugated with CUR showed promising results in in vitro assays and animal models of MRSA infection.^{33,34} Therefore, developing light-responsive nanosystems for CUR is promising for aPDT against biofilms and resistant microorganisms responsible for infections.

In this study we aimed to synthesize a photo-responsive polymer (PRP) by conjugating PEG with the 4-bromomethyl-3-nitrobenzoic group, followed by grafting phenoxyacetic acid, which can self-assemble into photo-responsive micelles in an aqueous medium for the light-triggered release of CUR. After the synthesis, its properties and efficacy in aPDT were compared to free CUR and

conventional micelles formed by two of the most used triblock pluronics (F127 and P123) comprised of poly (ethylene oxide) and poly (propylene oxide) blocks arranged as (EO) x -(PO) y -(EO) x . Besides the systems that make F127 and P123 helpful in providing suitable comparative parameters, they provide micelles with highly different degrees of hydrophobicity. Such a difference comes from their structural differences. They present a similar number of central hydrophobic PPO units (65 and 69 for F127 and P123, respectively),³⁵ but differ primarily in terminal hydrophilic PEO moieties (100 and 19 for F127 and P123, respectively). This makes P123 micelles much more hydrophobic than F127, which has been explored to efficiently load PS of quite different hydrophobicity.³⁵ When analyzing such pluronics, the loading capacity and biological efficacy of the photo-responsive synthetic polymer could be well evaluated comparatively.

Material and methods

Materials

CUR (MW 368.38 g mol⁻¹, ≥65% purity); Pluronic P123 (MW 5750 g mol⁻¹), Pluronic F127 (MW 12600 g mol⁻¹); PEG (MW 1500); 4-bromomethyl-3-nitrobenzoic acid (BNA); 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC); 4-dimethylaminopyridine (DMAP); dichloromethane (DCM), sodium bicarbonate (NaHCO₃); diethyl ether; phenoxyacetic acid (PAA); N, N-dimethylformamide (DMF); N, N-diisopropylethylamine (DIPEA); pyrene (MW 202.25 g mol⁻¹, 98% purity); dialysis membrane (cut-off 14 kDa); penicillin; streptomycin; 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT salt); and 1-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-3, 5-diphenylformazan (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Anhydrous ethanol of analytical grade was acquired from J.T. Becker™. Anhydrous calcium sulfate, potassium iodide (KI), and isopropanol were acquired from Labsynth (Diadema, SP, Brazil).

Sabouraud dextrose agar (SDA, Acumedia Manufacturer Inc., Baltimore, MD), mannitol salt agar (MNA, Difco, Detroit, Michigan, USA), tryptic soy agar (TSA, Difco, Detroit, Michigan, USA), Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) medium, and tryptic soy broth (TSB) were used as culture media in the microbiological assays. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and glutamine were acquired from GIBCO/BRL (Grand Island, NJ, USA).

The desiccator used in PRP synthesis and the microsyringe used in CMC tests were manufactured by Uniglass (Orem, UT, USA) and Thermo Fischer (Waltham, MA, USA), respectively. Ultrapure water was obtained through the Direct-Q™ 3 water system (Millipore™) and used in all experiments. Absorption spectra data were collected with a UV-visible spectrophotometer (Ultraspec 7000, GE Lifesciences, Marlborough, MA, USA) from 200 nm to 700 nm. Fluorescence spectra were determined with a spectrofluorometer (Fluorog-3, Horiba Instruments, Edison, NJ, USA). Dynamic light scattering and zeta potential were performed in a Zetasizer Nano ZS apparatus (Malvern PCS Instruments, UK). The ¹H NMR was performed on an NMR spectrophotometer (Bruker Avance III HD, Billerica, MA, USA). Images were acquired with a field emission scanning electron microscope (FE-SEM, JEOL, JSM-7500F Peabody, MA, USA) and the PC-SEM v 2,1,0,3 operation software. A sputter coater apparatus (BAL-TEC SCD 050, Bridgend, UK) was used to coat the samples with gold. The photo leakage of the PRP was performed with laser light (Continuum, Quantum Composers, Bozeman, MT, USA) at 355 and 25 mW cm⁻². Two light sources were used for the antimicrobial assays: a UV light apparatus (Prizmatix, San Francisco, CA, USA) at 369 nm and 25 mW cm⁻² for the photo-release of CUR from PRP and a red-green-blue LED light named Biotable (RGB, MMOptics, São Carlos, SP, Brazil) for aPDT (450 nm, 47 mW cm⁻²). A microplate reader (EZ Read 400, Biochrom, Cambridge, UK) was used for reading absorbance data in the cytotoxic assay.

Synthesis of Photo-responsive Polymer (PRP)

Synthesis of 4-bromomethyl-3-nitrobenzoic acid-conjugated PEG₁₅₀₀ (PEG-BNA)

The PEG₁₅₀₀ polymer with BNA was activated via Steglich esterification ³⁶ in 1-EDC and DMAP (Figure 1A). A BNA solution (0.35 g, 1.33 mmol) in DCM (20.00 mL) remained under light protection and an argon (Ar) atmosphere. Immediately, EDC (0.33 g, 2.1 mmol) and DMAP (0.12 g, 2.0 mmol) were added and the solution remained under magnetic stirring at room temperature.

Next a PEG₁₅₀₀ stock solution (1.0 g, 0.67 mmol) diluted in DCM (30 mL) was added by a dripping technique for 45 minutes. The resulting solution remained under magnetic stirring for 48 hours at room temperature and in an Ar atmosphere. Then, the solution was washed three times with 10% NaHCO₃,

and the organic phase was collected and dried with anhydrous calcium sulfate. Immediately, the solution was filtered and the solvent was eliminated by reduced pressure to obtain a yellow pasty product, which was purified by recrystallization with diethyl ether and left in a desiccator for 24 hours to eliminate solvent residues. The final product was a solid yellow crystal.

Synthesis of phenoxyacetic acid (PAA)-conjugated PEG-BNA

The PAA molecule at the end of the PEG-BNA backbone was conjugated by bimolecular nucleophilic substitution (SN2) to obtain ether as a final product (Figure 1A). In a two-necked reaction flask connected to a backflow system with PEG-BNA solution (0.5 g, 3.44 mmol) diluted in DMF (15.0 mL), a solution containing PAA (0.52 g, 3.44 mmol), DIPEA (60 μ L, 3.44 mmol), and KI (57.0 mg, 0.34 mmol) was added. The final solution remained under magnetic stirring at 80°C and Ar atmosphere. The reaction was monitored with thin layer chromatography, in which a silica gel plate was used as a stationary phase and a mixture of DCM:methanol (80:20, v/v) as a mobile phase. After 8 hours of reaction, the solvent was eliminated by reduced pressure, and the final product was solubilized in DCM and washed three times with 10% NaHCO₃. The organic phase was collected and dried with anhydrous calcium sulfate. The final product was purified by recrystallization with diethyl ether and left in a desiccator for 24 hours to eliminate solvent residues. The final product was a solid reddish crystal. Figure 1A illustrates the synthesis reaction.

Determination of critical micellar concentration (CMC)

A stock solution of 1% w/v of PRP in water was dropped via microsyringe on a 10-mm path-length quartz cuvette containing 2 mL of pyrene aqueous solution (1.0×10^{-6} mol L⁻¹) as a probe dye. After each increment, the fluorescence spectra were collected at excitation/emission of 330/378 nm.³⁷ The CMC of the PRP was also determined with CUR, at excitation/emission of 460/520 nm. For both dyes, CMC values were determined at 22°C, 25°C, 30°C, and 35°C. The same method was used for Pluronic P123 and F127 (1% and 4% w/v, respectively) at 25°C and 37°C with pyrene or CUR.

Synthesis and characterization of micelles

The PRP and conventional micelles were synthesized with the direct addition method. For PRP micelles synthesis, 114 μ L of PRP in a 1% aqueous solution was added to 1.886 μ L of an aqueous:acetonitrile solution with CUR at 5.30×10^{-6} mol L⁻¹. For F127 micelles, CUR at 5.33×10^{-6} mol L⁻¹ solubilized in 1.870 μ L of aqueous:acetonitrile was added to 130 μ L of the pluronic stock

solution at 4%. Finally, for the Pluronic P123 micelles, CUR at $6.75 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ in an aqueous:acetonitrile solution was added to 520 μL of P123 in a 1% aqueous solution. The CMC of PRP and Equilibrium Constant (Ks) of conventional micelles determined these values. CUR-free micelles were also synthesized with the same procedure used for PRP and conventional micelles. After the synthesis, the size and shape of micelles were evaluated with SEM. Samples diluted at 1:100 in water were dropped on stub conductors and dried in a desiccator. Then, the samples were coated with gold and verified in SEM. Moreover, the hydrodynamic size, polydispersity index (Pdl), and zeta potential were determined with DLS at 25°C and a scattering angle of 173° . A volume of 2 mL of undiluted samples of each CUR-loaded micellar suspension or CUR-free micelles was dropped in a DLS cuvette.

Entrapment efficiency (EE%)

After micelle synthesis, the absorbance of each synthesized micelle was measured spectrophotometrically (A0). Immediately after, the sample was centrifuged at 26,600 $\times g$ and 25°C for 10 min.³⁸ The pellet was resuspended in acetonitrile and absorbance was measured again (A1). The difference between A0 and A1 was used in the regression equation ($R^2 > 0.99$) obtained from a calibration curve to determine CUR concentration. The EE% was determined by the following formula³⁸:

$$EE\% = \frac{\text{Encapsulated amount}}{\text{Total amount of CUR}} * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Equilibrium constant (Ks)

The equilibrium constant (Ks) was determined with successive additions of an aqueous stock solution of PRP at 1% w/v into a quartz cuvette with 2 mL of a water solution of CUR ($5.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). After each increment, the absorption spectra of the solution were measured at 425 nm. Additional samples of an aqueous solution of Pluronic F127 at 4% w/v or P123 at 1% w/v were also used to determine the Ks of CUR of each pluronic. In all cases, the tests were performed at 25°C .

The binding constant (K_b) can be described by the equilibrium, as follows³⁹:



The following equation³⁹ determines the equilibrium constant (Ks) for the equilibrium:

$$Ks = \frac{[complex \text{ CUR} \leftrightarrow polymer]}{[CUR][polymer]} \quad (\text{Eq. 3})$$

where, [complex CUR↔polymer] is the interaction between CUR and the polymer, [CUR] is the CUR concentration, and [polymer] is the polymer concentration. The linear plot was used assuming the formation of 1:1 between CUR and the polymer, then the K_s was determined as follows ³⁹:

$$\frac{1}{\Delta A} = 1/K_s \Delta \epsilon [CUR] \left(\frac{1}{[polymer]} + \frac{1}{\Delta \epsilon [CUR]} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

where, ΔA is the absorbance change, $\Delta \epsilon$ is the molar extinction coefficient at a wavelength of 425 nm, and [CUR] and [polymer] are the equilibrium concentrations of curcumin and polymer, respectively.

Fluorescence quenching

A stock solution of 2 mM sodium iodide (NaI) was titrated in each CUR-loaded micellar suspension (PRP and Pluronics F127 and P123). Immediately after, fluorescence was measured. The Stern-Volmer plot was performed to obtain the quenching constants, as follows ⁴⁰:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{Eq. 5})$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities of CUR in the absence and presence of a quencher, respectively; K_{sv} is the Stern-Volmer constant; $[Q]$ is the quencher concentration. For Stern-Volmer deviation, the modified equation was used, as follows ⁴¹:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K' D [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (\text{Eq. 6})$$

where $\Delta F = F_0 - F$ is the difference between initial fluorescence intensity and fluorescence of CUR-loaded micelles in the quencher $[Q]$ at any point in the quenching titration, f_a is the fraction of total CUR relative to the quencher, and K'_D is the Stern–Volmer constant.

Polymer photo-response

Samples of PRP with pyrene at 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ or CUR at 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ were subjected to a UV light by pulsed laser irradiation at 25 mW cm⁻¹ of power and 355 nm of wavelength. The samples were irradiated at fluences of 9, 18, 27, 54, 72, and 90 J cm⁻². ³⁷ After each irradiation, the absorbance of PRP micelles was measured spectrophotometrically from 200 nm to 600 nm. **CUR photo-**

release

Samples of PRP at 0.057% w/v containing CUR at 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ were irradiated with the same parameters as the photo-response assay. After each irradiation, the samples were centrifuged (26,600 xg for 10 minutes at 25°C). The CUR released was quantified with a standard curve of CUR ranging from 7.0×10^{-7} mol L⁻¹ to 4.9×10^{-6} mol L⁻¹ serially double diluted ($R^2 \geq 0.99$).

CUR release from conventional micelles

Samples of CUR-loaded micelles (50 mL) were individually added to a dialysis membrane and submerged in a phosphate buffer solution (PBS). The samples were treated under magnetic stirring at 100 rpm at 37°C. An aliquot of dialyzed solution (PBS and free CUR) was removed at time intervals (0, 15, and 30 minutes and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, and 36 hours) and centrifuged at 26,600 $\times g$ and 25°C for 10 minutes. The supernatant was solubilized in acetonitrile and its absorbance was measured at 425 nm. The CUR concentration was determined with a standard curve (7.00×10^{-7} mol L⁻¹ to 4.90×10^{-6} mol L⁻¹ serially double diluted, $R^2 > 0.99$). The release of CUR from micelles (PRP or conventional) was determined with the following equation ³⁸:

$$CUR\ release\ (\%) = \frac{Amount\ of\ CUR\ released}{Total\ amount\ of\ CUR} * 100 \quad (Eq.\ 7)$$

Cytotoxicity assay

Spontaneously immortalized normal oral keratinocytes (NOK-si, kindly provided by Professor Carlos Rossa Junior, Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, Araraquara, UNESP, Brazil) were grown in DMEM with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and 100 UI/mL and 100 mg/mL of penicillin and streptomycin, respectively, at 37°C under 5% CO₂, 80% humidity, up to 90% confluence. A total of 20,000 cells were seeded in a 96 flat-bottom plate and incubated for 24 hours to form a monolayer cell surface. ²⁷ Next, the wells were washed once with PBS, and CUR-loaded or CUR-free PRP or conventional micelles were added immediately. Then, the samples were incubated for 96 minutes for PRP and 32 minutes for conventional micelles.

Additional samples were incubated with free CUR diluted in ACN or ACN in DMEM to evaluate the effect of the organic solvent alone in mammalian cell culture. In all cases, the PS was incubated for the time equivalent to PIT and irradiation time used in aPDT.

After incubation, the suspension was aspirated from the wells, the cells were washed once with PBS, and an MTT solution was poured immediately into the wells. The plates were incubated at 37°C for 4 hours. Next, the MTT solution was aspirated from the wells, and isopropanol was added to the wells to solubilize MTT crystals. Then, MTT absorbance was measured at 570 nm with a microplate reader. ⁴²

Microbial assay

Microbial strains and growth conditions

Standard strains of *C. albicans* (SC5314), MRSA (ATCC 33591), and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) were individually seeded in a specific agar plate for each microorganism. The SDA with 0.05 g L⁻¹ of chloramphenicol was used for *C. albicans*, MSA was used for MRSA, and TSA was used for *P. aeruginosa*. The plates were incubated for 48 hours at 37°C. After incubation, 5-10 colonies of each microorganism were individually transferred to specific broth media: RPMI 1640 (with glutamine and red phenol, without bicarbonate) buffered with MOPS, a pH of 7.0, supplemented with 2% D-glucose for *C. albicans*, and TSB for both bacteria. After overnight incubation at 37°C, each microbial suspension was diluted in fresh broth (1:10 and 1:20) and absorbance was read at 450 nm (for yeast) and 600 nm (for bacteria). Microbial suspensions were standardized by incubating them at 37°C until absorbance reached the mid-log growth phase determined previously for each species. The microbial suspensions were standardized at 4×10⁶ (±7 × 10⁵) colony-forming units per milliliter (CFU mL⁻¹) for fungi, 3×10⁷ (±2 × 10⁶) CFU mL⁻¹ for MRSA, and 5×10⁷ (±4×10⁶) CFU mL⁻¹ for *P. aeruginosa*.

For aPDT against planktonic cultures, 100 µL of each standardized microbial suspension was transferred to wells of a 96-well flat-bottom microtiter plate. The same volume of CUR-loaded PRP, F127, P123 micelles or free CUR was added. Additional wells with microbial suspensions were incubated with blank micelles or PBS. The samples remained in the dark for 20 minutes pre-irradiation time). The PRP micelles were irradiated with a UV light (369 nm) for 1hour (90 J cm⁻²) to release CUR and then illuminated with blue light (455 nm) for 12 minutes (33.84 J cm⁻²) for PS excitation. The samples incubated with conventional micelles and free CUR did not receive the UV light and were irradiated only with blue light. Chart S1 summarizes the experimental condition and light fluence used in each group.

Next, each sample was submitted to tenfold serial dilutions in PBS, and aliquots of 25 µL were spread on specific agar media for each microorganism. The agar plates were incubated at 37°C for 48 hours for colony quantification.

Biofilm formation

A volume of 200 μL of the standardized microbial suspension was individually transferred to wells of a 96-well flat-bottom plate and incubated at 37°C for 90 minutes (adhesion phase). For removing the non-adherent cells, each well was carefully washed twice with 200 μL of PBS. Next, 200 μL of free CUR or CUR-loaded micelles diluted in specific culture media was transferred to each well. Additional microbial samples were treated with culture media with unloaded micelles and culture media without PS (controls). The plates were incubated at 37°C for 24 hours. Then, the culture media were removed from each well and replaced with fresh media containing its respective PS (free CUR or CUR-loaded or unloaded micelles). The plates were incubated again at 37°C for 24 hours to complete biofilm formation.

After biofilm growth, the samples were washed twice with PBS and treated with the same groups evaluated in planktonic cultures. The effects of aPDT on the metabolic activity of biofilms and biofilm biomass were assessed with XTT and crystal violet staining, respectively. For the XTT assay, the microbial suspensions were removed after aPDT, and the biofilms were washed twice with PBS. Then, the biofilms were incubated with 200 μL of a solution containing 40 μL of XTT salt at 1 mg/mL diluted in PBS (maintained under -70°C until use), 0.4 mM menadione (2 μL) diluted in acetone (P.A.) and prepared a few minutes before use, and 158 μL of PBS supplemented with 200 mM glucose. Next, the 96-well flat-bottom plate was incubated at 37°C for 3 hours in the dark. Then, the absorbance of samples was read spectrophotometrically at 492 nm.^{43,44}

In the crystal violet assay, the biofilms were washed twice with PBS, and 200 μL of methanol (80%) was added to each well and maintained for 15 minutes for biofilm fixation. Next, methanol was removed, and the 1% crystal violet dye was added. After 5 minutes, the crystal violet was removed, and the biofilm was washed five times with PBS. Subsequently, 33% acetic acid was added to remove the dye from biofilms. Finally, 200 μL of the resulting solution was transferred to a new well of a microtiter plate, and absorbance was read at 570 nm.⁴⁴

Statistical analyses

The data on micelle characterizations are expressed as mean and standard deviation. The data from antimicrobial and cytotoxicity assays were analyzed with ANOVA/Welch and post-hoc Games-Howell tests at a significance level of 5%.

Results

Synthesis and characterization

The PRP [poly(ethylene glycol)-4-bromomethyl-3-nitrobenzoic acid-phenoxyacetic acid (PEG-BNA-PAA)] was synthesized in a two-step synthesis (Figure 1A). First, 4-bromomethyl-3 nitrobenzoic acid was conjugated to PEG₁₅₀₀ by an amide coupling reaction. Then, PEG-BNA was linked to the PAA forming the PRP. The hydrogen nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy showed proton signals assigned as follows: PEG₁₅₀₀ at 3.513 ppm; ester bonds between PEG and BNA at 4.392 ppm; and the bond of the PEG-BNA complex with PAA at 4.925 ppm (Figure 1B), indicating PRP formation.

The direct addition of synthesized PRP (5.0×10^{-3} mol L⁻¹) in water at 25°C formed micelles, as shown in SEM images (Figure 1C). The DLS determined the hydrodynamic diameter (H) as 32.0 (±0.4) nm, showing the nanoscale of the particle. The polydispersity index (Pdl) of 0.23 (±0.5) (Table S1) showed the formation of micelles in low dispersity. The zeta potential was slightly negative (−0.15 (±0.1) mV). PRP micelles in the presence of 5.00×10^{-6} mol L⁻¹ CUR, as shown in SEM (Figure 1D). The H_D and Pdl increased to 40.4 (±0.8) nm and 0.271 (±0.02). The zeta potential of CUR-loaded PRP micelles was similar to that of CUR-free PRP micelles.

As comparative nanosystems, F127 or P123 micelles (Figure S1) in the absence and presence of CUR were prepared, followed by their SEM, DLS, and zeta potential evaluations. According to SEM, both pluronics showed spherical micelles. The DLS showed lower H_D for pluronics than PRP micelles (Table S1).

Entrapment efficiency (EE%)

The EE% value of CUR in PRP micelles was 89 (±1) % (Table S2). The EE% of F127 and P123 was lower than PRP, which was 78 (±2) % and 73 (±1) %, respectively.

Critical micellar concentration

The transition from monomers to micelles is called critical micellar concentration (CMC), which is a dynamic and concentration- and temperature-dependent process (Figure 2A). In an aqueous PRP colloidal solution at 22°C, the fluorescence intensity of pyrene only slightly increased with a PRP concentration up to approximately 6.3×10^{-5} mol L⁻¹ (Figure 2B). This indicated poor solubilization of pyrene under these conditions. Conversely, the increase of fluorescence intensified above 5×10^{-5} mol L⁻¹ of PRP, showing that pyrene started to be efficiently solubilized. This indicated the presence of

PRP micelles above $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. According to PRP below and above this concentration, the distinct fluorescence behavior was linearly fitted, as illustrated in Figures 2B and 2C. The intersection point of the two curves was accepted as the CMC value, as validated in a previous study ³⁵, and it was equal to $6.3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Table S3 describes the CMC values for 25, 30, and 35°C, and the supplementary material (Figure S2) shows its fluorescence. In Figure 2D, the CMC increases as the temperature increases (in a non-linear way), indicating that micellization was exothermic at the temperature range evaluated.

The CMC of the CUR-loaded PRP was estimated with the same CUR loaded as a probe, preventing the potential effects of external probes on CMC values. Table S3 describes these values. Below 30°C, the presence of CUR seems to favor micelle formation, and micellization tends to be unfavorable in the presence of CUR above 30°C (Figure S3).

As a comparative study, the CMC values of F127 and P123 were determined at 25°C with and without CUR. In the case of F127, their CMC values were higher ($5.8 (\pm 2.8) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ and $5.7 (\pm 1.3) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, with and without CUR, respectively) than those of PRP, indicating that micelle formation is easier for PRP than F127 (Figure S4). These findings also show the higher hydrophobicity of PRP than F127 at that temperature.

For P123 (Figure S5), the CMC values were relatively low ($1.1 (\pm 6.1) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and $7.2 (\pm 2) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, without and with CUR, respectively) compared to those of PRP, showing that PRP is less hydrophobic than P123 at this temperature. It is worth noting that at 37°C (physiological temperature), the F127 and P123 micelles were formed in all the concentration ranges used ³⁸, which hinders the possibility of comparative studies with PRP.

Determination of the equilibrium constant (K_s)

The K_s is used to quantify the interaction between receptor and ligand molecules and evaluate the complexation process. ³⁹. Initially the absorption spectra of free CUR was performed (Figure S6), which denotes peak at 425 nm. The K_s values of CUR micelles were determined by spectrophotometric titration of PRP or Pluronics. Figure 2E depicts the variation in the absorption spectrum of CUR upon titration with the PRP. Absorbance at 425 nm showed high-intensity variations in PRP addition without dislocating the absorption spectra, and such a variation suggested a favorable partition of CUR into PRP micelles. Figure 2E shows the theoretical fitting of the variation of CUR absorbance at 425 nm, according to PRP concentration. The K_s value for PRP micelles was 1.00×10^5

M^{-1} (Table 2), showing a favorable CUR interaction with PRP micelles. This is important to guarantee a high loading of CUR into PRP micelles and prevent early releases before the light-trigger step.

The K_s for CUR in F127 and P123 micelles were also provided for comparison (Figure S7); Table S2 shows these values. The data showed that the K_s of CUR in PRP was lower than in pluronics, especially in P123 micelles.

Fluorescence quenching

Fluorescence quenching studies may provide information related to CUR in PRP micelles.

Herein, fluorescence quenching was determined by iodide titration (sodium iodide, NaI) as a quencher agent of CUR. For free CUR, the Stern-Volmer plot was linear (Figure 2F) and the K_{SV} value was estimated at 986 L mol^{-1} . Besides the higher K_s value, P123 micelles showed similar behavior to water with a roughly near K_{SV} value of 797 L mol^{-1} .

In contrast to water and P123 micelles, the Stern-Volmer plot did not show linearity for PRP and F127 micelles. This might indicate a more heterogeneous distribution of CUR inside such micelles, in which just a fraction of CUR is accessible to iodide ions ⁴⁰. In this case, a modified Stern-Volmer equation was used to consider an accessible fraction for fluorophore ⁴¹. The $F_0/\Delta F$ of each CUR-loaded micelle was plotted against the inverse of iodide concentration (Figure 2F for PRP and Figure S8 for F127 and P123 micelles).

For PRP micelles, fluorescence quenching was 506 M^{-1} , suggesting a deeper localization of CUR into the core of micelles than P123, that is, far from most water access. The lowest fluorescence quenching value of 175 M^{-1} of CUR in F127 micelles indicates the role of PEG length in the moiety protection of CUR against the aqueous agent.

Polymer photo-response and CUR photo-triggered release

Considering that PRP micelles can load and protect CUR in its hydrophobic core away from the surrounding medium, the efficiency of the photo-triggered release of CUR by the photodegradation processes of the PRP backbone must be evaluated. Such release would decrease the absorption intensity of CUR, which would be used to assess its release rate.

The PRP photodegradation was evaluated spectrophotometrically after UV light irradiation with a wavelength of 355 nm under different light fluence. Figure 3 shows the absorbance variation, meaning the photodegradation of PRP micelles under UV light irradiation. The CUR-free PRP (Figure 3A) showed an absorbance reduction at 225 nm from $1.00 (\pm 0.02)$ to 0.76

(± 0.03) after 90 J cm^{-1} of irradiation ($\Delta A = 0.24$). In turn, CUR-loaded PRP presented a further reduction from $1.13 (\pm 0.03)$ to $0.69 (\pm 0.05)$ under the same light fluence ($\Delta A = 0.44$) (Figure 3B). The normalized absorbance decrease did not show significant differences between the PRP photodegradation rates in the presence and absence of CUR (Figure 3C).

After PRP photodegradation, the photo-triggered CUR release was evaluated with $0.057\% \text{ w/v}$ of PRP. The percentage of photo-released CUR was $84.3 (\pm 4.7) \%$ (Figure 3D) after 90 J cm^{-1} of UV light irradiation.

For CUR-loaded F127 and P123 photo-inactive micelles, a release of $> 80\%$ was only obtained after more than 30 hours in a dialysis membrane assay (Figure S9).

Cytotoxicity assay

The positive control group showed significantly different results from the other groups ($p < 0.001$). Conversely, all CUR-loaded or CUR-free micelles and CUR solvents did not show significant differences ($p \geq 0.865$) with each other and compared with the negative control group (Figure S10).

Antimicrobial assay

The antimicrobial effect of CUR-loaded PRP micelles was compared with that of CUR-loaded F127 and P123 micelles and free CUR.

In MRSA samples, aPDT mediated by CUR-loaded PRP micelles (M+C+UL+BL+) significantly ($p < 0.001$) decreased by $2 \log_{10}$ (CFU/mL) compared with the untreated control group (C-L-). The aPDT mediated by free CUR and CUR-loaded F127 and P123 micelles reduced bacterial viability by $1 \log_{10}$ (CFU/mL) compared with the untreated control and did not show significant differences. These three groups were statistically different ($p < 0.001$) from the other groups (Figure 4A).

Figure 4B shows the results of aPDT against *P. aeruginosa*. Bacterial samples subjected to aPDT mediated by CUR-loaded PRP micelles (M+C+UL+BL+), conventional micelles, and free CUR resulted in a significant ($p \leq 0.048$) reduction of $1 \log_{10}$ (CFU/mL) compared with the untreated control group.

For *C. albicans*, aPDT mediated by free CUR and CUR-loaded PRP and conventional micelles also reduced ($p < 0.001$) yeast viability by $1 \log_{10}$ (CFU/mL) compared with the untreated control group (Figure 4C).

The present investigation also showed that irradiating CUR-loaded PRP micelles with a UV light significantly ($p \leq 0.001$) reduced the three microbial species evaluated by less than $1 \log_{10}$

(CFU/mL). The UV irradiation of CUR-free PRP micelles and UV alone did not reduce the viability of the three microbial species (Figure 4A, B, and C), confirming that CUR was responsible for the antimicrobial effect after UV light irradiation.

Metabolic Assay

The results obtained for bacteria, MRSA, and *P. aeruginosa* showed that aPDT did not significantly affect ($p \geq 0.196$) the metabolic activity of biofilms (Figures 5A and 5B). Although there were no significant differences among the groups, the biofilm of *P. aeruginosa* subjected to aPDT mediated by CUR-loaded F127 micelles showed the lowest mean value of the metabolic activity, 37% lower than the mean value of the untreated control group (Figure 5C). The high standard deviation of the groups may explain the absence of statistically significant differences.

Conversely, for the *C. albicans* biofilm, aPDT mediated by CUR-loaded F127 (F+C+BL+ group) reduced the metabolic activity by 59% compared with the untreated control group and showed a significant difference ($p \leq 0.028$) from the other groups, except the one treated only with CUR-free F127 micelles (F+C-L-, $p = 0.07$). Therefore, our results showed that CUR-loaded F127 micelles resulted in improved biofilm photoinactivation (Figure 4F).

Biomass assay

For single MRSA and *C. albicans* biofilms, aPDT mediated by CUR-loaded PRP micelles reduced ($p < 0.001$) the biofilm biomass by 48% and 47%, respectively, compared with the untreated control group (Figure 6A and 6C). Moreover, for the Gram-positive bacterium and yeast, aPDT mediated by free CUR and CUR-loaded F127 and P123 micelles decreased the biofilm biomass up to 36% ($p \leq 0.001$) and 30% ($p \leq 0.010$), respectively, compared with the untreated control group.

For *P. aeruginosa* there was no significant difference in the biofilm biomass of ($p \geq 0.067$) between the groups subjected to aPDT (F+C+BL+, P+C+BL+, C+BL+, and M+C+UL+BL+) and the untreated control group (Figure 6B). Therefore, our results from biofilm biomass showed that MRSA and *C. albicans* were more susceptible to aPDT mediated by free CUR and CUR-loaded micelles than *P. aeruginosa*.

Discussion

CUR in nanocarriers has been researched as an alternative for treating microbial infections and as PS in sPDT.²¹⁻²⁴ In a previous study²⁹ performed in murine model of oral candidiasis was reported a lower

effect of CUR in polymeric nanoparticle compared to free CUR. The authors suggested that slow release of CUR from the nanoparticles could be responsible for these results.²⁹ Thus in this study, we design a PRP that was used to carry CUR in photo responsive micelles for use as PS in aPDT. Moreover, we compared the aPDT mediated by CUR-loaded in photo responsive micelles with Pluronic F127 and P123 micelles, as well as free CUR.

The PRP is formed by three main segments: PEG as hydrophilic segment that enhances the anti-protein absorption on micelle surface.⁴⁵ The functionalization of nanoparticles with PEG (PEGylation) has been commonly explored to improve the stability and biocompatibility of several nanomaterials initially insoluble in water.⁴⁶ Another segment of PRP is formed by BNA as photo responsive segment which can be easily broken to release the hydrophobic compound encapsulated,⁴⁷ and PAA as hydrophobic segment.

The PRP micelles presented a spherical morphology, similar to previous reports.^{37,48} The higher diameter obtained with SEM images could be explained by the coalescence of small micelles driven by larger nanoparticles (Ostwald ripening).^{49,50} The zeta potential obtained was slightly negative because of electrical surface of PEG segment of PRP,⁴⁵ this is a disadvantage for our system, since, micelles can show low colloidal stability by the charge repulsion effect.

The H_D found for PRP micelles was lower than that previously reported by Zhao et al.⁵¹, who synthesized PRP micelles formed by a triblock copolymer polylactide-block-o-nitrobenzyl-poly(ethylene glycol)-o-nitrobenzyl-block-polylactide (PLA-NB-PEG-NB-PLA). The authors observed an increase in the diameter of micelles while the PLA and PEG portion units increased. Thus, the size of the micelles formed by PLA_{22.7}-PEG_{22.7} was 55 nm, while the hydrodynamic diameter of micelles formed by PLA₄₅-PEG₄₅ and PLA₁₃₆-PEG₁₃₆ were 86 nm and 174.6 nm, respectively.⁵¹

The DLS for pluronics agrees with those observed for CUR-loaded micelles synthesized with poloxamer 407 and tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS),⁵² whose sizes varied from 20.1 to 22.1 nm.⁵² There is a recent report of a hydrodynamic size variation in CUR-loaded F127 micelles in the presence of inorganic salts in the solvent that can modify the hydrodynamic size⁵³, considering that the inorganic salt of the phosphate buffer solution (PBS) facilitated the micellization of F127 micelles, resulting in smaller micelles than those formed in Milli-Q water.⁵³ Therefore, futures studies should evaluate the H_D PBS and culture media.

The PRP showed higher EE% value of CUR than Pluronic micelles, this could be related to the aromatic segment in PRP structure, as was reported in a previous study.⁵⁴ It is worth noting that the drug:polymer ratio highly modulates EE%. A ratio variation from 1:5 to 1:50 promoted a difference from 34.33% to 95.57% on the EE% of CUR in F127 micelles.⁵⁵

In CMC determination at 25°C was observed higher hydrophobicity of PRP than F127 at that temperature. This feature comes from the hydrophobic BNA-PAA moiety of the PRP, which is responsible for the self-assembly into micelles in water and free energy reduction. Subsequently, a low polymer concentration is required for micellization.⁵⁶ Moreover, the presence of *o*-nitrobenzyl esters increased the hydrophobicity of the hydrophobic chain⁴⁸, as reported in a previous study⁵⁷ that showed a CMC variation from 0.057 mg mL⁻¹ to 0.019 mg mL⁻¹ in the synthesis of 2-nitrobenzyl succinate-carboxymethyl chitosan micelles.⁴⁸

The interaction between host and receptor molecules was determined by K_s determination. The K_s values obtained are similar to those of a previous study³⁹ that evaluated CUR binding to chitosan/CTAB or chitosan/TWEEN-80 conjugates. The K_s values for CUR-chitosan-CTAB were 2.1×10⁵ and 2.14×10⁵ M⁻¹, by absorbance and fluorescence methods, respectively. In contrast the K_s values for CUR-chitosan-Tween were 3.32×10⁵ M⁻¹ from absorbance data and 3.39×10⁵ M⁻¹ from fluorescence data³⁹.

The data showed that the K_s of CUR in PRP was lower than in pluronics, especially in P123 micelles. The difference suggests that the hydrophobic/hydrophilic balance in the microenvironment could modulate the partition of CUR. Considering that the asymmetry of the PRP provides a gradient of hydrophobicity from the shell to the core of micelles, forming various sites of location for the loaded CUR, the preferred binding site of CUR must be evaluated.

The fluorescence quenching studies using water-soluble quenchers, including iodide ions.⁵⁶ may provide information about the availability of PS to the external environment, such as blood plasma proteins, which could compete with CUR delivery by decreasing the load of PRP micelles. The findings showed that CUR is not partitioned to the core of the P123 micelle but is located in a more accessible site for iodide ions such as the PEG shell. The short PEG of PRP might further contribute to the access of iodide ions, resulting in the high K_{SV} value obtained. The PEG shell works as a steric barrier, protecting CUR from biodegradation and potential interactions with serum proteins.

⁴⁵ The lowest fluorescence quenching value of 175 M⁻¹ of CUR in F127 micelles indicates the role of

PEG length in the moiety protection of CUR against the aqueous agent. The findings show the excellent efficiency of PRP and PEG shell as protectors of CUR, at least in vitro.

The PRP is an amphiphilic molecule composed of a hydrophilic part of PEG that forms the shell of micelles and a hydrophobic part comprising phenoxyacetic acid and *o*-nitrobenzyl, which constitute the micellar core. The photocleavage process would break the connection between the hydrophobic group and the hydrophilic PEG, disrupting the micelle and releasing CUR to the aqueous medium.

The photodegradation of polymers using UV light with a wavelength of 355 nm can be explained by the cleavage of the PEG-*o*-nitrobenzyl ester group⁵⁸. The photocleave observed here was similar to other studies,^{37,48} but there was no formation of another peak or shoulder after photocleavage in the present study. This phenomenon was also reported in polymeric nanocapsules formed by N-isopropylacrylamide (NIPAM), *o*-nitrobenzyl-methacrylic acid (MAA)⁵¹, and PLA-NB-PEG-NB-PLA micelles.⁵⁹

The photo-triggered CUR release observed in this research was lower than previous reports^{37,60} showed photo-release values of 99.5%³³ and 96.9% for a pesticide conjugated to photo-responsive micelles. This higher value is partly because the pesticide is chemically conjugated to the PRP, compared to the physical loading of CUR in our case. For a similar physical loading system with the Nile Red dye, only 23.3 and 36.3% of the dye was released from photo-triggered micelles after 60 minutes of UV irradiation at 365 nm.⁴⁸ Another study using mesoporous hollow titania nanoparticles was more efficient in the light-triggered CUR release, as the release reached up to 96% after UV light irradiation, while non-irradiated nanoparticles released 57%.³¹

Motivated by the results of CUR photo-release, the present study evaluated the cytotoxicity of After system characterization we evaluated the cell viability in mammalian cells. The results observed showed that PRP, F127, and P123 micelles did not show cytotoxicity in vitro, which motivates further clinical studies.⁶¹ These findings can be at least partially attributed to the biocompatibility of the PEG chain, approved by the Food and Drug Administration for clinical use.^{61,62}

Considering the biocompatibility observed in vitro and the hypothesis that a photo-controlled CUR release would improve the aPDT effect against Gram-positive (MRSA) and Gram-negative (*P. aeruginosa*) bacteria and yeast (*C. albicans*), this study applied CUR-loaded PRP micelles to aPDT. For MRSA, the M+C+UL+BL+ decreased by 2 log₁₀ (CFU/mL) compared with the untreated control group (C-L-). This result is lower than reports previously⁶³, polyvinylpyrrolidone complexes with 5 µM

CUR resulted in the photoinactivation of *S. aureus* from 1 to 6 log₁₀, according to the incubation time previously used for irradiation. Increased incubation times from 5 to 25 minutes with 5 µM CUR reduced photoinactivation, while complete photoinactivation occurred at longer incubation times with µM CUR.⁶³ As a limitation of our study, different incubation times and CUR concentrations loaded in the micelles were not evaluated.

As expected, the reduction in *P. aeruginosa* was lower than that of MRSA because Gram-negative species are less susceptible to photoinactivation⁶⁴ due to the presence of an outer membrane on their cell walls that is not present in Gram-positive bacteria. For an effective photoinactivation of Gram-negative species, cationic PS and cell wall permeabilizing agents have been used.⁶⁴ The slight anionic charge of micelles used here could also be related to the low decrease in colony count, as was reported previously.⁶⁵

In studies with planktonic cultures of *P. aeruginosa*, spermine micelles loaded with 50 and 100 nM CUR combined with 18 and 30 J cm⁻² of blue laser light promoted bacterial photoinactivation evaluated with an optical density at 600 nm. In contrast, free CUR at 200 µM combined with 6, 18, and 30 J cm⁻² was ineffective in the photoinactivation of *P. aeruginosa*.⁶⁶ Another study⁶⁷ showed a 1-log reduction of planktonic *P. aeruginosa* after aPDT mediated by 120 µM CUR, combined with 10 J cm⁻² of blue light. Furthermore, combining 100 µM CUR with the cationic polypeptide polymyxin B enhanced the effect of aPDT, decreasing 2 log⁶⁷. The CUR-mediated aPDT caused membrane depolarization, morphological deformation, and DNA and protein damage in the bacterium.⁶⁷

A similar pattern of low decrease was observed also in *C. albicans*, the results found in the present study showed lower decrease in colony count compared to a recent study⁶⁸ reported that aPDT mediated by free CUR at 50 µM decreased the viability of planktonic *C. albicans* by 3 log. Furthermore, a water-soluble positively-charged CUR derivative at 100 µM increased the photodynamic effect, reducing fungal viability by 6 log⁶⁸. A complex formed by CUR and sophorolipid (a surfactant from non-pathogenic yeast) at 100 µg/mL inhibited the growth of *C. albicans* by more than 70%, measured with an optical density at 595 nm (OD₅₉₅), while CUR alone at 9.37 µg/mL reduced fungal growth by 47%.⁶⁹

The UV light promoted reduction in the three microorganism incubated with CUR, this result can be explained by the wavelength of the UV light source (369 nm) used in the antimicrobial tests. This

wavelength corresponds to the initial absorption band of CUR.^{29,31} We decided the use of UV light >300 nm in order to minimize the tissue damage in topical applications.⁷⁰

An important aspect of the present study was replacing the UV-A light source used for micelle characterization with the UV light source used in the antimicrobial tests. The well size of the microtiter plate where aPDT was performed required a light source able to irradiate a larger area.⁷¹⁻⁷⁴ Therefore, an LED UV light was used because it can irradiate larger areas than laser lights. Considering that microorganisms grown as biofilm relate to infectious illnesses and require higher concentrations of antimicrobials to kill them, 48-hour biofilms were grown in the presence of a PS irradiated with the same protocol used for planktonic cultures.

In case of both bacteria, MRSA, and *P. aeruginosa*, did not observed significantly affect on the metabolic activity of biofilms. This result may be explained by the incubation of the PS during biofilm formation. A low and non-toxic CUR concentration was used, therefore, bacteria may have metabolized the PS during biofilm growth. Other studies verified the antibiofilm effect of CUR-mediated aPDT^{74,75}.

In *C. albicans* biofilm, aPDT reduction on metabolic activity by 59% compared with the untreated control group was observed. This result agrees with another one in which aPDT mediated by 5 μM CUR and 37.5 J cm⁻² of light decreased the metabolic activity of the *C. albicans* biofilm by up to 29%.²¹

Biofilms are complex microorganism communities embedded in a self-produced polymeric matrix. Although aPDT did not reduce the metabolic activity of the MRSA biofilm, the reduction of biofilm biomass may be attributed to a potential effect of aPDT on the biofilm matrix. The results of biofilm biomass agree with those from other studies, which used higher CUR concentrations against biofilms. A previous study showed that 256 $\mu\text{g/mL}$ of CUR decreased the viability of a 48-hour-old MRSA biofilm by 54%.⁷⁶ In another study⁷⁸, 2500 $\mu\text{g/mL}$ of CUR alone reduced by 28% the biofilm biomass of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), while CUR combined with 20 J cm⁻² of light reduced biofilm biomass by 80%.⁷⁷ For *C. albicans*, 9.37 $\mu\text{g/mL}$ of a CUR-sophorolipid nanocomplex decreased biofilm biomass when added before and after the adhesion phase of fungal cells.⁶⁹ Therefore, the reduction of biofilm biomass observed in our study for MRSA and *C. albicans* is promising, considering that a low concentration of CUR was used.

On the other hand, in *P. aeruginosa* biofilm was not observed significant difference among aPDT groups and control group. This result may be attributed to the low concentration of CUR-loaded micelles used against the bacterial biofilm, since higher of CUR (200 µg/mL) combined with 20 µg/mL of silver nanoparticles (AgNP) irradiated at 10 J cm⁻² inhibited the biofilm formation of *P. aeruginosa* by 85%. Conversely, aPDT mediated by CUR and AgNP irradiation decreased biofilm formation by 50% and 60%, respectively.⁷⁸ In another study⁷⁴, aPDT mediated by 6.75 mM CUR and 5 and 10 J cm⁻² of light inhibited the biofilm formation of *P. aeruginosa* by 40% and 70%, respectively. Therefore, our results from biofilm biomass showed that MRSA and *C. albicans* were more susceptible to aPDT mediated by free CUR and CUR-loaded micelles than *P. aeruginosa*.

Conclusion

This study designed an efficient photo-responsive polymeric micelle for the loading and light-triggered release of CUR. The nanoscale of CUR-loaded photo-responsive micelles, its polydispersity index, and low cytotoxicity in vitro is a proof-of-concept of its applicability as a photo-responsive system for aPDT. Moreover, the low CMC values of PRP guarantee its self-aggregation into micelles even at low concentrations and prevent the early release of CUR by dilution effects. The high association constant between CUR and polymeric micelles favors an efficient drug loading, and photocleavage releases CUR efficiently during light therapy. Finally photo-responsive polymeric micelles showed a broad-spectrum antimicrobial photodynamic effect against pathogenic microorganisms and biofilms. These findings approve the CUR-loaded photo-responsive micelle for antimicrobial photodynamic therapy.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Institute of Chemistry (UNESP) for the FEG-SEM and Dr. Paula Aboud Barbulgi and Freddy Marin for their support in the cytotoxicity assay. Author J.K.T.-G received a doctorate scholarship from the National Council for Scientific and Technological Development - Process 142184/2018-7. Author I.R.C. received a FAPESP Post-Doc fellowship (2020/04507-6).

Disclosure

The authors declare the competing financial interest of a patent deposited on the National Institute for Industrial Property (INPI, Brazil) on December 15, 2021, process number BR 10 2021 025155 7, entitled *Desenvolvimento de Micela Polimérica Fotoativada com Curcumina e suas Aplicações* (Development of a Polymeric Micelle Photoactivated with Curcumin and its Applications). There are no other competing interests.

References

1. Hiller CX, Hübner U, Fajnorova S, Schwartz T, Drewes JE. Antibiotic Microbial Resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review. *Sci Total Environ*. 2019;685:596-608. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.315
2. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*. 2020;25(6):1340. doi: 10.3390/molecules25061340.
3. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;(76)8. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3.
4. Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial resistance. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2020;30(4):619-635. doi: 10.1016/j.giec.2020.06.004.
5. McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Microbiol Spectr*. 2018;6(2). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.
6. Lee AS, Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18033. doi: 10.1038/nrdp.2018.33.
7. Jubeh B, Breijyeh Z, Karaman R. Resistance of Gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*. 2020;25(12):2888. doi: 10.3390/molecules25122888.
8. World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and

- development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. *World Health Organization; Geneva, Switzerland*. 2017;79.
9. Bisht K, Baishya J, Wakeman CA. *Pseudomonas aeruginosa* polymicrobial interactions during lung infection. *Curr Opin Microbiol*. 2020;53:1-8.doi:10.1016/j.mib.2020.01.014.
 10. Kollef MH, Torres A, Shorr AF, Martin-Loeches I, Micek ST. Nosocomial Infection. *Crit Care Med*. 2021;49(2):169-187. doi: 10.1097/CCM.0000000000004783.
 11. Raja NS. Epidemiology, risk factors, treatment and outcome of *Candida* bloodstream infections because of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in two district general hospitals in the United Kingdom. *Int J Clin Pract*. 2021;75(1):e13655. doi: 10.1111/ijcp.13655.
 12. Martinez RM, Wolk DM. Bloodstream infections. *Microbiol Spectr*. 2016;4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0031-2016.
 13. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:71–92.doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.
 14. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018;4:18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26.
 15. Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng, L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 2020;11(1):337–348.doi: 10.1080/21505594.2020.1748930.
 16. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Hall-Stoodley L, Stoodley P. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol*. 2017;15(12):740–755. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99
 17. Hamblin MR, Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33:67-73.doi:10.1016/j.mib.2016.06.008.
 18. Hamblin MR, Abrahamse, H. Oxygen-Independent Antimicrobial Photoinactivation: Type III Photochemical Mechanism?. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(2):53. doi: 10.3390/antibiotics9020053.
 19. Warriar A, Mazumder N, Prabhu S, Satyamoorthy K, Murali TS. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021;33:102090. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102090.
 20. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa M. Curcumin and health. *Molecules*. 2016;21(3):264. doi: 10.3390/molecules21030264.

21. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011;87(4):895-903. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x. Epub 2011
22. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011;43(9):927-34. doi: 10.1002/lsm.21110.
23. Quishida CC, Mima EGO, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci.* 2016;31:997-1009. doi: 10.1007/s10103-016-1942-7.
24. Trigo-Gutierrez JK, Vega-Chacón Y, Soares AB, Mima EGO. Antimicrobial activity of curcumin in nanoformulations: a comprehensive review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13): 7130. doi: 10.3390/ijms22137130.
25. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules.* 2014;19(12):20091-20112. doi: 10.3390/molecules191220091.
26. Calori IR, Tedesco AC. Aluminum chloride phthalocyanine in MCF-7: rationally accounting for state of aggregation of photosensitizers inside cells. *Dyes Pigm.* 2020; 173:107940. doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107940
27. Trigo Gutierrez, JK, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui MIC, Sanitá PV, Pavarina AC, et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PLoS One.* 2017;12:e0187418. doi:10.1371/journal.pone.0187418. eCollection 2017.
28. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis.* 2009;34(1):1-10. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.006. Epub 2008 Dec 3.
29. Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by curcumin-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. *Molecules.* 2018;23(8):2075. doi: 10.3390/molecules23082075.
30. Fomina N, Sankaranarayanan J, Almutairi A. Photochemical mechanisms of light-triggered release from nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(11):1005-1020. doi.org/10.1016/j.addr.2012.02.006.
31. Mai Z, Chen J, Cao Q, Hu Y, Dong X, Zhang H, et al. Rational design of hollow mesoporous

- titania nanoparticles loaded with curcumin for UV-controlled release and targeted drug delivery. *Nanotechnology*. 2021;32(20):205604. doi: 10.1088/1361-6528/abe4fe.
32. Duan Y, He K, Zhang G, Hu J. Photoresponsive micelles enabling codelivery of nitric oxide and formaldehyde for combinatorial antibacterial applications. *Biomacromolecules*. 2021;22(5):2160-2170. doi: 10.1021/acs.biomac.1c00251.
 33. Ye Y, Li Y, Fang F. Upconversion nanoparticles conjugated with curcumin as a photosensitizer to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in lung under near infrared light. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:5157-5165. doi: 10.2147/IJN.S71365.
 34. Liu J, Yu M, Zeng G, Cao J, Wang Y, Ding T, et al. Dual antibacterial behavior of a curcumin-upconversion photodynamic nanosystem for efficient eradication of drug-resistant bacteria in a deep joint infection. *J Mater Chem B*. 2018;6:7854-7861. doi: 10.1039/c8tb02493f.
 35. Alexandridis P, Holzwarth JF, Hatton TA. Micellization of Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules*. 1994;27:2414-2425.
 36. Neises B, Steglich W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1978;17:522-524.
 37. Ding L, Shi L, Zhang T, Zeng Y, Yin Y. Synthesis of photoresponsive polymeric propesticide micelles based on PEG for the controlled release of a herbicide. *Polym Chem*. 2016;7:899-904. doi:10.1039/C5PY01690H.
 38. Sahu A, Kasoju N, Goswami P, Bora, U. Encapsulation of curcumin in pluronic block copolymer micelles for drug delivery applications. *J Biom App*. 2011;25(6):619-639. doi: 10.1177/0885328209357110.
 39. Boruah B, Saikia PM, Dutta RK. Binding and stabilization of curcumin by mixed chitosan–surfactant systems: A spectroscopic study. *J Photochem Photobio A: Chem*. 2012;245:18-27. doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.07.004.
 40. Calori IR, Tedesco AC. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. *J Photochem Photobiol B*. 2016;160:240-247.

41. Kumar A, Kaur G, Kansal SK, Chaudhary GR, Mehta SK. Enhanced solubilization of curcumin in mixed surfactant vesicles. *Food. Chem.* 2016;199:660-666. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.077.
42. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6). doi: 10.1101/pdb.prot095505.
43. Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(2):331–336.
44. Trigo-Gutierrez JK, Sanitá PV, Tedesco AC, Pavarina AC, Mima EG. Effect of chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;24:212-219.
45. Shi L, Zhang J, Zhao M, Tang S, Cheng X, Zhang W, et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscal.* 2021;13(24):10748-10764.
46. Veronese FM, Gianfranco P. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today.* 2005;10(21):1451-1458.
47. Hou W, Liu R, Bi S, He Q, Wang H, Gu J. Photo-responsive polymersomes as drug delivery system for potential medical applications. *Molecules.* 2020;25(21):5147.
48. Liu X, He J, Niu Y, Li Y, Hu D, Xia X, et al. Photo-responsive amphiphilic poly(α -hydroxy acids) with pendent *o*-nitrobenzyl ester constructed via copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Pol Adv Tech.* 2015;26(5):449-456. doi.org/10.1002/pat.3472.
49. De Smet Y, Deriemaeker L, Finsy R. Ostwald ripening of alkane emulsions in the presence of surfactant micelles. *Langmuir.* 1999;15:6745-6754.
50. Kabalnov A. Ostwald ripening and related phenomena. *J Dispers Sci Technol.* 2001;22(1):1-12, doi: 10.1081/DIS-100102675.
51. Zhao C, Shuai S, Zhou S, Liu Y, Huo W, Zhu H, et al. Synthesis and characterization of photo-responsive flower-like copolymer micelles with *o*-nitrobenzyl as the junction point. *Mater Lett.* 2020;261(15):127151. doi:10.1016/j.matlet.2019.127151.
52. Saxena V, Hussain MD. Polymeric mixed micelles for delivery of curcumin to multidrug resistant ovarian cancer. *J Biomed Nanotechnol.* 2013;9(7):1146-1154. doi:

- 10.1166/jbn.2013.1632.
53. Thapa, R.K.; Cazzador, F.; Grønlien, K.G.; Tønnesen, H.H. Effect of curcumin and cosolvents on Pluronic micellization F127 in aqueous solution. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces*. 2020, 195, 111250. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111250.
 54. Naksuriya, O.; Shi, Y.; van Nostrum, C. F.; Anuchapreeda, S.; Hennink, W. E.; Okonogi, S. HPMA-based polymeric micelles for curcumin solubilization and inhibition of cancer cell growth. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015, 94, 501–512. doi:10.1016/j.ejpb.2015.06.010.
 55. Sahu, A.; Kasoju, N.; Goswami, P.; Bora, U. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications. *J. Biom. App.* 2011, 25(6), 619-639. doi: 10.1177/0885328209357110.
 56. Akbar MU, Zia KM, Nazir A, Iqbal J, Ejaz AS, Akash MSH. Pluronic-Based Mixed Polymeric Micelles Enhance the Therapeutic Potential of Curcumin. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2018;19(6):2719-2739. doi: 10.1208/s12249-018-1098-9.
 57. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. *In Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy; Springer: Boston.* 2006:pp 27-61.
 58. Holmes PC, Jones DG. Reagents for combinatorial organic synthesis: development of a new o-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase synthesis. *J Org Chem.* 1995;60(8): 2318–2319.
 59. Cao Z, Li Q, Wan, G. Photodegradable polymer nanocapsules fabricated from dimethyldiethoxysilane emulsion templates for controlled release. *Polym Chem.* 2017;8(44):6817–823. doi:10.1039/c7py01153a.
 60. Ye Z, Guo J, Wu D, Tan M, Xiong X, Yin Y, et al. Photo-responsive shell cross-linked micelles based on carboxymethyl chitosan and their application in controlled release of pesticide. *Carbohydr Polym.* 2015;132(5):520-528. doi:/10.1016/j.carbpol.2015.06.077.
 61. Deshmukh AS, Chauhan PN, Noolvi MN, Chaturvedi K, Ganguly K, Shukla SS, et al. Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm.* 2017;532(1):249-268. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.00.
 62. Zhao X, Si J, Huang D, Li K, Xin Y, Sui M. Application of star poly(ethylene glycol) derivatives in drug delivery and controlled release. *J Control Release.* 2020;10(323):565-577. doi:10.1016/j.jconrel.2020.04.039).

63. Winter S, Tortik N, Kubin A, Krammer B, Plaetzer K. Back to the roots: photodynamic inactivation of bacteria based on water-soluble curcumin bound to polyvinylpyrrolidone as a photosensitizer. *Photochem Photobiol Sci.* 2013;12(10):1795-802. doi: 10.1039/c3pp50095k.
64. Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers. Surg. Med.* 2012, 44(6), 490-499. doi: 10.1002/lsm.22045.
65. Ribeiro AP, Andrade MC, Bagnato VS, Vergani CE, Primo FL, Tedesco AC, Pavarina AC. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. *Lasers Med Sci.* 2015;30(2):549-59. doi: 10.1007/s10103-013-1354-x
66. Rupel K, Zupin L, Brich S, Mardirossian M, Ottaviani G, Gobbo M, et al. Antimicrobial activity of amphiphilic nanomicelles loaded with curcumin against *Pseudomonas aeruginosa* alone and activated by blue laser light. *J Biophotonics.* 2020;14(3):e202000350. doi: 10.1002/jbio.202000350.
67. Zhou F, Lin S, Zhang J, Kong Z, Tan BK, Hamzah SS, et al. Enhancement of photodynamic bactericidal activity of curcumin against *Pseudomonas aeruginosa* using polymyxin B. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;8(37):102677. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102677.
68. Schamberger B, Plaetzer K. Photofungizides based on curcumin and derivatives Thereof against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(11):1315. doi: 10.3390/antibiotics10111315.
69. Rajasekar V, Darne P, Prabhune A, Kao RYT, Solomon AP, Ramage G, et al. A curcumin-sophorolipid nanocomplex inhibits *Candida albicans* filamentation and biofilm development. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021;200:111617. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111617.
70. Kim MS, Diamond SL. Photocleavage of o-nitrobenzyl ether derivatives for rapid biomedical release applications. *Bioorganic Med Chem Let.* 2006;16(15):4007-4010.
71. de Oliveira EF, Tosati JV, Tikekar RV, Monteiro AR, Nitin N. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation. *Postharvest Biol Techn.* 2018;137:86-94. Doi:10.1016/j.postharvbio.2017.11.014.
72. Rosa LP, da Silva FC. Antimicrobial photodynamic therapy: a new therapeutic option to

- combat infections. *J Med Microb Diagn*. 2014;3:158. doi: 10.4172/2161-0703.1000158.
73. Araújo TSD, Rodrigues PLF, Santos MS, Oliveira JM, Rosa LP, Bagnato VS, et al. Reduced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:219-223. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.011.
 74. Abdulrahman H, Misba L, Ahmad S, Khan AU. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: an approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;30:101645. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101645.
 75. Ribeiro IP, Pinto JG, Souza BMN, Miñán AG, Ferreira-Strixino J. Antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022;16:37, 102729. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102729.
 76. Batista de Andrade Neto J, Pessoa de Farias Cabral V, Brito Nogueira LF, Rocha da Silva C, Gurgel do Amaral Valente Sá L, Ramos da Silva A, et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. *Microb Pathog*. 2021;155:104892. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104892.
 77. Akhtar F, Khan AU. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) against vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) biofilm disruption: A putative role of phagocytosis in infection control. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021;36:102552. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102552.
 78. Ghasemi M, Khorsandi K, Kianmehr Z. Photodynamic inactivation with curcumin and silver nanoparticles hinders *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm formation: evaluation of glutathione peroxidase activity and ROS production. *World J Microbiol Biotechnol*. 2021;37(9):149. doi: 10.1007/s11274-021-03104-4.

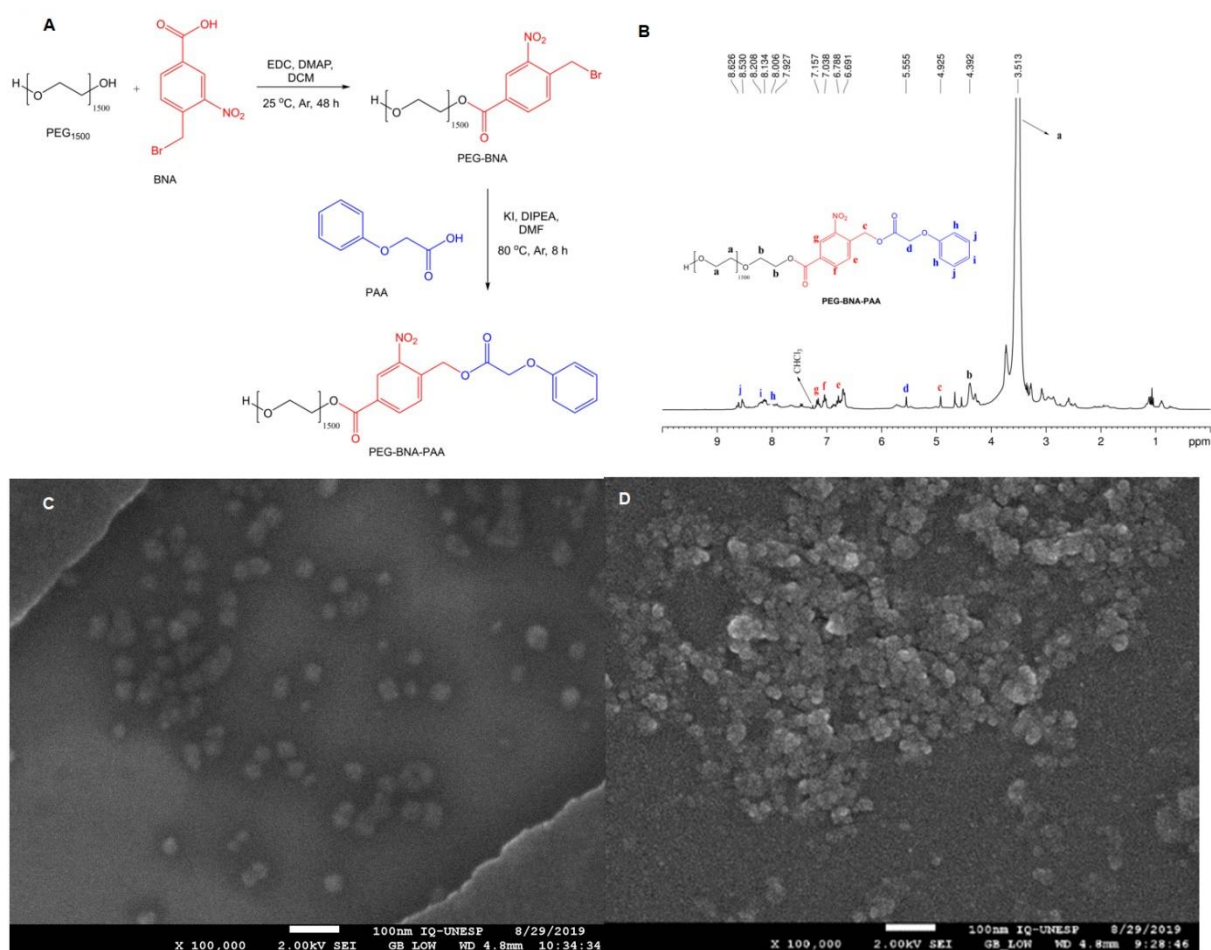


Figure 1: A) Synthetic PRP route; B) NMR spectra from the photosensitive polymer (PEG-BNA-PAA); C) SEM-FEG images of PRP micelles; D) CUR-loaded PRP micelles]

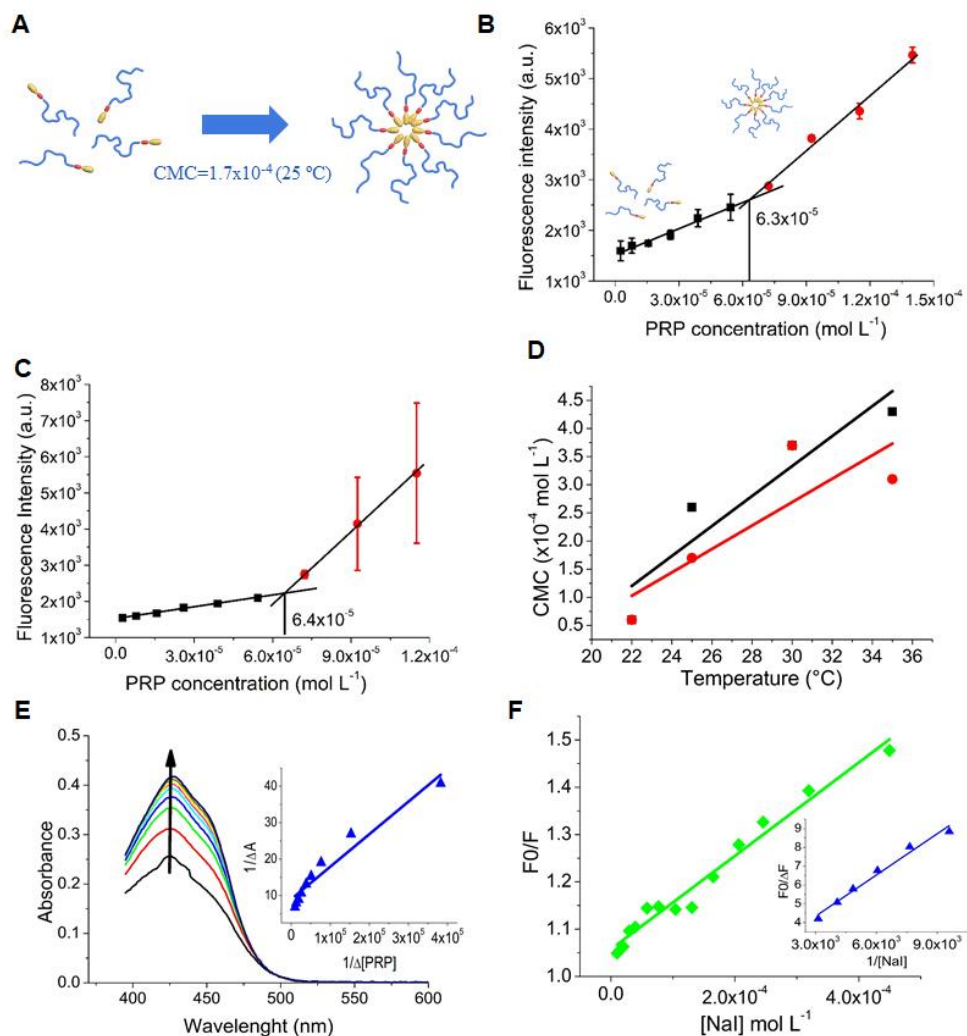


Figure 2: A) Micelle formation at 25°C; B) CMC of PRP at 22°C in the presence of pyrene; C) CMC of PRP at 22°C in the presence of CUR; D) Linear fitting of CMC versus temperature: PRP (■); CUR-loaded PRP (●); E) Ks of PRP to CUR, the arrow indicates an increase in absorption spectra; F) Fluorescence quenching of free CUR (◆) and CUR-loaded PRP micelles (▲)

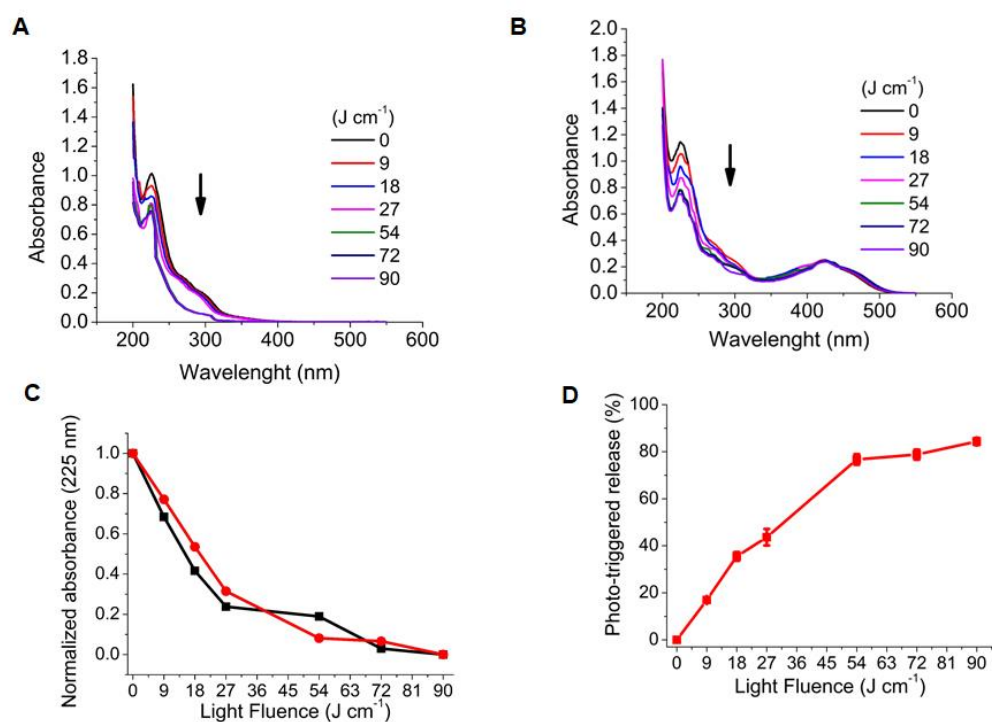


Figure 3: Photodegradation of PRP after irradiation with a UV laser light (355 nm). (A): Without CUR; (B): With CUR, arrows indicate decreased absorption spectra; (C): Normalized absorbance of photodegradation of PRP with CUR (●) and without CUR (■); (D): CUR ● release from PRP micelles.

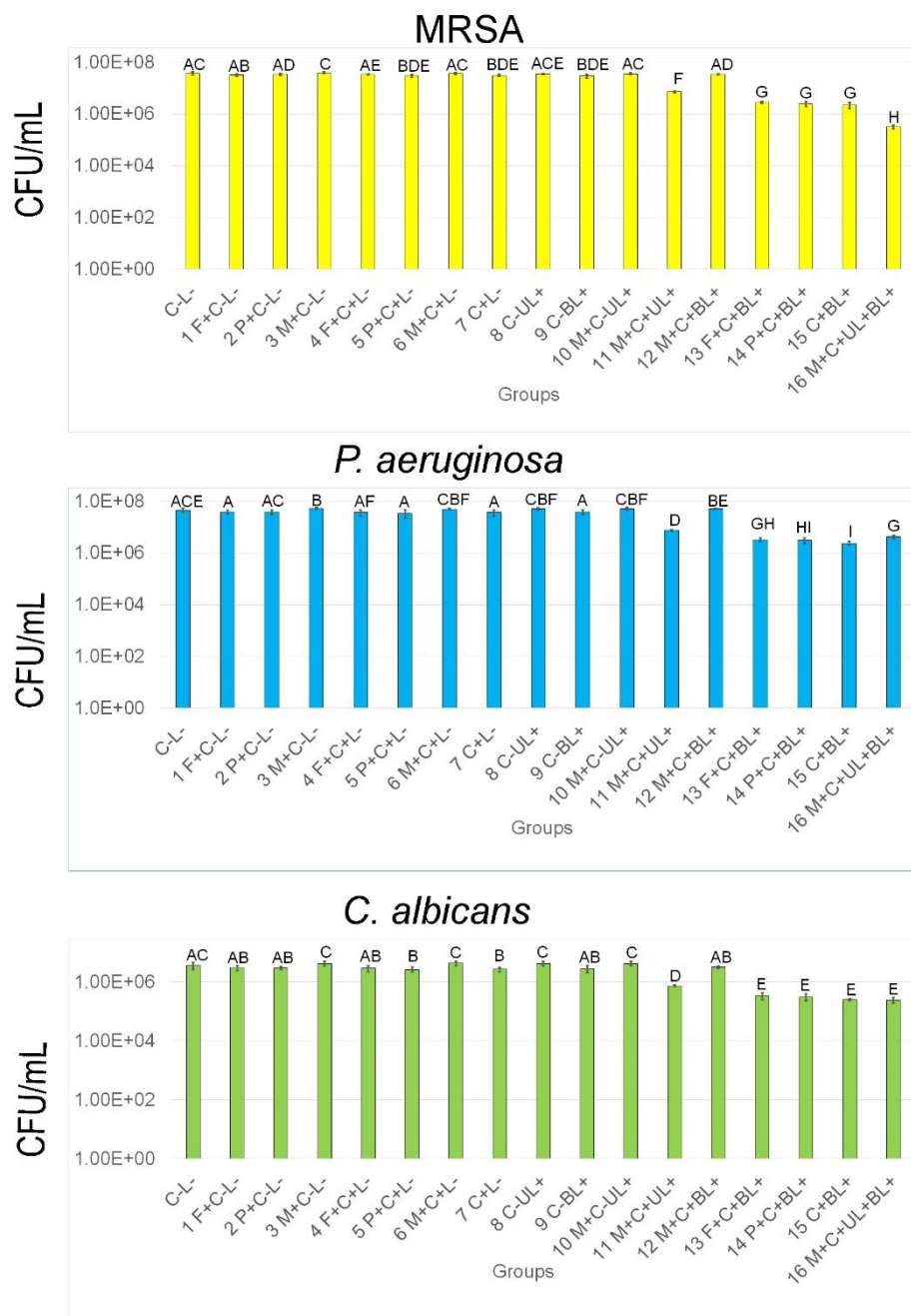


Figure 4: CFU/mL values of planktonic cultures of MRSA (A), *P. aeruginosa* (B), and *C. albicans* (C). Error bars: standard deviation (n = 12). Different letters denote significant differences (p<0.05) among the groups. The data was analyzed by ANOVA/Welch and Games-Howell post-hoc tests.

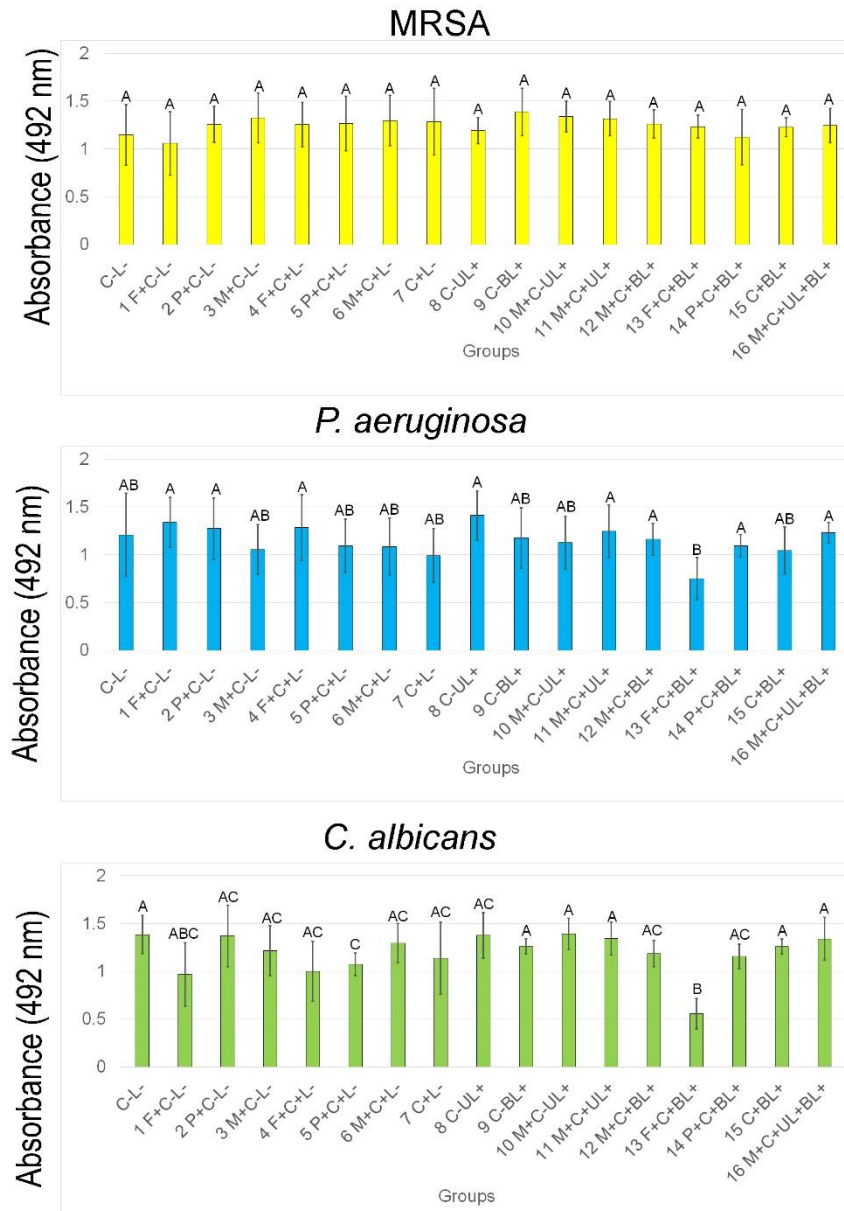


Figure 5: Biofilm viability (metabolic activity) of MRSA (A), *P. aeruginosa* (B), and *C. albicans* (C). Error bars: standard deviation (n = 12). Different letters denote significant differences (p<0.05) among the groups. The data was analyzed by ANOVA/Welch and Games-Howell post-hoc tests.

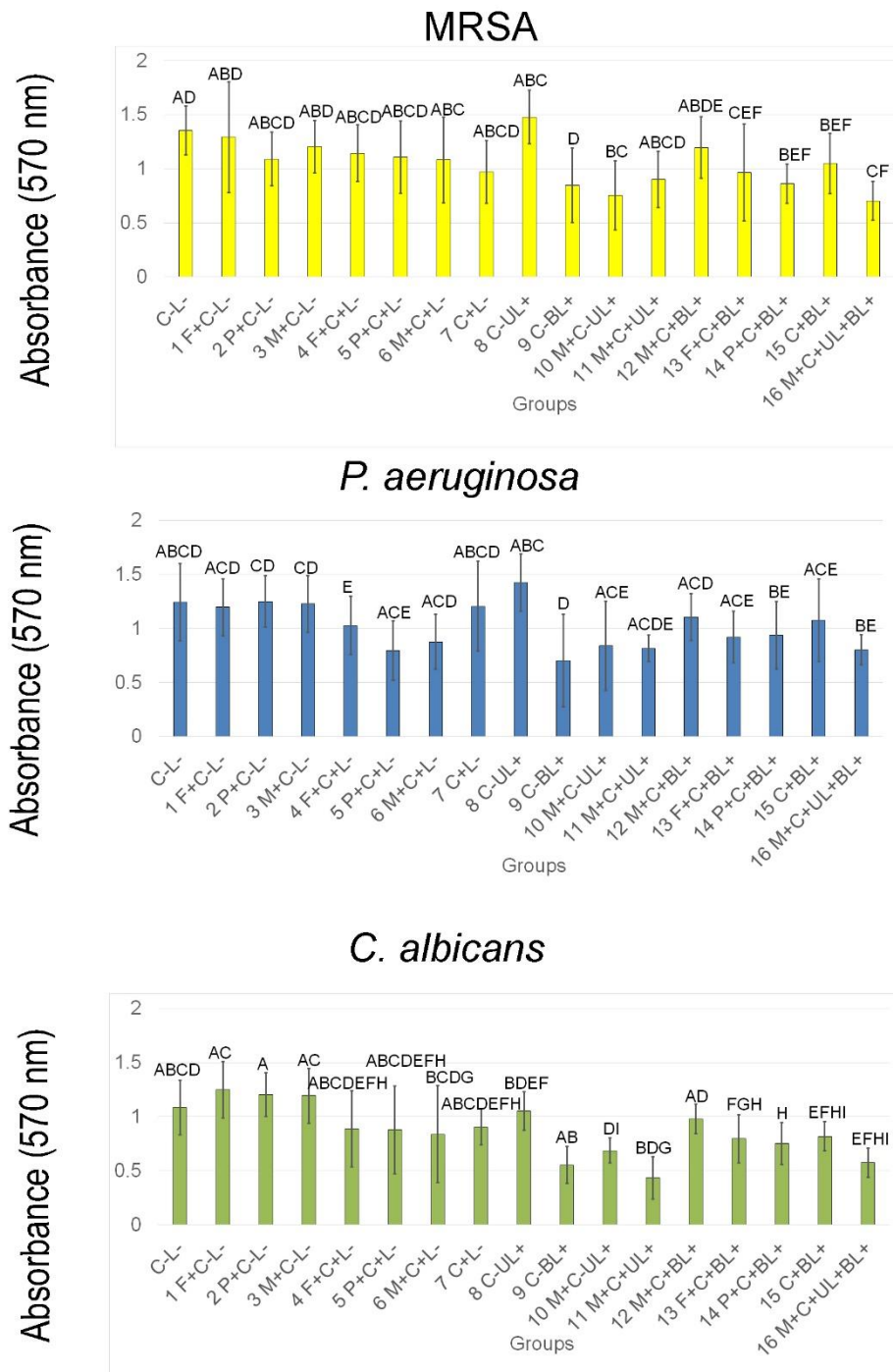


Figure 6: Biofilm viability (metabolic activity) of MRSA (A), *P. aeruginosa* (B), and *C. albicans* (C). Error bars: standard deviation (n = 12). Different letters denote significant differences (p<0.05) among the groups. The data was analyzed by ANOVA/Welch and Games-Howell post-hoc tests.

OUT-PUT DA ANÁLISE ESTATÍSTICA UFC/mL *Candida albicans*

Tests of Normality						
grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Controlee	,174	24	,059	,931	24	,102
F127 vazia	,155	12	,200 [*]	,941	12	,508
P123 vazia	,248	12	,040	,850	12	,037
FS vazia	,271	12	,015	,864	12	,055
F127/CUR	,262	12	,022	,861	12	,050
P123/CUR	,172	12	,200 [*]	,914	12	,240
FS/CUR	,136	12	,200 [*]	,955	12	,711
CUR livre	,140	12	,200 [*]	,968	12	,886
UFC Luz UV	,286	12	,008	,830	12	,021
Luz azul	,190	12	,200 [*]	,905	12	,182
FSvazia+UV	,251	12	,035	,861	12	,050
FS/CUR+UV	,180	12	,200 [*]	,887	12	,107
FS/CUR+Azul	,166	12	,200 [*]	,926	12	,340
PDTF127	,177	12	,200 [*]	,925	12	,330
PDTP123	,200	12	,199	,854	12	,041
PDTlivre	,223	12	,102	,891	12	,122
FS/CUR+UV+Azul	,169	12	,200 [*]	,913	12	,231

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Based on Mean	9,574	16	199	,000
Based on Median	4,751	16	199	,000
Based on Median and with adjusted df	4,751	16	111,401	,000
Based on trimmed mean	8,985	16	199	,000

ANOVA

UFC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6451842088009 25,900	16	4032401305005 7,870	122,383	,000
Within Groups	6556878008333 3,336	199	329491357202, 680		
Total	7107529888842 59,200	215			

Robust Tests of Equality of Means

UFC

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	446,584	16	70,295	,000

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: UFC
Games-Howell

(I) grupo		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Controle	F127 vazia	583750,00000	254788,30786	,659	-369130,0476	1536630,0476
	P123 vazia	655416,66667	217798,12033	,238	-161392,9051	1472226,2384
	FS vazia	-554583,33333	284132,84879	,851	-1629397,0264	520230,3598
	F127/CUR	677083,33333	273432,00548	,538	-352387,0830	1706553,7497
	P123/CUR	944583,33333*	248596,25802	,043	16248,1259	1872918,5408
	FS/CUR	-712916,66667	272026,46003	,446	-1736496,3120	310662,9787
	CUR livre	926250,00000*	232073,65277	,026	60369,4628	1792130,5372
	Luz UV	-580416,66667	285336,23353	,810	-1660378,9466	499545,6133
	Luz azul	777083,33333	290571,38243	,416	-325378,9510	1879545,6176
	FSvazia+UV	-666250,00000	268080,36449	,532	-1673382,4026	340882,4026
	FS/CUR+UV	-3607916,66667*	229549,75915	,000	-4464736,6077	-2751096,7256
	FS/CUR+Azul	468750,00000	213427,20711	,718	-334259,3705	1271759,3705
	PDTF127	3251250,00000*	196832,64312	,000	2493345,2817	4009154,7183

F127 vazia	PDTP123	3270083,33333*	196379,35100	,000	2513210,9979	4026955,6688
	PDTlivre	3327000,00000*	195359,16904	,000	2572404,6941	4081595,3059
	FS/CUR+UV+Azul	3338750,00000*	195791,06831	,000	2583198,6419	4094301,3581
	Controle	-583750,00000	254788,30786	,659	-1536630,0476	369130,0476
	P123 vazia	71666,66667	190020,59963	1,000	-685764,7427	829098,0760
	FS vazia	-1138333,33333*	263445,02810	,021	-2167171,9555	-109494,7112
	F127/CUR	93333,33333	251866,76773	1,000	-887211,5352	1073878,2019
	P123/CUR	360833,33333	224659,53478	,959	-511793,0520	1233459,7186
	FS/CUR	-1296666,66667*	250340,17261	,003	-2270927,7457	-322405,5876
	CUR livre	342500,00000	206227,99852	,946	-464310,6573	1149310,6573
	Luz UV	-1164166,66667*	264742,46587	,018	-2198479,2295	-129854,1039
	Luz azul	193333,33333	270376,65460	1,000	-864875,2522	1251541,9189
	FSvazia+UV	-1250000,00000*	246046,51773	,004	-2206707,8204	-293292,1796
	FS/CUR+UV	-4191666,66667*	203383,62518	,000	-4989115,1478	-3394218,1855
	FS/CUR+Azul	-115000,00000	184994,53991	1,000	-859490,6281	629490,6281
P123 vazia	PDTF127	2667500,00000*	165574,44388	,000	1956259,1179	3378740,8821
	PDTP123	2686333,33333*	165035,31915	,000	1975500,3581	3397166,3085
	PDTlivre	2743250,00000*	163820,05981	,000	2033203,1715	3453296,8285
	FS/CUR+UV+Azul	2755000,00000*	164334,86999	,000	2044643,0946	3465356,9054
	Controle	-655416,66667	217798,12033	,238	-1472226,2384	161392,9051
	F127 vazia	-71666,66667	190020,59963	1,000	-829098,0760	685764,7427
	FS vazia	-1210000,00000*	227864,48214	,005	-2136340,9013	-283659,0987
	F127/CUR	21666,66667	214373,05820	1,000	-844270,6993	887604,0326
	P123/CUR	289166,66667	181633,82383	,959	-431215,4215	1009548,7548
	FS/CUR	-1368333,33333*	212577,37747	,001	-2226240,8244	-510425,8423
	CUR livre	270833,33333	158268,52741	,933	-348218,0610	889884,7277
	Luz UV	-1235833,33333*	229363,27654	,005	-2168890,0564	-302776,6102
	Luz azul	121666,66667	235844,17472	1,000	-840436,3147	1083769,6481
	FSvazia+UV	-1321666,66667*	207503,80306	,001	-2156904,3187	-486429,0147

FS vazia	FS/CUR+UV	-4263333,33333*	154543,96910	,000	-4866641,9910	-3660024,6757
	FS/CUR+Azul	-186666,66667	129390,56840	,983	-689750,0948	316416,7615
	PDTF127	2595833,33333*	99668,63026	,000	2174479,0493	3017187,6174
	PDTP123	2614666,66667*	98770,42047	,000	2194300,5407	3035032,7927
	PDTlivre	2671583,33333*	96726,16703	,000	2252880,8668	3090285,7998
	FS/CUR+UV+Azul	2683333,33333*	97595,53724	,000	2264027,6722	3102638,9945
	Controle	554583,33333	284132,84879	,851	-520230,3598	1629397,0264
	F127 vazia	1138333,33333*	263445,02810	,021	109494,7112	2167171,9555
	P123 vazia	1210000,00000*	227864,48214	,005	283659,0987	2136340,9013
	F127/CUR	1231666,66667*	281516,00776	,018	137968,7713	2325364,5620
	P123/CUR	1499166,66667*	257461,26020	,001	490338,3179	2507995,0154
	FS/CUR	-158333,33333	280151,02348	1,000	-1246935,8888	930269,2222
	CUR livre	1480833,33333*	241545,81618	,001	520409,8730	2441256,7937
	Luz UV	-25833,33333	293092,07968	1,000	-1163785,1509	1112118,4842
	Luz azul	1331666,66667*	298191,09526	,014	173699,6966	2489633,6367
F127/CUR	FSvazia+UV	-111666,66667	276320,97790	1,000	-1186127,5165	962794,1831
	FS/CUR+UV	-3053333,33333*	239121,92064	,000	-4007131,0548	-2099535,6119
	FS/CUR+Azul	1023333,33333*	223690,35236	,022	105544,9913	1941121,6754
	PDTF127	3805833,33333*	207916,54673	,000	2909589,3644	4702077,3023
	PDTP123	3824666,66667*	207487,47072	,000	2928715,5663	4720617,7671
	PDTlivre	3881583,33333*	206522,16814	,000	2986223,1657	4776943,5010
	FS/CUR+UV+Azul	3893333,33333*	206930,76967	,000	2997734,6417	4788932,0250
	Controle	-677083,33333	273432,00548	,538	-1706553,7497	352387,0830
	F127 vazia	-93333,33333	251866,76773	1,000	-1073878,2019	887211,5352
	P123 vazia	-21666,66667	214373,05820	1,000	-887604,0326	844270,6993
	FS vazia	-1231666,66667*	281516,00776	,018	-2325364,5620	-137968,7713
	P123/CUR	267500,00000	245601,07158	,999	-691034,4568	1226034,4568
	FS/CUR	-1390000,00000*	269292,00103	,003	-2435551,9163	-344448,0837
	CUR livre	249166,66667	228862,33236	,999	-655460,3056	1153793,6389
	Luz UV	-1257500,00000*	282730,53077	,015	-2356071,9936	-158928,0064

P123/CUR	Luz azul	100000,00000	288013,04684	1,000	-1019937,7281	1219937,7281
	FSvazia+UV	-1343333,33333*	265305,23683	,004	-2373590,2324	-313076,4343
	FS/CUR+UV	-4285000,00000*	226302,62656	,000	-5182160,2128	-3387839,7872
	FS/CUR+Azul	-208333,33333	209930,84479	1,000	-1064443,1733	647776,5066
	PDTF127	2574166,66667*	193035,94552	,000	1742876,3622	3405456,9712
	PDTP123	2593000,00000*	192573,71670	,000	1762034,7369	3423965,2631
	PDTlivre	2649916,66667*	191533,26550	,000	1819598,3690	3480234,9644
	FS/CUR+UV+Azul	2661666,66667*	191973,77241	,000	1831088,9581	3492244,3753
	Controle	-944583,33333*	248596,25802	,043	-1872918,5408	-16248,1259
	F127 vazia	-360833,33333	224659,53478	,959	-1233459,7186	511793,0520
	P123 vazia	-289166,66667	181633,82383	,959	-1009548,7548	431215,4215
	FS vazia	-1499166,66667*	257461,26020	,001	-2507995,0154	-490338,3179
	F127/CUR	-267500,00000	245601,07158	,999	-1226034,4568	691034,4568
	FS/CUR	-1657500,00000*	244035,28371	,000	-2609468,6953	-705531,3047
	CUR livre	-18333,33333	198527,08896	1,000	-792659,1690	755992,5023
	Luz UV	-1525000,00000*	258788,69935	,001	-2539511,8492	-510488,1508
	Luz azul	-167500,00000	264549,71750	1,000	-1206785,8635	871785,8635
	FSvazia+UV	-1610833,33333*	239628,68477	,000	-2544431,7306	-677234,9361
	FS/CUR+UV	-4552500,00000*	195570,74594	,000	-5316677,7592	-3788322,2408
	FS/CUR+Azul	-475833,33333	176368,92435	,422	-1181875,6663	230208,9996
FS/CUR	PDTF127	2306666,66667*	155877,88214	,000	1637887,1774	2975446,1559
	PDTP123	2325500,00000*	155305,10050	,000	1657168,6311	2993831,3689
	PDTlivre	2382416,66667*	154013,08279	,000	1714936,8282	3049896,5051
	FS/CUR+UV+Azul	2394166,66667*	154560,56150	,000	1726353,4918	3061979,8415
	Controle	712916,66667	272026,46003	,446	-310662,9787	1736496,3120
	F127 vazia	1296666,66667*	250340,17261	,003	322405,5876	2270927,7457
	P123 vazia	1368333,33333*	212577,37747	,001	510425,8423	2226240,8244
	FS vazia	158333,33333	280151,02348	1,000	-930269,2222	1246935,8888
	F127/CUR	1390000,00000*	269292,00103	,003	344448,0837	2435551,9163

CUR livre	P123/CUR	1657500,00000*	244035,28371	,000	705531,3047	2609468,6953
	CUR livre	1639166,66667*	227181,20632	,000	741893,4414	2536439,8919
	Luz UV	132500,00000	281371,43843	1,000	-961019,9251	1226019,9251
	Luz azul	1490000,00000*	286678,99903	,003	374930,9959	2605069,0041
	FSvazia+UV	46666,66667	263856,40417	1,000	-977876,4056	1071209,7389
	FS/CUR+UV	-2895000,00000*	224602,34220	,000	-3784684,2734	-2005315,7266
	FS/CUR+Azul	1181666,66667*	208096,83546	,003	333777,1135	2029556,2198
	PDTF127	3964166,66667*	191039,81155	,000	3141594,0542	4786739,2791
	PDTP123	3983000,00000*	190572,74122	,000	3160757,2984	4805242,7016
	PDTlivre	4039916,66667*	189521,30520	,000	3218329,3034	4861504,0299
	FS/CUR+UV+Azul	4051666,66667*	189966,47764	,000	3229816,7967	4873516,5367
	Controle	-926250,00000*	232073,65277	,026	-1792130,5372	-60369,4628
	F127 vazia	-342500,00000	206227,99852	,946	-1149310,6573	464310,6573
	P123 vazia	-270833,33333	158268,52741	,933	-889884,7277	348218,0610
	FS vazia	-1480833,33333*	241545,81618	,001	-2441256,7937	-520409,8730
	F127/CUR	-249166,66667	228862,33236	,999	-1153793,6389	655460,3056
	P123/CUR	18333,33333	198527,08896	1,000	-755992,5023	792659,1690
	FS/CUR	-1639166,66667*	227181,20632	,000	-2536439,8919	-741893,4414
	Luz UV	-1506666,66667*	242960,22662	,001	-2473341,5482	-539991,7851
	Luz azul	-149166,66667	249087,60274	1,000	-1142977,7502	844644,4168
Luz UV	FSvazia+UV	-1592500,00000*	222440,97503	,000	-2469102,0146	-715897,9854
	FS/CUR+UV	-4534166,66667*	174086,17830	,000	-5210177,0420	-3858156,2913
	FS/CUR+Azul	-457500,00000	152197,49762	,267	-1057024,5035	142024,5035
	PDTF127	2325000,00000*	127890,55848	,000	1779079,5632	2870920,4368
	PDTP123	2343833,33333*	127191,80418	,000	1798535,5272	2889131,1395
	PDTlivre	2400750,00000*	125610,94889	,000	1856576,2634	2944923,7366
	FS/CUR+UV+Azul	2412500,00000*	126281,62170	,000	1867899,0259	2957100,9741
	Controle	580416,66667	285336,23353	,810	-499545,6133	1660378,9466
	F127 vazia	1164166,66667*	264742,46587	,018	129854,1039	2198479,2295
	P123 vazia	1235833,33333*	229363,27654	,005	302776,6102	2168890,0564

Luz azul	FS vazia	25833,33333	293092,07968	1,000	-1112118,4842	1163785,1509
	F127/CUR	1257500,00000*	282730,53077	,015	158928,0064	2356071,9936
	P123/CUR	1525000,00000*	258788,69935	,001	510488,1508	2539511,8492
	FS/CUR	-132500,00000	281371,43843	1,000	-1226019,9251	961019,9251
	CUR livre	1506666,66667*	242960,22662	,001	539991,7851	2473341,5482
	Luz azul	1357500,00000*	299337,96902	,012	195157,9729	2519842,0271
	FSvazia+UV	-85833,33333	277558,23395	1,000	-1165334,8501	993668,1835
	FS/CUR+UV	-3027500,00000*	240550,58373	,000	-3987634,7394	-2067365,2606
	FS/CUR+Azul	1049166,66667*	225216,92685	,019	124536,1266	1973797,2067
	PDTF127	3831666,66667*	209558,06071	,000	2928260,8994	4735072,4340
	PDTP123	3850500,00000*	209132,35261	,000	2947383,9441	4753616,0559
	PDTlivre	3907416,66667*	208174,67747	,000	3004885,9746	4809947,3588
	FS/CUR+UV+Azul	3919166,66667*	208580,04180	,000	3016399,5429	4821933,7904
	Controle	-777083,33333	290571,38243	,416	-1879545,6176	325378,9510
	F127 vazia	-193333,33333	270376,65460	1,000	-1251541,9189	864875,2522
	P123 vazia	-121666,66667	235844,17472	1,000	-1083769,6481	840436,3147
	FS vazia	-1331666,66667*	298191,09526	,014	-2489633,6367	-173699,6966
	F127/CUR	-100000,00000	288013,04684	1,000	-1219937,7281	1019937,7281
	P123/CUR	167500,00000	264549,71750	1,000	-871785,8635	1206785,8635
	FS/CUR	-1490000,00000*	286678,99903	,003	-2605069,0041	-374930,9959
	CUR livre	149166,66667	249087,60274	1,000	-844644,4168	1142977,7502
	Luz UV	-1357500,00000*	299337,96902	,012	-2519842,0271	-195157,9729
	FSvazia+UV	-1443333,33333*	282937,33468	,004	-2544905,6702	-341760,9965
	FS/CUR+UV	-4385000,00000*	246737,80710	,000	-5372624,5895	-3397375,4105
	FS/CUR+Azul	-308333,33333	231813,77496	,990	-1262525,8562	645859,1895
	PDTF127	2474166,66667*	216632,27583	,000	1539903,5785	3408429,7549
	PDTP123	2493000,00000*	216220,49632	,000	1559013,7767	3426986,2233
	PDTlivre	2549916,66667*	215294,35306	,000	1616493,0077	3483340,3256
	FS/CUR+UV+Azul	2561666,66667*	215686,33698	,000	1628015,1738	3495318,1596
	FSvazia+UV	666250,00000	268080,36449	,532	-340882,4026	1673382,4026
	Controle					

FS/CUR+UV	F127 vazia	1250000,00000*	246046,51773	,004	293292,1796	2206707,8204
	P123 vazia	1321666,66667*	207503,80306	,001	486429,0147	2156904,3187
	FS vazia	111666,66667	276320,97790	1,000	-962794,1831	1186127,5165
	F127/CUR	1343333,33333*	265305,23683	,004	313076,4343	2373590,2324
	P123/CUR	1610833,33333*	239628,68477	,000	677234,9361	2544431,7306
	FS/CUR	-46666,66667	263856,40417	1,000	-1071209,7389	977876,4056
	CUR livre	1592500,00000*	222440,97503	,000	715897,9854	2469102,0146
	Luz UV	85833,33333	277558,23395	1,000	-993668,1835	1165334,8501
	Luz azul	1443333,33333*	282937,33468	,004	341760,9965	2544905,6702
	FS/CUR+UV	-2941666,66667*	219806,50352	,000	-3810320,3642	-2073012,9692
	FS/CUR+Azul	1135000,00000*	202911,26089	,003	310348,1700	1959651,8300
	PDFT127	3917500,00000*	185377,71297	,000	3119661,9640	4715338,0360
	PDTP123	3936333,33333*	184896,34005	,000	3138839,8569	4733826,8097
	PDTlivre	3993250,00000*	183812,43700	,000	3196436,8911	4790063,1089
	FS/CUR+UV+Azul	4005000,00000*	184271,40173	,000	3207915,1678	4802084,8322
	Controle	3607916,66667*	229549,75915	,000	2751096,7256	4464736,6077
	F127 vazia	4191666,66667*	203383,62518	,000	3394218,1855	4989115,1478
	P123 vazia	4263333,33333*	154543,96910	,000	3660024,6757	4866641,9910
	FS vazia	3053333,33333*	239121,92064	,000	2099535,6119	4007131,0548
	F127/CUR	4285000,00000*	226302,62656	,000	3387839,7872	5182160,2128
	P123/CUR	4552500,00000*	195570,74594	,000	3788322,2408	5316677,7592
	FS/CUR	2895000,00000*	224602,34220	,000	2005315,7266	3784684,2734
	CUR livre	4534166,66667*	174086,17830	,000	3858156,2913	5210177,0420
	Luz UV	3027500,00000*	240550,58373	,000	2067365,2606	3987634,7394
	Luz azul	4385000,00000*	246737,80710	,000	3397375,4105	5372624,5895
	FSvazia+UV	2941666,66667*	219806,50352	,000	2073012,9692	3810320,3642
	FS/CUR+Azul	4076666,66667*	148320,56465	,000	3493933,9115	4659399,4218
	PDFT127	6859166,66667*	123251,39580	,000	6333666,5874	7384666,7459
	PDTP123	6878000,00000*	122526,18768	,000	6353164,4073	7402835,5927
	PDTlivre	6934916,66667*	120884,33354	,000	6411268,5394	7458564,7940
	FS/CUR+UV+Azul	6946666,66667*	121581,08239	,000	6422570,0483	7470763,2850

FS/CUR+Azul	Controle	-468750,00000	213427,20711	,718	-1271759,3705	334259,3705
	F127 vazia	115000,00000	184994,53991	1,000	-629490,6281	859490,6281
	P123 vazia	186666,66667	129390,56840	,983	-316416,7615	689750,0948
	FS vazia	-1023333,33333*	223690,35236	,022	-1941121,6754	-105544,9913
	F127/CUR	208333,33333	209930,84479	1,000	-647776,5066	1064443,1733
	P123/CUR	475833,33333	176368,92435	,422	-230208,9996	1181875,6663
	FS/CUR	-1181666,66667*	208096,83546	,003	-2029556,2198	-333777,1135
	CUR livre	457500,00000	152197,49762	,267	-142024,5035	1057024,5035
	Luz UV	-1049166,66667*	225216,92685	,019	-1973797,2067	-124536,1266
	Luz azul	308333,33333	231813,77496	,990	-645859,1895	1262525,8562
	FSvazia+UV	-1135000,00000*	202911,26089	,003	-1959651,8300	-310348,1700
	FS/CUR+UV	-4076666,66667*	148320,56465	,000	-4659399,4218	-3493933,9115
	PDTF127	2782500,00000*	89716,14890	,000	2405311,9572	3159688,0428
	PDTP123	2801333,33333*	88717,23325	,000	2425365,1584	3177301,5083
	PDTlivre	2858250,00000*	86435,54190	,000	2484278,5153	3232221,4847
	FS/CUR+UV+Azul	2870000,00000*	87407,32466	,000	2495320,6608	3244679,3392
	PDTF127	Controle	-3251250,00000*	196832,64312	,000	-4009154,7183
F127 vazia		-2667500,00000*	165574,44388	,000	-3378740,8821	-1956259,1179
P123 vazia		-2595833,33333*	99668,63026	,000	-3017187,6174	-2174479,0493
FS vazia		-3805833,33333*	207916,54673	,000	-4702077,3023	-2909589,3644
F127/CUR		-2574166,66667*	193035,94552	,000	-3405456,9712	-1742876,3622
P123/CUR		-2306666,66667*	155877,88214	,000	-2975446,1559	-1637887,1774
FS/CUR		-3964166,66667*	191039,81155	,000	-4786739,2791	-3141594,0542
CUR livre		-2325000,00000*	127890,55848	,000	-2870920,4368	-1779079,5632
Luz UV		-3831666,66667*	209558,06071	,000	-4735072,4340	-2928260,8994
Luz azul		-2474166,66667*	216632,27583	,000	-3408429,7549	-1539903,5785
FSvazia+UV		-3917500,00000*	185377,71297	,000	-4715338,0360	-3119661,9640
FS/CUR+UV		-6859166,66667*	123251,39580	,000	-7384666,7459	-6333666,5874
FS/CUR+Azul		-2782500,00000*	89716,14890	,000	-3159688,0428	-2405311,9572
PDTP123		18833,33333	32598,52974	1,000	-108133,9936	145800,6603
PDTlivre		75750,00000	25749,16641	,327	-33033,1447	184533,1447

PDTP123	FS/CUR+UV+Azul	87500,00000	28843,66604	,263	-27565,1976	202565,1976
	Controle	-3270083,33333*	196379,35100	,000	-4026955,6688	-2513210,9979
	F127 vazia	-2686333,33333*	165035,31915	,000	-3397166,3085	-1975500,3581
	P123 vazia	-2614666,66667*	98770,42047	,000	-3035032,7927	-2194300,5407
	FS vazia	-3824666,66667*	207487,47072	,000	-4720617,7671	-2928715,5663
	F127/CUR	-2593000,00000*	192573,71670	,000	-3423965,2631	-1762034,7369
	P123/CUR	-2325500,00000*	155305,10050	,000	-2993831,3689	-1657168,6311
	FS/CUR	-3983000,00000*	190572,74122	,000	-4805242,7016	-3160757,2984
	CUR livre	-2343833,33333*	127191,80418	,000	-2889131,1395	-1798535,5272
	Luz UV	-3850500,00000*	209132,35261	,000	-4753616,0559	-2947383,9441
	Luz azul	-2493000,00000*	216220,49632	,000	-3426986,2233	-1559013,7767
	FSvazia+UV	-3936333,33333*	184896,34005	,000	-4733826,8097	-3138839,8569
	FS/CUR+UV	-6878000,00000*	122526,18768	,000	-7402835,5927	-6353164,4073
	FS/CUR+Azul	-2801333,33333*	88717,23325	,000	-3177301,5083	-2425365,1584
	PDTF127	-18833,33333	32598,52974	1,000	-145800,6603	108133,9936
	PDTlivre	56916,66667	22017,71268	,495	-35287,0412	149120,3745
PDTlivre	FS/CUR+UV+Azul	68666,66667	25567,89338	,423	-32002,5620	169335,8953
	Controle	-3327000,00000*	195359,16904	,000	-4081595,3059	-2572404,6941
	F127 vazia	-2743250,00000*	163820,05981	,000	-3453296,8285	-2033203,1715
	P123 vazia	-2671583,33333*	96726,16703	,000	-3090285,7998	-2252880,8668
	FS vazia	-3881583,33333*	206522,16814	,000	-4776943,5010	-2986223,1657
	F127/CUR	-2649916,66667*	191533,26550	,000	-3480234,9644	-1819598,3690
	P123/CUR	-2382416,66667*	154013,08279	,000	-3049896,5051	-1714936,8282
	FS/CUR	-4039916,66667*	189521,30520	,000	-4861504,0299	-3218329,3034
	CUR livre	-2400750,00000*	125610,94889	,000	-2944923,7366	-1856576,2634
	Luz UV	-3907416,66667*	208174,67747	,000	-4809947,3588	-3004885,9746
	Luz azul	-2549916,66667*	215294,35306	,000	-3483340,3256	-1616493,0077
	FSvazia+UV	-3993250,00000*	183812,43700	,000	-4790063,1089	-3196436,8911
	FS/CUR+UV	-6934916,66667*	120884,33354	,000	-7458564,7940	-6411268,5394
	FS/CUR+Azul	-2858250,00000*	86435,54190	,000	-3232221,4847	-2484278,5153

	PDTF127	-75750,00000	25749,16641	,327	-184533,1447	33033,1447
	PDTP123	-56916,66667	22017,71268	,495	-149120,3745	35287,0412
	FS/CUR+UV+Azul	11750,00000	15939,65498	1,000	-53272,2957	76772,2957
FS/CUR+UV+Azul	Controle	-3338750,00000*	195791,06831	,000	-4094301,3581	-2583198,6419
	F127 vazia	-2755000,00000*	164334,86999	,000	-3465356,9054	-2044643,0946
	P123 vazia	-2683333,33333*	97595,53724	,000	-3102638,9945	-2264027,6722
	FS vazia	-3893333,33333*	206930,76967	,000	-4788932,0250	-2997734,6417
	F127/CUR	-2661666,66667*	191973,77241	,000	-3492244,3753	-1831088,9581
	P123/CUR	-2394166,66667*	154560,56150	,000	-3061979,8415	-1726353,4918
	FS/CUR	-4051666,66667*	189966,47764	,000	-4873516,5367	-3229816,7967
	CUR livre	-2412500,00000*	126281,62170	,000	-2957100,9741	-1867899,0259
	Luz UV	-3919166,66667*	208580,04180	,000	-4821933,7904	-3016399,5429
	Luz azul	-2561666,66667*	215686,33698	,000	-3495318,1596	-1628015,1738
	FSvazia+UV	-4005000,00000*	184271,40173	,000	-4802084,8322	-3207915,1678
	FS/CUR+UV	-6946666,66667*	121581,08239	,000	-7470763,2850	-6422570,0483
	FS/CUR+Azul	-2870000,00000*	87407,32466	,000	-3244679,3392	-2495320,6608
	PDTF127	-87500,00000	28843,66604	,263	-202565,1976	27565,1976
	PDTP123	-68666,66667	25567,89338	,423	-169335,8953	32002,5620
	PDTlivre	-11750,00000	15939,65498	1,000	-76772,2957	53272,2957

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

OUT-PUT DA ANÁLISE ESTATÍSTICA UFC/mL *Pseudomonas aeruginosa*

Tests of Normality

grupo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UFC	Controlee	,235	24	,001	,833	24	,001
	F127 vazia	,368	12	,000	,741	12	,002
	P123 vazia	,297	12	,004	,802	12	,010
	FS vazia	,161	12	,200*	,951	12	,649
	F127/CUR	,245	12	,045	,849	12	,035
	P123/CUR	,188	12	,200*	,911	12	,219
	FS/CUR	,293	12	,005	,748	12	,003
	CUR livre	,281	12	,010	,752	12	,003
	Luz UV	,151	12	,200*	,922	12	,307
	Luz azul	,256	12	,029	,855	12	,043
	FSvazia+UV	,110	12	,200*	,962	12	,809
	FS/CUR+UV	,123	12	,200*	,972	12	,930
	FS/CUR+Azul	,182	12	,200*	,931	12	,390
	PDTF127	,110	12	,200*	,951	12	,647
	PDTP123	,133	12	,200*	,940	12	,493
	PDTlivre	,186	12	,200*	,969	12	,901
	FS/CUR+UV+Azul	,134	12	,200*	,920	12	,284

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
UFC	Based on Mean	15,117	16	199	,000
	Based on Median	5,754	16	199	,000
	Based on Median and with adjusted df	5,754	16	104,201	,000
	Based on trimmed mean	14,232	16	199	,000

ANOVA

UFC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7491350139814 8144,000	16	4682093837384 259,000	114,834	,000
Within Groups	8113751616666 667,000	199	4077262118927 9,734		

Total	8302725301481 4816,000	215			
-------	---------------------------	-----	--	--	--

Robust Tests of Equality of Means

UFC

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	1065,044	16	71,919	,000

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: UFC
Games-Howell

(I) grupo		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Controle	F127 vazia	7095833,33333	2409434,18510	,278	-2117732,6551	16309399,3217
	P123 vazia	6345833,33333	2836423,33490	,691	-4771596,8886	17463263,5552
	FS vazia	-8470833,33333*	2083804,64036	,024	-16291534,6824	-650131,9842
	F127/CUR	8462500,00000	3341424,93064	,515	-4938537,5934	21863537,5934
	P123/CUR	11320833,33333	3724867,03870	,270	-3815801,8232	26457468,4899
	FS/CUR	-4020833,33333	1828739,24706	,718	-10843241,5799	2801574,9132
	CUR livre	8437500,00000	3115501,82598	,414	-3940545,0876	20815545,0876
	Luz UV	-4595833,33333	2189607,71161	,775	-12859351,4867	3667684,8201
	Luz azul	6395833,33333	2624374,74254	,567	-3770119,3955	16561786,0621
	FSvazia+UV	-5554166,66667	2618667,32268	,759	-15694638,3226	4586304,9893
	FS/CUR+UV	37822500,00000*	1540133,59037	,000	31884499,5830	43760500,4170
	FS/CUR+Azul	-5370833,33333	1585769,85141	,123	-11419378,3925	677711,7258
	PDTF127	42024166,66667*	1542176,77438	,000	36081546,0809	47966787,2524
	PDTP123	42227500,00000*	1547290,92399	,000	36273172,7578	48181827,2422
	PDTlivre	42904166,66667*	1537994,59858	,000	36970967,8625	48837365,4708
F127 vazia	FS/CUR+UV+Azul	41144166,66667*	1542748,46939	,000	35200247,4855	47088085,8478
	Controle	-7095833,33333	2409434,18510	,278	-16309399,3217	2117732,6551
	P123 vazia	-750000,00000	3025385,02433	1,000	-12575711,0735	11075711,0735
	FS vazia	-15566666,66667*	2334501,87190	,000	-24704351,3988	-6428981,9345

P123 vazia	F127/CUR	1366666,66667	3503252,45704	1,000	-12529457,0930	15262790,4264
	P123/CUR	4225000,00000	3870696,53508	,999	-11299977,6147	19749977,6147
	FS/CUR	- 11116666,66667*	2109963,13817	,005	-19594174,8865	-2639158,4468
	CUR livre	1341666,66667	3288466,03120	1,000	-11614216,2074	14297549,5408
	Luz UV	- 11691666,66667*	2429411,27465	,007	-21155218,2602	-2228115,0731
	Luz azul	-700000,00000	2827543,10312	1,000	-11700760,2666	10300760,2666
	FSvazia+UV	- 12650000,00000*	2822246,57987	,014	-23629078,7697	-1670921,2303
	FS/CUR+UV	30726666,66667*	1865387,00726	,000	22659222,4649	38794110,8684
	FS/CUR+Azul	- 12466666,66667*	1903240,19302	,002	-20565406,2007	-4367927,1326
	PDTF127	34928333,33333*	1867074,29261	,000	26859822,0164	42996844,6503
	PDTP123	35131666,66667*	1871300,72787	,000	27060342,6877	43202990,6457
	PDTlivre	35808333,33333*	1863621,36604	,000	27741971,4007	43874695,2659
	FS/CUR+UV+Azul	34048333,33333*	1867546,53235	,000	25979517,6246	42117149,0420
	Controle	-6345833,33333	2836423,33490	,691	-17463263,5552	4771596,8886
	F127 vazia	750000,00000	3025385,02433	1,000	-11075711,0735	12575711,0735
	FS vazia	- 14816666,66667*	2773053,05256	,003	-25867112,7166	-3766220,6167
	F127/CUR	2116666,66667	3809554,04479	1,000	-12751326,3805	16984659,7139
	P123/CUR	4975000,00000	4149965,77204	,997	-11346488,3911	21296488,3911
	FS/CUR	- 10366666,66667	2586864,64409	,059	-20979454,5056	246121,1723
	CUR livre	2091666,66667	3613022,70693	1,000	-11961695,4650	16145028,7984
	Luz UV	- 10941666,66667	2853412,58563	,063	-22220511,9554	337178,6221
	Luz azul	50000,00000	3199206,81458	1,000	-12389010,6726	12489010,6726
	FSvazia+UV	- 11900000,00000	3194526,56899	,070	-24321862,2707	521862,2707
	FS/CUR+UV	31476666,66667*	2391567,04470	,000	21121945,7581	41831387,5752
	FS/CUR+Azul	- 11716666,66667*	2421207,85451	,022	-22092818,0273	-1340515,3060
	PDTF127	35678333,33333*	2392883,33534	,000	25322821,2116	46033845,4550
	PDTP123	35881666,66667*	2396182,51737	,000	25524104,2748	46239229,0585
	PDTlivre	36558333,33333*	2390190,12599	,000	26204423,6295	46912243,0371
	FS/CUR+UV+Azul	34798333,33333*	2393251,82397	,000	24442596,9699	45154069,6968

FS vazia	Controle	8470833,33333*	2083804,64036	,024	650131,9842	16291534,6824
	F127 vazia	15566666,66667*	2334501,87190	,000	6428981,9345	24704351,3988
	P123 vazia	14816666,66667*	2773053,05256	,003	3766220,6167	25867112,7166
	F127/CUR	16933333,33333*	3287802,68031	,007	3586385,6237	30280281,0430
	P123/CUR	19791666,66667*	3676841,08353	,005	4701049,2068	34882284,1265
	FS/CUR	4450000,00000	1728818,42057	,487	-2346955,8980	11246955,8980
	CUR livre	16908333,33333*	3057920,45764	,003	4589917,6290	29226749,0376
	Luz UV	3875000,00000	2106871,57375	,892	-4314603,1608	12064603,1608
	Luz azul	14866666,66667*	2555752,07852	,001	4773003,3024	24960330,0309
	FSvazia+UV	2916666,66667	2549891,06521	,998	-7151387,4429	12984720,7762
	FS/CUR+UV	46293333,33333*	1420048,37021	,000	40164596,1204	52422070,5463
	FS/CUR+Azul	3100000,00000	1469418,90528	,756	-3078459,7321	9278459,7321
	PDTF127	50495000,00000*	1422264,07569	,000	44364734,0233	56625265,9767
	PDTP123	50698333,33333*	1427807,79554	,000	44563933,3585	56832733,3082
	PDTlivre	51375000,00000*	1417728,21190	,000	45247786,7516	57502213,2484
	FS/CUR+UV+Azul	49615000,00000*	1422883,95078	,000	43484293,6005	55745706,3995
F127/CUR	Controle	-8462500,00000	3341424,93064	,515	-21863537,5934	4938537,5934
	F127 vazia	-1366666,66667	3503252,45704	1,000	-15262790,4264	12529457,0930
	P123 vazia	-2116666,66667	3809554,04479	1,000	-16984659,7139	12751326,3805
	FS vazia	-	3287802,68031	,007	-30280281,0430	-3586385,6237
	P123/CUR	16933333,33333*	4510214,97729	1,000	-14687850,4013	20404517,0679
	FS/CUR	-	3132362,03514	,067	-25536978,8567	570312,1901
	CUR livre	12483333,33333	4021660,88987	1,000	-15653616,8805	15603616,8805
	Luz UV	-	3355858,55127	,064	-26563320,0944	446653,4278
	Luz azul	13058333,33333	3654414,79238	1,000	-16419899,6631	12286566,3298
	FSvazia+UV	-	3650318,23713	,060	-28356882,8574	323549,5241
	FS/CUR+UV	14016666,66667	2973115,56479	,000	16479382,6094	42240617,3906
	FS/CUR+Azul	-	2997010,29479	,031	-26729818,2317	-936848,4349
	PDTF127	13833333,33333*	2974174,48864	,000	20680431,0642	46442902,2692
	PDTP123	33561666,66667*	2976829,50282	,000	20882179,1633	46647820,8367

P123/CUR	PDTlivre	34441666,66667*	2972008,08725	,000	21561687,2350	47321646,0984
	FS/CUR+UV+Azul	32681666,66667*	2974470,96561	,000	19800256,5400	45563076,7933
	Controle	- 11320833,33333	3724867,03870	,270	-26457468,4899	3815801,8232
	F127 vazia	-4225000,00000	3870696,53508	,999	-19749977,6147	11299977,6147
	P123 vazia	-4975000,00000	4149965,77204	,997	-21296488,3911	11346488,3911
	FS vazia	- 19791666,66667*	3676841,08353	,005	-34882284,1265	-4701049,2068
	F127/CUR	-2858333,33333	4510214,97729	1,000	-20404517,0679	14687850,4013
	FS/CUR	- 15341666,66667*	3538531,58924	,040	-30205175,5235	-478157,8098
	CUR livre	-2883333,33333	4345488,48831	1,000	-19847778,7061	14081112,0395
	Luz UV	- 15916666,66667*	3737820,28796	,036	-31130964,3357	-702368,9976
	Luz azul	-4925000,00000	4008024,62114	,996	-20820641,8867	10970641,8867
	FSvazia+UV	- 16875000,00000*	4004289,83981	,031	-32759983,6581	-990016,3419
	FS/CUR+UV	26501666,66667*	3398371,67633	,000	11774753,8901	41228579,4432
	FS/CUR+Azul	- 16691666,66667*	3419295,92109	,022	-31431934,0653	-1951399,2680
	PDTF127	30703333,33333*	3399298,13017	,000	15975886,5873	45430780,0794
	PDTP123	30906666,66667*	3401621,34544	,000	16177857,2681	45635476,0653
	PDTlivre	31583333,33333*	3397402,82563	,000	16856973,1934	46309693,4733
	FS/CUR+UV+Azul	29823333,33333*	3399557,53211	,000	15095736,1139	44550930,5528
FS/CUR	Controle	4020833,33333	1828739,24706	,718	-2801574,9132	10843241,5799
	F127 vazia	11116666,66667*	2109963,13817	,005	2639158,4468	19594174,8865
	P123 vazia	10366666,66667	2586864,64409	,059	-246121,1723	20979454,5056
	FS vazia	-4450000,00000	1728818,42057	,487	-11246955,8980	2346955,8980
	F127/CUR	12483333,33333	3132362,03514	,067	-570312,1901	25536978,8567
	P123/CUR	15341666,66667*	3538531,58924	,040	478157,8098	30205175,5235
	CUR livre	12458333,33333*	2890142,38054	,038	487251,4946	24429415,1720
	Luz UV	-575000,00000	1854980,66913	1,000	-7922227,5959	6772227,5959
	Luz azul	10416666,66667*	2352427,28717	,026	854685,7799	19978647,5534
	FSvazia+UV	-1533333,33333	2346058,37502	1,000	-11066779,2908	8000112,6242
	FS/CUR+UV	41843333,33333*	1009248,64542	,000	37508188,6606	46178478,0061

CUR livre	FS/CUR+Azul	-1350000,00000	1077607,24466	,994	-5779236,6543	3079236,6543
	PDTF127	46045000,00000*	1012363,84544	,000	41707297,0952	50382702,9048
	PDTP123	46248333,33333*	1020137,51796	,000	41903432,8638	50593233,8029
	PDTlivre	46925000,00000*	1005981,47964	,000	42592331,2783	51257668,7217
	FS/CUR+UV+Azul	45165000,00000*	1013234,51970	,000	40826548,1987	49503451,8013
	Controle	-8437500,00000	3115501,82598	,414	-20815545,0876	3940545,0876
	F127 vazia	-1341666,66667	3288466,03120	1,000	-14297549,5408	11614216,2074
	P123 vazia	-2091666,66667	3613022,70693	1,000	-16145028,7984	11961695,4650
	FS vazia	-16908333,33333*	3057920,45764	,003	-29226749,0376	-4589917,6290
	F127/CUR	25000,00000	4021660,88987	1,000	-15603616,8805	15653616,8805
	P123/CUR	2883333,33333	4345488,48831	1,000	-14081112,0395	19847778,7061
	FS/CUR	-12458333,33333*	2890142,38054	,038	-24429415,1720	-487251,4946
	Luz UV	-13033333,33333*	3130977,11214	,036	-25536835,4086	-529831,2581
	Luz azul	-2041666,66667	3449054,73070	1,000	-15517768,4177	11434435,0843
	FSvazia+UV	-13991666,66667*	3444713,96388	,036	-27453062,1569	-530271,1764
	FS/CUR+UV	29385000,00000*	2716734,66173	,000	17617761,9979	41152238,0021
	FS/CUR+Azul	-13808333,33333*	2742863,78949	,017	-25593485,2582	-2023181,4085
	PDTF127	33586666,66667*	2717893,47648	,000	21818744,8701	45354588,4632
	PDTP123	33790000,00000*	2720798,58672	,000	22020317,9297	45559682,0703
	PDTlivre	34466666,66667*	2715522,62581	,000	22700132,6105	46233200,7229
	FS/CUR+UV+Azul	32706666,66667*	2718217,90625	,000	20938551,5502	44474781,7832
Luz UV	Controle	4595833,33333	2189607,71161	,775	-3667684,8201	12859351,4867
	F127 vazia	11691666,66667*	2429411,27465	,007	2228115,0731	21155218,2602
	P123 vazia	10941666,66667	2853412,58563	,063	-337178,6221	22220511,9554
	FS vazia	-3875000,00000	2106871,57375	,892	-12064603,1608	4314603,1608
	F127/CUR	13058333,33333	3355858,55127	,064	-446653,4278	26563320,0944
	P123/CUR	15916666,66667*	3737820,28796	,036	702368,9976	31130964,3357
	FS/CUR	575000,00000	1854980,66913	1,000	-6772227,5959	7922227,5959
	CUR livre	13033333,33333*	3130977,11214	,036	529831,2581	25536835,4086
	Luz azul	10991666,66667*	2642727,53767	,031	626889,6057	21356443,7276

Luz azul	FSvazia+UV	-958333,33333	2637059,83928	1,000	-11298793,2653	9382126,5986
	FS/CUR+UV	42418333,33333*	1571202,57295	,000	35631133,0956	49205533,5711
	FS/CUR+Azul	-775000,00000	1615961,65509	1,000	-7603842,5684	6053842,5684
	PDTF127	46620000,00000*	1573205,40697	,000	39831467,8747	53408532,1253
	PDTP123	46823333,33333*	1578219,01285	,000	40031236,5974	53615430,0692
	PDTlivre	47500000,00000*	1569105,93471	,000	40714136,9247	54285863,0753
	FS/CUR+UV+Azul	45740000,00000*	1573765,83039	,000	38951085,7147	52528914,2853
	Controle	-6395833,33333	2624374,74254	,567	-16561786,0621	3770119,3955
	F127 vazia	700000,00000	2827543,10312	1,000	-10300760,2666	11700760,2666
	P123 vazia	-50000,00000	3199206,81458	1,000	-12489010,6726	12389010,6726
	FS vazia	-14866666,66667*	2555752,07852	,001	-24960330,0309	-4773003,3024
	F127/CUR	2066666,66667	3654414,79238	1,000	-12286566,3298	16419899,6631
	P123/CUR	4925000,00000	4008024,62114	,996	-10970641,8867	20820641,8867
	FS/CUR	-10416666,66667*	2352427,28717	,026	-19978647,5534	-854685,7799
	CUR livre	2041666,66667	3449054,73070	1,000	-11434435,0843	15517768,4177
	Luz UV	-10991666,66667*	2642727,53767	,031	-21356443,7276	-626889,6057
	FSvazia+UV	-11950000,00000*	3007830,68914	,041	-23628057,1407	-271942,8593
	FS/CUR+UV	31426666,66667*	2135799,23772	,000	22183448,3441	40669884,9893
	FS/CUR+Azul	-11766666,66667*	2168938,20320	,009	-21035219,2331	-2498114,1003
	PDTF127	35628333,33333*	2137273,05488	,000	26384210,8502	44872455,8165
	PDTP123	35831666,66667*	2140966,16300	,000	26585184,7295	45078148,6038
	PDTlivre	36508333,33333*	2134257,31648	,000	27266037,9246	45750628,7421
	FS/CUR+UV+Azul	34748333,33333*	2137685,60539	,000	25503953,9186	43992712,7481
FSvazia+UV	Controle	5554166,66667	2618667,32268	,759	-4586304,9893	15694638,3226
	F127 vazia	12650000,00000*	2822246,57987	,014	1670921,2303	23629078,7697
	P123 vazia	11900000,00000	3194526,56899	,070	-521862,2707	24321862,2707
	FS vazia	-2916666,66667	2549891,06521	,998	-12984720,7762	7151387,4429
	F127/CUR	14016666,66667	3650318,23713	,060	-323549,5241	28356882,8574
	P123/CUR	16875000,00000*	4004289,83981	,031	990016,3419	32759983,6581
	FS/CUR	1533333,33333	2346058,37502	1,000	-8000112,6242	11066779,2908

FS/CUR+UV	CUR livre	13991666,66667*	3444713,96388	,036	530271,1764	27453062,1569
	Luz UV	958333,33333	2637059,83928	1,000	-9382126,5986	11298793,2653
	Luz azul	11950000,00000*	3007830,68914	,041	271942,8593	23628057,1407
	FS/CUR+UV	43376666,66667*	2128782,31424	,000	34163949,3149	52589384,0184
	FS/CUR+Azul	183333,33333	2162028,83581	1,000	-9054845,0483	9421511,7150
	PDTF127	47578333,33333*	2130260,98605	,000	38364708,2461	56791958,4205
	PDTP123	47781666,66667*	2133966,22951	,000	38565672,2709	56997661,0625
	PDTlivre	48458333,33333*	2127235,30680	,000	39246542,4138	57670124,2529
	FS/CUR+UV+Azul	46698333,33333*	2130674,89426	,000	37484450,2770	55912216,3897
	Controle	-	1540133,59037	,000	-43760500,4170	-
	F127 vazia	37822500,00000*	1865387,00726	,000	-38794110,8684	31884499,5830
	P123 vazia	30726666,66667*	2391567,04470	,000	-41831387,5752	22659222,4649
	FS vazia	-	31476666,66667*	,000	-41831387,5752	21121945,7581
	F127/CUR	46293333,33333*	1420048,37021	,000	-52422070,5463	-
	P123/CUR	-	2973115,56479	,000	-42240617,3906	40164596,1204
	FS/CUR	29360000,00000*	3398371,67633	,000	-41228579,4432	-
	CUR livre	-	26501666,66667*	,000	-41228579,4432	11774753,8901
	Luz UV	41843333,33333*	1009248,64542	,000	-46178478,0061	-
	Luz azul	-	2716734,66173	,000	-41152238,0021	37508188,6606
	FSvazia+UV	29385000,00000*	1571202,57295	,000	-41152238,0021	-
	FS/CUR+Azul	-	42418333,33333*	,000	-49205533,5711	17617761,9979
	PDTF127	-	31426666,66667*	,000	-49205533,5711	-
	PDTP123	-	2135799,23772	,000	-40669884,9893	35631133,0956
	PDTlivre	-	2128782,31424	,000	-40669884,9893	-
	FS/CUR+UV+Azul	-	43376666,66667*	,000	-52589384,0184	22183448,3441
	Controle	43376666,66667*	434697,15454	,000	-52589384,0184	-
	F127 vazia	43193333,33333*	229357,35868	,000	-44991841,6406	34163949,3149
	P123 vazia	4201666,66667*	261543,10922	,000	-44991841,6406	-
	FS vazia	4405000,00000*	199306,24626	,000	-44991841,6406	41394825,0261
	F127/CUR	5081666,66667*	233170,39766	,000	3309735,7537	41394825,0261
	P123/CUR	3321666,66667*	261543,10922	,000	3309735,7537	5093597,5796
FS/CUR+Azul	FS/CUR+UV+Azul	3321666,66667*	233170,39766	,000	3309735,7537	5093597,5796
	Controle	5370833,33333	1585769,85141	,123	-677711,7258	5432449,9444
	F127 vazia	12466666,66667*	1903240,19302	,002	4367927,1326	5857882,6503
	P123 vazia	11716666,66667*	2421207,85451	,022	1340515,3060	4229208,2273
	FS vazia	-3100000,00000	1469418,90528	,756	-9278459,7321	22092818,0273
	F127/CUR	13833333,33333*	2997010,29479	,031	936848,4349	3078459,7321
	P123/CUR	16691666,66667*	3419295,92109	,022	1951399,2680	26729818,2317
						31431934,0653

PDTF127	FS/CUR	1350000,00000	1077607,24466	,994	-3079236,6543	5779236,6543
	CUR livre	13808333,33333*	2742863,78949	,017	2023181,4085	25593485,2582
	Luz UV	775000,00000	1615961,65509	1,000	-6053842,5684	7603842,5684
	Luz azul	11766666,66667*	2168938,20320	,009	2498114,1003	21035219,2331
	FSvazia+UV	-183333,33333	2162028,83581	1,000	-9421511,7150	9054845,0483
	FS/CUR+UV	43193333,33333*	434697,15454	,000	41394825,0261	44991841,6406
	PDTF127	47395000,00000*	441881,59436	,000	45583319,6055	49206680,3945
	PDTP123	47598333,33333*	459411,95395	,000	45748232,5291	49448434,1376
	PDTlivre	48275000,00000*	427056,81736	,000	46488579,2871	50061420,7129
	FS/CUR+UV+Azul	46515000,00000*	443872,70675	,000	44699384,3787	48330615,6213
	Controle	-	1542176,77438	,000	-47966787,2524	-
	F127 vazia	42024166,66667*	1867074,29261	,000	-42996844,6503	36081546,0809
	P123 vazia	34928333,33333*	2392883,33534	,000	-46033845,4550	26859822,0164
	FS vazia	35678333,33333*	1422264,07569	,000	-56625265,9767	25322821,2116
	F127/CUR	50495000,00000*	2974174,48864	,000	-46442902,2692	44364734,0233
	P123/CUR	33561666,66667*	3399298,13017	,000	-45430780,0794	20680431,0642
	FS/CUR	30703333,33333*	1012363,84544	,000	-50382702,9048	15975886,5873
	CUR livre	46045000,00000*	2717893,47648	,000	-45354588,4632	41707297,0952
	Luz UV	33586666,66667*	1573205,40697	,000	-453408532,1253	21818744,8701
	Luz azul	46620000,00000*	2137273,05488	,000	-44872455,8165	39831467,8747
	FSvazia+UV	35628333,33333*	2130260,98605	,000	-56791958,4205	26384210,8502
	FS/CUR+UV	47578333,33333*	229357,35868	,000	-5093597,5796	38364708,2461
	FS/CUR+Azul	-4201666,66667*	441881,59436	,000	-49206680,3945	-3309735,7537
	PDTP123	47395000,00000*	273317,62704	1,000	-863197,8936	45583319,6055
	PDTlivre	203333,33333	214524,37407	,034	39718,0565	1269864,5602
	FS/CUR+UV+Azul	880000,00000*	246305,01744	,093	-1836381,8629	1720281,9435
PDTP123	Controle	-	1547290,92399	,000	-48181827,2422	-
	F127 vazia	42227500,00000*	1871300,72787	,000	-43202990,6457	36273172,7578
	P123 vazia	35131666,66667*	2396182,51737	,000	-46239229,0585	27060342,6877
	FS vazia	35881666,66667*	1427807,79554	,000	-56832733,3082	25524104,2748
		50698333,33333*				44563933,3585

PDTlivre	F127/CUR	-	2976829,50282	,000	-46647820,8367	-
		33765000,00000*				20882179,1633
	P123/CUR	-	3401621,34544	,000	-45635476,0653	-
		30906666,66667*				16177857,2681
	FS/CUR	-	1020137,51796	,000	-50593233,8029	-
		46248333,33333*				41903432,8638
	CUR livre	-	2720798,58672	,000	-45559682,0703	-
		33790000,00000*				22020317,9297
	Luz UV	-	1578219,01285	,000	-53615430,0692	-
		46823333,33333*				40031236,5974
	Luz azul	-	2140966,16300	,000	-45078148,6038	-
		35831666,66667*				26585184,7295
	FSvazia+UV	-	2133966,22951	,000	-56997661,0625	-
		47781666,66667*				38565672,2709
	FS/CUR+UV	-4405000,00000*	261543,10922	,000	-5432449,9444	-3377550,0556
	FS/CUR+Azul	-	459411,95395	,000	-49448434,1376	-
		47598333,33333*				45748232,5291
	PDTF127	-203333,33333	273317,62704	1,000	-1269864,5602	863197,8936
	PDTlivre	676666,66667	248637,70243	,407	-312298,0469	1665631,3802
	FS/CUR+UV+Azul	-1083333,33333*	276525,15549	,048	-2161040,3762	-5626,2904
	Controle	-	1537994,59858	,000	-48837365,4708	-
		42904166,66667*				36970967,8625
	F127 vazia	-	1863621,36604	,000	-43874695,2659	-
		35808333,33333*				27741971,4007
	P123 vazia	-	2390190,12599	,000	-46912243,0371	-
		36558333,33333*				26204423,6295
	FS vazia	-	1417728,21190	,000	-57502213,2484	-
		51375000,00000*				45247786,7516
	F127/CUR	-	2972008,08725	,000	-47321646,0984	-
		34441666,66667*				21561687,2350
	P123/CUR	-	3397402,82563	,000	-46309693,4733	-
		31583333,33333*				16856973,1934
	FS/CUR	-	1005981,47964	,000	-51257668,7217	-
		46925000,00000*				42592331,2783
	CUR livre	-	2715522,62581	,000	-46233200,7229	-
		34466666,66667*				22700132,6105
	Luz UV	-	1569105,93471	,000	-54285863,0753	-
		47500000,00000*				40714136,9247
	Luz azul	-	2134257,31648	,000	-45750628,7421	-
		36508333,33333*				27266037,9246
	FSvazia+UV	-	2127235,30680	,000	-57670124,2529	-
		48458333,33333*				39246542,4138
	FS/CUR+UV	-5081666,66667*	199306,24626	,000	-5857882,6503	-4305450,6831
	FS/CUR+Azul	-	427056,81736	,000	-50061420,7129	-
		48275000,00000*				46488579,2871
	PDTF127	-880000,00000*	214524,37407	,034	-1720281,9435	-39718,0565
	PDTP123	-676666,66667	248637,70243	,407	-1665631,3802	312298,0469
	FS/CUR+UV+Azul	-1760000,00000*	218596,30243	,000	-2617732,5021	-902267,4979
	FS/CUR+UV+Azul Controle	-	1542748,46939	,000	-47088085,8478	-
		41144166,66667*				35200247,4855

F127 vazia	- 34048333,33333*	1867546,53235	,000	-42117149,0420	- 25979517,6246
P123 vazia	- 34798333,33333*	2393251,82397	,000	-45154069,6968	- 24442596,9699
FS vazia	- 49615000,00000*	1422883,95078	,000	-55745706,3995	- 43484293,6005
F127/CUR	- 32681666,66667*	2974470,96561	,000	-45563076,7933	- 19800256,5400
P123/CUR	- 29823333,33333*	3399557,53211	,000	-44550930,5528	- 15095736,1139
FS/CUR	- 45165000,00000*	1013234,51970	,000	-49503451,8013	- 40826548,1987
CUR livre	- 32706666,66667*	2718217,90625	,000	-44474781,7832	- 20938551,5502
Luz UV	- 45740000,00000*	1573765,83039	,000	-52528914,2853	- 38951085,7147
Luz azul	- 34748333,33333*	2137685,60539	,000	-43992712,7481	- 25503953,9186
FSvazia+UV	- 46698333,33333*	2130674,89426	,000	-55912216,3897	- 37484450,2770
FS/CUR+UV	-3321666,66667*	233170,39766	,000	-4229208,2273	-2414125,1061
FS/CUR+Azul	- 46515000,00000*	443872,70675	,000	-48330615,6213	- 44699384,3787
PDTF127	880000,00000	246305,01744	,093	-76381,8629	1836381,8629
PDTP123	1083333,33333*	276525,15549	,048	5626,2904	2161040,3762
PDTlivre	1760000,00000*	218596,30243	,000	902267,4979	2617732,5021

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

OUT-PUT DA ANÁLISE ESTATÍSTICA UFC/mL MRSA

Tests of Normality

Tests of Normality							
grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
UFC	Controlee	,157	24	,131	,941	24	,175
	F127 vazia	,155	12	,200*	,932	12	,404
	P123 vazia	,210	12	,148	,918	12	,266
	FS vazia	,166	12	,200*	,914	12	,240
	F127/CUR	,228	12	,087	,886	12	,103
	P123/CUR	,114	12	,200*	,970	12	,914
	FS/CUR	,131	12	,200*	,960	12	,786
	CUR livre	,182	12	,200*	,954	12	,703
	Luz UV	,145	12	,200*	,942	12	,518
	Luz azul	,183	12	,200*	,908	12	,201
	FSvazia+UV	,235	12	,066	,754	12	,003
	FS/CUR+UV	,180	12	,200*	,887	12	,107
	FS/CUR+Azul	,181	12	,200*	,894	12	,135
	PDTF127	,232	12	,073	,932	12	,403
	PDTP123	,131	12	,200*	,959	12	,775
	PDTlivre	,164	12	,200*	,903	12	,175
	FS/CUR+UV+Azul	,197	12	,200*	,933	12	,417

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
UFC	Based on Mean	6,865	16	199	,000
	Based on Median	5,981	16	199	,000
	Based on Median and with adjusted df	5,981	16	93,892	,000
	Based on trimmed mean	6,871	16	199	,000

ANOVA

UFC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4409671073009 2592,000	16	2756044420630 787,000	289,281	,000
Within Groups	1895915778333 333,200	199	9527214966499 ,162		
Total	4599262650842 5928,000	215			

Robust Tests of Equality of Means

UFC

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	1581,348	16	68,788	,000

a. Asymptotically F distributed.

Multiple ComparisonsDependent Variable: UFC
Games-Howell

					95% Confidence Interval	
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
(I) grupo						
Controle	F127 vazia	4883333,33333	1602657,37136	,231	-1222294,8324	10988961,4990
	P123 vazia	2825000,00000	1343157,66709	,775	-2193079,2670	7843079,2670
	FS vazia	-2583333,33333	1325878,98936	,855	-7533541,5500	2366874,8834
	F127/CUR	2775000,00000	1135606,80770	,559	-1503115,2030	7053115,2030
	P123/CUR	6391666,66667*	1577967,55657	,028	393322,3374	12390010,9959
	FS/CUR	-391666,66667	1462669,06766	1,000	-5897725,4752	5114392,1418
	CUR livre	5508333,33333*	1391916,34250	,030	294701,8222	10721964,8445
	Luz UV	1433333,33333	1228954,36522	,998	-3153996,9057	6020663,5724
	Luz azul	7441666,66667*	1782209,15954	,026	543168,5332	14340164,8001
	FSvazia+UV	708333,33333	1324251,94949	1,000	-4235526,3585	5652193,0252
	FS/CUR+UV	29623333,33333*	1052861,20196	,000	25566881,9178	33679784,7489
	FS/CUR+Azul	3316666,66667	1149143,52976	,296	-1003050,3347	7636383,6681
	PDTF127	34035000,00000*	1048292,88522	,000	29988816,2940	38081183,7060
	PDTP123	34345000,00000*	1057733,32716	,000	30277335,8243	38412664,1757
	PDTlivre	34549166,66667*	1059882,77462	,000	30476471,6411	38621861,6923

	FS/CUR+UV+Azul	36488333,33333*	1046012,00018	,000	32447184,9663	40529481,7004
F127 vazia	Controle	-4883333,33333	1602657,37136	,231	-	1222294,8324
					10988961,4990	
	P123 vazia	-2058333,33333	1478069,90923	,987	-7876601,2056	3759934,5390
	FS vazia	-7466666,66667*	1462386,14337	,005	-	-1696418,6867
					13236914,6467	
	F127/CUR	-2108333,33333	1292370,28734	,945	-7465041,3445	3248374,6779
	P123/CUR	1508333,33333	1694284,43523	1,000	-5070360,1759	8087026,8425
	FS/CUR	-5275000,00000	1587456,75198	,152	-	908552,5321
					11458552,5321	
	CUR livre	625000,00000	1522514,11896	1,000	-5335778,6247	6585778,6247
	Luz UV	-3450000,00000	1375117,07491	,530	-8979662,6602	2079662,6602
	Luz azul	2558333,33333	1885971,26867	,990	-4788175,9976	9904842,6642
	FSvazia+UV	-4175000,00000	1460911,14159	,335	-9940798,0386	1590798,0386
	FS/CUR+UV	24740000,00000*	1220301,13025	,000	19469521,6800	30010478,3200
	FS/CUR+Azul	-1566666,66667	1304281,02413	,996	-6944080,8399	3810747,5066
	PDTF127	29151666,66667*	1216361,83396	,000	23883638,9788	34419694,3545
	PDTP123	29461666,66667*	1224507,21896	,000	24188279,2089	34735054,1244
	PDTlivre	29665833,33333*	1226364,39684	,000	24391067,0460	34940599,6206
	FS/CUR+UV+Azul	31605000,00000*	1214396,65778	,000	26338093,8132	36871906,1868
P123 vazia	Controle	-2825000,00000	1343157,66709	,775	-7843079,2670	2193079,2670
	F127 vazia	2058333,33333	1478069,90923	,987	-3759934,5390	7876601,2056
	FS vazia	-5408333,33333*	1172235,08777	,010	-9960168,8905	-856497,7762
	F127/CUR	-50000,00000	951726,23600	1,000	-3881139,9932	3781139,9932
	P123/CUR	3566666,66667	1451262,07701	,556	-2135583,4629	9268916,7962
	FS/CUR	-3216666,66667	1324983,32370	,574	-8382172,6563	1948839,3230
	CUR livre	2683333,33333	1246439,37322	,741	-2160048,5090	7526715,1757
	Luz UV	-1391666,66667	1061371,20669	,993	-5544168,8114	2760835,4781
	Luz azul	4616666,66667	1671062,38512	,387	-2049542,1077	11282875,4410
	FSvazia+UV	-2116666,66667	1170394,47723	,904	-6661472,4226	2428139,0892
	FS/CUR+UV	26798333,33333*	851291,20586	,000	23137661,1479	30459005,5188
	FS/CUR+Azul	491666,66667	967838,23989	1,000	-3380030,8546	4363364,1879

FS vazia	PDTF127	31210000,00000*	845634,66095	,000	27553261,1022	34866738,8978
	PDTP123	31520000,00000*	857309,62784	,000	27854309,9000	35185690,1000
	PDTlivre	31724166,66667*	859960,17496	,000	28056004,7194	35392328,6139
	FS/CUR+UV+Azul	33663333,33333*	842805,50017	,000	30008265,4727	37318401,1939
	Controle	2583333,33333	1325878,98936	,855	-2366874,8834	7533541,5500
	F127 vazia	7466666,66667*	1462386,14337	,005	1696418,6867	13236914,6467
	P123 vazia	5408333,33333*	1172235,08777	,010	856497,7762	9960168,8905
	F127/CUR	5358333,33333*	927181,42995	,002	1636706,0131	9079960,6536
	P123/CUR	8975000,00000*	1435285,40434	,000	3322716,8877	14627283,1123
	FS/CUR	2191666,66667	1307464,48665	,943	-2913183,5069	7296516,8402
	CUR livre	8091666,66667*	1227800,34487	,000	3317049,5329	12866283,8005
	Luz UV	4016666,66667	1039418,78670	,054	-42881,5975	8076214,9308
	Luz azul	10025000,00000*	1657206,10387	,001	3395412,0273	16654587,9727
	FSvazia+UV	3291666,66667	1150524,14494	,325	-1175302,2539	7758635,5873
	FS/CUR+UV	32206666,66667*	823759,24452	,000	28666413,6995	35746919,6338
	FS/CUR+Azul	5900000,00000*	943712,58037	,001	2135435,0893	9664564,9107
F127/CUR	PDTF127	36618333,33333*	817912,31532	,000	33082202,4147	40154464,2520
	PDTP123	36928333,33333*	829977,33327	,000	33382781,4129	40473885,2538
	PDTlivre	37132500,00000*	832714,88415	,000	33584328,3347	40680671,6653
	FS/CUR+UV+Azul	39071666,66667*	814986,92435	,000	35537271,4007	42606061,9326
	Controle	-2775000,00000	1135606,80770	,559	-7053115,2030	1503115,2030
	F127 vazia	2108333,33333	1292370,28734	,945	-3248374,6779	7465041,3445
	P123 vazia	50000,00000	951726,23600	1,000	-3781139,9932	3881139,9932
	FS vazia	-5358333,33333*	927181,42995	,002	-9079960,6536	-1636706,0131
	P123/CUR	3616666,66667	1261622,73251	,351	-1602464,7607	8835798,0941
	FS/CUR	-3166666,66667	1114051,66447	,358	-7724666,7257	1391333,3924
	CUR livre	2733333,33333	1019382,85945	,435	-1400414,9997	6867081,6663
	Luz UV	-1341666,66667	782329,30497	,931	-4423860,6422	1740527,3088
	Luz azul	4666666,66667	1509297,78307	,265	-1658238,4653	10991571,7986
	FSvazia+UV	-2066666,66667	924853,25071	,691	-5777916,5910	1644583,2577

P123/CUR	FS/CUR+UV	26848333,33333*	458505,20194	,000	24915035,7117	28781630,9550
	FS/CUR+Azul	541666,66667	649800,86305	1,000	-1982742,4745	3066075,8078
	PDTF127	31260000,00000*	447915,48626	,000	29337658,0134	33182341,9866
	PDTP123	31570000,00000*	469585,03065	,000	29620694,3931	33519305,6069
	PDTlivre	31774166,66667*	474406,79333	,000	29816619,0240	33731714,3093
	FS/CUR+UV+Azul	33713333,33333*	442551,02999	,000	31794686,4761	35631980,1905
	Controle	-6391666,66667*	1577967,55657	,028	-	-393322,3374
	F127 vazia	-1508333,33333	1694284,43523	1,000	12390010,9959	5070360,1759
	P123 vazia	-3566666,66667	1451262,07701	,556	-8087026,8425	2135583,4629
	FS vazia	-8975000,00000*	1435285,40434	,000	-9268916,7962	-3322716,8877
	F127/CUR	-3616666,66667	1261622,73251	,351	14627283,1123	1602464,7607
	FS/CUR	-6783333,33333*	1562526,76745	,019	-8835798,0941	-702631,2438
	CUR livre	-883333,33333	1496502,65687	1,000	12864035,4229	4966887,5772
	Luz UV	-4958333,33333	1346260,72114	,091	-6733554,2439	442641,8746
	Luz azul	1050000,00000	1865035,81356	1,000	10359308,5412	8322926,2694
	FSvazia+UV	-5683333,33333*	1433782,52299	,048	-6222926,2694	-35683,5459
	FS/CUR+UV	23231666,66667*	1187689,27253	,000	11330983,1207	28360098,6233
	FS/CUR+Azul	-3075000,00000	1273821,00371	,587	18103234,7100	2165954,4216
	PDTF127	27643333,33333*	1183641,44516	,000	-8315954,4216	32769231,4161
	PDTP123	27953333,33333*	1192010,43992	,000	22517435,2506	33084787,0021
FS/CUR	PDTlivre	28157500,00000*	1193918,16865	,000	22821879,6646	33290389,6876
	FS/CUR+UV+Azul	30096666,66667*	1181621,85238	,000	23024610,3124	35221410,0767
	Controle	391666,66667	1462669,06766	1,000	24971923,2566	5897725,4752
	F127 vazia	5275000,00000	1587456,75198	,152	-5114392,1418	11458552,5321
	P123 vazia	3216666,66667	1324983,32370	,574	-908552,5321	8382172,6563
	FS vazia	-2191666,66667	1307464,48665	,943	-1948839,3230	2913183,5069
	F127/CUR	3166666,66667	1114051,66447	,358	-7296516,8402	7724666,7257
	P123/CUR	6783333,33333*	1562526,76745	,019	-1391333,3924	12864035,4229
	CUR livre	5900000,00000*	1374386,91566	,021	702631,2438	11243004,8868

CUR livre	Luz UV	1825000,00000	1209064,56453	,973	-2967945,3509	6617945,3509
	Luz azul	7833333,33333*	1768552,45265	,018	881403,7002	14785262,9665
	FSvazia+UV	1100000,00000	1305814,50258	1,000	-3999205,6212	6199205,6212
	FS/CUR+UV	30015000,00000*	1029575,15510	,000	25575774,1474	34454225,8526
	FS/CUR+Azul	3708333,33333	1127847,12679	,186	-878348,9332	8295015,5999
	PDTF127	34426666,66667*	1024903,05035	,000	29990479,0801	38862854,2532
	PDTP123	34736666,66667*	1034556,94904	,000	30293720,3693	39179612,9641
	PDTlivre	34940833,33333*	1036754,44795	,000	30496092,4062	39385574,2605
	FS/CUR+UV+Azul	36880000,00000*	1022569,99464	,000	32445161,6715	41314838,3285
	Controle	-5508333,33333*	1391916,34250	,030	-	-294701,8222
	F127 vazia	-625000,00000	1522514,11896	1,000	10721964,8445 -6585778,6247	5335778,6247
	P123 vazia	-2683333,33333	1246439,37322	,741	-7526715,1757	2160048,5090
	FS vazia	-8091666,66667*	1227800,34487	,000	-	-3317049,5329
	F127/CUR	-2733333,33333	1019382,85945	,435	12866283,8005 -6867081,6663	1400414,9997
	P123/CUR	883333,33333	1496502,65687	1,000	-4966887,5772	6733554,2439
	FS/CUR	-5900000,00000*	1374386,91566	,021	-	-556995,1132
	Luz UV	-4075000,00000	1122438,16054	,090	11243004,8868 -8489638,0943	339638,0943
	Luz azul	1933333,33333	1710499,36592	,998	-4842909,8925	8709576,5592
	FSvazia+UV	-4800000,00000*	1226043,15511	,047	-9568200,1931	-31799,8069
	FS/CUR+UV	24115000,00000*	926312,74580	,000	20126481,5037	28103518,4963
Luz UV	FS/CUR+Azul	-2191666,66667	1034441,60997	,756	-6360298,3783	1976965,0450
	PDTF127	28526666,66667*	921117,02061	,000	24541646,2052	32511687,1281
	PDTP123	28836666,66667*	931846,75985	,000	24843769,1798	32829564,1536
	PDTlivre	29040833,33333*	934285,87080	,000	25045798,8653	33035867,8014
	FS/CUR+UV+Azul	30980000,00000*	918520,38462	,000	26996497,4852	34963502,5148
	Controle	-1433333,33333	1228954,36522	,998	-6020663,5724	3153996,9057
	F127 vazia	3450000,00000	1375117,07491	,530	-2079662,6602	8979662,6602
	P123 vazia	1391666,66667	1061371,20669	,993	-2760835,4781	5544168,8114
	FS vazia	-4016666,66667	1039418,78670	,054	-8076214,9308	42881,5975
	F127/CUR	1341666,66667	782329,30497	,931	-1740527,3088	4423860,6422

Luz azul	P123/CUR	4958333,33333	1346260,72114	,091	-442641,8746	10359308,5412
	FS/CUR	-1825000,00000	1209064,56453	,973	-6617945,3509	2967945,3509
	CUR livre	4075000,00000	1122438,16054	,090	-339638,0943	8489638,0943
	Luz azul	6008333,33333	1580729,51769	,081	-441620,0702	12458286,7368
	FSvazia+UV	-725000,00000	1037342,54008	1,000	-4775798,1161	3325798,1161
	FS/CUR+UV	28190000,00000*	656470,12903	,000	25383054,5291	30996945,4709
	FS/CUR+Azul	1883333,33333	801852,33785	,623	-1260588,0278	5027254,6945
	PDTF127	32601666,66667*	649118,08859	,000	29800540,1298	35402793,2035
	PDTP123	32911666,66667*	664256,05839	,000	30096821,7943	35726511,5390
	PDTlivre	33115833,33333*	667673,43489	,000	30296992,5609	35934674,1058
	FS/CUR+UV+Azul	35055000,00000*	645428,09378	,000	32256151,9731	37853848,0269
	Controle	-7441666,66667*	1782209,15954	,026	-	-543168,5332
	F127 vazia	-2558333,33333	1885971,26867	,990	-9904842,6642	4788175,9976
	P123 vazia	-4616666,66667	1671062,38512	,387	-	2049542,1077
	FS vazia	-	1657206,10387	,001	-	-3395412,0273
		10025000,00000*			16654587,9727	
	F127/CUR	-4666666,66667	1509297,78307	,265	-	1658238,4653
					10991571,7986	
	P123/CUR	-1050000,00000	1865035,81356	1,000	-8322926,2694	6222926,2694
	FS/CUR	-7833333,33333*	1768552,45265	,018	-	-881403,7002
					14785262,9665	
	CUR livre	-1933333,33333	1710499,36592	,998	-8709576,5592	4842909,8925
	Luz UV	-6008333,33333	1580729,51769	,081	-	441620,0702
					12458286,7368	
	FSvazia+UV	-6733333,33333*	1655904,64762	,044	-	-107126,7597
					13359539,9070	
	FS/CUR+UV	22181666,66667*	1448065,49813	,000	15919853,3939	28443479,9394
	FS/CUR+Azul	-4125000,00000	1519509,07476	,427	-	2214741,2542
					10464741,2542	
	PDTF127	26593333,33333*	1444747,36528	,000	20333517,0457	32853149,6210
	PDTP123	26903333,33333*	1451611,78270	,000	20639209,0530	33167457,6137
	PDTlivre	27107500,00000*	1453178,74751	,000	20842297,2059	33372702,7941
	FS/CUR+UV+Azul	29046666,66667*	1443093,23358	,000	22787785,3603	35305547,9731
FSvazia+UV	Controle	-708333,33333	1324251,94949	1,000	-5652193,0252	4235526,3585
	F127 vazia	4175000,00000	1460911,14159	,335	-1590798,0386	9940798,0386
	P123 vazia	2116666,66667	1170394,47723	,904	-2428139,0892	6661472,4226

	FS vazia	-3291666,66667	1150524,14494	,325	-7758635,5873	1175302,2539
	F127/CUR	2066666,66667	924853,25071	,691	-1644583,2577	5777916,5910
	P123/CUR	5683333,33333*	1433782,52299	,048	35683,5459	11330983,1207
	FS/CUR	-1100000,00000	1305814,50258	1,000	-6199205,6212	3999205,6212
	CUR livre	4800000,00000*	1226043,15511	,047	31799,8069	9568200,1931
	Luz UV	725000,00000	1037342,54008	1,000	-3325798,1161	4775798,1161
	Luz azul	6733333,33333*	1655904,64762	,044	107126,7597	13359539,9070
	FS/CUR+UV	28915000,00000*	821137,88382	,000	25386215,5691	32443784,4309
	FS/CUR+Azul	2608333,33333	941425,28416	,383	-1146089,9350	6362756,6017
	PDTF127	33326666,66667*	815272,15509	,000	29802023,2172	36851310,1162
	PDTP123	33636666,66667*	827375,67347	,000	30102554,9754	37170778,3579
	PDTlivre	33840833,33333*	830121,80407	,000	30304086,9841	37377579,6826
	FS/CUR+UV+Azul	35780000,00000*	812337,25643	,000	32257098,6289	39302901,3711
FS/CUR+UV	Controle	-	1052861,20196	,000	-	-
		29623333,33333*			33679784,7489	25566881,9178
	F127 vazia	-	1220301,13025	,000	-	-
		24740000,00000*			30010478,3200	19469521,6800
	P123 vazia	-	851291,20586	,000	-	-
		26798333,33333*			30459005,5188	23137661,1479
	FS vazia	-	823759,24452	,000	-	-
		32206666,66667*			35746919,6338	28666413,6995
	F127/CUR	-	458505,20194	,000	-	-
		26848333,33333*			28781630,9550	24915035,7117
	P123/CUR	-	1187689,27253	,000	-	-
		23231666,66667*			28360098,6233	18103234,7100
	FS/CUR	-	1029575,15510	,000	-	-
		30015000,00000*			34454225,8526	25575774,1474
	CUR livre	-	926312,74580	,000	-	-
		24115000,00000*			28103518,4963	20126481,5037
	Luz UV	-	656470,12903	,000	-	-
		28190000,00000*			30996945,4709	25383054,5291
	Luz azul	-	1448065,49813	,000	-	-
		22181666,66667*			28443479,9394	15919853,3939
FS/CUR+Azul	FSvazia+UV	-	821137,88382	,000	-	-
		28915000,00000*			32443784,4309	25386215,5691
	FS/CUR+Azul	-	491075,40206	,000	-	-
		26306666,66667*			28384344,0799	24228989,2535
	PDTF127	4411666,66667*	139793,31786	,000	3854015,7455	4969317,5878
	PDTP123	4721666,66667*	198554,75290	,000	3944838,7566	5498494,5768
	PDTlivre	4925833,33333*	209703,82554	,000	4101155,8612	5750510,8055
	FS/CUR+UV+Azul	6865000,00000*	121512,56326	,000	6340951,1813	7389048,8187
	Controle	-3316666,66667	1149143,52976	,296	-7636383,6681	1003050,3347
	F127 vazia	1566666,66667	1304281,02413	,996	-3810747,5066	6944080,8399

PDTF127	P123 vazia	-491666,66667	967838,23989	1,000	-4363364,1879	3380030,8546
	FS vazia	-5900000,00000*	943712,58037	,001	-9664564,9107	-2135435,0893
	F127/CUR	-541666,66667	649800,86305	1,000	-3066075,8078	1982742,4745
	P123/CUR	3075000,00000	1273821,00371	,587	-2165954,4216	8315954,4216
	FS/CUR	-3708333,33333	1127847,12679	,186	-8295015,5999	878348,9332
	CUR livre	2191666,66667	1034441,60997	,756	-1976965,0450	6360298,3783
	Luz UV	-1883333,33333	801852,33785	,623	-5027254,6945	1260588,0278
	Luz azul	4125000,00000	1519509,07476	,427	-2214741,2542	10464741,2542
	FSvazia+UV	-2608333,33333	941425,28416	,383	-6362756,6017	1146089,9350
	FS/CUR+UV	26306666,66667*	491075,40206	,000	24228989,2535	28384344,0799
	PDTF127	30718333,33333*	481202,98537	,000	28650276,3026	32786390,3641
	PDTP123	31028333,33333*	501436,06902	,000	28936752,7170	33119913,9496
	PDTlivre	31232500,00000*	505954,38120	,000	29133766,2165	33331233,7835
	FS/CUR+UV+Azul	33171666,66667*	476213,65420	,000	31106955,9958	35236377,3375
	Controle	-	1048292,88522	,000	-	-
		34035000,00000*			38081183,7060	29988816,2940
	F127 vazia	-	1216361,83396	,000	-	-
		29151666,66667*			34419694,3545	23883638,9788
	P123 vazia	-	845634,66095	,000	-	-
		31210000,00000*			34866738,8978	27553261,1022
	FS vazia	-	817912,31532	,000	-	-
		36618333,33333*			40154464,2520	33082202,4147
	F127/CUR	-	447915,48626	,000	-	-
		31260000,00000*			33182341,9866	29337658,0134
	P123/CUR	-	1183641,44516	,000	-	-
		27643333,33333*			32769231,4161	22517435,2506
	FS/CUR	-	1024903,05035	,000	-	-
		34426666,66667*			38862854,2532	29990479,0801
	CUR livre	-	921117,02061	,000	-	-
		28526666,66667*			32511687,1281	24541646,2052
	Luz UV	-	649118,08859	,000	-	-
		32601666,66667*			35402793,2035	29800540,1298
	Luz azul	-	1444747,36528	,000	-	-
		26593333,33333*			32853149,6210	20333517,0457
	FSvazia+UV	-	815272,15509	,000	-	-
		33326666,66667*			36851310,1162	29802023,2172
	FS/CUR+UV	-4411666,66667*	139793,31786	,000	-4969317,5878	-3854015,7455
	FS/CUR+Azul	-	481202,98537	,000	-	-
		30718333,33333*			32786390,3641	28650276,3026
	PDTP123	310000,00000	172699,89150	,900	-394667,0101	1014667,0101
	PDTlivre	514166,66667	185410,23993	,392	-247474,4450	1275807,7783
	FS/CUR+UV+Azul	2453333,33333*	71878,82620	,000	2146480,1142	2760186,5525

PDTP123	Controle	-	1057733,32716	,000	-	-
		34345000,00000*			38412664,1757	30277335,8243
	F127 vazia	-	1224507,21896	,000	-	-
		29461666,66667*			34735054,1244	24188279,2089
	P123 vazia	-	857309,62784	,000	-	-
		31520000,00000*			35185690,1000	27854309,9000
	FS vazia	-	829977,33327	,000	-	-
		36928333,33333*			40473885,2538	33382781,4129
	F127/CUR	-	469585,03065	,000	-	-
		31570000,00000*			33519305,6069	29620694,3931
	P123/CUR	-	1192010,43992	,000	-	-
		27953333,33333*			33084787,0021	22821879,6646
	FS/CUR	-	1034556,94904	,000	-	-
		34736666,66667*			39179612,9641	30293720,3693
	CUR livre	-	931846,75985	,000	-	-
		28836666,66667*			32829564,1536	24843769,1798
	Luz UV	-	664256,05839	,000	-	-
		32911666,66667*			35726511,5390	30096821,7943
	Luz azul	-	1451611,78270	,000	-	-
		26903333,33333*			33167457,6137	20639209,0530
PDTlivre	FSvazia+UV	-	827375,67347	,000	-	-
		33636666,66667*			37170778,3579	30102554,9754
	FS/CUR+UV	-	198554,75290	,000	-5498494,5768	-3944838,7566
		-4721666,66667*				
	FS/CUR+Azul	-	501436,06902	,000	-	-
		31028333,33333*			33119913,9496	28936752,7170
	PDTF127	-310000,00000	172699,89150	,900	-1014667,0101	394667,0101
	PDTlivre	204166,66667	232935,13100	1,000	-700932,8729	1109266,2062
	FS/CUR+UV+Azul	2143333,33333*	158266,81218	,000	1459190,7643	2827475,9024
	Controle	-	1059882,77462	,000	-	-
		34549166,66667*			38621861,6923	30476471,6411
	F127 vazia	-	1226364,39684	,000	-	-
		29665833,33333*			34940599,6206	24391067,0460
	P123 vazia	-	859960,17496	,000	-	-
		31724166,66667*			35392328,6139	28056004,7194
	FS vazia	-	832714,88415	,000	-	-
		37132500,00000*			40680671,6653	33584328,3347
	F127/CUR	-	474406,79333	,000	-	-
		31774166,66667*			33731714,3093	29816619,0240
	P123/CUR	-	1193918,16865	,000	-	-
		28157500,00000*			33290389,6876	23024610,3124
	FS/CUR	-	1036754,44795	,000	-	-
		34940833,33333*			39385574,2605	30496092,4062
	CUR livre	-	934285,87080	,000	-	-
		29040833,33333*			33035867,8014	25045798,8653
	Luz UV	-	667673,43489	,000	-	-
		33115833,33333*			35934674,1058	30296992,5609
	Luz azul	-	1453178,74751	,000	-	-
		27107500,00000*			33372702,7941	20842297,2059
	FSvazia+UV	-	830121,80407	,000	-	-
		33840833,33333*			37377579,6826	30304086,9841
	FS/CUR+UV	-	209703,82554	,000	-5750510,8055	-4101155,8612
		-4925833,33333*				
	FS/CUR+Azul	-	505954,38120	,000	-	-
		31232500,00000*			33331233,7835	29133766,2165

	PDTF127	-514166,66667	185410,23993	,392	-1275807,7783	247474,4450
	PDTP123	-204166,66667	232935,13100	1,000	-1109266,2062	700932,8729
	FS/CUR+UV+Azul	1939166,66667*	172046,76220	,000	1195074,2829	2683259,0505
FS/CUR+UV+Azul	Controle	-	1046012,00018	,000	-	-
		36488333,33333*			40529481,7004	32447184,9663
	F127 vazia	-	1214396,65778	,000	-	-
		31605000,00000*			36871906,1868	26338093,8132
	P123 vazia	-	842805,50017	,000	-	-
		33663333,33333*			37318401,1939	30008265,4727
	FS vazia	-	814986,92435	,000	-	-
		39071666,66667*			42606061,9326	35537271,4007
	F127/CUR	-	442551,02999	,000	-	-
		33713333,33333*			35631980,1905	31794686,4761
	P123/CUR	-	1181621,85238	,000	-	-
		30096666,66667*			35221410,0767	24971923,2566
	FS/CUR	-	1022569,99464	,000	-	-
		36880000,00000*			41314838,3285	32445161,6715
	CUR livre	-	918520,38462	,000	-	-
		30980000,00000*			34963502,5148	26996497,4852
	Luz UV	-	645428,09378	,000	-	-
		35055000,00000*			37853848,0269	32256151,9731
	Luz azul	-	1443093,23358	,000	-	-
		29046666,66667*			35305547,9731	22787785,3603
	FSvazia+UV	-	812337,25643	,000	-	-
		35780000,00000*			39302901,3711	32257098,6289
	FS/CUR+UV	-6865000,00000*	121512,56326	,000	-7389048,8187	-6340951,1813
	FS/CUR+Azul	-	476213,65420	,000	-	-
		33171666,66667*			35236377,3375	31106955,9958
	PDTF127	-2453333,33333*	71878,82620	,000	-2760186,5525	-2146480,1142
	PDTP123	-2143333,33333*	158266,81218	,000	-2827475,9024	-1459190,7643
	PDTlivre	-1939166,66667*	172046,76220	,000	-2683259,0505	-1195074,2829

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

OUT-PUT DA ANÁLISE ESTATÍSTICA Biomassa *Pseudomonas aeruginosa*

Tests of Normality

grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk	
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df
Control	,110	12	,200*	,986	12
F127 vazia	,123	12	,200*	,941	12
P123 vazia	,281	12	,010	,863	12
FS vazia	,186	12	,200*	,899	12
F127/CUR	,200	12	,200*	,909	12
P123/CUR	,211	12	,146	,880	12
FS/CUR	,165	12	,200*	,913	12
CUR livre	,152	12	,200*	,974	12
Luz UV	,174	12	,200*	,966	12
Luz azul	,164	12	,200*	,967	12
FSvazia+UV	,123	12	,200*	,928	12
FS/CUR+UV	,234	12	,070	,855	12
FS/CUR+Azul	,146	12	,200*	,965	12
PDTF127	,262	12	,022	,872	12
PDTP123	,256	12	,029	,898	12
PDTlivre	,367	12	,000	,692	12
FS/CUR+UV+Azul	,324	12	,001	,824	12

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Based on Mean	2,773	16	187	,001
Based on Median	1,583	16	187	,077
Based on Median and with adjusted df	1,583	16	113,556	,085
Based on trimmed mean	2,560	16	187	,001

ANOVA

absorbância

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,307	16	,519	5,832	,000
Within Groups	16,646	187	,089		

Total	24,953	203			
-------	--------	-----	--	--	--

Robust Tests of Equality of Means

absorbância

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	7,506	16	69,909	,000

a. Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
Control	F127 vazia	,04450	,12799	1,000	-,4576
	P123 vazia	-,00708	,12416	1,000	-,4973
	FS vazia	,01533	,12835	1,000	-,4880
	F127/CUR	,44600	,13015	,128	-,0632
	P123/CUR	,36483	,12678	,323	-,1334
	FS/CUR	,03625	,15798	1,000	-,5785
	CUR livre	,21392	,12951	,948	-,2932
	Luz UV	,32217	,12412	,475	-,1679
	Luz azul	-,18333	,12886	,985	-,6883
	FSvazia+UV	,30392	,13689	,701	-,2288
	FS/CUR+UV	,16508	,15170	,999	-,4242
	FS/CUR+Azul	,13683	,12077	,998	-,3436
	PDTF127	,40217	,15765	,498	-,2113
	PDTP123	,42617	,10925	,077	-,0286
	PDTlivre	,53725	,16074	,147	-,0889
	FS/CUR+UV+Azul	,43825	,11118	,067	-,0198
F127 vazia	Control	-,04450	,12799	1,000	-,5466
	P123 vazia	-,05158	,10214	1,000	-,4485
	FS vazia	-,02917	,10719	1,000	-,4453
	F127/CUR	,40150	,10935	,077	-,0231
	P123/CUR	,32033	,10531	,245	-,0886
	FS/CUR	-,00825	,14133	1,000	-,5684
	CUR livre	,16942	,10858	,968	-,2522
	Luz UV	,27767	,10209	,400	-,1191

	Luz azul	-,22783	,10780	,763	-,6464
	FSvazia+UV	,25942	,11729	,706	-,1975
	FS/CUR+UV	,12058	,13427	1,000	-,4087
	FS/CUR+Azul	,09233	,09798	1,000	-,2896
	PDTF127	,35767	,14096	,510	-,2009
	PDTP123	,38167*	,08337	,020	,0428
	PDTlivre	,49275	,14441	,140	-,0810
	FS/CUR+UV+Azul	,39375*	,08589	,017	,0490
P123 vazia	Control	,00708	,12416	1,000	-,4831

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval	
		Upper Bound	
Control	F127 vazia	,5466	
	P123 vazia	,4831	
	FS vazia	,5186	
	F127/CUR	,9552	
	P123/CUR	,8631	
	FS/CUR	,6510	
	CUR livre	,7210	
	Luz UV	,8123	
	Luz azul	,3216	
	FSvazia+UV	,8366	
	FS/CUR+UV	,7544	
	FS/CUR+Azul	,6172	
	PDTF127	1,0156	
	PDTP123	,8809	
	PDTlivre	1,1634	
	FS/CUR+UV+Azul	,8963	
	Control	,4576	
	P123 vazia	,3453	
	FS vazia	,3870	
F127 vazia	F127/CUR	,8261	
	P123/CUR	,7292	
	FS/CUR	,5519	
	CUR livre	,5910	
	Luz UV	,6744	
	Luz azul	,1907	
	FSvazia+UV	,7163	

	FS/CUR+UV	,6499
	FS/CUR+Azul	,4743
	PDTF127	,9162
	PDTP123	,7205*
	PDTlivre	1,0665
	FS/CUR+UV+Azul	,7385*
P123 vazia	Control	,4973

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
P123 vazia	F127 vazia	,05158	,10214	1,000	-,3453
	FS vazia	,02242	,10259	1,000	-,3763
	F127/CUR	,45308	,10483	,020	,0452
	P123/CUR	,37192	,10062	,073	-,0189
	FS/CUR	,04333	,13787	1,000	-,5073
	CUR livre	,22100	,10404	,757	-,1837
	Luz UV	,32925	,09725	,134	-,0483
	Luz azul	-,17625	,10322	,935	-,5776
	FSvazia+UV	,31100	,11309	,386	-,1314
	FS/CUR+UV	,17217	,13062	,992	-,3464
	FS/CUR+Azul	,14392	,09292	,969	-,2172
	PDTF127	,40925	,13749	,287	-,1397
	PDTP123	,43325	,07736	,003	,1213
	PDTlivre	,54433	,14102	,065	-,0203
	FS/CUR+UV+Azul	,44533	,08007	,002	,1264
	Control	-,01533	,12835	1,000	-,5186
	F127 vazia	,02917	,10719	1,000	-,3870
	P123 vazia	-,02242	,10259	1,000	-,4212
	F127/CUR	,43067	,10977	,046	,0044
	P123/CUR	,34950	,10574	,155	-,0611
FS vazia	FS/CUR	,02092	,14165	1,000	-,5402
	CUR livre	,19858	,10901	,899	-,2247
	Luz UV	,30683	,10254	,266	-,0918
	Luz azul	-,19867	,10822	,894	-,6189
	FSvazia+UV	,28858	,11768	,558	-,1697
	FS/CUR+UV	,14975	,13461	,999	-,3806
	FS/CUR+Azul	,12150	,09845	,996	-,2624

F127/CUR	PDTF127	,38683	,14128	,397	-,1727
	PDTP123	,41083	,08392	,011	,0695
	PDTlivre	,52192*	,14472	,099	-,0527
	FS/CUR+UV+Azul	,42292	,08643	,010	,0758
	Control	-,44600*	,13015	,128	-,9552
	F127 vazia	-,40150	,10935	,077	-,8261

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval	
		Upper Bound	
P123 vazia	F127 vazia	,4485	
	FS vazia	,4212	
	F127/CUR	,8610	
	P123/CUR	,7627	
	FS/CUR	,5940	
	CUR livre	,6257	
	Luz UV	,7068	
	Luz azul	,2251	
	FSvazia+UV	,7534	
	FS/CUR+UV	,6907	
	FS/CUR+Azul	,5051	
	PDTF127	,9582	
	PDTP123	,7452	
	PDTlivre	1,1090	
	FS/CUR+UV+Azul	,7642	
	Control	,4880	
	F127 vazia	,4453	
	P123 vazia	,3763	
	F127/CUR	,8569	
	P123/CUR	,7601	
FS vazia	FS/CUR	,5821	
	CUR livre	,6218	
	Luz UV	,7054	
	Luz azul	,2215	
	FSvazia+UV	,7469	
	FS/CUR+UV	,6801	
	FS/CUR+Azul	,5054	
	PDTF127	,9463	
	PDTP123	,7522	

F127/CUR	PDTlivre	1,0966*
	FS/CUR+UV+Azul	,7701
	Control	,0632*
	F127 vazia	,0231

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
F127/CUR	P123 vazia	-,45308	,10483	,020	-,8610
	FS vazia	-,43067	,10977	,046	-,8569
	P123/CUR	-,08117	,10793	1,000	-,5005
	FS/CUR	-,40975	,14329	,334	-,9757
	CUR livre	-,23208	,11113	,777	-,6635
	Luz UV	-,12383	,10479	,998	-,5316
	Luz azul	-,62933	,11036	,001	-1,0578
	FSvazia+UV	-,14208	,11964	,997	-,6074
	FS/CUR+UV	-,28092	,13633	,790	-,8166
	FS/CUR+Azul	-,30917	,10079	,238	-,7029
	PDTF127	-,04383	,14292	1,000	-,6082
	PDTP123	-,01983	,08666	1,000	-,3734
	PDTlivre	,09125	,14633	1,000	-,4880
	FS/CUR+UV+Azul	-,00775	,08908	1,000	-,3668
	Control	-,36483	,12678	,323	-,8631
	F127 vazia	-,32033	,10531	,245	-,7292
	P123 vazia	-,37192	,10062	,073	-,7627
	FS vazia	-,34950	,10574	,155	-,7601
	F127/CUR	,08117	,10793	1,000	-,3381
	FS/CUR	-,32858	,14023	,627	-,8857
P123/CUR	CUR livre	-,15092	,10715	,987	-,5671
	Luz UV	-,04267	,10057	1,000	-,4333
	Luz azul	-,54817	,10636	,003	-,9612
	FSvazia+UV	-,06092	,11597	1,000	-,5132
	FS/CUR+UV	-,19975	,13312	,975	-,7256
	FS/CUR+Azul	-,22800	,09640	,612	-,6033
	PDTF127	,03733	,13986	1,000	-,5181
	PDTP123	,06133	,08150	1,000	-,2692
	PDTlivre	,17242	,14333	,997	-,3984
	FS/CUR+UV+Azul	,07342*	,08408	1,000	-,2633

FS/CUR	Control	-,03625	,15798	1,000	-,6510
	F127 vazia	,00825*	,14133	1,000	-,5519
	P123 vazia	-,04333	,13787	1,000	-,5940

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval	
		Upper Bound	
F127/CUR	P123 vazia	-,0452	
	FS vazia	-,0044	
	P123/CUR	,3381	
	FS/CUR	,1562	
	CUR livre	,1994	
	Luz UV	,2839	
	Luz azul	-,2008	
	FSvazia+UV	,3233	
	FS/CUR+UV	,2548	
	FS/CUR+Azul	,0845	
	PDTF127	,5205	
	PDTP123	,3338	
	PDTlivre	,6705	
	FS/CUR+UV+Azul	,3513	
	Control	,1334	
	F127 vazia	,0886	
	P123 vazia	,0189	
	FS vazia	,0611	
	F127/CUR	,5005	
	FS/CUR	,2285	
P123/CUR	CUR livre	,2653	
	Luz UV	,3480	
	Luz azul	-,1351	
	FSvazia+UV	,3913	
	FS/CUR+UV	,3261	
	FS/CUR+Azul	,1473	
	PDTF127	,5928	
	PDTP123	,3918	
	PDTlivre	,7432	
	FS/CUR+UV+Azul	,4101*	
FS/CUR	Control	,5785	
	F127 vazia	,5684*	

P123 vazia

,5073

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR	FS vazia	-,02092	,14165	1,000	-,5821
	F127/CUR	,40975	,14329	,334	-,1562
	P123/CUR	,32858	,14023	,627	-,2285
	CUR livre	,17767	,14271	,995	-,3866
	Luz UV	,28592	,13784	,780	-,2646
	Luz azul	-,21958	,14211	,968	-,7821
	FSvazia+UV	,26767	,14944	,908	-,3176
	FS/CUR+UV	,12883	,16311	1,000	-,5048
	FS/CUR+Azul	,10058	,13482	1,000	-,4423
	PDTF127	,36592	,16866	,731	-,2889
	PDTP123	,38992	,12461	,253	-,1333
	PDTLivre	,50100	,17155	,297	-,1651
	FS/CUR+UV+Azul	,40200	,12631	,230	-,1237
	Control	-,21392	,12951	,948	-,7210
	F127 vazia	-,16942	,10858	,968	-,5910
	P123 vazia	-,22100	,10404	,757	-,6257
	FS vazia	-,19858	,10901	,899	-,6218
	F127/CUR	,23208	,11113	,777	-,1994
	P123/CUR	,15092	,10715	,987	-,2653
	FS/CUR	-,17767	,14271	,995	-,7419
CUR livre	Luz UV	,10825	,10400	,999	-,2963
	Luz azul	-,39725	,10960	,084	-,8228
	FSvazia+UV	,09000	,11895	1,000	-,3728
	FS/CUR+UV	-,04883	,13572	1,000	-,5826
	FS/CUR+Azul	-,07708	,09996	1,000	-,4673
	PDTF127	,18825	,14234	,992	-,3744
	PDTP123	,21225	,08569	,550	-,1370
	PDTLivre	,32333	,14576	,701	-,2543
	FS/CUR+UV+Azul	,22433	,08815	,509	-,1305
	Control	-,32217*	,12412	,475	-,8123
Luz UV	F127 vazia	-,27767	,10209	,400	-,6744
	P123 vazia	-,32925*	,09725	,134	-,7068
	FS vazia	-,30683	,10254	,266	-,7054

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
FS/CUR	FS vazia	,5402
	F127/CUR	,9757
	P123/CUR	,8857
	CUR livre	,7419
	Luz UV	,8365
	Luz azul	,3429
	FSvazia+UV	,8530
	FS/CUR+UV	,7625
	FS/CUR+Azul	,6435
	PDTF127	1,0207
	PDTP123	,9131
	PDTlivre	1,1671
	FS/CUR+UV+Azul	,9277
	Control	,2932
	F127 vazia	,2522
	P123 vazia	,1837
	FS vazia	,2247
	F127/CUR	,6635
	P123/CUR	,5671
	FS/CUR	,3866
CUR livre	Luz UV	,5128
	Luz azul	,0283
	FSvazia+UV	,5528
	FS/CUR+UV	,4850
	FS/CUR+Azul	,3131
	PDTF127	,7509
	PDTP123	,5615
	PDTlivre	,9009
	FS/CUR+UV+Azul	,5792
	Control	,1679*
Luz UV	F127 vazia	,1191
	P123 vazia	,0483*
	FS vazia	,0918

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
Luz UV	F127/CUR	,12383	,10479	,998	-,2839
	P123/CUR	,04267	,10057	1,000	-,3480
	FS/CUR	-,28592	,13784	,780	-,8365
	CUR livre	-,10825	,10400	,999	-,5128
	Luz azul	-,50550	,10318	,006	-,9067
	FSvazia+UV	-,01825	,11306	1,000	-,4606
	FS/CUR+UV	-,15708	,13059	,997	-,6756
	FS/CUR+Azul	-,18533	,09288	,825	-,5463
	PDTF127	,08000	,13746	1,000	-,4689
	PDTP123	,10400	,07731	,989	-,2077
	PDTlivre	,21508	,14099	,970	-,3495
	FS/CUR+UV+Azul	,11608	,08002	,981	-,2026
	Control	,18333	,12886	,985	-,3216
	F127 vazia	,22783	,10780	,763	-,1907
	P123 vazia	,17625	,10322	,935	-,2251
	FS vazia	,19867	,10822	,894	-,2215
	F127/CUR	,62933	,11036	,001	,2008
	P123/CUR	,54817	,10636	,003	,1351
	FS/CUR	,21958	,14211	,968	-,3429
	CUR livre	,39725	,10960	,084	-,0283
Luz azul	Luz UV	,50550	,10318	,006	,1043
	FSvazia+UV	,48725	,11823	,031	,0270
	FS/CUR+UV	,34842	,13509	,484	-,1834
	FS/CUR+Azul	,32017	,09911	,180	-,0665
	PDTF127	,58550	,14174	,036	,0246
	PDTP123	,60950	,08470	,000	,2647
	PDTlivre	,72058	,14517	,007	,1447
	FS/CUR+UV+Azul	,62158	,08718	,000	,2711
	Control	-,30392	,13689	,701	-,8366
	F127 vazia	-,25942*	,11729	,706	-,7163
FSvazia+UV	P123 vazia	-,31100	,11309	,386	-,7534
	FS vazia	-,28858*	,11768	,558	-,7469
	F127/CUR	,14208	,11964	,997	-,3233

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
-----------	-----------	-------------------------

		Upper Bound
Luz UV	F127/CUR	,5316
	P123/CUR	,4333
	FS/CUR	,2646
	CUR livre	,2963
	Luz azul	-,1043
	FSvazia+UV	,4241
	FS/CUR+UV	,3614
	FS/CUR+Azul	,1756
	PDTF127	,6289
	PDTP123	,4157
	PDTlivre	,7796
	FS/CUR+UV+Azul	,4347
	Control	,6883
	F127 vazia	,6464
	P123 vazia	,5776
	FS vazia	,6189
	F127/CUR	1,0578
	P123/CUR	,9612
	FS/CUR	,7821
	CUR livre	,8228
Luz azul	Luz UV	,9067
	FSvazia+UV	,9475
	FS/CUR+UV	,8802
	FS/CUR+Azul	,7068
	PDTF127	1,1464
	PDTP123	,9543
	PDTlivre	1,2965
	FS/CUR+UV+Azul	,9721
	Control	,2288
	F127 vazia	,1975*
FSvazia+UV	P123 vazia	,1314
	FS vazia	,1697*
	F127/CUR	,6074

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound

FSvazia+UV	P123/CUR	,06092	,11597	1,000	-,3913
	FS/CUR	-,26767	,14944	,908	-,8530
	CUR livre	-,09000	,11895	1,000	-,5528
	Luz UV	,01825	,11306	1,000	-,4241
	Luz azul	-,48725	,11823	,031	-,9475
	FS/CUR+UV	-,13883	,14278	1,000	-,6959
	FS/CUR+Azul	-,16708	,10936	,971	-,5975
	PDTF127	,09825	,14909	1,000	-,4855
	PDTP123	,12225	,09649	,993	-,2754
	PDTlivre	,23333	,15235	,971	-,3644
	FS/CUR+UV+Azul	,13433	,09867	,988	-,2676
	Control	-,16508	,15170	,999	-,7544
	F127 vazia	-,12058	,13427	1,000	-,6499
	P123 vazia	-,17217	,13062	,992	-,6907
	FS vazia	-,14975	,13461	,999	-,6801
	F127/CUR	,28092	,13633	,790	-,2548
	P123/CUR	,19975	,13312	,975	-,3261
	FS/CUR	-,12883	,16311	1,000	-,7625
	CUR livre	,04883	,13572	1,000	-,4850
FS/CUR+UV	Luz UV	,15708	,13059	,997	-,3614
	Luz azul	-,34842	,13509	,484	-,8802
	FSvazia+UV	,13883	,14278	1,000	-,4183
	FS/CUR+Azul	-,02825	,12740	1,000	-,5381
	PDTF127	,23708	,16278	,982	-,3953
	PDTP123	,26108	,11654	,686	-,2262
	PDTlivre	,37217	,16578	,686	-,2722
	FS/CUR+UV+Azul	,27317	,11835	,648	-,2169
	Control	-,13683	,12077	,998	-,6172
	F127 vazia	-,09233	,09798	1,000	-,4743
FS/CUR+Azul	P123 vazia	-,14392*	,09292	,969	-,5051
	FS vazia	-,12150	,09845	,996	-,5054
	F127/CUR	,30917*	,10079	,238	-,0845
	P123/CUR	,22800	,09640	,612	-,1473

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
FSvazia+UV	P123/CUR	,5132
	FS/CUR	,3176

FS/CUR+UV	CUR livre	,3728
	Luz UV	,4606
	Luz azul	-,0270
	FS/CUR+UV	,4183
	FS/CUR+Azul	,2633
	PDTF127	,6820
	PDTP123	,5199
	PDTlivre	,8311
	FS/CUR+UV+Azul	,5363
	Control	,4242
	F127 vazia	,4087
	P123 vazia	,3464
	FS vazia	,3806
	F127/CUR	,8166
	P123/CUR	,7256
	FS/CUR	,5048
	CUR livre	,5826
	Luz UV	,6756
	Luz azul	,1834
	FSvazia+UV	,6959
	FS/CUR+Azul	,4816
	PDTF127	,8694
	PDTP123	,7483
	PDTlivre	1,0166
	FS/CUR+UV+Azul	,7633
	Control	,3436
	F127 vazia	,2896
FS/CUR+Azul	P123 vazia	,2172*
	FS vazia	,2624
	F127/CUR	,7029*
	P123/CUR	,6033

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR+Azul	FS/CUR	-,10058	,13482	1,000	-,6435
	CUR livre	,07708	,09996	1,000	-,3131
	Luz UV	,18533	,09288	,825	-,1756
	Luz azul	-,32017	,09911	,180	-,7068

PDTF127	FSvazia+UV	,16708	,10936	,971	-,2633
	FS/CUR+UV	,02825	,12740	1,000	-,4816
	PDTF127	,26533	,13443	,829	-,2758
	PDTP123	,28933	,07179	,047	,0022
	PDTlivre	,40042	,13804	,325	-,1569
	FS/CUR+UV+Azul	,30142	,07470	,043	,0062
	Control	-,40217	,15765	,498	-1,0156
	F127 vazia	-,35767	,14096	,510	-,9162
	P123 vazia	-,40925	,13749	,287	-,9582
	FS vazia	-,38683	,14128	,397	-,9463
	F127/CUR	,04383	,14292	1,000	-,5205
	P123/CUR	-,03733	,13986	1,000	-,5928
	FS/CUR	-,36592	,16866	,731	-1,0207
	CUR livre	-,18825	,14234	,992	-,7509
	Luz UV	-,08000	,13746	1,000	-,6289
	Luz azul	-,58550	,14174	,036	-1,1464
	FSvazia+UV	-,09825	,14909	1,000	-,6820
	FS/CUR+UV	-,23708	,16278	,982	-,8694
	FS/CUR+Azul	-,26533	,13443	,829	-,8065
	PDTP123	,02400	,12419	1,000	-,4973
PDTP123	PDTlivre	,13508	,17124	1,000	-,5299
	FS/CUR+UV+Azul	,03608	,12589	1,000	-,4877
	Control	-,42617	,10925	,077	-,8809
	F127 vazia	-,38167	,08337	,020	-,7205
	P123 vazia	-,43325	,07736	,003	-,7452
	FS vazia	-,41083*	,08392	,011	-,7522
	F127/CUR	,01983	,08666	1,000	-,3338
	P123/CUR	-,06133*	,08150	1,000	-,3918
	FS/CUR	-,38992	,12461	,253	-,9131

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
FS/CUR+Azul	FS/CUR	,4423
	CUR livre	,4673
	Luz UV	,5463
	Luz azul	,0665
	FSvazia+UV	,5975
	FS/CUR+UV	,5381
	PDTF127	,8065

PDTF127	PDTP123	,5764
	PDTlivre	,9577
	FS/CUR+UV+Azul	,5967
	Control	,2113
	F127 vazia	,2009
	P123 vazia	,1397
	FS vazia	,1727
	F127/CUR	,6082
	P123/CUR	,5181
	FS/CUR	,2889
	CUR livre	,3744
	Luz UV	,4689
	Luz azul	-,0246
	FSvazia+UV	,4855
	FS/CUR+UV	,3953
	FS/CUR+Azul	,2758
	PDTP123	,5453
	PDTlivre	,8000
	FS/CUR+UV+Azul	,5599
PDTP123	Control	,0286
	F127 vazia	-,0428
	P123 vazia	-,1213
	FS vazia	-,0695*
	F127/CUR	,3734
	P123/CUR	,2692*
	FS/CUR	,1333

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
PDTP123	CUR livre	-,21225	,08569	,550	-,5615
	Luz UV	-,10400	,07731	,989	-,4157
	Luz azul	-,60950	,08470	,000	-,9543
	FSvazia+UV	-,12225	,09649	,993	-,5199
	FS/CUR+UV	-,26108	,11654	,686	-,7483
	FS/CUR+Azul	-,28933	,07179	,047	-,5764
	PDTF127	-,02400	,12419	1,000	-,5453
	PDTlivre	,11108	,12809	1,000	-,4276
	FS/CUR+UV+Azul	,01208	,05414	1,000	-,1986

PDTlivre	Control	-,53725	,16074	,147	-1,1634
	F127 vazia	-,49275	,14441	,140	-1,0665
	P123 vazia	-,54433	,14102	,065	-1,1090
	FS vazia	-,52192	,14472	,099	-1,0966
	F127/CUR	-,09125	,14633	1,000	-,6705
	P123/CUR	-,17242	,14333	,997	-,7432
	FS/CUR	-,50100	,17155	,297	-1,1671
	CUR livre	-,32333	,14576	,701	-,9009
	Luz UV	-,21508	,14099	,970	-,7796
	Luz azul	-,72058	,14517	,007	-1,2965
	FSvazia+UV	-,23333	,15235	,971	-,8311
	FS/CUR+UV	-,37217	,16578	,686	-1,0166
	FS/CUR+Azul	-,40042	,13804	,325	-,9577
	PDTF127	-,13508	,17124	1,000	-,8000
	PDTP123	-,11108	,12809	1,000	-,6497
	FS/CUR+UV+Azul	-,09900	,12974	1,000	-,6400
FS/CUR+UV+Azul	Control	-,43825	,11118	,067	-,8963
	F127 vazia	-,39375	,08589	,017	-,7385
	P123 vazia	-,44533	,08007	,002	-,7642
	FS vazia	-,42292	,08643	,010	-,7701
	F127/CUR	,00775*	,08908	1,000	-,3513
	P123/CUR	-,07342	,08408	1,000	-,4101
	FS/CUR	-,40200*	,12631	,230	-,9277
	CUR livre	-,22433	,08815	,509	-,5792

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval	
		Upper Bound	
PDTP123	CUR livre	,1370	
	Luz UV	,2077	
	Luz azul	-,2647	
	FSvazia+UV	,2754	
	FS/CUR+UV	,2262	
	FS/CUR+Azul	-,0022	
	PDTF127	,4973	
	PDTlivre	,6497	
	FS/CUR+UV+Azul	,2228	
	Control	,0889	
PDTlivre	F127 vazia	,0810	
	P123 vazia	,0203	

FS/CUR+UV+Azul	FS vazia	,0527
	F127/CUR	,4880
	P123/CUR	,3984
	FS/CUR	,1651
	CUR livre	,2543
	Luz UV	,3495
	Luz azul	-,1447
	FSvazia+UV	,3644
	FS/CUR+UV	,2722
	FS/CUR+Azul	,1569
	PDTF127	,5299
	PDTP123	,4276
	FS/CUR+UV+Azul	,4420
	Control	,0198
	F127 vazia	-,0490
	P123 vazia	-,1264
	FS vazia	-,0758
	F127/CUR	,3668*
	P123/CUR	,2633
	FS/CUR	,1237*
	CUR livre	,1305

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR+UV+Azul	Luz UV	-,11608	,08002	,981	-,4347
	Luz azul	-,62158	,08718	,000	-,9721
	FSvazia+UV	-,13433	,09867	,988	-,5363
	FS/CUR+UV	-,27317	,11835	,648	-,7633
	FS/CUR+Azul	-,30142	,07470	,043	-,5967
	PDTF127	-,03608	,12589	1,000	-,5599
	PDTP123	-,01208	,05414	1,000	-,2228
	PDTlivre	,09900	,12974	1,000	-,4420

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound

FS/CUR+UV+Azul	Luz UV	,2026
	Luz azul	-,2711
	FSvazia+UV	,2676
	FS/CUR+UV	,2169
	FS/CUR+Azul	-,0062
	PDTF127	,4877
	PDTP123	,1986
	PDTlivre	,6400

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tests of Normality

grupo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk	
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df
absorbância	Control	,133	12	,200*	,930	12
	F127 vazia	,241	12	,053	,904	12
	P123 vazia	,205	12	,173	,891	12
	FS vazia	,280	12	,010	,681	12
	F127/CUR	,199	12	,200*	,919	12
	P123/CUR	,161	12	,200*	,894	12
	FS/CUR	,164	12	,200*	,969	12
	CUR livre	,161	12	,200*	,958	12
	Luz UV	,302	12	,003	,720	12
	Luz azul	,126	12	,200*	,947	12
	FSvazia+UV	,207	12	,167	,904	12
	FS/CUR+UV	,186	12	,200*	,913	12
	FS/CUR+Azul	,206	12	,168	,917	12
	PDTF127	,258	12	,027	,832	12
	PDTP123	,197	12	,200*	,879	12
	PDTlivre	,222	12	,104	,922	12
	FS/CUR+UV+Azul	,264	12	,021	,858	12

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

OUT-PUT DA ANÁLISE ESTATÍSTICA Biomassa MRSA

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Based on Mean	1,339	16	187	,177
Based on Median	,915	16	187	,553
Based on Median and with adjusted df	,915	16	107,219	,554
Based on trimmed mean	1,211	16	187	,263

ANOVA

absorbância

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,513	16	,532	5,553	,000
Within Groups	17,918	187	,096		
Total	26,430	203			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
Control	F127 vazia	,05925	,12637	1,000	-,3839
	P123 vazia	,26342	,12637	,798	-,1798
	FS vazia	,14792	,12637	,999	-,2953
	F127/CUR	,24233	,12637	,884	-,2008
	P123/CUR	,27008	,12637	,766	-,1731
	FS/CUR	,38142	,12637	,187	-,0618
	CUR livre	,20792	,12637	,967	-,2353
	Luz UV	,38633	,12637	,171	-,0568
	Luz azul	-,12500	,12637	1,000	-,5682
	FSvazia+UV	,49125*	,12637	,014	,0481
	FS/CUR+UV	,30200	,12637	,588	-,1412
	FS/CUR+Azul	,15658	,12637	,998	-,2866
	PDTF127	,59608*	,12637	,001	,1529
	PDTP123	,44858*	,12637	,044	,0054
	PDTlivre	,50233*	,12637	,011	,0592
	FS/CUR+UV+Azul	,65008*	,12637	,000	,2069

F127 vazia	Control	-,05925	,12637	1,000	-,5024
	P123 vazia	,20417	,12637	,972	-,2390
	FS vazia	,08867	,12637	1,000	-,3545
	F127/CUR	,18308	,12637	,990	-,2601
	P123/CUR	,21083	,12637	,962	-,2323
	FS/CUR	,32217	,12637	,469	-,1210
	CUR livre	,14867	,12637	,999	-,2945
	Luz UV	,32708	,12637	,441	-,1161
	Luz azul	-,18425	,12637	,990	-,6274
	FSvazia+UV	,43200	,12637	,065	-,0112
	FS/CUR+UV	,24275	,12637	,883	-,2004
	FS/CUR+Azul	,09733	,12637	1,000	-,3458
	PDTF127	,53683*	,12637	,004	,0937
	PDTP123	,38933	,12637	,161	-,0538
	PDTlivre	,44308	,12637	,050	-,0001
	FS/CUR+UV+Azul	,59083*	,12637	,001	,1477
P123 vazia	Control	-,26342	,12637	,798	-,7066

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
Control	F127 vazia	,5024
	P123 vazia	,7066
	FS vazia	,5911
	F127/CUR	,6855
	P123/CUR	,7133
	FS/CUR	,8246
	CUR livre	,6511
	Luz UV	,8295
	Luz azul	,3182
	FSvazia+UV	,9344*
	FS/CUR+UV	,7452
	FS/CUR+Azul	,5998
	PDTF127	1,0393*
	PDTP123	,8918*
	PDTlivre	,9455*
F127 vazia	FS/CUR+UV+Azul	1,0933*
	Control	,3839
	P123 vazia	,6473

P123 vazia	FS vazia	,5318
	F127/CUR	,6263
	P123/CUR	,6540
	FS/CUR	,7653
	CUR livre	,5918
	Luz UV	,7703
	Luz azul	,2589
	FSvazia+UV	,8752
	FS/CUR+UV	,6859
	FS/CUR+Azul	,5405
	PDTF127	,9800*
	PDTP123	,8325
	PDTlivre	,8863
	FS/CUR+UV+Azul	1,0340*
	Control	,1798

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
P123 vazia	F127 vazia	-,20417	,12637	,972	-,6473
	FS vazia	-,11550	,12637	1,000	-,5587
	F127/CUR	-,02108	,12637	1,000	-,4643
	P123/CUR	,00667	,12637	1,000	-,4365
	FS/CUR	,11800	,12637	1,000	-,3252
	CUR livre	-,05550	,12637	1,000	-,4987
	Luz UV	,12292	,12637	1,000	-,3203
	Luz azul	-,38842	,12637	,164	-,8316
	FSvazia+UV	,22783	,12637	,928	-,2153
	FS/CUR+UV	,03858*	,12637	1,000	-,4046
	FS/CUR+Azul	-,10683	,12637	1,000	-,5500
	PDTF127	,33267	,12637	,410	-,1105
	PDTP123	,18517*	,12637	,989	-,2580
	PDTlivre	,23892*	,12637	,896	-,2043
	FS/CUR+UV+Azul	,38667*	,12637	,170	-,0565
	Control	-,14792*	,12637	,999	-,5911
FS vazia	F127 vazia	-,08867	,12637	1,000	-,5318
	P123 vazia	,11550	,12637	1,000	-,3277
	F127/CUR	,09442	,12637	1,000	-,3488

F127/CUR	P123/CUR	,12217	,12637	1,000	-,3210
	FS/CUR	,23350	,12637	,912	-,2097
	CUR livre	,06000	,12637	1,000	-,3832
	Luz UV	,23842	,12637	,897	-,2048
	Luz azul	-,27292	,12637	,752	-,7161
	FSvazia+UV	,34333	,12637	,353	-,0998
	FS/CUR+UV	,15408	,12637	,999	-,2891
	FS/CUR+Azul	,00867	,12637	1,000	-,4345
	PDTF127	,44817	,12637	,044	,0050
	PDTP123	,30067*	,12637	,596	-,1425
	PDTlivre	,35442	,12637	,298	-,0888
	FS/CUR+UV+Azul	,50217	,12637	,011	,0590
	Control	-,24233*	,12637	,884	-,6855
	F127 vazia	-,18308	,12637	,990	-,6263

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
P123 vazia	F127 vazia	,2390
	FS vazia	,3277
	F127/CUR	,4221
	P123/CUR	,4498
	FS/CUR	,5612
	CUR livre	,3877
	Luz UV	,5661
	Luz azul	,0548
	FSvazia+UV	,6710
	FS/CUR+UV	,4818*
	FS/CUR+Azul	,3363
	PDTF127	,7758
	PDTP123	,6283*
	PDTlivre	,6821*
	FS/CUR+UV+Azul	,8298*
	Control	,2953*
	F127 vazia	,3545
FS vazia	P123 vazia	,5587
	F127/CUR	,5376
	P123/CUR	,5653
	FS/CUR	,6767

F127/CUR	CUR livre	,5032
	Luz UV	,6816
	Luz azul	,1703
	FSvazia+UV	,7865
	FS/CUR+UV	,5973
	FS/CUR+Azul	,4518
	PDTF127	,8913
	PDTP123	,7438*
	PDTlivre	,7976
	FS/CUR+UV+Azul	,9453
	Control	,2008*
	F127 vazia	,2601

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
F127/CUR	P123 vazia	,02108	,12637	1,000	-,4221
	FS vazia	-,09442	,12637	1,000	-,5376
	P123/CUR	,02775	,12637	1,000	-,4154
	FS/CUR	,13908	,12637	1,000	-,3041
	CUR livre	-,03442	,12637	1,000	-,4776
	Luz UV	,14400	,12637	,999	-,2992
	Luz azul	-,36733	,12637	,241	-,8105
	FSvazia+UV	,24892	,12637	,861	-,1943
	FS/CUR+UV	,05967	,12637	1,000	-,3835
	FS/CUR+Azul	-,08575*	,12637	1,000	-,5289
	PDTF127	,35375	,12637	,301	-,0894
	PDTP123	,20625	,12637	,969	-,2369
	PDTlivre	,26000*	,12637	,814	-,1832
	FS/CUR+UV+Azul	,40775*	,12637	,111	-,0354
	Control	-,27008*	,12637	,766	-,7133
	F127 vazia	-,21083*	,12637	,962	-,6540
	P123 vazia	-,00667	,12637	1,000	-,4498
P123/CUR	FS vazia	-,12217	,12637	1,000	-,5653
	F127/CUR	-,02775	,12637	1,000	-,4709
	FS/CUR	,11133	,12637	1,000	-,3318
	CUR livre	-,06217	,12637	1,000	-,5053
	Luz UV	,11625	,12637	1,000	-,3269

FS/CUR	Luz azul	-,39508	,12637	,144	-,8383
	FSvazia+UV	,22117	,12637	,943	-,2220
	FS/CUR+UV	,03192	,12637	1,000	-,4113
	FS/CUR+Azul	-,11350	,12637	1,000	-,5567
	PDTF127	,32600	,12637	,447	-,1172
	PDTP123	,17850	,12637	,993	-,2647
	PDTlivre	,23225*	,12637	,916	-,2109
	FS/CUR+UV+Azul	,38000	,12637	,192	-,0632
	Control	-,38142	,12637	,187	-,8246
	F127 vazia	-,32217*	,12637	,469	-,7653
	P123 vazia	-,11800	,12637	1,000	-,5612

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
F127/CUR	P123 vazia	,4643
	FS vazia	,3488
	P123/CUR	,4709
	FS/CUR	,5823
	CUR livre	,4088
	Luz UV	,5872
	Luz azul	,0758
	FSvazia+UV	,6921
	FS/CUR+UV	,5028
	FS/CUR+Azul	,3574*
	PDTF127	,7969
	PDTP123	,6494
	PDTlivre	,7032*
	FS/CUR+UV+Azul	,8509*
	Control	,1731*
	F127 vazia	,2323*
	P123 vazia	,4365
	FS vazia	,3210
	F127/CUR	,4154
P123/CUR	FS/CUR	,5545
	CUR livre	,3810
	Luz UV	,5594
	Luz azul	,0481
	FSvazia+UV	,6643

FS/CUR	FS/CUR+UV	,4751
	FS/CUR+Azul	,3297
	PDTF127	,7692
	PDTP123	,6217
	PDTlivre	,6754*
	FS/CUR+UV+Azul	,8232
	Control	,0618
	F127 vazia	,1210*
	P123 vazia	,3252

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR	FS vazia	-,23350	,12637	,912	-,6767
	F127/CUR	-,13908	,12637	1,000	-,5823
	P123/CUR	-,11133	,12637	1,000	-,5545
	CUR livre	-,17350	,12637	,994	-,6167
	Luz UV	,00492	,12637	1,000	-,4383
	Luz azul	-,50642	,12637	,009	-,9496
	FSvazia+UV	,10983	,12637	1,000	-,3333
	FS/CUR+UV	-,07942	,12637	1,000	-,5226
	FS/CUR+Azul	-,22483	,12637	,935	-,6680
	PDTF127	,21467*	,12637	,956	-,2285
	PDTP123	,06717	,12637	1,000	-,3760
	PDTlivre	,12092	,12637	1,000	-,3223
	FS/CUR+UV+Azul	,26867*	,12637	,773	-,1745
	Control	-,20792*	,12637	,967	-,6511
	F127 vazia	-,14867*	,12637	,999	-,5918
	P123 vazia	,05550*	,12637	1,000	-,3877
	FS vazia	-,06000	,12637	1,000	-,5032
	F127/CUR	,03442	,12637	1,000	-,4088
	P123/CUR	,06217	,12637	1,000	-,3810
CUR livre	FS/CUR	,17350	,12637	,994	-,2697
	Luz UV	,17842	,12637	,993	-,2648
	Luz azul	-,33292	,12637	,408	-,7761
	FSvazia+UV	,28333	,12637	,696	-,1598
	FS/CUR+UV	,09408	,12637	1,000	-,3491
	FS/CUR+Azul	-,05133	,12637	1,000	-,4945
	PDTF127	,38817	,12637	,165	-,0550

Luz UV	PDTP123	,24067	,12637	,890	-,2025
	PDTlivre	,29442	,12637	,633	-,1488
	FS/CUR+UV+Azul	,44217*	,12637	,051	-,0010
	Control	-,38633	,12637	,171	-,8295
	F127 vazia	-,32708	,12637	,441	-,7703
	P123 vazia	-,12292*	,12637	1,000	-,5661
	FS vazia	-,23842	,12637	,897	-,6816

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval	
		Upper Bound	
FS/CUR	FS vazia		,2097
	F127/CUR		,3041
	P123/CUR		,3318
	CUR livre		,2697
	Luz UV		,4481
	Luz azul		-,0632
	FSvazia+UV		,5530
	FS/CUR+UV		,3638
	FS/CUR+Azul		,2183
	PDTF127		,6578*
	PDTP123		,5103
	PDTlivre		,5641
	FS/CUR+UV+Azul		,7118*
	Control		,2353*
	F127 vazia		,2945*
	P123 vazia		,4987*
	FS vazia		,3832
	F127/CUR		,4776
	P123/CUR		,5053
	FS/CUR		,6167
CUR livre	Luz UV		,6216
	Luz azul		,1103
	FSvazia+UV		,7265
	FS/CUR+UV		,5373
	FS/CUR+Azul		,3918
	PDTF127		,8313
	PDTP123		,6838
	PDTlivre		,7376
	FS/CUR+UV+Azul		,8853*

Luz UV	Control	,0568
	F127 vazia	,1161
	P123 vazia	,3203*
	FS vazia	,2048

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
Luz UV	F127/CUR	-,14400	,12637	,999	-,5872
	P123/CUR	-,11625	,12637	1,000	-,5594
	FS/CUR	-,00492	,12637	1,000	-,4481
	CUR livre	-,17842	,12637	,993	-,6216
	Luz azul	-,51133	,12637	,008	-,9545
	FSvazia+UV	,10492	,12637	1,000	-,3383
	FS/CUR+UV	-,08433	,12637	1,000	-,5275
	FS/CUR+Azul	-,22975	,12637	,923	-,6729
	PDTF127	,20975	,12637	,964	-,2334
	PDTP123	,06225*	,12637	1,000	-,3809
	PDTlivre	,11600	,12637	1,000	-,3272
	FS/CUR+UV+Azul	,26375	,12637	,797	-,1794
	Control	,12500*	,12637	1,000	-,3182
	F127 vazia	,18425*	,12637	,990	-,2589
	P123 vazia	,38842*	,12637	,164	-,0548
	FS vazia	,27292*	,12637	,752	-,1703
	F127/CUR	,36733	,12637	,241	-,0758
	P123/CUR	,39508	,12637	,144	-,0481
	FS/CUR	,50642	,12637	,009	,0632
Luz azul	CUR livre	,33292	,12637	,408	-,1103
	Luz UV	,51133	,12637	,008	,0682
	FSvazia+UV	,61625	,12637	,000	,1731
	FS/CUR+UV	,42700	,12637	,073	-,0162
	FS/CUR+Azul	,28158	,12637	,705	-,1616
	PDTF127	,72108	,12637	,000	,2779
	PDTP123	,57358	,12637	,001	,1304
	PDTlivre	,62733	,12637	,000	,1842
	FS/CUR+UV+Azul	,77508	,12637	,000	,3319
	Control	-,49125*	,12637	,014	-,9344
FSvazia+UV	F127 vazia	-,43200	,12637	,065	-,8752
	P123 vazia	-,22783	,12637	,928	-,6710

FS vazia	-,34333*	,12637	,353	-,7865
F127/CUR	-,24892	,12637	,861	-,6921

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
Luz UV	F127/CUR	,2992
	P123/CUR	,3269
	FS/CUR	,4383
	CUR livre	,2648
	Luz azul	-,0682
	FSvazia+UV	,5481
	FS/CUR+UV	,3588
	FS/CUR+Azul	,2134
	PDTF127	,6529
	PDTP123	,5054*
	PDTlivre	,5592
	FS/CUR+UV+Azul	,7069
	Control	,5682*
	F127 vazia	,6274*
	P123 vazia	,8316*
	FS vazia	,7161*
	F127/CUR	,8105
	P123/CUR	,8383
	FS/CUR	,9496
	CUR livre	,7761
Luz azul	Luz UV	,9545
	FSvazia+UV	1,0594
	FS/CUR+UV	,8702
	FS/CUR+Azul	,7248
	PDTF127	1,1643
	PDTP123	1,0168
	PDTlivre	1,0705
	FS/CUR+UV+Azul	1,2183
	Control	-,0481*
	F127 vazia	,0112
FSvazia+UV	P123 vazia	,2153
	FS vazia	,0998*
	F127/CUR	,1943

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FSvazia+UV	P123/CUR	-,22117	,12637	,943	-,6643
	FS/CUR	-,10983	,12637	1,000	-,5530
	CUR livre	-,28333	,12637	,696	-,7265
	Luz UV	-,10492	,12637	1,000	-,5481
	Luz azul	-,61625	,12637	,000	-1,0594
	FS/CUR+UV	-,18925	,12637	,986	-,6324
	FS/CUR+Azul	-,33467	,12637	,399	-,7778
	PDTF127	,10483	,12637	1,000	-,3383
	PDTP123	-,04267	,12637	1,000	-,4858
	PDTlivre	,01108*	,12637	1,000	-,4321
	FS/CUR+UV+Azul	,15883	,12637	,998	-,2843
	Control	-,30200	,12637	,588	-,7452
	F127 vazia	-,24275*	,12637	,883	-,6859
	P123 vazia	-,03858*	,12637	1,000	-,4818
	FS vazia	-,15408*	,12637	,999	-,5973
	F127/CUR	-,05967*	,12637	1,000	-,5028
	P123/CUR	-,03192	,12637	1,000	-,4751
	FS/CUR	,07942	,12637	1,000	-,3638
	CUR livre	-,09408	,12637	1,000	-,5373
	Luz UV	,08433	,12637	1,000	-,3588
FS/CUR+UV	Luz azul	-,42700	,12637	,073	-,8702
	FSvazia+UV	,18925	,12637	,986	-,2539
	FS/CUR+Azul	-,14542	,12637	,999	-,5886
	PDTF127	,29408	,12637	,634	-,1491
	PDTP123	,14658	,12637	,999	-,2966
	PDTlivre	,20033	,12637	,976	-,2428
	FS/CUR+UV+Azul	,34808	,12637	,328	-,0951
	Control	-,15658	,12637	,998	-,5998
	F127 vazia	-,09733*	,12637	1,000	-,5405
	P123 vazia	,10683	,12637	1,000	-,3363
	FS vazia	-,00867	,12637	1,000	-,4518
	F127/CUR	,08575*	,12637	1,000	-,3574
FS/CUR+Azul	P123/CUR	,11350	,12637	1,000	-,3297

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
FSvazia+UV	P123/CUR	,2220
	FS/CUR	,3333
	CUR livre	,1598
	Luz UV	,3383
	Luz azul	-,1731
	FS/CUR+UV	,2539
	FS/CUR+Azul	,1085
	PDTF127	,5480
	PDTP123	,4005
	PDTlivre	,4543*
	FS/CUR+UV+Azul	,6020
	Control	,1412
	F127 vazia	,2004*
	P123 vazia	,4046*
	FS vazia	,2891*
	F127/CUR	,3835*
	P123/CUR	,4113
	FS/CUR	,5226
	CUR livre	,3491
FS/CUR+UV	Luz UV	,5275
	Luz azul	,0162
	FSvazia+UV	,6324
	FS/CUR+Azul	,2978
	PDTF127	,7373
	PDTP123	,5898
	PDTlivre	,6435
	FS/CUR+UV+Azul	,7913
	Control	,2866
	F127 vazia	,3458*
FS/CUR+Azul	P123 vazia	,5500
	FS vazia	,4345
	F127/CUR	,5289*
	P123/CUR	,5567

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR+Azul	FS/CUR	,22483	,12637	,935	-,2183
	CUR livre	,05133	,12637	1,000	-,3918
	Luz UV	,22975	,12637	,923	-,2134
	Luz azul	-,28158	,12637	,705	-,7248
	FSvazia+UV	,33467	,12637	,399	-,1085
	FS/CUR+UV	,14542	,12637	,999	-,2978
	PDTF127	,43950	,12637	,055	-,0037
	PDTP123	,29200	,12637	,647	-,1512
	PDTLivre	,34575	,12637	,340	-,0974
	FS/CUR+UV+Azul	,49350*	,12637	,014	,0503
	Control	-,59608	,12637	,001	-1,0393
	F127 vazia	-,53683	,12637	,004	-,9800
	P123 vazia	-,33267*	,12637	,410	-,7758
	FS vazia	-,44817*	,12637	,044	-,8913
	F127/CUR	-,35375*	,12637	,301	-,7969
	P123/CUR	-,32600*	,12637	,447	-,7692
	FS/CUR	-,21467	,12637	,956	-,6578
	CUR livre	-,38817	,12637	,165	-,8313
	Luz UV	-,20975	,12637	,964	-,6529
	Luz azul	-,72108	,12637	,000	-1,1643
PDTF127	FSvazia+UV	-,10483	,12637	1,000	-,5480
	FS/CUR+UV	-,29408	,12637	,634	-,7373
	FS/CUR+Azul	-,43950	,12637	,055	-,8827
	PDTP123	-,14750	,12637	,999	-,5907
	PDTLivre	-,09375	,12637	1,000	-,5369
	FS/CUR+UV+Azul	,05400	,12637	1,000	-,3892
	Control	-,44858	,12637	,044	-,8918
	F127 vazia	-,38933	,12637	,161	-,8325
	P123 vazia	-,18517*	,12637	,989	-,6283
	FS vazia	-,30067	,12637	,596	-,7438
PDTP123	F127/CUR	-,20625	,12637	,969	-,6494
	P123/CUR	-,17850*	,12637	,993	-,6217
	FS/CUR	-,06717	,12637	1,000	-,5103

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound

FS/CUR+Azul	FS/CUR	,6680
	CUR livre	,4945
	Luz UV	,6729
	Luz azul	,1616
	FSvazia+UV	,7778
	FS/CUR+UV	,5886
	PDTF127	,8827
	PDTP123	,7352
	PDTlivre	,7889
	FS/CUR+UV+Azul	,9367*
	Control	-,1529
	F127 vazia	-,0937
	P123 vazia	,1105*
	FS vazia	-,0050*
	F127/CUR	,0894*
	P123/CUR	,1172*
	FS/CUR	,2285
	CUR livre	,0550
	Luz UV	,2334
	Luz azul	-,2779
PDTP127	FSvazia+UV	,3383
	FS/CUR+UV	,1491
	FS/CUR+Azul	,0037
	PDTP123	,2957
	PDTlivre	,3494
	FS/CUR+UV+Azul	,4972
	Control	-,0054
	F127 vazia	,0538
	P123 vazia	,2580*
	FS vazia	,1425
PDTP123	F127/CUR	,2369
	P123/CUR	,2647*
	FS/CUR	,3760

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
PDTP123	CUR livre	-,24067	,12637	,890	-,6838
	Luz UV	-,06225	,12637	1,000	-,5054

PDTlivre	Luz azul	-,57358	,12637	,001	-1,0168
	FSvazia+UV	,04267	,12637	1,000	-,4005
	FS/CUR+UV	-,14658	,12637	,999	-,5898
	FS/CUR+Azul	-,29200	,12637	,647	-,7352
	PDTF127	,14750	,12637	,999	-,2957
	PDTlivre	,05375	,12637	1,000	-,3894
	FS/CUR+UV+Azul	,20150	,12637	,975	-,2417
	Control	-,50233*	,12637	,011	-,9455
	F127 vazia	-,44308	,12637	,050	-,8863
	P123 vazia	-,23892	,12637	,896	-,6821
	FS vazia	-,35442*	,12637	,298	-,7976
	F127/CUR	-,26000*	,12637	,814	-,7032
	P123/CUR	-,23225*	,12637	,916	-,6754
	FS/CUR	-,12092*	,12637	1,000	-,5641
	CUR livre	-,29442	,12637	,633	-,7376
	Luz UV	-,11600	,12637	1,000	-,5592
	Luz azul	-,62733	,12637	,000	-1,0705
	FSvazia+UV	-,01108	,12637	1,000	-,4543
	FS/CUR+UV	-,20033	,12637	,976	-,6435
	FS/CUR+Azul	-,34575	,12637	,340	-,7889
	PDTF127	,09375	,12637	1,000	-,3494
	PDTP123	-,05375	,12637	1,000	-,4969
	FS/CUR+UV+Azul	,14775	,12637	,999	-,2954
	Control	-,65008	,12637	,000	-1,0933
	F127 vazia	-,59083	,12637	,001	-1,0340
	P123 vazia	-,38667	,12637	,170	-,8298
	FS vazia	-,50217*	,12637	,011	-,9453
	F127/CUR	-,40775	,12637	,111	-,8509
	P123/CUR	-,38000	,12637	,192	-,8232
	FS/CUR	-,26867*	,12637	,773	-,7118
	CUR livre	-,44217	,12637	,051	-,8853

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
PDTP123	CUR livre	,2025
	Luz UV	,3809
	Luz azul	-,1304
	FSvazia+UV	,4858
	FS/CUR+UV	,2966

PDTlivre	FS/CUR+Azul	,1512
	PDTF127	,5907
	PDTlivre	,4969
	FS/CUR+UV+Azul	,6447
	Control	-,0592*
	F127 vazia	,0001
	P123 vazia	,2043
	FS vazia	,0888*
	F127/CUR	,1832*
	P123/CUR	,2109*
	FS/CUR	,3223*
	CUR livre	,1488
	Luz UV	,3272
	Luz azul	-,1842
	FSvazia+UV	,4321
	FS/CUR+UV	,2428
	FS/CUR+Azul	,0974
	PDTF127	,5369
	PDTP123	,3894
	FS/CUR+UV+Azul	,5909
FS/CUR+UV+Azul	Control	-,2069
	F127 vazia	-,1477
	P123 vazia	,0565
	FS vazia	-,0590*
	F127/CUR	,0354
	P123/CUR	,0632
	FS/CUR	,1745*
	CUR livre	,0010

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR+UV+Azul	Luz UV	-,26375	,12637	,797	-,7069
	Luz azul	-,77508	,12637	,000	-1,2183
	FSvazia+UV	-,15883	,12637	,998	-,6020
	FS/CUR+UV	-,34808	,12637	,328	-,7913
	FS/CUR+Azul	-,49350	,12637	,014	-,9367
	PDTF127	-,05400	,12637	1,000	-,4972
	PDTP123	-,20150	,12637	,975	-,6447

PDTlivre	-,14775	,12637	,999	-,5909
----------	---------	--------	------	--------

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Tukey HSD

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
FS/CUR+UV+Azul	Luz UV	,1794
	Luz azul	-,3319
	FSvazia+UV	,2843
	FS/CUR+UV	,0951
	FS/CUR+Azul	-,0503
	PDTF127	,3892
	PDTP123	,2417
	PDTlivre	,2954

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

absorbância

Tukey HSD

grupo	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
FS/CUR+UV+Azul	12	,7003				
PDTF127	12	,7543	,7543			
PDTlivre	12	,8481	,8481	,8481		
FSvazia+UV	12	,8592	,8592	,8592		
PDTP123	12	,9018	,9018	,9018		
Luz UV	12	,9641	,9641	,9641	,9641	
FS/CUR	12	,9690	,9690	,9690	,9690	
FS/CUR+UV	12	1,0484	1,0484	1,0484	1,0484	1,0484
P123/CUR	12	1,0803	1,0803	1,0803	1,0803	1,0803
P123 vazia	12	1,0870	1,0870	1,0870	1,0870	1,0870
F127/CUR	12	1,1081	1,1081	1,1081	1,1081	1,1081
CUR livre	12	1,1425	1,1425	1,1425	1,1425	1,1425
FS/CUR+Azul	12		1,1938	1,1938	1,1938	1,1938

FS vazia	12			1,2025	1,2025	1,2025
F127 vazia	12			1,2912	1,2912	1,2912
Control	12				1,3504	1,3504
Luz azul	12					1,4754
Sig.		,051	,055	,050	,171	,073

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

OUT-PUT DA ANÁLISE ESTATÍSTICA Biomassa *Candida albicans*

Tests of Normality

grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk	
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df
Control	,201	12	,196	,929	12
F127 vazia	,275	12	,013	,822	12
P123 vazia	,260	12	,024	,923	12
FS vazia	,287	12	,007	,792	12
F127/CUR	,286	12	,008	,769	12
P123/CUR	,374	12	,000	,725	12
FS/CUR	,244	12	,047	,890	12
CUR livre	,160	12	,200*	,908	12
Luz UV	,212	12	,142	,898	12
Luz azul	,196	12	,200*	,938	12
FSvazia+UV	,171	12	,200*	,938	12
FS/CUR+UV	,174	12	,200*	,870	12
FS/CUR+Azul	,207	12	,167	,918	12
PDTF127	,244	12	,047	,924	12
PDTP123	,169	12	,200*	,924	12
PDTlivre	,119	12	,200*	,981	12
FS/CUR+UV+Azul	,114	12	,200*	,945	12

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Based on Mean	3,009	16	187	,000
Based on Median	1,133	16	187	,327
Based on Median and with adjusted df	1,133	16	76,495	,341
Based on trimmed mean	2,417	16	187	,003

ANOVA

absorbância

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10,678	16	,667	11,301	,000
Within Groups	11,044	187	,059		

Total	21,722	203			
-------	--------	-----	--	--	--

Robust Tests of Equality of Means

absorbância

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	15,962	16	70,009	,000

a. Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
Control	F127 vazia	-,16450	,10446	,965	-,5701
	P123 vazia	-,11933	,09289	,994	-,4822
	FS vazia	-,10858	,10310	,999	-,5089
	F127/CUR	,20717	,13766	,974	-,3389
	P123/CUR	,24650	,14851	,943	-,3477
	FS/CUR	,18125	,08730	,781	-,1638
	CUR livre	,19925	,12500	,960	-,2916
	Luz UV	,29025	,09756	,274	-,0892
	Luz azul	,03217	,08906	1,000	-,3182
	FSvazia+UV	,33442	,09171	,085	-,0245
	FS/CUR+UV	,26642	,08257	,198	-,0657
	FS/CUR+Azul	,10567	,08309	,994	-,2278
	PDTF127	,40050*	,08023	,010	,0737
	PDTP123	,65192*	,09257	,000	,2901
	PDTlivre	,53208*	,08770	,001	,1859
	FS/CUR+UV+Azul	,51058*	,08281	,001	,1779
F127 vazia	Control	,16450	,10446	,965	-,2411
	P123 vazia	,04517	,09427	1,000	-,3236
	FS vazia	,05592	,10435	1,000	-,3493
	F127/CUR	,37167	,13859	,427	-,1771
	P123/CUR	,41100	,14938	,393	-,1854
	FS/CUR	,34575	,08877	,057	-,0057
	CUR livre	,36375	,12604	,318	-,1305
	Luz UV	,45475*	,09888	,011	,0700

	Luz azul	,19667	,09050	,728	-,1600
	FSvazia+UV	,49892*	,09312	,002	,1340
	FS/CUR+UV	,43092*	,08412	,006	,0918
	FS/CUR+Azul	,27017	,08463	,209	-,0702
	PDTF127	,56500*	,08182	,000	,2310
	PDTP123	,81642*	,09395	,000	,4487
	PDTlivre	,69658*	,08916	,000	,3440
	FS/CUR+UV+Azul	,67508*	,08436	,000	,3354
P123 vazia	Control	,11933	,09289	,994	-,2436

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
Control	F127 vazia	,2411
	P123 vazia	,2436
	FS vazia	,2917
	F127/CUR	,7533
	P123/CUR	,8407
	FS/CUR	,5263
	CUR livre	,6901
	Luz UV	,6697
	Luz azul	,3826
	FSvazia+UV	,6934
	FS/CUR+UV	,5986
	FS/CUR+Azul	,4391
	PDTF127	,7273*
	PDTP123	1,0137*
	PDTlivre	,8783*
	FS/CUR+UV+Azul	,8433*
	Control	,5701
F127 vazia	P123 vazia	,4139
	FS vazia	,4611
	F127/CUR	,9205
	P123/CUR	1,0074
	FS/CUR	,6972
	CUR livre	,8580
	Luz UV	,8395*
	Luz azul	,5533
	FSvazia+UV	,8638*

	FS/CUR+UV	,7700*
	FS/CUR+Azul	,6105
	PDTF127	,8990*
	PDTP123	1,1841*
	PDTlivre	1,0492*
	FS/CUR+UV+Azul	1,0147*
P123 vazia	Control	,4822

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
P123 vazia	F127 vazia	-,04517	,09427	1,000	-,4139
	FS vazia	,01075	,09277	1,000	-,3516
	F127/CUR	,32650	,13010	,530	-,2001
	P123/CUR	,36583	,14153	,489	-,2120
	FS/CUR	,30058	,07481	,039	,0090
	CUR livre	,31858	,11663	,404	-,1479
	Luz UV	,40958	,08657	,008	,0729
	Luz azul	,15150	,07687	,836	-,1474
	FSvazia+UV	,45375	,07993	,001	,1434
	FS/CUR+UV	,38575	,06924	,002	,1126
	FS/CUR+Azul	,22500	,06986	,188	-,0501
	PDTF127	,51983	,06643	,000	,2547
	PDTP123	,77125*	,08090	,000	,4571
	PDTlivre	,65142*	,07528	,000	,3582
	FS/CUR+UV+Azul	,62992*	,06952	,000	,3559
	Control	,10858*	,10310	,999	-,2917
	F127 vazia	-,05592	,10435	1,000	-,4611
	P123 vazia	-,01075	,09277	1,000	-,3731
	F127/CUR	,31575	,13758	,656	-,2301
	P123/CUR	,35508	,14843	,598	-,2389
FS vazia	FS/CUR	,28983	,08717	,159	-,0546
	CUR livre	,30783	,12491	,552	-,1828
	Luz UV	,39883	,09745	,033	,0199
	Luz azul	,14075*	,08893	,962	-,2091
	FSvazia+UV	,44300	,09159	,007	,0846
	FS/CUR+UV	,37500*	,08243	,019	,0435
	FS/CUR+Azul	,21425*	,08295	,486	-,1186

F127/CUR	PDTF127	,50908	,08009	,001	,1829
	PDTP123	,76050*	,09244	,000	,3992
	PDTlivre	,64067*	,08757	,000	,2950
	FS/CUR+UV+Azul	,61917*	,08267	,000	,2870
	Control	-,20717*	,13766	,974	-,7533
	F127 vazia	-,37167	,13859	,427	-,9205

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval	
		Upper Bound	
P123 vazia	F127 vazia		,3236
	FS vazia		,3731
	F127/CUR		,8531
	P123/CUR		,9436
	FS/CUR		,5921
	CUR livre		,7850
	Luz UV		,7462
	Luz azul		,4504
	FSvazia+UV		,7641
	FS/CUR+UV		,6589
	FS/CUR+Azul		,5001
	PDTF127		,7850
	PDTP123		1,0854*
	PDTlivre		,9446*
	FS/CUR+UV+Azul		,9040*
	Control		,5089*
	F127 vazia		,3493
	P123 vazia		,3516
	F127/CUR		,8616
	P123/CUR		,9490
FS vazia	FS/CUR		,6343
	CUR livre		,7984
	Luz UV		,7778
	Luz azul		,4906*
	FSvazia+UV		,8014
	FS/CUR+UV		,7065*
	FS/CUR+Azul		,5471*
	PDTF127		,8352
	PDTP123		1,1218*

F127/CUR	PDTlivre	,9863*
	FS/CUR+UV+Azul	,9513*
	Control	,3389*
	F127 vazia	,1771

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
F127/CUR	P123 vazia	-,32650	,13010	,530	-,8531
	FS vazia	-,31575	,13758	,656	-,8616
	P123/CUR	,03933	,17422	1,000	-,6379
	FS/CUR	-,02592	,12617	1,000	-,5443
	CUR livre	-,00792	,15467	1,000	-,6097
	Luz UV	,08308	,13348	1,000	-,4517
	Luz azul	-,17500	,12739	,987	-,6958
	FSvazia+UV	,12725	,12926	1,000	-,3975
	FS/CUR+UV	,05925	,12294	1,000	-,4536
	FS/CUR+Azul	-,10150	,12329	1,000	-,6149
	PDTF127	,19333	,12138	,952	-,3173
	PDTP123	,44475	,12987	,147	-,0813
	PDTlivre	,32492*	,12644	,499	-,1940
	FS/CUR+UV+Azul	,30342*	,12310	,560	-,2097
	Control	-,24650*	,14851	,943	-,8407
	F127 vazia	-,41100*	,14938	,393	-1,0074
	P123 vazia	-,36583	,14153	,489	-,9436
	FS vazia	-,35508	,14843	,598	-,9490
	F127/CUR	-,03933	,17422	1,000	-,7166
	FS/CUR	-,06525	,13793	1,000	-,6363
	CUR livre	-,04725	,16441	1,000	-,6896
P123/CUR	Luz UV	,04375	,14464	1,000	-,5409
	Luz azul	-,21433	,13905	,964	-,7873
	FSvazia+UV	,08792*	,14077	1,000	-,4883
	FS/CUR+UV	,01992	,13499	1,000	-,5466
	FS/CUR+Azul	-,14083*	,13530	,999	-,7078
	PDTF127	,15400*	,13356	,997	-,4107
	PDTP123	,40542	,14132	,345	-,1720
	PDTlivre	,28558*	,13818	,780	-,2859
	FS/CUR+UV+Azul	,26408*	,13513	,831	-,3026

FS/CUR	Control	-,18125*	,08730	,781	-,5263
	F127 vazia	-,34575*	,08877	,057	-,6972
	P123 vazia	-,30058	,07481	,039	-,5921

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval	
		Upper Bound	
F127/CUR	P123 vazia	,2001	
	FS vazia	,2301	
	P123/CUR	,7166	
	FS/CUR	,4924	
	CUR livre	,5939	
	Luz UV	,6179	
	Luz azul	,3458	
	FSvazia+UV	,6520	
	FS/CUR+UV	,5721	
	FS/CUR+Azul	,4119	
	PDTF127	,7040	
	PDTP123	,9708	
	PDTlivre	,8438*	
	FS/CUR+UV+Azul	,8165*	
	Control	,3477*	
	F127 vazia	,1854*	
	P123 vazia	,2120	
	FS vazia	,2389	
	F127/CUR	,6379	
	FS/CUR	,5058	
P123/CUR	CUR livre	,5951	
	Luz UV	,6284	
	Luz azul	,3587	
	FSvazia+UV	,6642*	
	FS/CUR+UV	,5864	
	FS/CUR+Azul	,4261*	
	PDTF127	,7187*	
	PDTP123	,9828	
	PDTlivre	,8570*	
	FS/CUR+UV+Azul	,8308*	
FS/CUR	Control	,1638*	
	F127 vazia	,0057*	

P123 vazia

-,0090

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR	FS vazia	-,28983	,08717	,159	-,6343
	F127/CUR	,02592	,12617	1,000	-,4924
	P123/CUR	,06525	,13793	1,000	-,5058
	CUR livre	,01800	,11223	1,000	-,4379
	Luz UV	,10900	,08054	,990	-,2067
	Luz azul	-,14908	,07000	,754	-,4210
	FSvazia+UV	,15317	,07335	,777	-,1323
	FS/CUR+UV	,08517	,06153	,988	-,1550
	FS/CUR+Azul	-,07558	,06223	,997	-,3181
	PDTF127	,21925	,05835	,071	-,0104
	PDTP123	,47067	,07441	,000	,1808
	PDTLivre	,35083	,06826	,003	,0858
	FS/CUR+UV+Azul	,32933*	,06185	,002	,0881
	Control	-,19925*	,12500	,960	-,6901
	F127 vazia	-,36375*	,12604	,318	-,8580
	P123 vazia	-,31858*	,11663	,404	-,7850
	FS vazia	-,30783	,12491	,552	-,7984
	F127/CUR	,00792	,15467	1,000	-,5939
	P123/CUR	,04725	,16441	1,000	-,5951
	FS/CUR	-,01800	,11223	1,000	-,4739
CUR livre	Luz UV	,09100	,12039	1,000	-,3858
	Luz azul	-,16708	,11360	,977	-,6261
	FSvazia+UV	,13517	,11570	,997	-,3289
	FS/CUR+UV	,06717*	,10859	1,000	-,3815
	FS/CUR+Azul	-,09358	,10898	1,000	-,5430
	PDTF127	,20125*	,10682	,862	-,2446
	PDTP123	,45267*	,11637	,062	-,0131
	PDTLivre	,33283	,11254	,302	-,1237
	FS/CUR+UV+Azul	,31133*	,10877	,352	-,1377
	Control	-,29025*	,09756	,274	-,6697
Luz UV	F127 vazia	-,45475*	,09888	,011	-,8395
	P123 vazia	-,40958*	,08657	,008	-,7462
	FS vazia	-,39883	,09745	,033	-,7778

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
FS/CUR	FS vazia	,0546
	F127/CUR	,5443
	P123/CUR	,6363
	CUR livre	,4739
	Luz UV	,4247
	Luz azul	,1228
	FSvazia+UV	,4387
	FS/CUR+UV	,3253
	FS/CUR+Azul	,1669
	PDTF127	,4489
	PDTP123	,7605
	PDTlivre	,6159
	FS/CUR+UV+Azul	,5706*
	Control	,2916*
	F127 vazia	,1305*
	P123 vazia	,1479*
	FS vazia	,1828
	F127/CUR	,6097
	P123/CUR	,6896
	FS/CUR	,4379
CUR livre	Luz UV	,5678
	Luz azul	,2919
	FSvazia+UV	,5992
	FS/CUR+UV	,5159*
	FS/CUR+Azul	,3558
	PDTF127	,6471*
	PDTP123	,9185*
	PDTlivre	,7894
	FS/CUR+UV+Azul	,7603*
	Control	,0892*
Luz UV	F127 vazia	-,0700*
	P123 vazia	-,0729*
	FS vazia	-,0199

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
Luz UV	F127/CUR	-,08308	,13348	1,000	-,6179
	P123/CUR	-,04375	,14464	1,000	-,6284
	FS/CUR	-,10900	,08054	,990	-,4247
	CUR livre	-,09100	,12039	1,000	-,5678
	Luz azul	-,25808	,08245	,215	-,5802
	FSvazia+UV	,04417	,08531	1,000	-,2879
	FS/CUR+UV	-,02383	,07540	1,000	-,3241
	FS/CUR+Azul	-,18458	,07596	,574	-,4864
	PDTF127	,11025	,07282	,971	-,1834
	PDTP123	,36167	,08623	,026	,0263
	PDTlivre	,24183	,08098	,272	-,0753
	FS/CUR+UV+Azul	,22033	,07566	,313	-,0806
	Control	-,03217*	,08906	1,000	-,3826
	F127 vazia	-,19667*	,09050	,728	-,5533
	P123 vazia	-,15150*	,07687	,836	-,4504
	FS vazia	-,14075*	,08893	,962	-,4906
	F127/CUR	,17500	,12739	,987	-,3458
	P123/CUR	,21433	,13905	,964	-,3587
	FS/CUR	,14908	,07000	,754	-,1228
	CUR livre	,16708	,11360	,977	-,2919
Luz azul	Luz UV	,25808	,08245	,215	-,0640
	FSvazia+UV	,30225	,07544	,039	,0091
	FS/CUR+UV	,23425	,06401	,083	-,0164
	FS/CUR+Azul	,07350*	,06468	,998	-,1793
	PDTF127	,36833	,06096	,001	,1273
	PDTP123	,61975*	,07647	,000	,3224
	PDTlivre	,49992*	,07050	,000	,2261
	FS/CUR+UV+Azul	,47842	,06432	,000	,2268
	Control	-,33442*	,09171	,085	-,6934
	F127 vazia	-,49892*	,09312	,002	-,8638
	P123 vazia	-,45375*	,07993	,001	-,7641
	FS vazia	-,44300*	,09159	,007	-,8014
FSvazia+UV	F127/CUR	-,12725	,12926	1,000	-,6520

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
-----------	-----------	-------------------------

		Upper Bound
Luz UV	F127/CUR	,4517
	P123/CUR	,5409
	FS/CUR	,2067
	CUR livre	,3858
	Luz azul	,0640
	FSvazia+UV	,3763
	FS/CUR+UV	,2764
	FS/CUR+Azul	,1172
	PDTF127	,4039
	PDTP123	,6971
	PDTlivre	,5590
	FS/CUR+UV+Azul	,5213
	Control	,3182*
	F127 vazia	,1600*
	P123 vazia	,1474*
	FS vazia	,2091*
	F127/CUR	,6958
	P123/CUR	,7873
	FS/CUR	,4210
	CUR livre	,6261
Luz azul	Luz UV	,5802
	FSvazia+UV	,5954
	FS/CUR+UV	,4849
	FS/CUR+Azul	,3263*
	PDTF127	,6094
	PDTP123	,9171*
	PDTlivre	,7737*
	FS/CUR+UV+Azul	,7300
	Control	,0245*
	F127 vazia	-,1340*
FSvazia+UV	P123 vazia	-,1434*
	FS vazia	-,0846*
	F127/CUR	,3975

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound

FSvazia+UV	P123/CUR	-,08792	,14077	1,000	-,6642
	FS/CUR	-,15317	,07335	,777	-,4387
	CUR livre	-,13517	,11570	,997	-,5992
	Luz UV	-,04417	,08531	1,000	-,3763
	Luz azul	-,30225	,07544	,039	-,5954
	FS/CUR+UV	-,06800	,06766	1,000	-,3343
	FS/CUR+Azul	-,22875	,06829	,149	-,4970
	PDTF127	,06608	,06477	,999	-,1917
	PDTP123	,31750	,07955	,040	,0086
	PDTlivre	,19767	,07383	,424	-,0895
	FS/CUR+UV+Azul	,17617	,06795	,476	-,0910
	Control	-,26642	,08257	,198	-,5986
	F127 vazia	-,43092*	,08412	,006	-,7700
	P123 vazia	-,38575*	,06924	,002	-,6589
	FS vazia	-,37500*	,08243	,019	-,7065
	F127/CUR	-,05925*	,12294	1,000	-,5721
	P123/CUR	-,01992	,13499	1,000	-,5864
	FS/CUR	-,08517	,06153	,988	-,3253
	CUR livre	-,06717	,10859	1,000	-,5159
	Luz UV	,02383	,07540	1,000	-,2764
FS/CUR+UV	Luz azul	-,23425	,06401	,083	-,4849
	FSvazia+UV	,06800	,06766	1,000	-,1983
	FS/CUR+Azul	-,16075	,05540	,306	-,3759
	PDTF127	,13408*	,05101	,452	-,0644
	PDTP123	,38550	,06880	,002	,1142
	PDTlivre	,26567*	,06210	,023	,0232
	FS/CUR+UV+Azul	,24417*	,05498	,015	,0307
	Control	-,10567	,08309	,994	-,4391
	F127 vazia	-,27017*	,08463	,209	-,6105
	P123 vazia	-,22500*	,06986	,188	-,5001
FS/CUR+Azul	FS vazia	-,21425*	,08295	,486	-,5471
	F127/CUR	,10150*	,12329	1,000	-,4119
	P123/CUR	,14083	,13530	,999	-,4261

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
FSvazia+UV	P123/CUR	,4883
	FS/CUR	,1323

FS/CUR+UV	CUR livre	,3289
	Luz UV	,2879
	Luz azul	-,0091
	FS/CUR+UV	,1983
	FS/CUR+Azul	,0395
	PDTF127	,3239
	PDTP123	,6264
	PDTlivre	,4849
	FS/CUR+UV+Azul	,4434
	Control	,0657
	F127 vazia	-,0918*
	P123 vazia	-,1126*
	FS vazia	-,0435*
	F127/CUR	,4536*
	P123/CUR	,5466
	FS/CUR	,1550
	CUR livre	,3815
	Luz UV	,3241
	Luz azul	,0164
	FSvazia+UV	,3343
	FS/CUR+Azul	,0544
	PDTF127	,3326*
	PDTP123	,6568
	PDTlivre	,5082*
	FS/CUR+UV+Azul	,4576*
	Control	,2278
	F127 vazia	,0702*
	P123 vazia	,0501*
FS/CUR+Azul	FS vazia	,1186*
	F127/CUR	,6149*
	P123/CUR	,7078

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR+Azul	FS/CUR	,07558	,06223	,997	-,1669
	CUR livre	,09358	,10898	1,000	-,3558
	Luz UV	,18458	,07596	,574	-,1172
	Luz azul	-,07350	,06468	,998	-,3263

PDTF127	FSvazia+UV	,22875	,06829	,149	-,0395
	FS/CUR+UV	,16075	,05540	,306	-,0544
	PDTF127	,29483	,05184	,001	,0929
	PDTP123	,54625	,06942	,000	,2731
	PDTlivre	,42642	,06278	,000	,1816
	FS/CUR+UV+Azul	,40492	,05575	,000	,1885
	Control	-,40050	,08023	,010	-,7273
	F127 vazia	-,56500	,08182	,000	-,8990
	P123 vazia	-,51983*	,06643	,000	-,7850
	FS vazia	-,50908*	,08009	,001	-,8352
	F127/CUR	-,19333*	,12138	,952	-,7040
	P123/CUR	-,15400*	,13356	,997	-,7187
	FS/CUR	-,21925	,05835	,071	-,4489
	CUR livre	-,20125	,10682	,862	-,6471
	Luz UV	-,11025	,07282	,971	-,4039
	Luz azul	-,36833	,06096	,001	-,6094
	FSvazia+UV	-,06608	,06477	,999	-,3239
	FS/CUR+UV	-,13408	,05101	,452	-,3326
	FS/CUR+Azul	-,29483	,05184	,001	-,4968
	PDTP123	,25142*	,06597	,070	-,0117
	PDTlivre	,13158	,05895	,693	-,1007
	FS/CUR+UV+Azul	,11008*	,05139	,747	-,0900
	Control	-,65192*	,09257	,000	-1,0137
	F127 vazia	-,81642	,09395	,000	-1,1841
	P123 vazia	-,77125*	,08090	,000	-1,0854
PDTP123	FS vazia	-,76050*	,09244	,000	-1,1218
	F127/CUR	-,44475*	,12987	,147	-,9708
	P123/CUR	-,40542*	,14132	,345	-,9828
	FS/CUR	-,47067	,07441	,000	-,7605

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound
FS/CUR+Azul	FS/CUR	,3181
	CUR livre	,5430
	Luz UV	,4864
	Luz azul	,1793
	FSvazia+UV	,4970
	FS/CUR+UV	,3759
	PDTF127	,4968

PDTF127	PDTP123	,8194
	PDTlivre	,6713
	FS/CUR+UV+Azul	,6214
	Control	-,0737
	F127 vazia	-,2310
	P123 vazia	-,2547*
	FS vazia	-,1829*
	F127/CUR	,3173*
	P123/CUR	,4107*
	FS/CUR	,0104
	CUR livre	,2446
	Luz UV	,1834
	Luz azul	-,1273
	FSvazia+UV	,1917
	FS/CUR+UV	,0644
	FS/CUR+Azul	-,0929
	PDTP123	,5146*
	PDTlivre	,3638
	FS/CUR+UV+Azul	,3102*
PDTP123	Control	-,2901*
	F127 vazia	-,4487
	P123 vazia	-,4571*
	FS vazia	-,3992*
	F127/CUR	,0813*
	P123/CUR	,1720*
	FS/CUR	-,1808

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
PDTP123	CUR livre	-,45267	,11637	,062	-,9185
	Luz UV	-,36167	,08623	,026	-,6971
	Luz azul	-,61975	,07647	,000	-,9171
	FSvazia+UV	-,31750	,07955	,040	-,6264
	FS/CUR+UV	-,38550	,06880	,002	-,6568
	FS/CUR+Azul	-,54625	,06942	,000	-,8194
	PDTF127	-,25142	,06597	,070	-,5146
	PDTlivre	-,11983	,07488	,960	-,4114
	FS/CUR+UV+Azul	-,14133	,06909	,797	-,4135

PDTlivre	Control	-,53208	,08770	,001	-,8783
	F127 vazia	-,69658	,08916	,000	-1,0492
	P123 vazia	-,65142	,07528	,000	-,9446
	FS vazia	-,64067*	,08757	,000	-,9863
	F127/CUR	-,32492*	,12644	,499	-,8438
	P123/CUR	-,28558*	,13818	,780	-,8570
	FS/CUR	-,35083*	,06826	,003	-,6159
	CUR livre	-,33283	,11254	,302	-,7894
	Luz UV	-,24183	,08098	,272	-,5590
	Luz azul	-,49992	,07050	,000	-,7737
	FSvazia+UV	-,19767	,07383	,424	-,4849
	FS/CUR+UV	-,26567	,06210	,023	-,5082
	FS/CUR+Azul	-,42642	,06278	,000	-,6713
	PDTF127	-,13158	,05895	,693	-,3638
	PDTP123	,11983*	,07488	,960	-,1717
	FS/CUR+UV+Azul	-,02150	,06242	1,000	-,2651
FS/CUR+UV+Azul	Control	-,51058*	,08281	,001	-,8433
	F127 vazia	-,67508*	,08436	,000	-1,0147
	P123 vazia	-,62992	,06952	,000	-,9040
	FS vazia	-,61917*	,08267	,000	-,9513
	F127/CUR	-,30342*	,12310	,560	-,8165
	P123/CUR	-,26408*	,13513	,831	-,8308
	FS/CUR	-,32933*	,06185	,002	-,5706
	CUR livre	-,31133	,10877	,352	-,7603

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval	
		Upper Bound	
PDTP123	CUR livre	,0131	
	Luz UV	-,0263	
	Luz azul	-,3224	
	FSvazia+UV	-,0086	
	FS/CUR+UV	-,1142	
	FS/CUR+Azul	-,2731	
	PDTF127	,0117	
	PDTlivre	,1717	
	FS/CUR+UV+Azul	,1308	
	Control	-,1859	
PDTlivre	F127 vazia	-,3440	
	P123 vazia	-,3582	

FS/CUR+UV+Azul	FS vazia	-,2950*
	F127/CUR	,1940*
	P123/CUR	,2859*
	FS/CUR	-,0858*
	CUR livre	,1237
	Luz UV	,0753
	Luz azul	-,2261
	FSvazia+UV	,0895
	FS/CUR+UV	-,0232
	FS/CUR+Azul	-,1816
	PDTF127	,1007
	PDTP123	,4114*
	FS/CUR+UV+Azul	,2221
	Control	-,1779*
	F127 vazia	-,3354*
	P123 vazia	-,3559
	FS vazia	-,2870*
	F127/CUR	,2097*
	P123/CUR	,3026*
	FS/CUR	-,0881*
	CUR livre	,1377

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
FS/CUR+UV+Azul	Luz UV	-,22033	,07566	,313	-,5213
	Luz azul	-,47842	,06432	,000	-,7300
	FSvazia+UV	-,17617	,06795	,476	-,4434
	FS/CUR+UV	-,24417	,05498	,015	-,4576
	FS/CUR+Azul	-,40492	,05575	,000	-,6214
	PDTF127	-,11008	,05139	,747	-,3102
	PDTP123	,14133	,06909	,797	-,1308
	PDTlivre	,02150	,06242	1,000	-,2221

Multiple Comparisons

Dependent Variable: absorbância

Games-Howell

(I) grupo	(J) grupo	95% Confidence Interval
		Upper Bound

FS/CUR+UV+Azul	Luz UV	,0806
	Luz azul	-,2268
	FSvazia+UV	,0910
	FS/CUR+UV	-,0307
	FS/CUR+Azul	-,1885
	PDTF127	,0900
	PDTP123	,4135
	PDTlivre	,2651

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

OUT-PUT DA ANÁLISE ESTATÍSTICA VIABILIDADE CELULAR

Tests of Normality							
Grupos		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Absorbância	controlee negativo	,195	12	,200*	,874	12	,073
	controlee positivo	,129	12	,200*	,930	12	,380
	CUR livre	,144	12	,200*	,932	12	,400
	Controlee do veículo	,173	12	,200*	,898	12	,150
	McF127+CUR	,261	12	,024	,841	12	,029
	McF127 vazia	,214	12	,136	,910	12	,216
	McP123+CUR	,152	12	,200*	,924	12	,324
	McP123 vazia	,286	12	,008	,833	12	,023
	Mf+CUR	,192	12	,200*	,909	12	,205
	Mf vazia	,158	12	,200*	,925	12	,327

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Based on Mean	3,063	9	110	,003
Based on Median	1,833	9	110	,070
Based on Median and with adjusted df	1,833	9	87,583	,073
Based on trimmed mean	2,973	9	110	,003

ANOVA

Absorbância

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
--	----------------	----	-------------	---	------

Between Groups	,051	9	,006	10,578	,000
Within Groups	,059	110	,001		
Total	,110	119			

Robust Tests of Equality of Means

Absorbância

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	66,999	9	42,232	,000

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Absorbância
Games-Howell

(I) Grupos		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
controlee negativo	controlee positivo	,061333*	,005510	,000	,04037	,08229
	CUR livre	-,001000	,009318	1,000	-,03404	,03204
	Controlee do veículo	-,004833	,008259	1,000	-,03385	,02419
	McF127+CUR	-,009667	,008530	,975	-,03970	,02037
	McF127 vazia	-,012667	,008277	,865	-,04175	,01642
	McP123+CUR	-,004417	,008672	1,000	-,03498	,02615
	McP123 vazia	-,003583	,009063	1,000	-,03564	,02848
	Mf+CUR	-,008917	,009367	,992	-,04215	,02431
	Mf vazia	-,010917	,010347	,984	-,04798	,02615
controlee positivo	controlee negativo	-,061333*	,005510	,000	-,08229	-,04037
	CUR livre	-,062333*	,007718	,000	-,09197	-,03270
	Controlee do veículo	-,066167*	,006399	,000	-,09063	-,04170
	McF127+CUR	-,071000*	,006746	,000	-,09683	-,04517
	McF127 vazia	-,074000*	,006423	,000	-,09856	-,04944
	McP123+CUR	-,065750*	,006924	,000	-,09227	-,03923
	McP123 vazia	-,064917*	,007409	,000	-,09334	-,03649
	Mf+CUR	-,070250*	,007777	,000	-,10012	-,04038
	Mf vazia	-,072250*	,008933	,000	-,10664	-,03786

CUR livre	controlee negativo	,001000	,009318	1,000	-,03204	,03404
	controlee positivo	,062333*	,007718	,000	,03270	,09197
Controlee do veículo	McF127+CUR	-,003833	,009870	1,000	-,03856	,03089
	McF127 vazia	-,008667	,010098	,996	-,04413	,02680
McP123+CUR	McP123 vazia	-,011667	,009885	,968	-,04644	,02311
	Mf+CUR	-,003417	,010218	1,000	-,03928	,03245
Mf vazia	Mf vazia	-,002583	,010553	1,000	-,03958	,03441
		-,007917	,010814	,999	-,04582	,02999
Controlee do veículo	controlee negativo	-,009917	,011673	,997	-,05093	,03109
	controlee positivo	,004833	,008259	1,000	-,02419	,03385
CUR livre	McF127+CUR	,066167*	,006399	,000	,04170	,09063
	McF127 vazia	,003833	,009870	1,000	-,03089	,03856
McP123+CUR	McP123 vazia	-,004833	,009130	1,000	-,03685	,02718
	Mf+CUR	-,007833	,008894	,996	-,03901	,02334
Mf vazia	Mf vazia	,000417	,009262	1,000	-,03207	,03291
		,001250	,009630	1,000	-,03258	,03508
McF127+CUR	McF127 vazia	-,004083	,009916	1,000	-,03898	,03082
		-,006083	,010847	1,000	-,04453	,03236
Controlee do veículo	controlee negativo	,009667	,008530	,975	-,02037	,03970
	controlee positivo	,071000*	,006746	,000	,04517	,09683
CUR livre	McF127 vazia	,008667	,010098	,996	-,02680	,04413
	McP123+CUR	,004833	,009130	1,000	-,02718	,03685
McP123 vazia	McP123 vazia	-,003000	,009147	1,000	-,03507	,02907
	Mf+CUR	,005250	,009505	1,000	-,02807	,03857
Mf vazia	Mf vazia	,006083	,009864	1,000	-,02853	,04069
		,000750	,010144	1,000	-,03488	,03638
McF127 vazia	controlee negativo	-,001250	,011055	1,000	-,04031	,03781
	controlee positivo	,012667	,008277	,865	-,01642	,04175
		,074000*	,006423	,000	,04944	,09856

	CUR livre	,011667	,009885	,968	-,02311	,04644
	Controlee do veículo	,007833	,008894	,996	-,02334	,03901
	McF127+CUR	,003000	,009147	1,000	-,02907	,03507
	McP123+CUR	,008250	,009279	,995	-,02429	,04079
	McP123 vazia	,009083	,009646	,993	-,02480	,04297
	Mf+CUR	,003750	,009931	1,000	-,03120	,03870
	Mf vazia	,001750	,010861	1,000	-,03673	,04023
McP123+CUR	controlee negativo	,004417	,008672	1,000	-,02615	,03498
	controlee positivo	,065750*	,006924	,000	,03923	,09227
	CUR livre	,003417	,010218	1,000	-,03245	,03928
	Controlee do veículo	-,000417	,009262	1,000	-,03291	,03207
	McF127+CUR	-,005250	,009505	1,000	-,03857	,02807
	McF127 vazia	-,008250	,009279	,995	-,04079	,02429
	McP123 vazia	,000833	,009986	1,000	-,03419	,03586
	Mf+CUR	-,004500	,010263	1,000	-,04052	,03152
	Mf vazia	-,006500	,011164	1,000	-,04589	,03289
	controlee negativo	,003583	,009063	1,000	-,02848	,03564
McP123 vazia	controlee positivo	,064917*	,007409	,000	,03649	,09334
	CUR livre	,002583	,010553	1,000	-,03441	,03958
	Controlee do veículo	-,001250	,009630	1,000	-,03508	,03258
	McF127+CUR	-,006083	,009864	1,000	-,04069	,02853
	McF127 vazia	-,009083	,009646	,993	-,04297	,02480
	McP123+CUR	-,000833	,009986	1,000	-,03586	,03419
	Mf+CUR	-,005333	,010596	1,000	-,04248	,03182
	Mf vazia	-,007333	,011471	1,000	-,04769	,03302
	controlee negativo	,008917	,009367	,992	-,02431	,04215
	controlee positivo	,070250*	,007777	,000	,04038	,10012
Mf+CUR	CUR livre	,007917	,010814	,999	-,02999	,04582
	Controlee do veículo	,004083	,009916	1,000	-,03082	,03898
	McF127+CUR	-,000750	,010144	1,000	-,03638	,03488

Mf vazia	McF127 vazia	-,003750	,009931	1,000	-,03870	,03120
	McP123+CUR	,004500	,010263	1,000	-,03152	,04052
	McP123 vazia	,005333	,010596	1,000	-,03182	,04248
	Mf vazia	-,002000	,011712	1,000	-,04314	,03914
	controlee negativo	,010917	,010347	,984	-,02615	,04798
	controlee positivo	,072250*	,008933	,000	,03786	,10664
	CUR livre	,009917	,011673	,997	-,03109	,05093
	Controlee do veículo	,006083	,010847	1,000	-,03236	,04453
	McF127+CUR	,001250	,011055	1,000	-,03781	,04031
	McF127 vazia	-,001750	,010861	1,000	-,04023	,03673
	McP123+CUR	,006500	,011164	1,000	-,03289	,04589
	McP123 vazia	,007333	,011471	1,000	-,03302	,04769
	Mf+CUR	,002000	,011712	1,000	-,03914	,04314

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ANEXO – MAPEAMENTO DISTRIBUIÇÃO DA LUZ UV EM CADA POÇO DA PLACA DE 96 ORIFÍCIOS

23,3027	24,02756	24,57818	24,92138	25,10316	25,24497	25,26382	25,11976	24,83615	24,48315	23,61271	22,67061
23,79072	24,54047	25,04131	25,35057	25,41393	25,48181	25,55799	25,50293	25,21781	24,67699	24,05999	23,10432
24,02379	24,81126	25,27061	25,51424	25,64398	25,6568	25,74505	25,73072	25,50821	25,00661	24,27949	23,28912
24,10676	24,93496	25,52103	25,58666	25,87932	25,84386	25,86197	25,79257	25,515	25,04961	24,25762	23,44224
23,9989	24,8271	25,2427	25,70508	25,93287	26	25,92985	25,78579	25,45164	24,97795	24,25083	23,38567
23,74395	24,59327	25,17557	25,6304	25,79333	25,8597	25,8054	25,64926	25,29022	24,78109	24,04265	23,22727
23,33136	23,92121	24,78259	25,15219	25,40714	25,55347	25,58892	25,28494	24,88895	24,35944	23,69568	22,99118
22,52353	23,50334	24,07734	24,57668	24,92515	25,00888	24,94929	24,67926	24,33304	23,82617	23,23255	22,34326

Fonte: Prizmatix

Não autorizo a publicação deste trabalho até 31 de janeiro de 2025

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 31 de janeiro de 2023.

Jeffersson Krishan Trigo Gutierrez