



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

MAÍRA TERRA GARCIA

**NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O CONTROLE DE
BIOFILMES ORAIS: terapia fotodinâmica e sistema carreador de
antimicrobianos**

MAÍRA TERRA GARCIA

**NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O CONTROLE DE
BIOFILMES ORAIS: terapia fotodinâmica e sistema carreador de
antimicrobianos**

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

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

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

Coorientadora: Prof. Dra. Juliana Ferreira Strixino

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Garcia, Maíra Terra

Novas estratégias terapêuticas para o controle de biofilmes orais: terapia fotodinâmica e sistema carreador de antimicrobianos / Maíra Terra Garcia. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
110 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira

Coorientadora: Juliana Ferreira Strixino

1. Biofilmes microcosmos. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Candidose bucal. 4. Azul de metileno. 5. Cárie dentária. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Strixino, Juliana Ferreira, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Assoc. Alessandra Buhler Borges

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Julhiany de Fátima da Silva

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Faculdade de medicina

Campus Botucatu

Profa. Dayane Batista Tada

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 28 de julho de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos que cruzaram o meu caminho ao longo dessa vida e colaboraram para eu chegasse aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Juliana Campos Junqueira**, por me guiar de forma esplêndida todos esses anos. Costumo dizer que estradas difíceis normalmente chegam a lugares incríveis, e sem dúvidas só consegui percorrer esse caminho, nada fácil, porque você estava do meu lado. Quando cheguei no laboratório em 2015, não fazia ideia do quanto eu iria amadurecer, posso dizer com propriedade que com seu suporte cresci como pessoa, aluna, pesquisadora e venho aprendendo a ser docente graças à todas oportunidades que você vem me proporcionando. É lindo de ver seu amor pela docência e pela pesquisa, e isso é inspirador. Espero um dia conseguir ser um pouco do que você é, e passar esse amor pela pesquisa e docência.

À minha coorientadora **Juliana Ferreira Strixino** por sempre ser tão solícita em me ajudar com as dúvidas, que não foram poucas, por manter as portas abertas da UNIVAP, onde eu recorri em todos os momentos que precisei, e por confiar no meu potencial.

À minha tia **Islene Calciolari Garcia**, por ser sem dúvidas meu maior suporte de vida. Sem você, todo esse longo caminho que percorri até chegar aqui, teria sido muito mais árduo, muito mais instável e inseguro. Muito obrigada por acreditar e confiar mim em todos os momentos e nunca me cobrar nada em troca. Você é meu exemplo de ser humano, de mãe, de amiga, de docente e pesquisadora.

Ao meu pai **Jônatas Calciolari Garcia** e minha mãe **Carla Oliveira Terra** eu agradeço a honra de ser filha de seres humanos tão iluminados e dedicados ao próximo. Com vocês eu tive as lições mais bonitas que a vida poderia me dar, com vocês aprendi ter empatia, empenho e determinação em lutar pelo que acredito. Ser filha de artistas brilhantes como vocês, me traz diversas vantagens, como saber me reinventar diante de um erro ou uma frustração. Obrigada por embarcarem nesse sonho comigo.

À minha irmã **Tainã Terra Bossi**, meu irmão **Gabriel Terra Garcia**, aos meus primos **Guy Jann Terra** e **Larissa Garcia Oliva** que são mais irmãos que primos, eu agradeço a existência, não sei quem eu seria, se não tivesse vocês para compartilhar os perrengues e as melhores aventuras. E nesse momento não posso deixar de agradecer a mais nova integrante da família, minha quase sobrinha **Luna Garcia**

Oliva Santos, que chegou em meio uma pandemia, para trazer a lembrança do que é um amor genuíno, sem dúvidas você alegra todos os meus dias, e me inspira ser alguém melhor para te orgulhar sempre!

Ao meu Tio **Alexandre Oliva**, por ser meu maior exemplo de genialidade, por estar do meu lado, mesmo sem obrigação nenhuma, por mostrar que acredita e confia em mim, e por ter o melhor abraço do mundo.

Ao meu marido **Marcelo Pilatti Mendes da Silva**, por toda a lealdade durante todos esses anos que estamos um na vida do outro, olha que já temos mais tempo de vida juntos do que separados. Obrigada por ser tão paciente, tão dedicado, tão amigo. Obrigada por me acalmar nos dias em que eu achava que não ia dar conta, e por sempre procurar resolver tudo aquilo que eu não estava dando conta no momento. Nem nos meus maiores sonhos imaginava ter alguém do meu lado tão incrível e parceiro quanto você, obrigada por sempre estar e nunca cobrar!

À minha família por completo, todos tiveram papel fundamental em toda essa jornada, não só acadêmica, como na da minha formação como um ser humano. Em especial agradeço à minha avó **Edile Calciolari Garcia** (*in memoriam*) você foi uma vó exemplar, sempre se empenhou em me mostrar o lado mais bonito da vida, e até hoje me dá conselhos mesmo não estando aqui, em momentos de dificuldade, eu sempre penso em como você me aconselharia, e é dessa forma que tento sempre escolher o melhor caminho, espero que de alguma forma eu esteja te dando muito orgulho. À minha avó **Terezinha Aparecida Oliveira Terra**, por ser presente, carinhosa, e entusiasta das minhas decisões. Ao meu avô **Mauricy Airton Terra** e a minha avó postíça **Dorothea Castagnari** por compartilharem todos os momentos comigo, por se empenharem em me ajudar a conquistar meus sonhos.

À minha quase madrinha **Aparecida Bueno**, além de ter sido um dos meus maiores suportes emocionais durante minha vida, você foi sem dúvidas a pessoa responsável por eu me apaixonar pela odontologia. Nas minhas melhores lembranças de infância, estou eu na porta do seu consultório esperando você terminar os atendimentos para poder entrar, ficar sentindo aquele cheiro gostoso, te ajudar a arrumar as coisas e depois ir assistir Castelo Rá-Tim-Bum na sua casa. Você sempre me dizia: “se for fazer odonto vá para a carreira acadêmica, não venha para consultório, é muito ingrato”, e eu achava aquilo loucura, pois bem olha onde estou! Quero agradecer também ao **Lucas Bueno** por sempre ser um incentivador dos meus

sonhos, você é uma pessoa muito querida, tenho em você um lugar de acolhimento, obrigada por sempre estar por perto nos ajudando.

À **Amanda de Souza Martins**, ao **Leandro de Luna Araújo** e ao pequeno **Lucas Martins de Luna**, quero deixar meu sincero muito obrigada, a presença de vocês na minha vida me traz um conforto e segurança emocional que poucos me trazem. Vocês são pessoas que transbordam amor, a empatia é genuína, e com isso me faz resgatar uma esperança na humanidade que há tempos não sentia, obrigada por mostrarem que eu sou capaz, e que está tudo bem surtar de vez em quando, vocês são incríveis!

À **Marilena Morsoleto** que é uma pessoa iluminada, mesmo distante você foi uma das pessoas que mais me incentivou a ser quem eu sou, e não desanimar dos meus sonhos, obrigada por ser tão carinhosa comigo desde o dia que nos conhecemos, você tem um lugar muito especial no meu coração

Aos meus sogros **Antônio Mendes** e **Eliane Pilatti** por toda ajuda e compreensão das minhas decisões, por nos dar o suporte necessário em alguns momentos, e por sempre estarem por perto.

À professora **Luciane Dias de Oliveira**, com você eu aprendi a olhar com empatia e admiração para o que acontece nos bastidores e que quase ninguém vê. Sua dedicação com os alunos e seu empenho em tentar sempre solucionar tudo de uma forma que traga menos impacto desastroso para os alunos é admirável. Obrigada por ser sempre tão carismática, empolgada e acolhedora.

À professora **Liliana Scorzoni**, por ser tão solícita, tão presente e amiga, você é uma pessoa de luz, que onde passa alegre, acrescenta e ilumina, você me ajudou em dias que não via mais solução, serei eternamente grata por todas as oportunidades, por todas as conversas e conselhos, obrigada por ser tão humilde e sempre estar disposta a ajudar.

À Professora **Dayane Batista Tada**, pela dedicação de tempo e paciência para me ensinar toda a parte dos cálculos matemáticos dos testes de liberação de fármacos.

À Professora **Alessandra Buhler Borges**, por ser sempre tão solícita e sempre disposta a me ajudar durante todo meu período de confecção dos corpos-de-prova e por todas as vezes que precisei de ajuda.

À professora **Ana Lia Anbinder**, minha admiração por você é enorme, seu jeito de lutar pelo que acredita me inspira, e sou muito grata a você por todas as oportunidades concedidas, por estar sempre de portas abertas não só para mim, mas para todos os alunos que precisam. Sou muito grata por poder saber que posso sempre recorrer a você em momentos de indecisão.

Ao **corpo docente do programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Saúde Bucal (CASB)**, por sempre acolherem seus alunos de forma tão solícita. Foi uma experiência formidável poder participar do conselho de curso com vocês, a experiência de cada um foi muito enriquecedora para minha formação.

À minha amiga **Jéssica Diane dos Santos**, quando entrei na pós-graduação não imaginei que faria uma amizade como a nossa, me faltam palavras para te agradecer, você tem uma importância enorme não só na minha jornada de pós-graduação, mas na minha vida pessoal, você é uma amiga que eu sei que posso contar a qualquer momento. Obrigada por ter tido toda a paciência do mundo para me ensinar tudo que não sabia quando cheguei, por me ajudar a tomar as melhores decisões, por estar presente mesmo longe, você é incrível e não se esqueça nunca disso.

À minha amiga **Janaína Alvarenga** agradeço por todo o companheirismo, a vida nos fez amigas de lab e vizinhas, e com isso pude participar de momentos únicos na sua vida como a gestação da Malu. Obrigada por estar sempre presente e me deixar ser presente na vidinha de vocês, aprendo de mais com você, seu jeito leve de ver a vida.

À minha amiga **Renata Mendonça Moraes** nossos destinos se cruzaram mais de uma vez, e não tinha como não nos tornarmos BFF's, sem você os dias no lab seriam bem sem graça, você é luz e paz. Obrigada por me proporcionar momentos gastronômicos únicos, e por sempre pensar em como levantar meu astral. Sou muito grata por ter você como amiga, e espero que a gente possa aproveitar muitas trilhas e cachoeiras geladas ainda!

À **Jaqueline Ribeiro**, por ser minha melhor companhia em todos os almoços, por dar os melhores conselhos, e ser uma amiga tão presente, divertida e sincera, sua amizade é um presente para mim.

As minhas queridas amigas **Cheyenne Marçal de Souza, Thais Aguiar e Bruna Fernandes**, por virem me acompanhando ao longo desses anos e serem as

melhores companhias no dia a dia, vocês são meu suspiro de paz no caos, obrigada por serem essas pessoas tão maravilhosas.

Aos meus alunos de IC, **Ana Bonafé, Andressa Mayumi, Lara Castro, Nathalia Maria, Rafael Ward e Fernanda Consiglio** por toda ajuda durante esses anos, alguns passaram pelo meu caminho no mestrado, outros no doutorado, mas não posso deixar de agradecer, pois sem dúvidas aprendi muito com vocês.

Aos meus amigos de laboratório **Evelyn Santos, Livia Godoi, Juliana Gonçale, Felipe Ribeiro, Rodnei Rossoni, Patrícia de Barros e Patrícia Nagai**, deixo meus sinceros agradecimentos por todos esses anos de ajuda e convívio, sem dúvidas sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria o mesmo. Quero agradecer muito aos recém-chegados **Paulo Fonseca, Gabriela Mendes e Amanda Rehem** vocês não chegaram há muito tempo, mas logo de cara conquistaram um lugar enorme no meu coração, me acolheram e me ajudaram em momentos muito preciosos, além de serem companhias maravilhosas para um bom *happy hour*, saibam que em mim sempre vão ter uma amiga disposta a ajudar.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-graduação **Sandra, Carolina e Bruno**, e a **Carla** secretária do departamento, deixo meu muito obrigada por toda a dedicação que vocês possuem conosco, sempre empenhados a nos ajudar e responder o mais de pressa possível. Vocês são excelentes profissionais e pessoas adoráveis. Muito obrigada.

À **CAPES** (2018 a 2022) por conceder a minha bolsa de pesquisa e me proporcionar a possibilidade desse sonho ser realizado.

E por fim mas não menos importante aos meus amigos de vida, que vem me apoiando e comemorando cada conquista comigo, **Lidiane Noccerino, Natasche Annunciato, Yago Collares, Beatriz Collares, Eduardo Mahfoud, Luana Rosas, Isabela Bomboniato, Giulia Borges, Virginia Couto, Hawiza Banheza, Isabelle Alegri**, vocês foram fundamentais em toda minha jornada de vida, alguns de vocês vem desde que tenho 2 anos de idade, outros vieram ao longo da vida, mas todos são pessoas que levo comigo e me espelho de mais, deixo aqui registrado meu muito obrigada por permanecerem mesmo com essa loucura chamada vida sendo tão imprevisível.

Perseverança

Eis aqui o bom conselho a se seguir:

Tente mais uma vez;

Se no início algo é difícil conseguir!

Tente mais uma vez,

E verá sua coragem aparecer.

Nunca tema, não há nada que temer

Persevere e verá que vai vencer;

Tente mais uma vez.

O pescador que puxa a rede com pressa

Não tem peixe para a feira;

A criança que fecha o livro depressa

Não aprende a lição inteira.

Por isso, criança, se quer ter ciência,

A hora do estudo prolongue;

Nada se alcança sem paciência,

E devagar se vai ao longe.

O livro das virtudes para crianças

Willian J. Bennett

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPEUTICAS PARA O CONTROLE DE BIOFILMES ORAIS: terapia fotodinâmica.....	15
1.1 INTRODUÇÃO	15
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.2.1 Cárie dentária e biofilmes cariogênicos	17
1.2.2 Terapia fotodinâmica antimicrobiana e fotossensibilizadores.....	19
1.3 PROPOSIÇÃO	23
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.4.1 Comitê de ética	25
1.4.2 Seleção dos voluntários e coleta do material	25
1.4.3 Confeção dos corpos-de-prova.....	25
1.4.4 Formação dos biofilmes microcosmos	29
1.4.5 Preparo dos fotossensibilizadores e fonte de luz	30
1.4.6 Análise da TFDa sobre o número de células viáveis dos biofilmes microcosmos	31
1.4.7 Análise do efeito da TFDa sobre a produção de ácido lático nos biofilmes microcosmos	32
1.4.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura	32
1.4.9 Análise da biomassa total dos biofilmes por cristal violeta	33
1.4.10 Análise estatística	34
1.5 RESULTADOS.....	35
1.5.1 Análise dos biofilmes por contagem de células viáveis	35
1.5.1.2 Contagem de UFC do biofilme microcosmo da amostra 1	35
1.5.1.3 Contagem de UFC do biofilme microcosmo da amostra 2	37
1.5.1.4 Contagem de UFC do biofilme microcosmo da amostra 3	39
1.5.2 Análise dos biofilmes pela produção de ácido lático.....	41

1.5.3 Análise dos biofilmes microcosmos em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
1.5.3.1 Imagens de MEV do biofilme formado pela amostra 1.....	45
1.5.3.2 Imagens de MEV do biofilme formado pela amostra 2.....	47
1.5.3.3 Imagens de MEV do biofilme formado pela amostra 3.....	50
1.5.4 Quantificação da biomassa dos biofilmes microcosmos	53
1.6 DISCUSSÃO	55
1.7 CONCLUSÃO	60
2 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPEUTICAS PARA O CONTROLE DE BIOFILMES ORAIS: sistema carreador de antimicrobianos	61
2.1 INTRODUÇÃO	61
2.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	63
2.2.1 Candidose bucal e <i>Candida</i> spp.	63
2.2.2 Ester fenetil do ácido caféico e <i>gellan gum</i>	65
2.3 PROPOSIÇÃO	69
2.3.1 Objetivos gerais.....	69
2.3.2 Objetivos específicos.....	69
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.4.1 Ativação do microrganismo	70
2.4.2 Preparo do <i>gellan gum</i> e do CAPE.....	71
2.4.3 Teste de concentração inibitória mínima	71
2.4.4 Espectroscopia de absorção UV-Vis	72
2.4.5 Eficiência de encapsulamento	72
2.4.6 Cinética de liberação.....	72
2.4.7 Teste em cultura planctônica	73
2.4.8 Formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	73
2.4.9 Avaliação da atividade proteolítica (Sap)	74
2.4.10 Análise estatística	74
2.5 RESULTADOS.....	75

2.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	75
2.5.2 Espectro de absorção	75
2.5.3 Cinética de liberação.....	78
2.5.4 Ação do CAPE associado ao <i>gellan gum</i> sobre cultura planctônica de <i>C. albicans</i>	80
2.5.5 Ação do CAPE associado ao <i>gellan gum</i> sobre biofilme de <i>C. albicans</i>	82
2.5.6 Análise da produção de Sap.....	86
2.6 DISCUSSÃO	90
2.7 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICE	108
ANEXO.....	109

RESUMO

Garcia MT. Novas estratégias terapêuticas para o controle de biofilmes orais: terapia fotodinâmica e sistema carreador de antimicrobianos [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

Os biofilmes orais possuem grande relevância clínica por estarem associados com o desenvolvimento de cárie dentária e candidose bucal, que são doenças infecciosas frequentemente encontradas na população. O presente trabalho foi dividido em dois estudos: Estudo 1 que teve como objetivo analisar os efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), mediada por Fotoenticine (FTC) e Azul de Metileno (AM), sobre biofilmes microcosmos de cárie dentária; e Estudo 2 cujo objetivo foi avaliar o *gellan gum* como biomaterial para carreador do antifúngico Ester fenetil do ácido caféico (CAPE) contra *Candida albicans*. No estudo 1, amostras de dentina cariada foram coletadas de diferentes pacientes para formar biofilmes microcosmos *in vitro*. Os biofilmes foram tratados com FTC ou AM associado à irradiação LED a 660 nm (28,5 J/cm²). Os dados foram analisados pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). Além disso, a biomassa, estrutura do biofilme e produção de ácidos pelos microrganismos foram determinadas por análises microscópicas ou espectrofotométricas. Os biofilmes de diferentes pacientes apresentaram variações na composição microbiana, sendo formados por estreptococos, lactobacilos e leveduras. No geral, a TFDa diminuiu 3,7 Log₁₀ do total de microrganismos, 2,8 Log₁₀ de estreptococos, 3,2 Log₁₀ de lactobacilos e 3,2 Log₁₀ de leveduras, e atingiu a erradicação de estreptococos do grupo *mutans*. A TFDa também foi capaz de reduzir a biomassa, desagregar os biofilmes e diminuir a concentração de ácidos em 1,1 a 1,9 mmol de lactato/L. Em relação ao estudo 2, inicialmente, foram preparadas formulações do CAPE em diferentes concentrações de *gellan gum* (0,6 a 1%). As formulações foram avaliadas em relação ao sistema de liberação e ação antifúngica contra *C. albicans*. Verificou-se que concentrações mais altas de gellan (0,9 e 1%) levaram a uma liberação mais prolongada do CAPE em relação as concentrações mais baixas. Os valores de concentração inibitória mínima do CAPE sobre *C. albicans* foram aumentados quando esse composto foi incorporado no gellan. As formulações de CAPE em gellan apresentaram atividade antifúngica tanto em culturas planctônicas como em biofilmes de *C. albicans*, sendo esses efeitos dependentes do tempo de tratamento. O CAPE e suas formulações em *gellan* também levaram a uma diminuição da atividade proteolítica de *C. albicans*. Concluiu-se que a TFDa mediada por Fotoenticine e o sistema carreador de *gellan gum* podem ser estratégias terapêuticas promissoras para o controle dos biofilmes na cavidade bucal, podendo ser usadas respectivamente no tratamento da cárie e candidose.

Palavras-chave: cárie dentária; biofilmes microcosmos; terapia fotodinâmica; fotoenticine; azul de metileno; candidose bucal; gellan gum, Ester fenetil do ácido caféico.

ABSTRACT

Garcia MT. *New therapeutic strategies for the control of oral biofilms: photodynamic therapy and drug delivery system [doctor thesis]*. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

Dental caries and oral candidiasis are infectious diseases frequently found in the population. The present work is divided into two studies, study 1 time as objective: To analyze the effects of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), mediated by Fotoenticine (FTC) and Methylene Blue (MB), on dental caries microcosm biofilms. In study 2, the objective was to evaluate gellan gum as a biomaterial to carry the antifungal caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on Candida albicans. To conduct study 1, carious dentin samples were collected from different patients to form in vitro microcosm biofilms. The biofilms were treated with FTC or MB associated with 660 nm red LED irradiation, with energy dose of 28.5 J/cm² and power dose of 40 mW/cm². The data were analyzed by the count of Colony Forming Units (CFU/mL). In addition, the biomass, biofilm structure and acid production of the microorganisms were determined by microscopic or spectrophotometric analysis. The biofilms from different patients showed variations in microbial composition, being formed by streptococci, lactobacilli, and yeasts. Overall, aPDT decreased 3.7 Log₁₀ of total microorganisms, 2.8 Log₁₀ of streptococci, 3.2 Log₁₀ of lactobacilli and 3.2 Log₁₀ of yeasts, and achieved eradication of mutans group streptococci. PDTa was also able to reduce biomass, disaggregate biofilms, and decrease acid concentration by 1.1 to 1.9 mmol lactate/L. For study 2 of this, first the standards of CAPE were determined, such as minimum inhibitory concentration, and absorption peak, then CAPE was incorporated into gellan gum, and then the standard curve test and analysis of CAPE release was performed, finally the formulations were tested on planktonic culture and biofilm of different strains of C. albicans, it was also analyzed the action of this drug on the production of Sap. The MIC found varied from 32 to 64 µg/mL, the release tests showed a gradual release in the higher formulations, finally in the CFU/mL count both in planktonic culture and biofilm the formulations were able to inhibit the fungus. With this it is concluded that both aPDT for oral microcosm and gellan gum as caregiver of CAPE for *Candida albicans* inhibition are promising.

Keywords: dental caries; microcosm biofilms; photodynamic therapy; fotoenticine; methylene blue; oral candidiasis; gellan gum, caffeic acid phenethyl ester.

1 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O CONTROLE DE BIOFILMES

ORAIS: terapia fotodinâmica

1.1 INTRODUÇÃO

A microbiota bucal humana é composta por uma comunidade de microrganismos bastante diversificada, sendo considerada a segunda microbiota mais complexa do corpo humano, perdendo somente para o cólon (Zhang et al., 2018). Atualmente, sabe-se que existem mais de 700 espécies na cavidade bucal, entre as quais 70% já foram cultivadas, embora somente 57% tenham sido nomeadas (Verma et al., 2018; Wade, 2013a). Os inúmeros microrganismos da cavidade bucal coexistem por relações ecológicas de comensalismo, simbiose e antagonismo, sendo essas essenciais na saúde do hospedeiro por inibirem o crescimento de patógenos e proporcionarem o equilíbrio do sistema imunológico (Bandara et al., 2019). Porém, com influência de mudanças ambientais internas e/ou externas, pode ocorrer a proliferação de microrganismos específicos, levando à doenças infecciosas, como cárie dentária (Hu et al., 2019; Wade, 2013a).

A cárie dentária é uma doença amplamente presente na população, sendo a principal causa de dor e perda dentária. É uma doença multifatorial influenciada pelos fatores de virulência dos microrganismos do biofilme dentário, características do hospedeiro e composição da dieta. Quando um indivíduo se alimenta de carboidratos, microrganismos fermentadores desses açúcares produzem ácidos, levando a perda de íons cálcio e fosfato da estrutura dental para o meio. Esse processo é denominado desmineralização, e com o passar do tempo, se não ocorrer o processo de remineralização, esse desequilíbrio do pH resulta em dissolução da estrutura dental e o desenvolvimento da doença (Bandara et al., 2019; Pitts et al., 2017). Diversos microrganismos apresentam essa capacidade acidogênica, dentre eles podemos destacar *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. e leveduras do gênero *Candida* (Lamont et al., 2018).

Esses microrganismos do biofilme também estabelecem interações ecológicas, que além da cárie, podem contribuir para o desenvolvimento de outras doenças. Entre as interações fúngicas-bacterianas, a relação sinérgica de *C. albicans* com *Streptococcus* é muito investigada, sabe-se que a fermentação de carboidratos

por *Streptococcus* favorece a fixação dessas leveduras na cavidade bucal, o que resulta em um favorecimento do desenvolvimento da candidose bucal (Vila et al., 2020).

A cárie dentária possui um tratamento convencional efetivo, mas esse ainda requer técnicas invasivas e possui limitações para erradicação microbiana, o que pode resultar em recidivas. Assim, existe a necessidade de terapias adjuvantes que possam favorecer o sucesso do tratamento convencional. Entre as novas terapias que estão sendo desenvolvidas, destaca-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). A TFDa é uma reação fotoquímica que associa um fotossensibilizador à uma fonte de luz em comprimento de onda específico, resultando em formação de espécies reativas de oxigênio com consequente morte da célula microbiana. Como a eficácia da TFDa depende das características do agente fotossensibilizante, a busca por novos fotossensibilizadores, tornou-se o alvo das pesquisas atuais.

Diante do exposto, o estudo 1 dessa tese teve como objetivo avaliar o efeito da TFDa mediada por dois diferentes fotossensibilizadores (Fotoentincine e Azul de Metileno) no controle de biofilmes cariogênicos.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Cárie dentária e biofilmes cariogênicos

A cavidade bucal é habitada por diversos microrganismos que coabitam em homeostase com hospedeiro. Entretanto, devido às alterações intrínsecas ou extrínsecas à cavidade bucal, esses microrganismos podem aumentar em número e se tornarem patogênicos, levando ao desenvolvimento de doenças, como a cárie dentária (Belda-Ferre et al., 2012; Wade, 2013b). Essa doença é um grande problema de saúde pública em todo o mundo, afetando principalmente os segmentos mais desfavorecidos da sociedade. Embora tenha ocorrido uma diminuição da sua prevalência nas últimas décadas, esta doença ainda afeta mais de 621 milhões de crianças e 2,4 bilhões de adultos em todo o mundo (Pinheiro et al., 2019). As lesões de cárie não tratadas podem afetar as atividades diárias das pessoas, incluindo alimentação, sono, relacionamento social e podem até comprometer a empregabilidade e as oportunidades sociais (Calvasina et al., 2018).

A cárie dentária é uma doença de tecidos duros, de caráter multifatorial, fortemente influenciada por: carboidratos provenientes da dieta, ação dos componentes salivares do hospedeiro e patogenicidade de determinados microrganismos do biofilme dentário (Bowen, Koo, 2011; Chenicheri et al., 2017; Hamada, Slade, 1980; Koo et al., 2010). Apesar da doença estar erroneamente sempre associada a lesão cavitária, seu processo se inicia muito antes disso. Ao ingerirmos carboidratos, determinados microrganismos bucais começam a metabolizar esses açúcares e a produzir ácidos que levam à alteração do pH salivar. Essa alteração, faz com que o dente perca íons para o meio bucal, fenômeno denominado desmineralização. Com o passar das horas, a saliva é capaz de tamponar o seu pH, devolvendo os íons a estrutura dental, em um processo de remineralização. Entretanto, se a ingestão dos açúcares ocorre com frequência, a saliva não tem tempo hábil para regularizar o seu pH, causando uma intensa desmineralização da superfície dental, dando início ao processo de cavitação da estrutura dental (Pitts et al., 2017; Valm, 2020).

Dentre os microrganismos fermentadores de carboidratos, podemos destacar *Streptococcus mutans*. Essa bactéria tem alto potencial acidogênico e acidúrico, ou seja, é capaz de metabolizar uma ampla variedade de carboidratos e sobreviver em ambientes de baixo pH, por isso é considerada uma das principais espécies bacterianas envolvidas na etiologia da doença cárie. Seus atributos de virulência permitem uma fácil adesão e acumulação na superfície do dente, resultando na formação de biofilmes. Esses fatores de virulência são o ponto chave para sua colonização e desenvolvimento da cárie dentária (Banas, Vickerman, 2003; Bowen, Koo, 2011; Esberg et al., 2017).

Contudo, embora *S. mutans* seja vital para o desenvolvimento da cárie dentária, essa bactéria interage com um conjunto diverso de microrganismos, que se acumulam em uma superfície dura e produzem matriz extracelular, resultando em um biofilme organizado e tridimensional (Bowen et al., 2018). Essa composição microbiana, pode variar entre indivíduos e até mesmo entre nichos em uma mesma pessoa, ou seja, a presença de microrganismos pode diferir tanto em quantidade quando em diversidade (Rudney et al., 2012; Tanner et al., 2018). Devido à alta prevalência da cárie dentária na população, várias pesquisas são desenvolvidas para encontrar novas metodologias de controle dos biofilmes cariogênicos (Nagata et al. 2012, Araujo et al. 2015).

Na tentativa de minimizar dissimilaridade entre pesquisas *in vitro* e *in vivo*, os modelos de estudo de biofilme microcosmo conquistaram espaço (Kim et al., 2014; Rudney et al., 2012; Sande et al., 2011; Signori et al., 2018). Esse tipo de biofilme consiste no cultivo de um material biológico coletado de pacientes como: saliva, fluido gengival, tecido cariado e biofilme de dente íntegro. A coleta pode ser de um ou múltiplos doadores, e traz uma melhor compreensão da dinâmica microbiológica do nicho em estudo. Os biofilmes microcosmos abrigam informações de relevância que não são possíveis de serem observadas em biofilmes simples, como por exemplo, a quantidade e a diversidade microbiológica em cada nicho (Kim et al., 2016). Esse tipo de biofilme pode ser desenvolvido em forma estática que fornece nutrientes limitados, como por exemplo biofilmes em placas de poços, ou em forma dinâmica, na qual o fornecimento de nutrientes é constante, como bocas artificiais. Ambos apresentam vantagens em relação aos biofilmes monoespécies (Santos et al., 2019).

Os biofilmes microcosmos também têm a capacidade de induzir lesões de cárie

artificial mais coincidentes com a realidade, simulando de forma mais fidedigna as interações entre os diversos microrganismos e carboidratos (Carvalho et al., 2018). Sande et al. (2011) estudaram a capacidade de desmineralização dos biofilmes microcosmos. Para isso, alíquotas de saliva de voluntários foram colocadas sobre corpos-de-prova de esmalte bovino por 5 dias, sendo após esse período encontradas áreas de desmineralização do esmalte. Em análise de microscopia eletrônica de varredura, é possível observar a diversidade desse tipo de biofilme e toda sua estrutura tridimensional. No estudo de Jardine et al. (2019) foi avaliado o efeito antimicrobiano de cimentos biocerâmicos em biofilme microcosmo, e nas análises de imagem foi possível verificar uma diversidade de microrganismos presentes, além de toda sua estrutura e agregação.

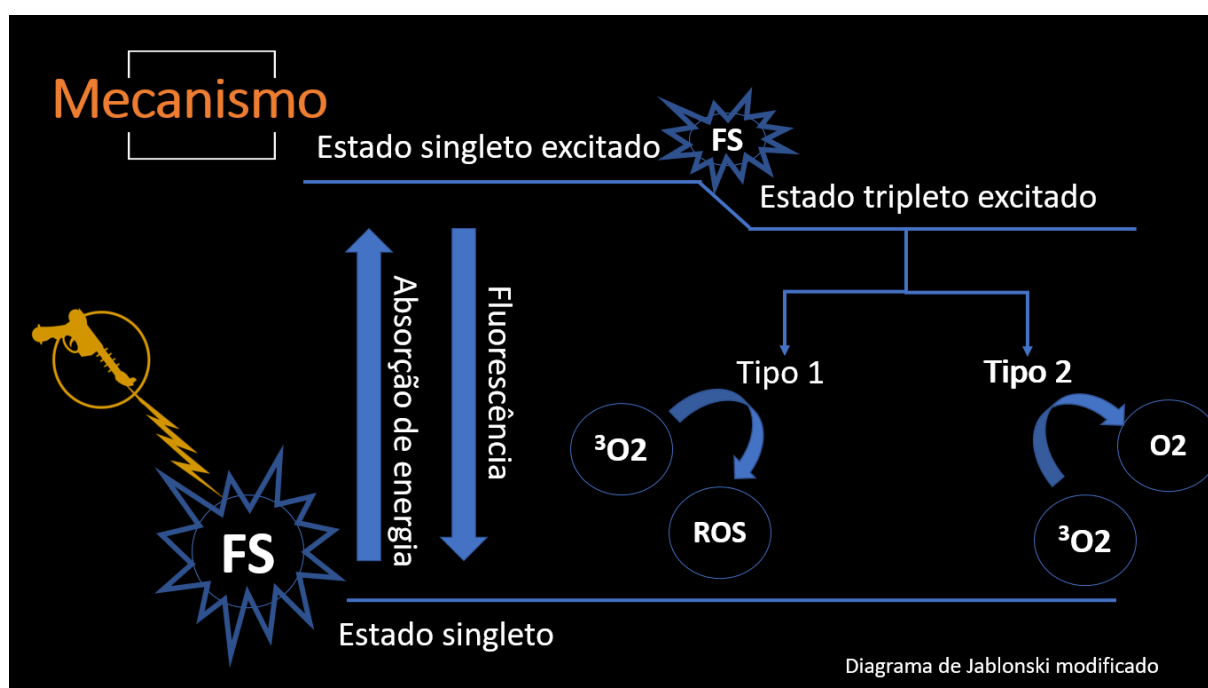
Outra vantagem dos biofilmes microcosmos é a possibilidade de avaliar a acidogenicidade do biofilme relacionada à presença de microrganismos capazes de produzir ácido láctico (Oliveira, 2018). O ácido láctico é um produto resultante da fermentação de sacarose proveniente da dieta (Papadimitriou et al., 2016). Uma vez que esses ácidos estão relacionados com o processo de desmineralização dos tecidos dentários e desenvolvimento da cárie dentária, a quantificação da produção de ácido láctico nos biofilmes microcosmos permite investigar se as taxas metabólicas dos microrganismos são comprometidas após o tratamento (Creeth et al., 2018; Guilherme et al., 2009), fornecendo dados adicionais para o estudo do controle da cárie dentária. Portanto, os biofilmes microcosmos constituem-se de modelos importantes para estudo de novas terapias contra a cárie dentária.

1.2.2 Terapia fotodinâmica antimicrobiana e fotossensibilizadores

A TFDa baseia-se em uma reação fotofísica capaz de causar morte celular de microrganismos, por meio da utilização de um fotossensibilizador e uma fonte de luz na presença do oxigênio (Issa, Manela-Azulay 2010; Méndez et al. 2018; Neves et al., 2016). A reação acontece quando uma luz, em comprimento de onda ressoante, se incide sobre o fotossensibilizador, que por sua vez, é ativado e passa do seu estado singleto para um estado singleto excitado. A meia vida do fotossensibilizador nesse

estado é curta, e por uma perda de energia pode voltar ao seu estado original. Entretanto, se ocorrer um cruzamento intersistemas o fotossensibilizador pode passar para seu estado tripleto, que apresenta maior estabilidade, podendo reagir com o oxigênio do ambiente por dois processos distintos: Reação tipo I: na qual ocorre transferência de elétrons, originando radicais livres; e reação tipo II: onde há transferência de energia, formando o oxigênio singleto (figura 1). Ambas as reações resultam em produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que iniciam o estresse oxidativo e reagem com membranas celulares e proteínas, resultando na morte celular microbiana (Carrera et al., 2016; Da Hora Machado, 2000; Méndez et al., 2018a).

Figura 1- Mecanismo de ação da TFDa representando as reações do tipo 1 e tipo 2



Legenda: Diagrama de Jablonski modificado.
Fonte: Elaborado pela autora.

A TFDa possui como vantagem a seletividade, já que podemos direcionar a luz no local da lesão (Perussi, 2007). O alcance de resultados imediatos, eliminação de patógenos em biofilmes, inibição de fatores de virulência produzidos pelos

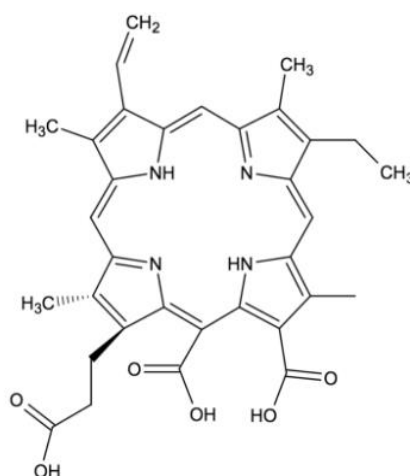
microrganismos e ausência de seleção de cepas microbianas resistentes são outros benefícios que essa terapia apresenta (Dovigo et al., 2013; Lourenço et al., 2019; Vieira et al., 2019).

Entretanto, sabe-se que os resultados da TFDa dependem da natureza das células alvo, das condições de iluminação e propriedades do fotossensibilizador (Kou et al., 2017). Entre as propriedades ideais de um fotossensibilizador estão: baixa toxicidade no escuro, alto rendimento quântico de EROs, capacidade de absorção em comprimento de onda que proporcione boa penetração da luz no tecido (vermelho ou infra-vermelho), estado tripleto com uma meia vida longa, alta solubilidade em água, simplicidade na formulação, farmacocinética favorável, facilidade de manuseio e possibilidade de obtenção em escala industrial a custo reduzido (Hamblin, 2016; Simplicio et al., 2002).

Na busca por essas características ideais, vários fotossensibilizadores são investigados e desenvolvidos, como os fenotiazínicos, derivados da hematoporfirina, clorinas, xantenos, fitalocianinas e derivados de produtos naturais (Bayona et al., 2017; Junqueira et al., 2012; Mesquita et al., 2018). Certamente, os fenotiazínicos azul de metileno (AM) e azul de toluidina são os fotossensibilizadores mais usados e estudados até hoje. Ambos receberam aprovação regulamentar em vários países do mundo para uso na TFDa. Entretanto, os cromóforos fenotiazínicos não são altamente ativos e muitos laboratórios estão tentando introduzir compostos com maior atividade (Bonifácio et al., 2018; Hamblin, 2016).

Entre os compostos com maior atividade para serem usados na TFDa, a clorina e₆ (figura 2) mostra-se um ótimo fotossensibilizador em diversos tratamentos *in vitro* para inibição de microrganismos como *S. mutans* e *C. albicans* (Garcia et al., 2018; Khademi et al., 2014). A clorina e₆ é um fotossensibilizador de segunda geração, ou seja, apresenta tempo de fotossensibilização mais curto e um rendimento de produção de EROs maior. Pode ser ativada pela luz na faixa de 650 e 800 nm, região mais favorável por apresentar maior penetração da luz ao tecido, por isso é mais estável, possibilitando o tratamento de lesões mais profundas (Silva, 2007).

Figura 2- Estrutura química da molécula da Clorina e₆



Fonte: Cieplik et al. 2018 com adaptações.

A partir da molécula de Clorina e₆ surgiram diversos fotossensibilizadores, por exemplo o Radachlorin e Photoditazine (PDZ), que tem suas ações antimicrobianas estudadas em ampla escala (Fekrazad et al., 2011; Hakimiha et al., 2014; Quishida et al., 2015; Vahabi et al., 2011). Além desses, um novo fotossensibilizador derivado da Clorina e₆, o Fotoenticine® (FTC), foi sintetizado por pesquisadores da Espanha e suas ações antimicrobianas ainda estão sendo investigadas.

Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa, o FTC mostrou ser um fotossensibilizador promissor para uso na TFDa contra *S. mutans*, sendo capaz de inibir o crescimento dessas bactérias em culturas planctônicas e diminuir a formação do biofilme (Garcia et al., 2018). Contudo, esses resultados foram só um indício que esse fotossensibilizador pode ser promissor para tratamento da cárie dentária, afinal, se faz necessário entender a ação da TFDa com FTC sobre os microrganismos organizados em biofilmes multiespécies. Para esse tipo de estudo, os biofilmes microcosmos são os melhores modelos *in vitro*, por isso a primeira parte desse estudo teve como objetivo comprar a ação da TFDa associada ao FTC e ao AM sobre biofilmes microcosmos provenientes de cárie dentária.

1.3 PROPOSIÇÃO

1.3.1 Objetivos gerais

Investigar a ação da TFDa associada ao Fotoenticine ou Azul de Metileno sobre biofilmes microcosmos de cárie dentária.

1.3.2 Objetivos específicos

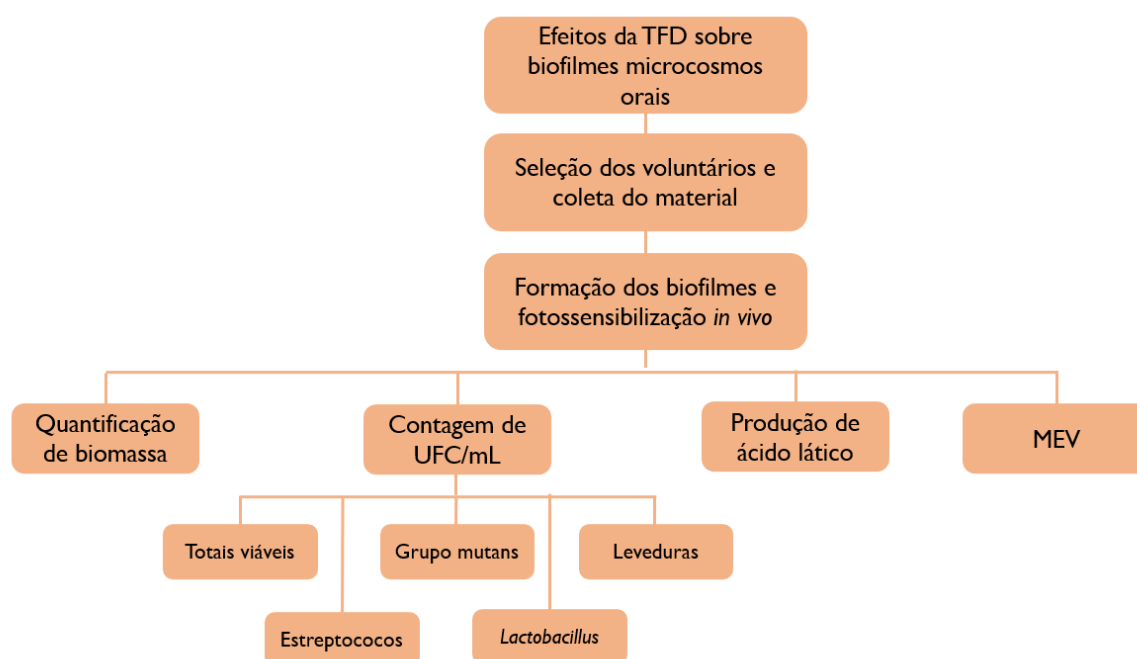
Avaliar os efeitos dos fotossensibilizadores Fotoenticine e Azul de Metileno na TFDa sobre biofilmes microcosmos de cárie dentária, por meio de:

- a) contagem de células viáveis;
- b) quantificação de biomassa;
- c) análise estrutural microscópica;
- d) determinação da capacidade acidogênica.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo analisamos a ação da TFDa sobre biofilmes microcosmos de cárie dentária. O fluxograma das etapas seguidas nesta parte do estudo pode ser observado na figura 3.

Figura 3- Fluxograma do estudo da TFDa sobre biofilmes microcosmos cariogênicos.



Legenda: Fluxograma das etapas experimentais da primeira parte do trabalho.

Fonte: Elaborado pela autora.

1.4.1 Comitê de ética

Esse trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista/Unesp do campus de São José dos Campos sob Parecer nº 158617/2019 (ANEXO A).

1.4.2 Seleção dos voluntários e coleta do material

Para a formação dos biofilmes microcosmos, foram selecionados 3 pacientes em atendimento na clínica de Odontologia Restauradora do ICT/Unesp. Os critérios de inclusão foram: idade entre 20 a 40 anos, presença de no mínimo uma lesão de cárie dentinária em molar. Os critérios de não inclusão foram o uso de antibióticos nos últimos 90 dias.

A coleta do material de dentina infectada foi realizada após anestesia do paciente e isolamento absoluto, utilizando-se uma cureta estéril. O material foi transferido para caldo BHI com 20% de glicerol e armazenado em freezer -80. Os dentes foram então restaurados de acordo com a necessidade individual pré-determinada.

1.4.3 Confeção dos corpos-de-prova

Foram confeccionados corpos-de-prova de dentina de dentes bovinos, conforme metodologia de Garcia et al. 2018. Os corpos-de-prova foram preparados a partir de dentes incisivos mandibulares, medindo 5 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura. Inicialmente, foi realizado um corte na junção amelocementária com auxílio de uma peça reta odontológica com disco diamantado, para assim conseguir o seccionamento da raiz com a coroa dos dentes (figura 4). As coroas foram então

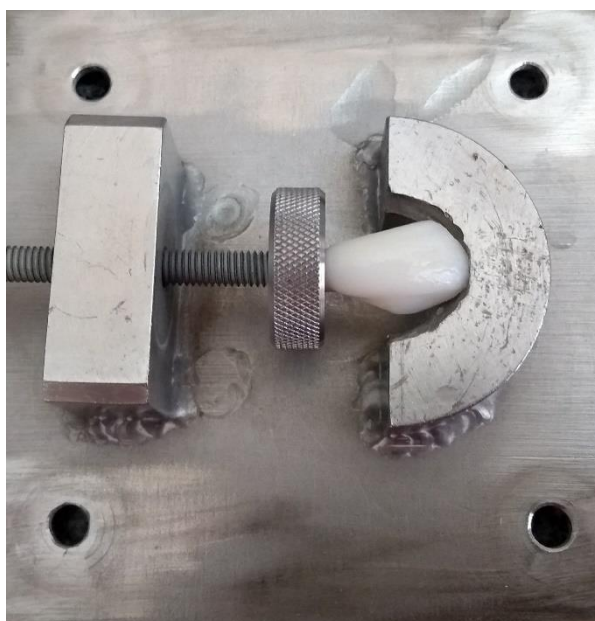
fixadas em um suporte da máquina de amostra circulares com a face vestibular voltada para cima (figura 5). Os cortes foram realizados com uma broca trefina de 4 mm de diâmetro (figura 6)

Figura 4- Corte na junção amelocementária



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5- Dentes fixados no suporte da máquina de corte de amostras circulares



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6- Dente posicionado na máquina de cortes de amostras circulares



Fonte: Elaborado pela autora.

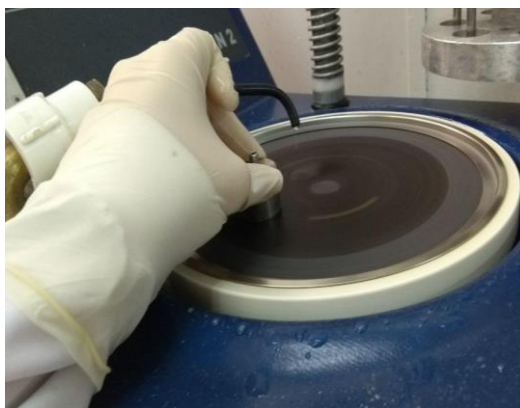
Para polimento e padronização das amostras, cada corpo-de-prova foi inserido no interior de uma matriz metálica, com dimensões de 6 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura, onde a superfície da dentina ficou posicionada para o interior da matriz (figura 7). Assim, foi realizado o desgaste com lixa de granulação decrescente em uma politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica, AS, São Paulo, SP, Brasil) sob refrigeração em baixa velocidade (figura 8), sendo sempre conferida sua dimensão final por paquímetro digital (figura 9). Após a confecção, os corpos-de-prova foram armazenados em 0,1% (v/v) de solução de timol a 4°C. Todos esses procedimentos foram realizados no Laboratório Integrado de Pesquisa em Odontologia Restauradora (LIPq) do Departamento de Odontologia Restauradora do Instituto de Ciência e Tecnologia no Campus de São José dos Campos/Unesp.

Figura 7- Corpo-de-prova posicionado na matriz para polimento



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8- Corpo-de-prova sendo polido



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9- Verificação da dimensão final do corpo-de-prova por paquímetro digital



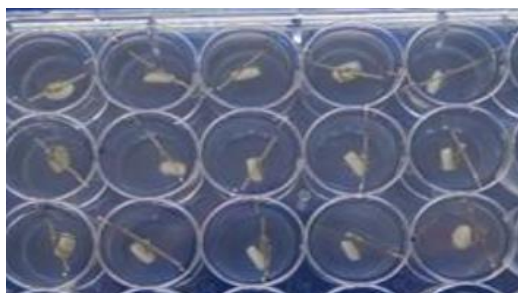
Fonte: Elaborado pela autora.

1.4.4 Formação dos biofilmes microcosmos

Para a formação dos biofilmes microcosmos foi seguida a metodologia de Méndez et al. (2018) com algumas modificações. As amostras do material de dentina cariada foram descongeladas e homogeneizadas. Então, 200 μ L foi adicionado em 10 mL de caldo BHI fresco enriquecido com 5% de sacarose e levado para estufa a 37°C em 5% de CO₂ por 48 h.

Os corpos-de-prova foram autoclavados e posicionados em placa de 24 poços (figura 10), sendo suspensos por suportes confeccionados com fio ortodôntico. Com os corpos-de-prova devidamente posicionados, foi acrescentado 2 mL de caldo BHI com 5% de sacarose. A seguir, foram adicionados 225 μ L da suspensão em cada poço e as placas foram incubadas a 37°C por 120 h em 5% de CO₂. A cada 24 h os poços foram lavados duas vezes com 2 mL de PBS para remoção das células fracamente aderidas, e posteriormente foram adicionados 2 mL de caldo BHI com 5% de sacarose em cada poço e incubadas a 37°C em 5% de CO₂ novamente.

Figura 10- Corpos-de-prova posicionados nos suportes na placa de 24 poços



Fonte: Elaborado pela autora.

1.4.5 Preparo dos fotossensibilizadores e fonte de luz

Para a realização da fotossensibilização *in vitro* foi seguida a metodologia previamente descrita por Garcia et al., (2018). Como fotossensibilizador foi utilizado o FTC e o AM (como controle, por ser o padrão outro utilizado atualmente na clínica). Tanto o FTC quanto o AM foram diluídos em PBS e esterilizados utilizando filtro com poro 0,22 μm (MFS, Dublin, EUA). ambos fotossensibilizadores foram armazenados no escuro. Para irradiação dos corpos de prova, foi utilizado o IrradLED® (biopdi - São Carlos, São Paulo, Brasil) que possui 48 diodos emissores de luz (LED) com comprimento de onda de 660 nm, vermelho visível, e uma potência individual de cada LED de 3 W gerando dose de energia de 28,5 J/cm² por 714 s, totalizando uma dose de potência de 40 mW/cm².

Após a formação do biofilme, os corpos-de-prova foram posicionados na intersecção dos poços da placa de 24 poços, para que fosse possível o uso de um volume mínimo de fotossensibilizador. Assim, foi adicionado 200 μL de FTC, AM ou PBS conforme o grupo experimental (Quadro 1). As placas foram protegidas da luz, para evitar a irradiação de luz do ambiente, e colocadas no agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil) durante 15min (tempo de pré-irradiação). Em seguida os grupos F-L+; FTC+L+ e AM+L+ foram irradiados com LED. Já os grupos F-L-; FTC+L- e AM+L- continuaram protegidos da luz, pelo mesmo tempo em que os biofilmes foram submetidos à irradiação.

Quadro 1- Divisão dos grupos experimentais

Grupo controle: biofilme microcosmo sem tratamento	Biofilme microcosmo tratado com Azul de Metileno	Biofilme microcosmo tratado com Fotoenticine®
LED na ausência de fotossensibilizador (F-L+)	Azul de Metileno e LED (AM+L+)	Fotoenticine® e LED (FTC+L+)
Ausência de fotossensibilizador e LED (F-L-)	Azul de Metileno sem LED (AM+L-)	Fotoenticine® sem LED (FTC+L-)

Fonte: Elaborado pela autora.

1.4.6 Análise da TFDa sobre o número de células viáveis dos biofilmes microcosmos

Após a fotossensibilização *in vitro*, os corpos-de-prova foram transferidos para tubos Falcon contendo 4 mL de PBS. Os biofilmes aderidos foram desprendidos utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD2200, Bandelin Eletronic) com potência de 7 W por 30 s, rompendo os agregados microbianos. A partir da solução obtida, foram realizadas diluições seriadas da suspensão do biofilme.

Para contagem total de microrganismos foram semeadas alíquotas de 100 µL de cada diluição em placas contendo ágar BHI, já para as demais contagens foram semeadas três alíquotas de 10 µL de cada diluição em placas contendo meios de cultura específicos: ágar Mitis Salivarius para contagem de estreptococos, ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose para contagem de estreptococos do grupo *mutans*, ágar Rogosa para contagem de lactobacilos, e ágar Sabouraud com cloranfenicol para contagem de leveduras.

Posteriormente, as placas de ágar Sabouraud foram incubadas a 37°C por 48 h, as demais placas foram incubadas à 5% de CO₂ nas mesmas condições, para determinação do número de UFC.

1.4.7 Análise do efeito da TFDa sobre a produção de ácido láctico nos biofilmes microcosmos

Após a fotossensibilização, os corpos-de-prova de dentina foram transferidos para tubos Falcon contendo 5 mL de PBS e incubados a 37°C por 3 h. A seguir, 1 mL de cada tubo foi levado para o freezer -80°C por 5 min para interromper a produção de ácido láctico e posteriormente foram levados para análise seguindo a metodologia de Pires et al. (2019) com algumas modificações. Para verificação das concentrações de L-lactato foi utilizado o método espectrofotômetro enzimático (método da desidrogenase láctica LDH UV, K014 - Bioclin), de acordo com as instruções do fabricante. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV (Epoch, Biotek Instruments, Winooski, EUA) no comprimento de onda de 340 nm, e os valores foram expressos em mmol de lactato/mL.

1.4.8 Análise estrutural dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

Após a formação do biofilme e tratamento de acordo com cada grupo, os corpos-de-prova de dentina foram tratados com 1 mL de glutaraldeído a 2,5% por uma hora para fixação das células, e a seguir foi realizada a desidratação das amostras com 1 mL de soluções crescente de etanol (10, 25, 50, 75 e 90%) por 20 min e, por último, etanol absoluto por 1 h. As placas contendo os corpos-de-prova foram levadas à estufa por 24 h para secagem completa das amostras e, posteriormente, os corpos de prova foram transferidos para stubs de alumínio e recobertos com ouro por 160 s a 40 mA (Denton Vacuum Desk II). Após a metalização, as peças foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura do Laboratório Associado de Sensores e Materiais LAS/dimare no Instituto Nacional de Pesquisa Espaciais (INPE) em São José dos Campos/SP.

1.4.9 Análise da biomassa total dos biofilmes por coloração com cristal violeta

Para essa análise, 200 µL das amostras de dentina cariada homogeneizadas foram adicionados em 10 mL de caldo BHI fresco enriquecido com 5% de sacarose e levados para estufa a 37°C em 5% de CO₂ por 24 h. Após esse tempo, a suspensão foi centrifugada e ressuspensa em 10mL de BHI. Em placas de 96 poços, foram adicionados 200 µL das suspensões seguido por incubação a 37°C por 48 h em 5% de CO₂. Após 24h da formação dos biofilmes, os poços foram lavados duas vezes com 2mL de PBS para remoção das células fracamente aderidas. Depois de 48h de formação do biofilme, os poços foram lavados novamente e então foi feita a fotossensibilização *in vitro*. Para isso 200 µL de FTC, AM ou PBS foram adicionados aos biofilmes, conforme os grupos experimentais do Quadro 1. As placas foram protegidas da luz e levadas ao agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil) por um tempo de 15 min (tempo pré-irradiação). A seguir, os grupos F-L+; FTC+L+ e AM+L+ foram irradiados com LED, enquanto os grupos F-L-; FTC+L- e AM+L- permaneceram no escuro pelo mesmo tempo em que os biofilmes foram submetidos à irradiação.

As placas foram lavadas com PBS duas vezes e foi adicionado o álcool metílico por 20 min. Após remoção do álcool, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 16 h para secagem do biofilme. Passado esse tempo, 200 µL de Cristal Violeta foram adicionados em cada poço por 20 min. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e acrescentados 200 µL de ácido acético (33%) para descoloração do biofilme. Então, 100 µL do sobrenadante do processo de descoloração foi transferido para placas de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm para medida da absorbância.

1.4.10 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de contagem de células viáveis (UFC/mL), produção de ácido láctico e análise de biomassa foram analisados por ANOVA e teste de Tukey usando o programa GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para análise estatística, foram utilizados n=5 por grupo. Os ensaios foram repetidos três vezes. O nível de significância de 5% foi adotado em todas as análises.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Análise dos biofilmes por contagem de células viáveis

Para desenvolver esse estudo, foi realizada a coleta de dentina cariada de três pacientes diferentes, sendo essas amostras denominadas amostras 1, 2 e 3. Assim, foi realizada a contagem de células viáveis em cada uma das amostras com todos os grupos de estudo. No geral, os resultados demonstraram que apesar da individualidade de cada amostra, com variação de espécies e quantidade de microrganismos, todas apresentaram um padrão semelhante de inibição na resposta aos tratamentos realizados.

1.5.1.2 Contagem de UFC do biofilme microcosmo da amostra 1

A amostra 1 apresentou crescimento em ágar BHI, Mitis Salivarius, MSBS e Rogosa. Entretanto, não foi observado crescimento em ágar Sabouraud, indicando ausência de leveduras nesta lesão.

Na contagem total de microrganismos em ágar BHI, foi possível observar que os grupos controle (F-L- e F-L+) apresentaram um crescimento médio na contagem de UFC de 7,2 Log10, assim como o grupo AM+L-. Nos grupos com TFDa a inibição foi significativa em relação ao grupo controle, sendo de 0,4 Log10 para o grupo AM+L+ e de 1,8 Log10 para o grupo FTC+L+. O grupo FTC+L- também apresentou redução microbiana, de aproximadamente 0,2 Log10 (figura 11A).

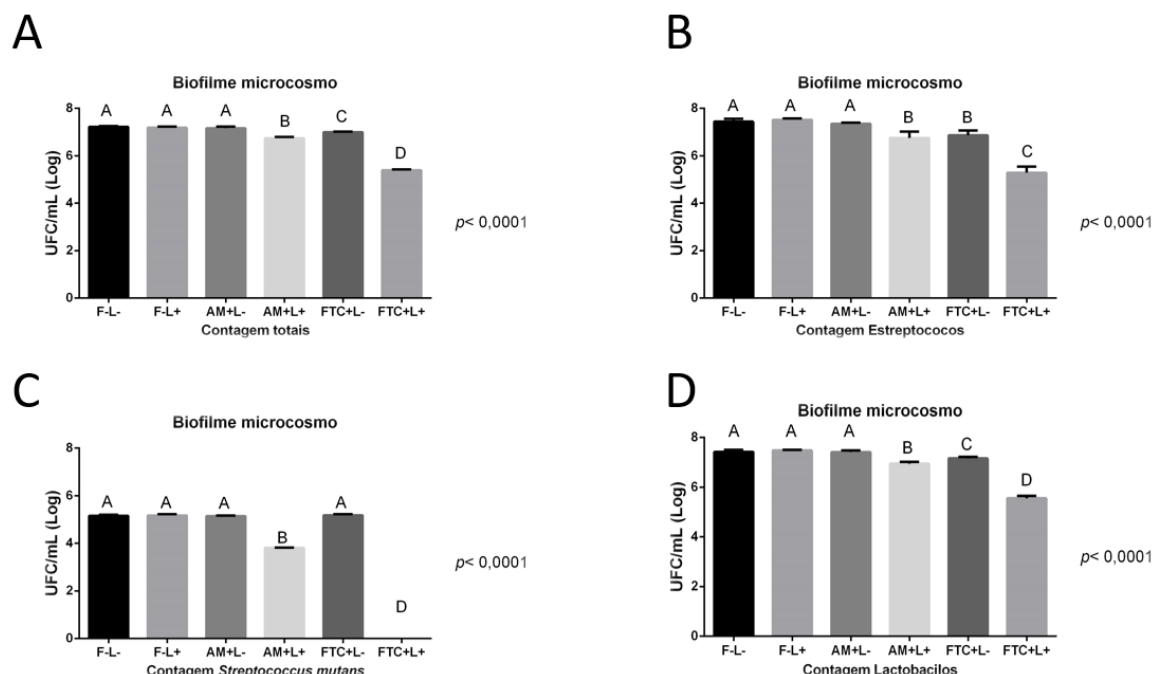
O crescimento de UFC na contagem dos estreptococos em ágar Mitis Salivarius dos grupos controles (F-L- e F-L+) foi muito semelhante aos da contagem total, apresentando em média 7,4 Log10. Os grupos AM+L+ e FTC+L- apresentaram uma inibição de 0,7 e 0,6 Log10, respectivamente, com diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controles. Da mesma forma que na contagem

total, a maior inibição de estreptococos dos biofilmes microcosmos ocorreu no grupo FTC+L+, que alcançou redução de 2,1 Log10 (figura 11B).

Na contagem de estreptococos do grupo *mutans* em ágar MSBS, o crescimento dos grupos controles e do grupo AM+L- foi em média 5,1 Log10. Nessa contagem, o grupo FTC+L- não apresentou diferença estatística, apresentando o mesmo crescimento que os grupos controle. A inibição dos grupos da TFDa, foi de 1,3 Log10 para o grupo AM+L+ e o grupo FTC+L+ alcançou uma inibição total de microrganismo (figura 11C).

Por fim, na contagem de lactobacilos em ágar Rogosa, os grupos controles e grupo AM+L- apresentaram em média 7,5 Log10 de crescimento. O grupo FTC+L- inibiu 0,3 Log10, enquanto os grupos com TFDa apresentaram inibição de 0,5 Log10 no AM+L+ e 1,9 Log10 no FTC+L+. Esses dados confirmam que a TFDa com FTC apresentou maior atividade antimicrobiana do que a TFDa com AM (figura 11D).

Figura 11- Dados de unidade formadoras de colônias (UFC log 10) obtidos no biofilme microcosmo formados a partir da amostra 1



Legenda: A) contagem de UFC/mL em meio BHI para contagens totais de microrganismos; B) contagem de UFC/mL em meio MS para contagem de *Streptococcus* spp. C) contagem em meio MSBS para contagem de de *Streptococcus* do grupo *mutans*; D) contagem de UFC/mL em meio Rogosa para contagem de *Lactobacillus*. Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Fotoentice® na ausência de luz (FTC+L-); Grupo TFDa com Fotoentice® (FTC+L+). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

1.5.1.3 Contagem de UFC do biofilme microcosmo da amostra 2

A contagem total de UFC da amostra 2 demonstrou um crescimento médio de 8 Log10 para os grupos controles e o grupo AM+L-. Os grupos com TFDa apresentaram redução de 1,2 Log10 para o grupo AM+L+ e de 3,1 Log10 para o grupo FTC+L+. O grupo FTC+L- apresentou redução microbiana semelhante ao grupo AM+L+ (figura 12A).

Os grupos controles e o grupo AM+L-, avaliados na contagem de estreptococos, apresentaram um crescimento microbiano médio de 5,0 Log10. Os

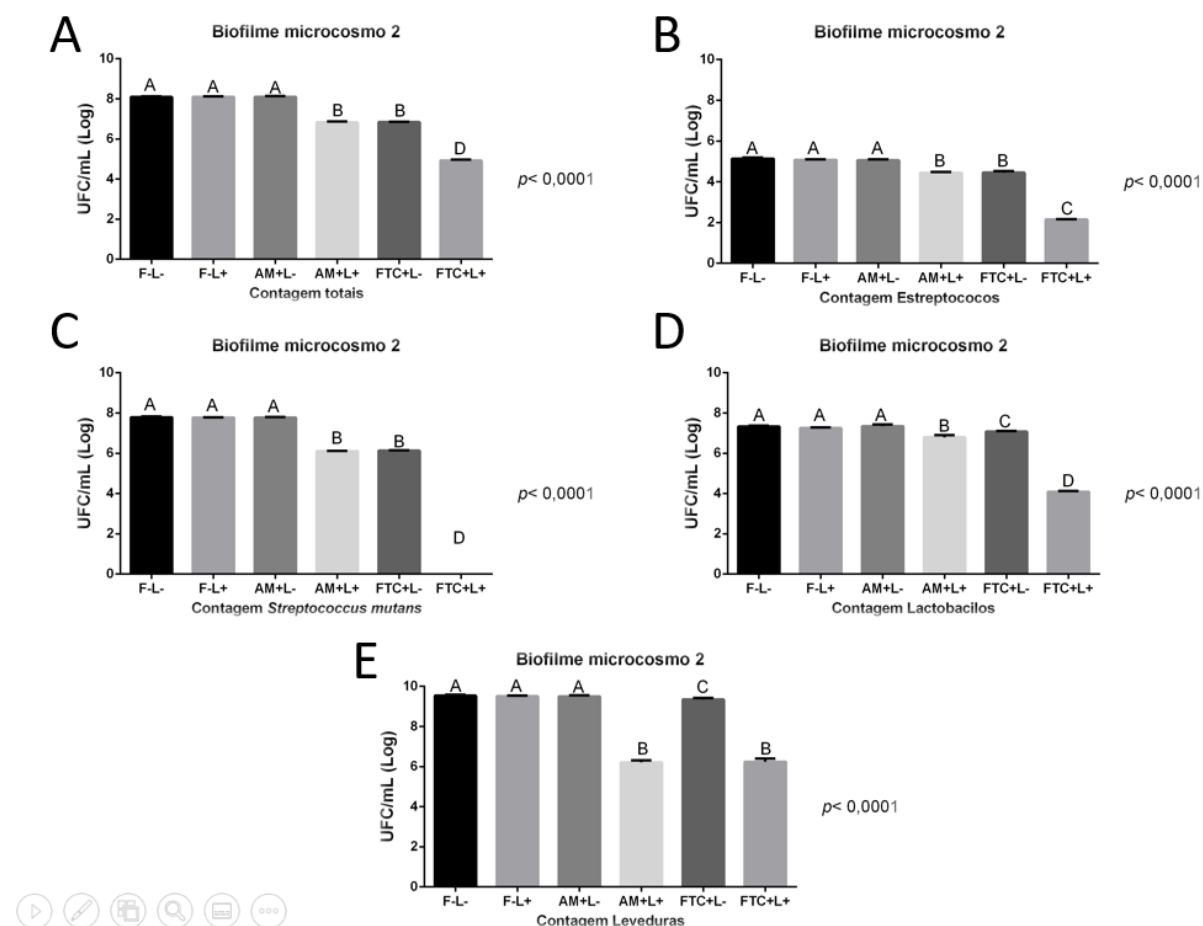
grupos AM+L+ e FTC+L- apresentaram redução de 0,69 e 0,68 Log10 respectivamente em relação ao controle. A maior inibição de estreptococos nessa amostra de biofilme microcosmo ocorreu no grupo FTC+L+, que alcançou redução de 2,9 Log10 (figura 12B).

Para a contagem de estreptococos do grupo *mutans*, os grupos controles e o grupo AM+L- obtiveram um crescimento médio de 7,7 Log10. Os grupos AM+L+ e FTC+L- apresentaram reduções do crescimento microbiano de 1,6 Log10 em relação ao controle. A TFDa mediada pelo FTC foi capaz novamente de inibir 100% do crescimento de estreptococos do grupo *mutans* (figura 12C).

Na contagem de lactobacilos, os grupos controles e o grupo AM+L- apresentaram uma média de crescimento de 7,3 Log10. O grupo FTC+L- inibiu 0,2 Log10, o grupo AM+L+ 0,5 Log10 e o grupo FTC+L+ a redução foi de 3,2 Log10, todos comparados ao controle (figura 12D).

A amostra 2 apresentou crescimento de leveduras, que foi de 9,3 Log10 nos grupos controles e o grupo AM+L-. O grupo FTC+L-, apresentou uma redução de 0,2 Log10, já os grupos tratados com a TFDa utilizando o AM e o FTC alcançaram uma redução do crescimento de leveduras de aproximadamente 3,3 Log10 (figura 12E).

Figura 12- Dados de unidade formadoras de colônias (UFC log 10) obtidos no biofilme microcosmo formados a partir da amostra 2



Legenda: A) contagem de UFC/mL em meio BHI para contagem totais de microrganismos; B) contagem de UFC/mL em meio MS para contagem de *Streptococcus spp.*; C) contagem em meio MSBS para contagem de de Estreptococos do grupo *mutans*; D) contagem de UFC/mL em meio Rogosa para contagem de *Lactobacillus*; E) contagem de UFC/mL em meio Sabouraud para contagem de Leveduras. Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Fotoentice® na ausência de luz (FTC+L-); Grupo TFDa com Fotoentice® (FTC+L+). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

1.5.1.4 Contagem de UFC do biofilme microcosmo da amostra 3

Na contagem total de microrganismos da amostra 3, os grupos controles e o grupo AM+L- demonstraram um crescimento microbiano médio de 10,3 Log10. Os grupos AM+L+ e FTC+L- apresentaram uma inibição no crescimento de 0,35 Log10.

O grupo FTC+L+ obteve uma redução de 3,4 Log₁₀ (figura 13A).

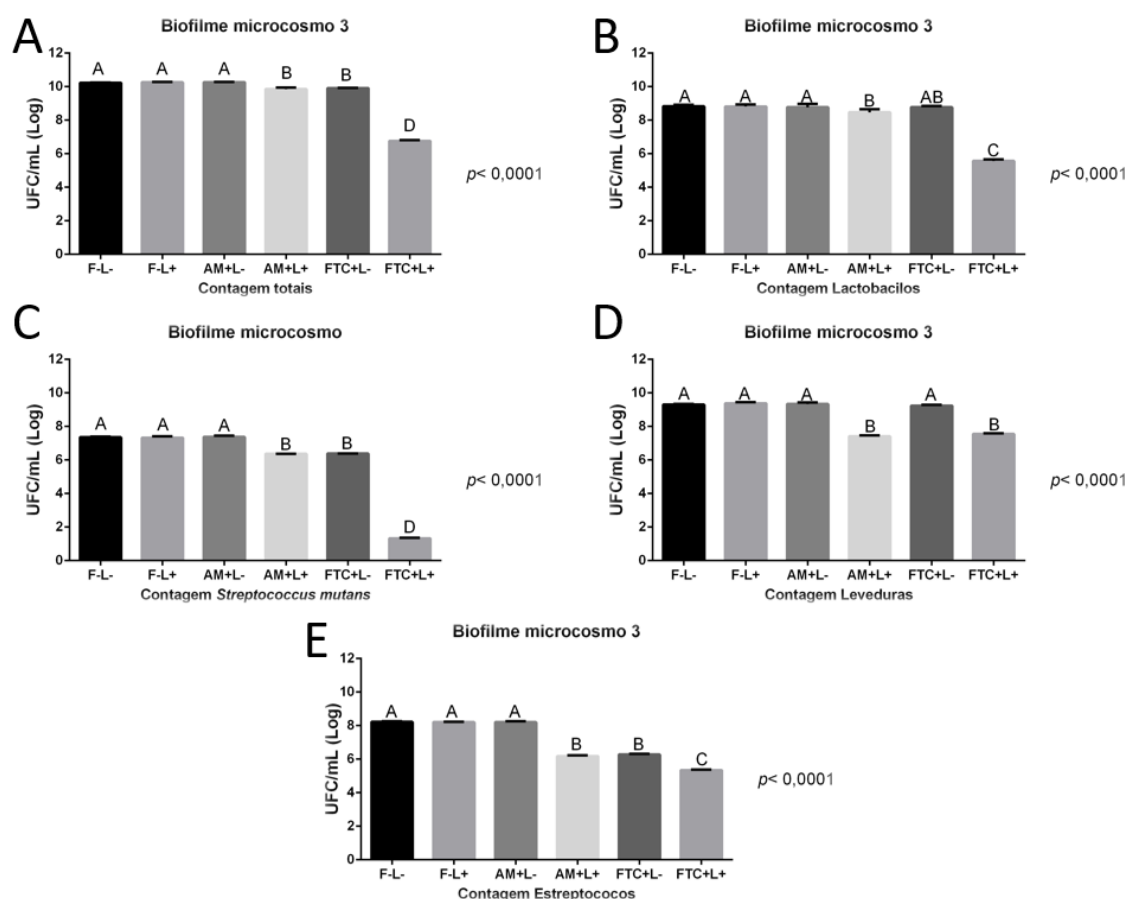
Nos grupos controles e o grupo AM+L- o crescimento médio foi de 8,2 Log₁₀ na contagem de estreptococos. Nos grupos AM+L+ e FTC+L- as reduções foram de 2 e 1,9 Log₁₀ respectivamente. O grupo FTC+L+ apresentou inibição de 2,8 Log₁₀ em relação ao controle (figura 13B).

Ao analisar o ágar MSBS para contagem de estreptococos do grupo *mutans*, foi possível notar que não houve diferenças estatísticas significativas nos grupos controles e AM+L-, cujo crescimento microbiano foi de 7,6 Log₁₀. Os grupos AM+L+ e FTC+L- obtiveram uma redução média de 0,9 Log₁₀ em relação ao grupo controle. A maior atividade antimicrobiana ocorreu no grupo FTC+L+ cuja inibição foi de 6 Log₁₀ (figura 13C).

Na contagem de lactobacilos, não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos controles, AM+L- e FTC+L-, onde o crescimento médio de 8,8 Log₁₀. A atividade antimicrobiana esteve presente quando utilizado a TFDa, com inibição de 0,3 Log₁₀ no grupo AM+L+ e de 3,3 Log₁₀ no grupo FTC+L+ (figura 13D).

Na contagem de leveduras, houve um comportamento semelhante dos grupos controle e grupos tratados na ausência de luz (AM+L- e FTC+L-) com um crescimento médio de 9,3 Log₁₀. Os grupos AM+L+ e FTC+L+ resultaram em uma atividade antimicrobiana semelhante, com 1,9 e 1,8 Log₁₀ de redução respectivamente (figura 13E).

Figura 13- Dados de unidade formadoras de colônias (UFC log 10) obtidos no biofilme microcosmo formados a partir da amostra 3



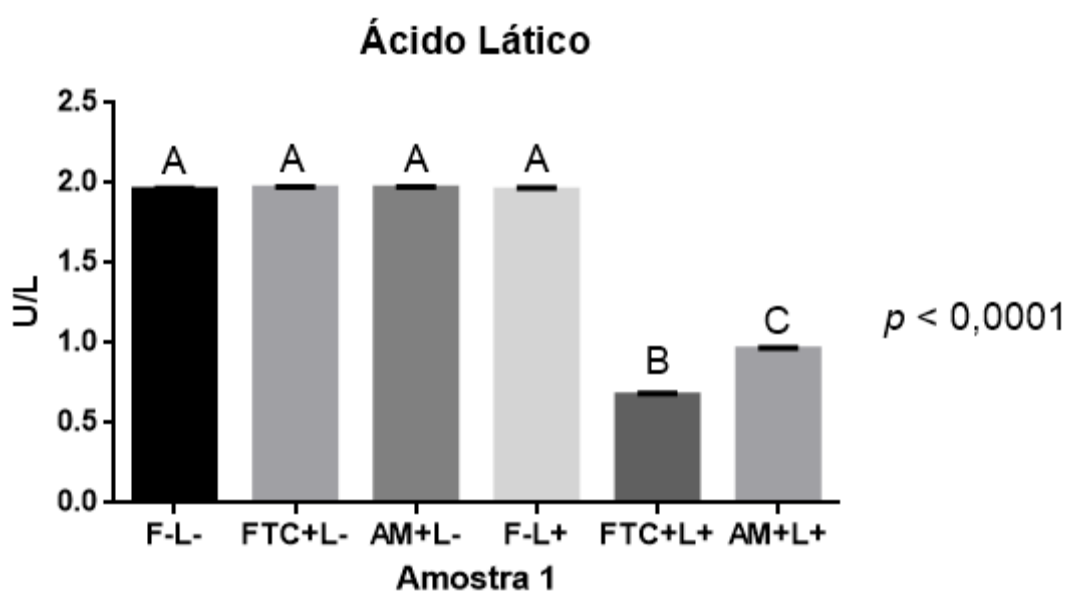
Legenda: A) contagem de UFC/mL em meio BHI para contagem totais de microrganismos; B) contagem de UFC/mL em meio MS para contagem de *Streptococcus spp.*; C) contagem em meio MSBS para contagem de *Streptococcus* do grupo *mutans*; D) contagem de UFC/mL em meio Rogosa para contagem de *Lactobacillus*; E) contagem de UFC/mL em meio Sabouraud para contagem de Leveduras. Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Fotoentice® na ausência de luz (FTC+L-); Grupo TFDa com Fotoentice® (FTC+L+). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).
Fonte: Elaborado pela autora.

1.5.2 Análise dos biofilmes pela produção de ácido láctico

Foi realizado o teste de produção de ácido láctico em cada uma das amostras (1, 2 e 3) com todos os grupos de estudo.

Os grupos controles e os grupos AM+L- e FTC+L- da amostra 1 demonstraram uma média de 1,9 U/L de ácido láctico. As reduções estatisticamente significativas ficaram para os biofilmes quando tratados com a TFDa, sendo 0,9 U/L para o grupo AM+L+ e 1,2 U/L para o grupo FTC+L+ (figura 14).

Figura 14- Avaliação da Produção de ácido láctico (U/L) dos biofilmes microcosmos da amostra 1 após os tratamentos

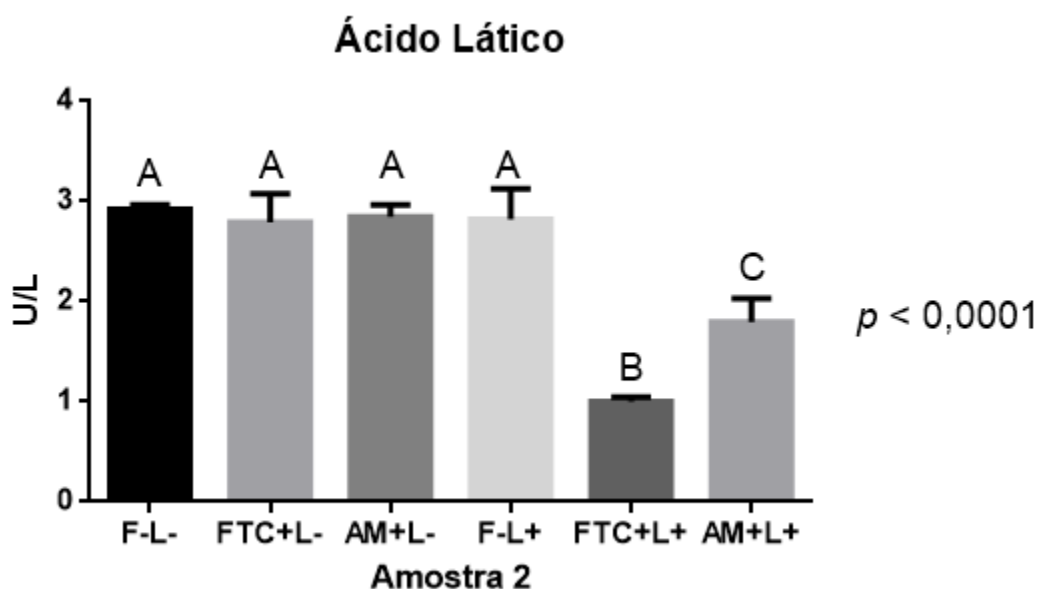


Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Fotoenticine® na ausência de luz (FTC+L-); Grupo TFDa com Fotoenticine® (FTC+L+). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

No biofilme microcosmo da amostra 2, a produção de ácido láctico nos grupos controles, AM+L- e FTC+L-, foi em média de 2,9 U/L. Novamente, a TFDa foi capaz de reduzir a produção de ácido láctico, sendo que o grupo AM+L+ reduziu 1,1 U/L e o grupo FTC+L+ em 1,8 U/L (figura 15).

Figura 15- Avaliação da Produção de ácido láctico (U/L) dos biofilmes microcosmos da amostra 2 após os tratamentos

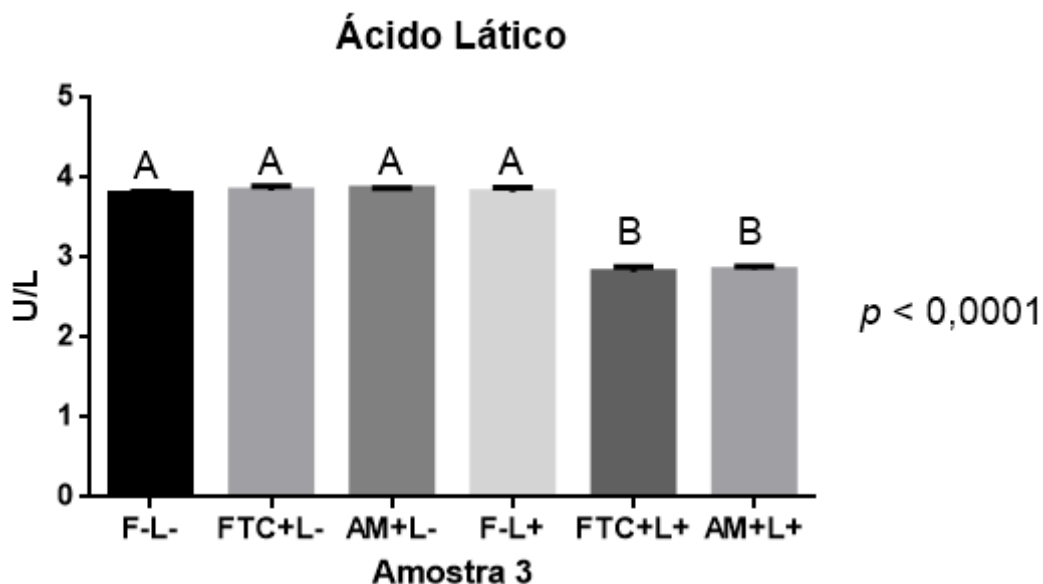


Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Fotoentcine® na ausência de luz (FTC+L-); Grupo TFDa com Fotoentcine® (FTC+L+). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Ao analisar a produção de ácido láctico do biofilme microcosmo da amostra 3, a produção média nos grupos controles, AM+L- e FTC+L- foi de 3,8 U/L. Os grupos com a TFDa apresentaram uma inibição de 0,9 U/L da produção de ácido láctico em relação ao grupo controle. Diferentemente das outras amostras, na amostra 3 os grupos AM+L+ e FTC+L+ não apresentaram diferença estatística significativa entre si (figura 16).

Figura 16- Avaliação da Produção de ácido láctico (U/L) dos biofilmes microcosmos da amostra 2 após os tratamentos



Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Fotoentecine® na ausência de luz (FTC+L-); Grupo TFDa com Fotoentecine® (FTC+L+). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

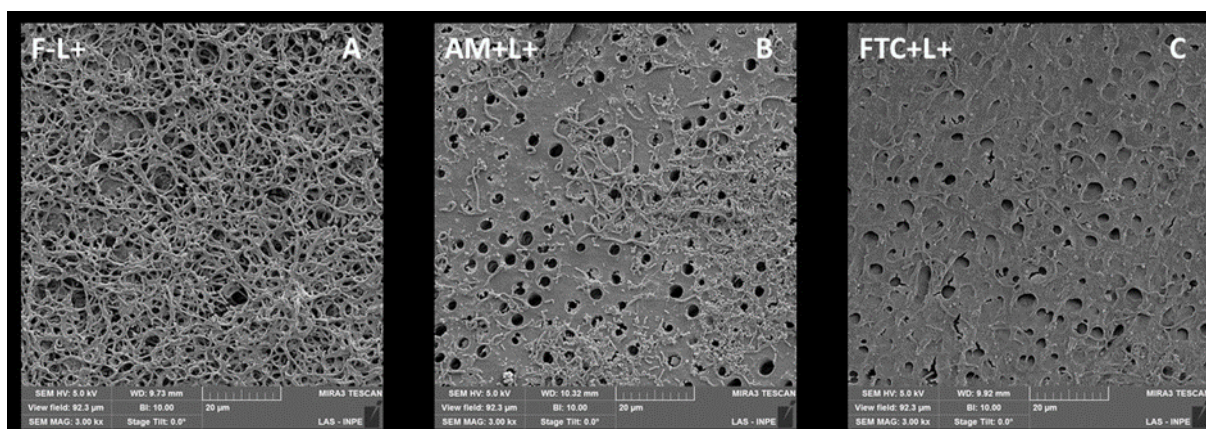
1.5.3 Análise dos biofilmes microcosmos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram realizadas imagens de MEV dos biofilmes microcosmos das 3 amostras. A partir de todas as amostras, foi possível observar a formação dos biofilmes microcosmos sobre a superfície de corpos-de-prova de dentina bovina. As imagens microscópicas demonstraram que a estrutura e complexidade dos biofilmes variaram entre elas, assim como entre os grupos experimentais estudados. Para obtenção das imagens foram padronizados 3 aumentos de observação (3, 5 e 10 Kx) em regiões diferentes dos corpos-de-prova.

1.5.3.1 Imagens de MEV do biofilme formado pela amostra 1

Começando pelo menor aumento (3Kx) das imagens de MEV da amostra 1, já é possível observar a diferença entre os grupos tratados e controles. O grupo controle irradiado (F-L+) apresentou um biofilme denso e compacto, com estrutura tridimensional complexa, formado por grandes quantidades de microrganismos coagregados e entrelaçados. Esses biofilmes recobriram toda a estrutura da dentina, impossibilitando assim a visualização da superfície dentinária. Por outro lado, os grupos tratados com TFDa (AM+L+ e FTC+L+) mostraram a presença de um biofilme menos denso e com menor quantidade de microrganismos, o que possibilitou a visualização da superfície da dentina e dos túbulos dentinários. Nesses grupos tratados, a TFDa com azul de metileno (AM+L+) ainda é possível observar a formação de algumas aglomerações microbianas, enquanto a TFDa com FTC (FTC+L+) é possível visualizar apenas a aderência de microrganismos isolados (figura 17).

Figura 17- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 3 Kx) da amostra 1

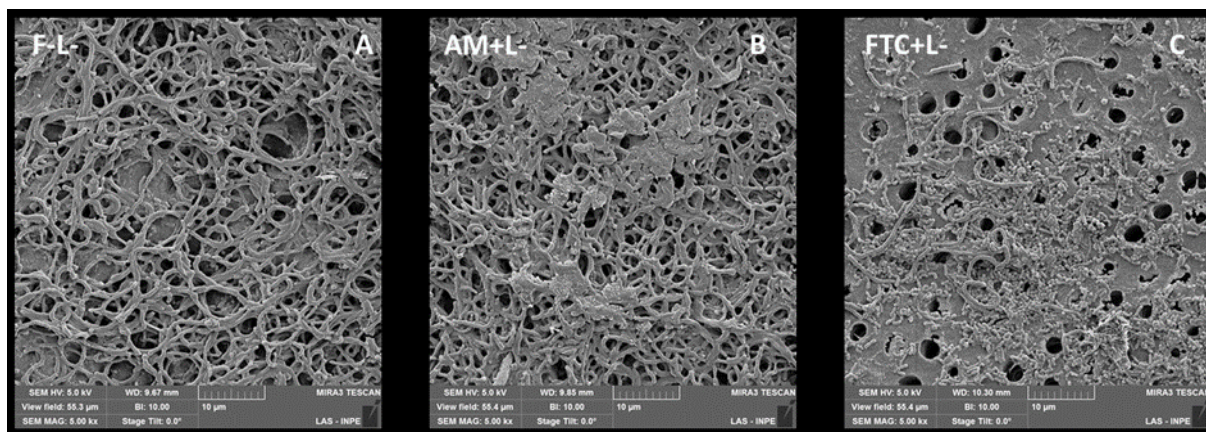


Legenda: Imagens no aumento de 3 Kx. A) Grupo controle com presença de luz (F-L+); B) Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); C) Grupo TFDa com Fotoencina® (FTC+L+).

Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação aos grupos não irradiados (F-L-, AM+L- e FTC+L-), em um aumento de 5 Kx, é possível observar que todos apresentaram um biofilme estruturado característico de biofilme microcosmo. Os grupos F-L- e AM+L- exibem um biofilme denso recobrindo toda a superfície da dentina, não sendo fácil observar diferenças na estrutura dos biofilmes entre esses dois grupos. Porém, o grupo FTC+L- demonstra um biofilme menos estruturado e sem recobrimento contínuo da superfície dentária, sugerindo uma citotoxicidade no escuro do FTC (figura 18).

Figura 18- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 5 Kx) da amostra 1

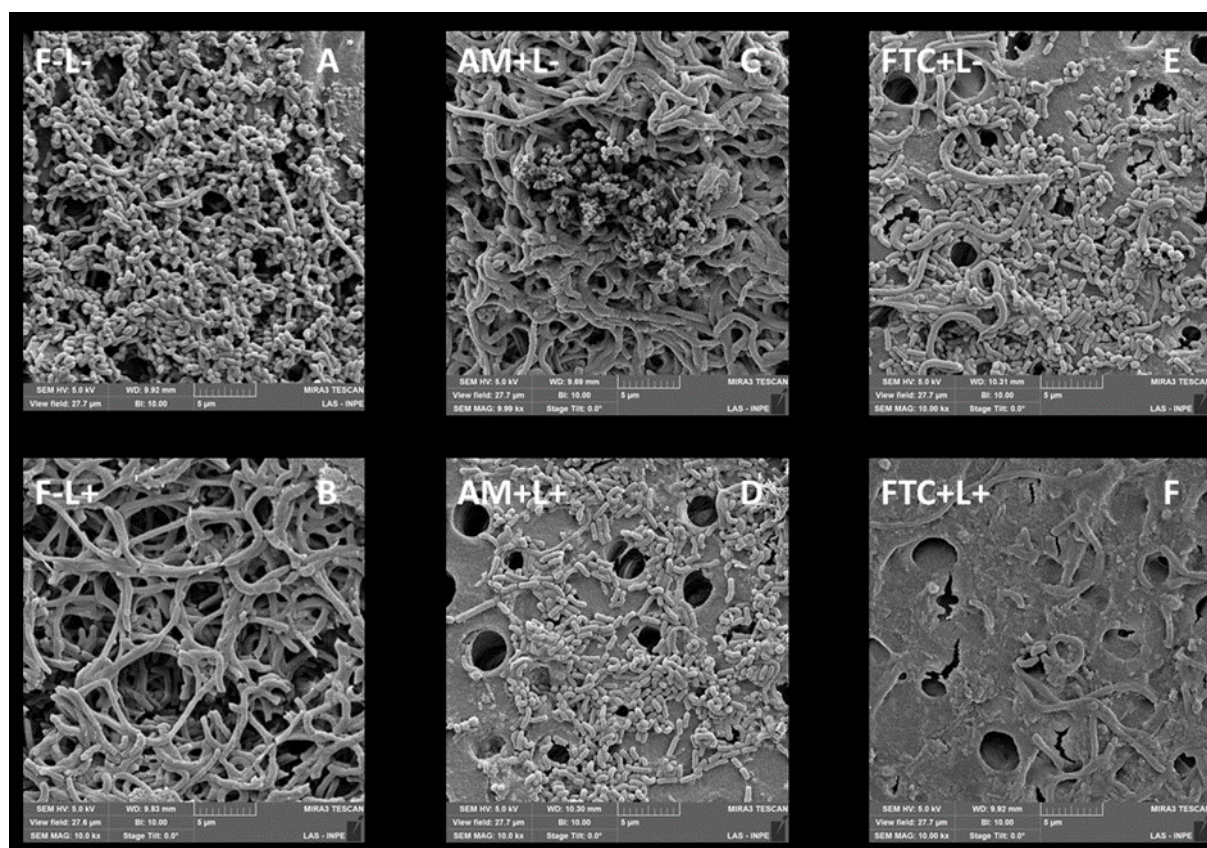


Legenda: Imagens com 5 Kx de aumento. A) Grupo controle na ausência de luz (F-L-); B) Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); C) Grupo Fotoentcine® na ausência de luz (FTC+L-);
Fonte: Elaborado pela autora.

Em análises em aumento maior 10 Kx, foi possível observar as diferenças morfológicas dos microrganismos, indicando a presença de células bacterianas em formas de cocos, cocobacilos, bastonetes com extremidades retas, bacilos fusiformes e bacilos filamentosos, evidenciando assim a diversidade microbiana de um biofilme microcosmo cariogênico. Nos grupos controles F-L-, F-L+ e AM+L-, todas essas morfologias estavam presentes formando uma estrutura tridimensional altamente complexa. No grupo FTC+L-, os biofilmes ainda se encontravam bem estruturados, entretanto, de uma forma reduzida quando comparado aos grupos já citados. Nos

grupos tratados com TFDa (AM+L+ e FTC+L+), a redução dos biofilmes tornou-se bastante evidente, principalmente no grupo da TFDa com FTC (FTC+L+) (figura 19).

Figura 19- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 10 Kx) da amostra 1



Legenda: Imagens com 10 Kx de aumento. A) Grupo controle na ausência de luz (F-L-); B) Grupo controle com presença de luz (F-L+); C) Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); D) Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); E) Grupo Fotoentecine® na ausência de luz (FTC+L-); F) Grupo TFDa com Fotoentecine® (FTC+L+).

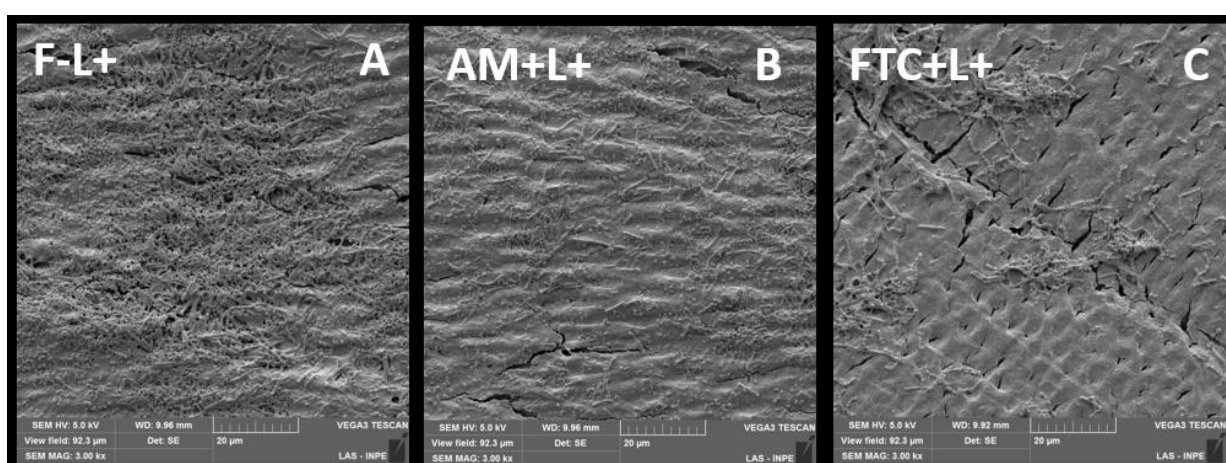
Fonte: Elaborado pela autora.

1.5.3.2 Imagens de MEV do biofilme formado pela amostra 2

Nas imagens obtidas da amostra 2 em menores aumentos 3 e 5 Kx, os grupos controles F-L- e F-L+ e o grupo AM+L- apresentam biofilme característico dos microcosmos, bem estruturado e com uma variedade de bactérias, sendo possível

observar bacilos e cocos. A TFDa com AM levou a redução do biofilme, demonstrando espaços livres de bactérias na superfície dentinária. Assim como na amostra 1, o grupo FTC+L- apresentou uma intensa desagregação dos microrganismos (Figuras 20 e 21).

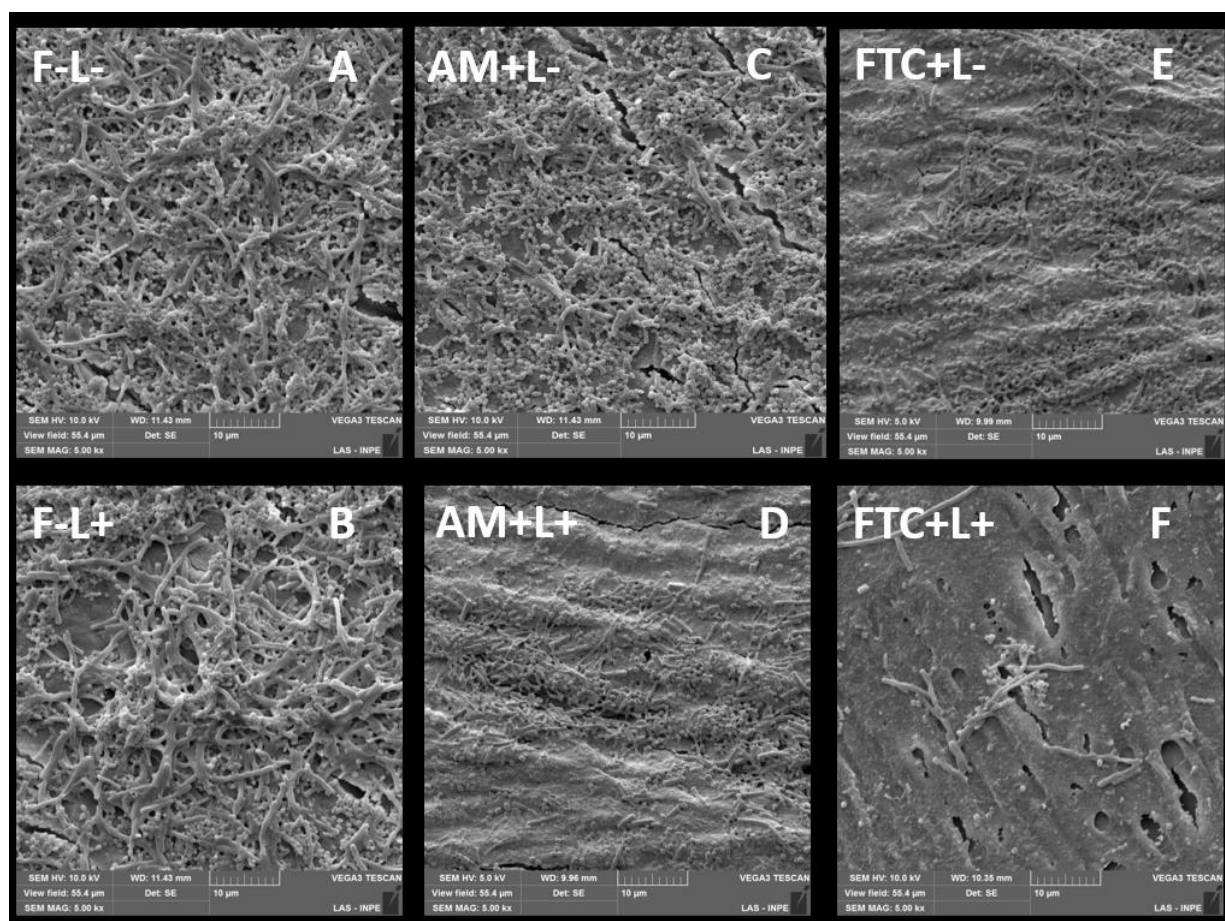
Figura 20- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 3 Kx) da amostra 2



Legenda: Imagens no aumento de 3 Kx. A) Grupo controle com presença de luz (F-L+); B) Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); C) Grupo TFDa com Fotoentcine® (FTC+L+).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 21- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 5 Kx) da amostra 2

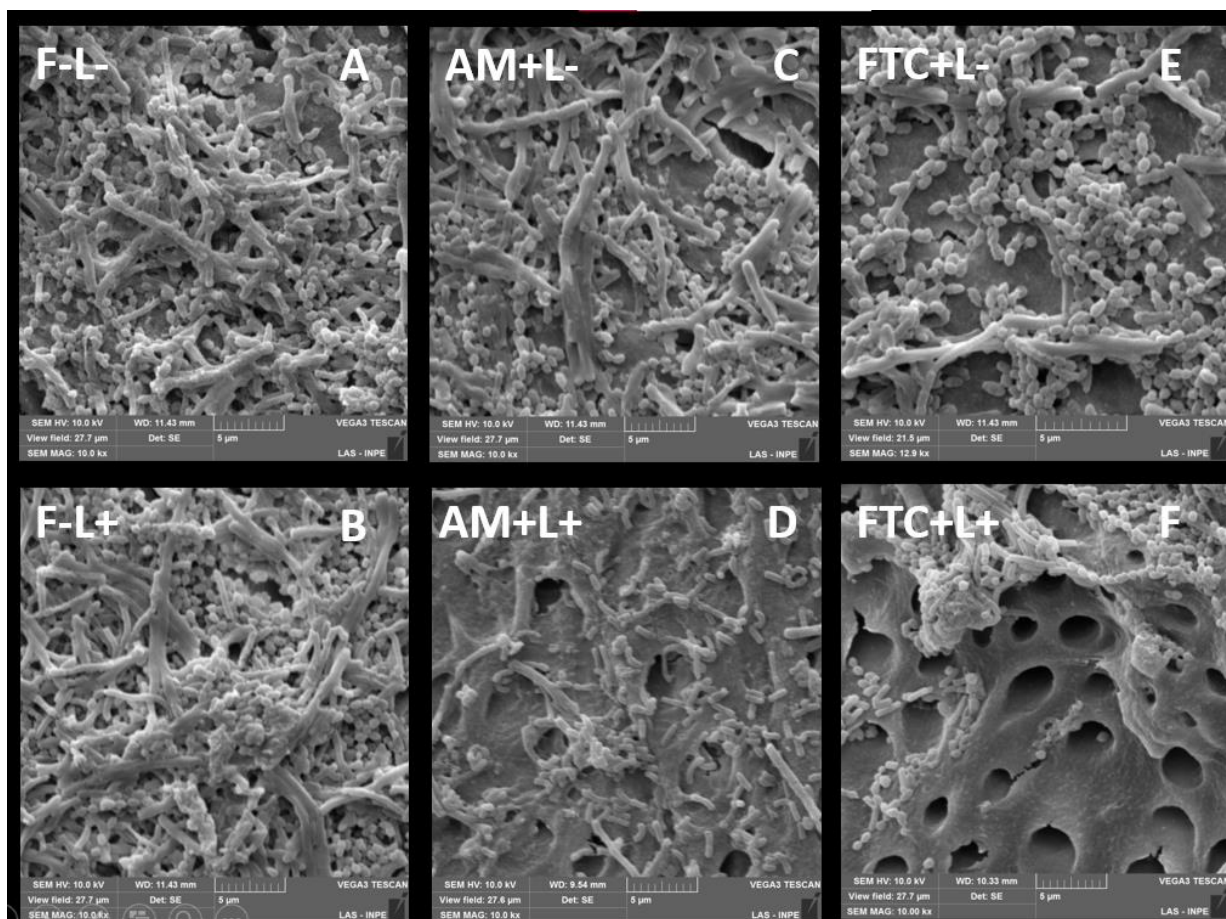


Legenda: Imagens com 5 Kx de aumento. A) Grupo controle na ausência de luz (F-L-); B) Grupo controle com presença de luz (F-L+); C) Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); D) Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); E) Grupo Fotoentencine® na ausência de luz (FTC+L-); F) Grupo TFDa com Fotoentencine® (FTC+L+).

Fonte: Elaborado pela autora.

As imagens em maiores aumentos (10 Kx) confirmaram os resultados obtidos, possibilitando identificar as formas bacterianas em maiores detalhes, observando-se assim cocos, cocobacilos, bastonetes com extremidades retas, bacilos fusiformes e bacilos filamentosos. Nos grupos tratados com TFDa a redução do biofilme expôs a superfície dentinária, exibindo os túbulos dentinários, que em algumas imagens apresentaram bactérias em seu interior (figura 22).

Figura 22- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 10 Kx) da amostra 2



Legenda: Imagens com 10 Kx de aumento. A) Grupo controle na ausência de luz (F-L-); B) Grupo controle com presença de luz (F-L+); C) Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); D) Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); E) Grupo Fotoenticine® na ausência de luz (FTC+L-); F) Grupo TFDa com Fotoenticine® (FTC+L+).

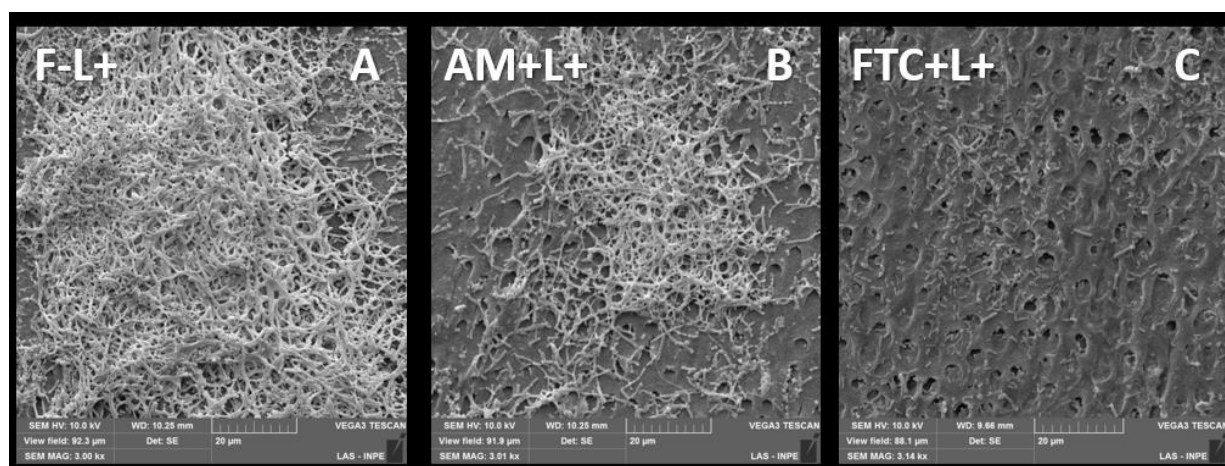
Fonte: Elaborado pela autora.

1.5.3.3 Imagens de MEV do biofilme formado pela amostra 3

As imagens obtidas da amostra 3, em menor aumento (3 Kx), demonstraram a formação de biofilmes microcosmos em diferentes proporções sobre a superfície da dentina em todos os grupos experimentais. O grupo controle (F-L+) apresentou uma massa densa com a presença de inúmeros microrganismos aglomerados, cobrindo o

corpo-de-prova quase por completo. Já nos grupos tratados com TFDa por AM ou FTC, é de fácil visualização a redução dessa estrutura do biofilme. O grupo com AM+L+ obteve uma redução na quantidade de microrganismos, mas ainda apresentou áreas de aglomerados em estrutura tridimensional. Já no grupo FTC+L+, a redução microbiana foi mais intensa, sendo possível observar microrganismos isolados (figura 23).

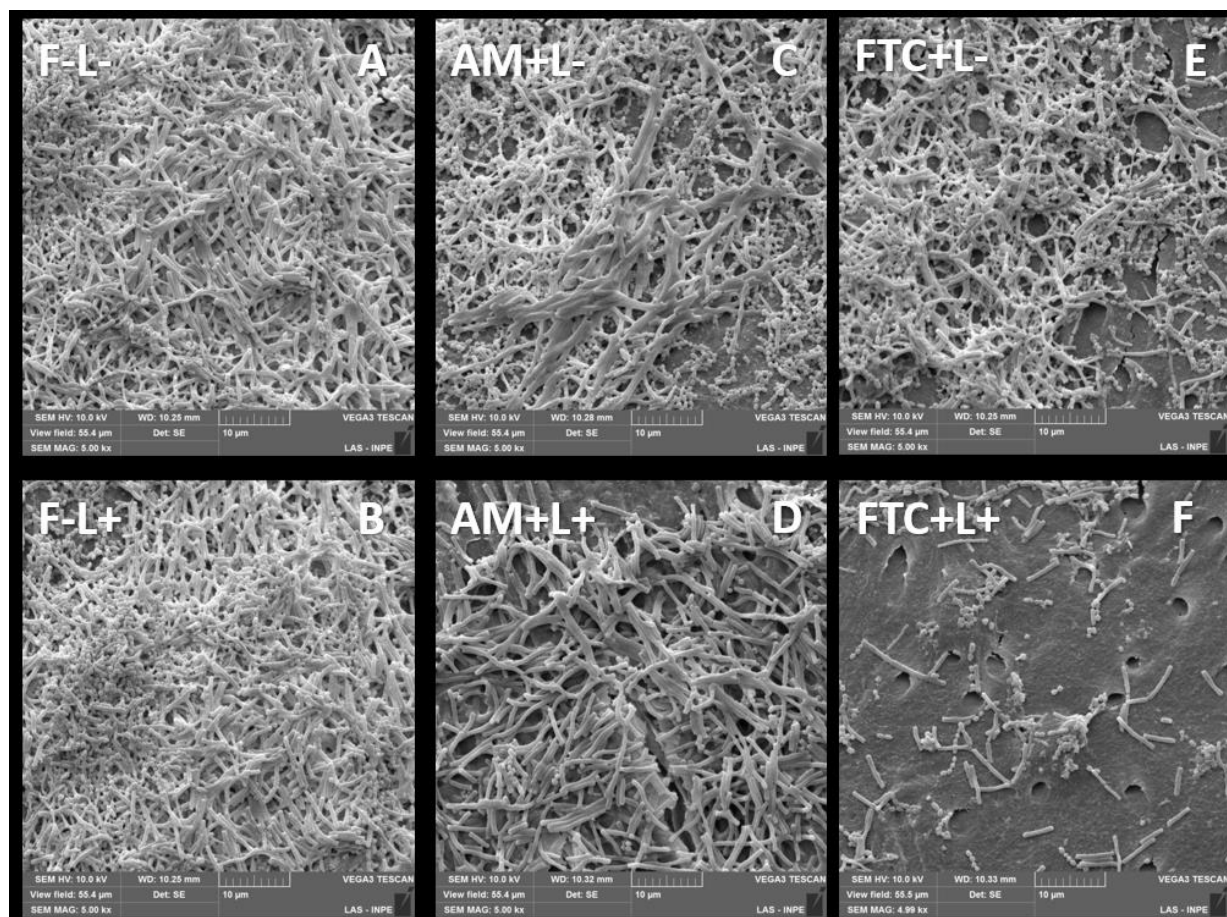
Figura 23- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 3 Kx) da amostra 3



Legenda: Imagens no aumento de 3Kx. A) Grupo controle com presença de luz (F-L+); B) Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); C) Grupo TFDa com Fotoentcine® (FTC+L+).
Fonte: Elaborado pela autora.

Nos aumentos de 5 e 10 Kx, além de observar as diferenças na massa dos biofilmes entre os grupos controles e tratados, foi possível verificar a morfologia das células microbianas. Os grupos F-L-, F-L+, AM+L- e FTC+L- apresentam um biofilme característico de microcosmo, com estrutura tridimensional e uma variedade de bactérias, sendo possível observar bacilos, cocos e a matriz extracelular. O grupo TFDa com AM+L- apresentou redução na biomassa, mas ainda manteve muitos microrganismos aglomerados. Interessantemente, o grupo FTC+L- apresentou um biofilme desagregado, com menor número de bactérias, que se encontraram isoladas, possibilitando a observação de cocos em cadeias e bacilos (Figuras 24 e 25).

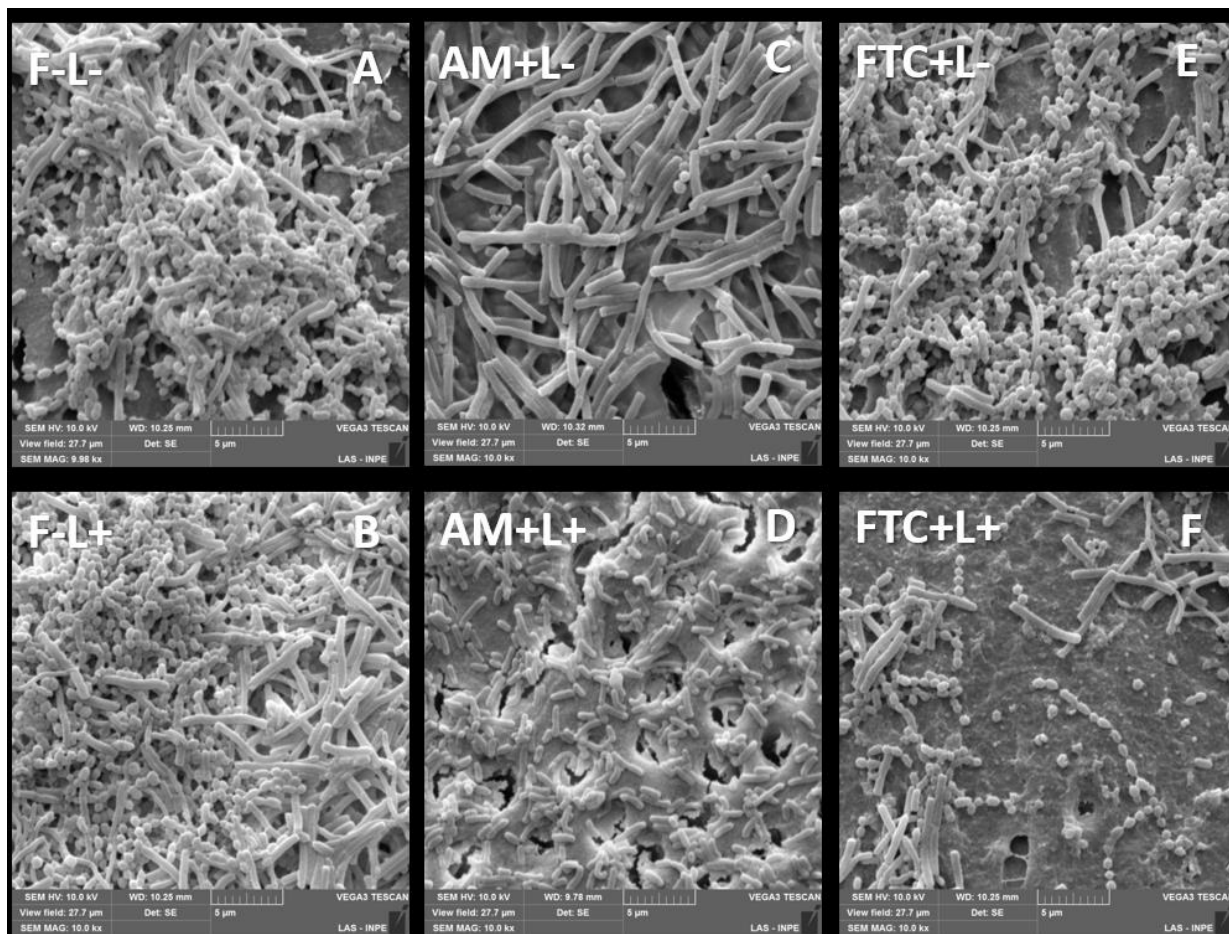
Figura 24- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 5 Kx) da amostra 3



Legenda: Imagens com 5 Kx de aumento. A) Grupo controle na ausência de luz (F-L-); B) Grupo controle com presença de luz (F-L+); C) Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); D) Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); E) Grupo Fotoenticine® na ausência de luz (FTC+L-); F) Grupo TFDa com Fotoenticine® (FTC+L+).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 25- Imagens de MEV da superfície de dentina com biofilme microcosmo (aumento de 10 Kx) da amostra 3



Legenda: Imagens com 10Kx de aumento. A) Grupo controle na ausência de luz (F-L-); B) Grupo controle com presença de luz (F-L+); C) Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); D) Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); E) Grupo Fotoentecine® na ausência de luz (FTC+L-); F) Grupo TFDa com Fotoentecine® (FTC+L+).

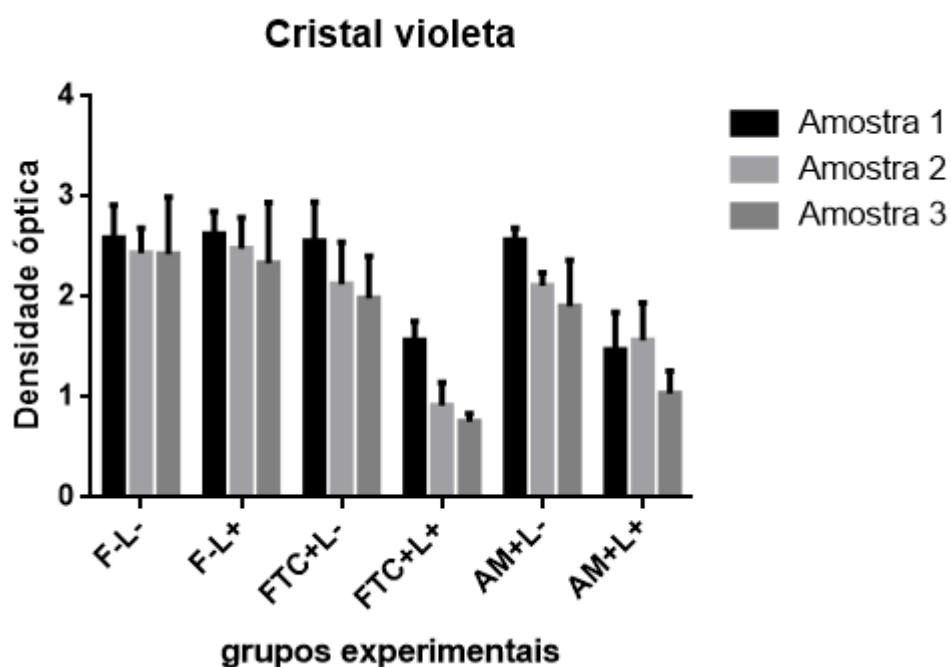
Fonte: Elaborado pela autora.

1.5.4 Quantificação da biomassa dos biofilmes microcosmos

Os resultados de biomassa obtidos nas amostras 1, 2 e 3 estão apresentados na figura 26. Nesse experimento, foi possível observar que os grupos F-L- e F-L+ apresentaram DO média de aproximadamente 2,5 entre todas as amostras. Nos grupos FTC+L- e AM+L- houve uma diminuição na média da biomassa, porém sem diferenças estatísticas em relação aos controles sem luz. Já no grupo TFDa com AM

(AM+L+), as amostras 1, 2 e 3 exibiram reduções de biomassa estatisticamente significante em relação aos controles, com DO de 1,0 a 1,5. O grupo FTC+L+ foi o que alcançou as reduções mais intensas de biomassa, demonstrando valores de DO até inferior a 1,0

Figura 26- Médias e desvio-padrão dos dados de densidade óptica obtidos na quantificação de biomassa dos biofilmes microcosmos



Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFDa com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Fotoenticine® na ausência de luz (FTC+L-); Grupo TFDa com Fotoenticine® (FTC+L+).

Fonte: Elaborado pela autora.

1.6 DISCUSSÃO

Biofilmes cariogênicos são ecossistemas ativos e complexos ricos em ácidos orgânicos (Mosaddad et al., 2019), que formam uma organização espacial e ordenada de comunidades microbianas nas superfícies dos dentes (Kim, Koo, 2020). As superfícies dentárias e o desenvolvimento de lesões de cárie proporcionam diferentes microambientes que permitem a colonização de diversos tipos de microrganismos, em quantidades e composições que variam de acordo com o estágio de cárie (Bhaumik et al., 2021; de Jesus et al., 2021). Além disso, vários fatores individuais podem influenciar a diversidade do biofilme, como a dieta do hospedeiro, hábitos de higiene bucal, morfologia dos dentes, composição da saliva e discrepâncias no sistema imunológico (Astasov-Frauenhoffer, Kulik, 2020). Considerando as variações nos biofilmes cariogênicos entre diferentes indivíduos, neste estudo coletamos amostras de três pacientes com cárie de dentina para formar biofilmes microcosmos *in vitro* e investigar o potencial da TFDa mediada por FTC ou AM para o controle da cárie dentária.

O biofilme microcosmo obtido do paciente 3 apresentou a maior contagem de microrganismos totais de 10,31 Log10, seguido pelos pacientes 2 de 8,09 Log10 e 1 de 7,21 Log10. Nos três pacientes analisados, os resultados foram superiores aos encontrados por Méndez et al. (2018), que obtiveram uma contagem microbiana total de aproximadamente 6,5 Log10 nos biofilmes microcosmos de cárie de dentina de crianças. Possivelmente, essas diferenças podem ser atribuídas à idade dos pacientes, pois em nosso estudo foram incluídos apenas adultos. No entanto, Rudney et al. (2012) não observaram diferenças na quantidade de microrganismos entre pacientes adultos e pediátricos quando biofilmes microcosmos foram formados a partir de saliva ou biofilme dental. A contagem microbiana total variou de 8 a 10 Log10, independentemente da fonte de inóculo. Embora a quantidade de microrganismos formados em biofilmes microcosmos possa variar dependendo do estudo na literatura, é evidente que o modelo de microcosmos é capaz de fornecer biofilmes densos que podem ser úteis para muitos estudos *in vitro*.

Neste estudo, os biofilmes microcosmos de todos os pacientes foram compostos por estreptococos, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos. Além

disso, os biofilmes microcosmos dos pacientes 2 e 3 também apresentaram leveduras. De fato, a cárie está intimamente associada a altas contagens de estreptococos (particularmente *Streptococcus mutans*), lactobacilos e leveduras do gênero *Candida* (Chen et al., 2021; Klinke et al., 2014). *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. exibem propriedades especiais que os tornam bactérias cariogênicas, incluindo a capacidade de aderir às superfícies dentárias, produzir uma grande quantidade de ácidos a partir de açúcares fermentáveis e sobreviver em um ambiente ácido (Meyer et al., 2021). *Candida* spp. têm sido frequentemente isoladas de lesões de cárie dentária e também apresentam propriedades acidogênicas e acidúricas. A presença de *C. albicans* em biofilmes cariogênicos parece aumentar a virulência de *S. mutans* e, conseqüentemente, a gravidade da cárie dentária (Alkhars et al., 2022; Zhang et al., 2020). Muitos outros gêneros bacterianos também têm sido associados aos biofilmes cariogênicos, como *Actionomyces*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Prevotella* (Chen et al., 2021; Meyer et al., 2021) e, mais recentemente, *Scardovia* (Chen et al., 2021). No entanto, o presente estudo limitou-se à identificação de estreptococos, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e leveduras nos biofilmes microcosmos. Portanto, estudos adicionais com foco em outros grupos microrganismos são necessários, principalmente estudos com análises moleculares.

A contagem de células viáveis nos biofilmes microcosmos dos pacientes variaram de 5 a 8 Log10 para estreptococos, 5 a 7 Log10 para estreptococos do grupo mutans, 7 a 8 Log10 para lactobacilos e 0 a 9 Log10 para leveduras. Resultados semelhantes foram encontrados por Vertuan et al. (2021), Frazão Câmara et al. (2021), e Méndez et al. (2018), que obtiveram contagens bacterianas entre 6 a 7 Log10 para estreptococos, 5 a 7 Log10 para estreptococos mutans e 6 a 7 Log10 para lactobacilos em biofilmes microcosmos de amostras orais. No entanto, esses autores não investigaram a presença de leveduras nos biofilmes microcosmos formados em seus estudos.

Quando a TFDa mediada por FTC foi aplicada nos biofilmes microcosmos, o número de células viáveis de todos os grupos microbianos estudados diminuiu significativamente. Em geral, os biofilmes microcosmos dos pacientes apresentaram reduções entre 2,1 a 2,8 Log10 para estreptococos, 6,0 Log10 até inibição total para estreptococos do grupo mutans, 1,8 a 3,2 Log10 para lactobacilos e 1,7 a 3,2 Log10 para leveduras após o tratamento da TFDa com FTC e de 1,2 a 2 Log10 para

contagem total, 0,7 a 0,9 Log₁₀ para estreptococos, 0,3 a 0,5 Log₁₀ para lactobacilos e 1,8 a 3,3 Log₁₀ para leveduras. Curiosamente, os efeitos antimicrobianos do FTC observados em nosso estudo foram mais pronunciados do que outros fotossensibilizadores citados na literatura. Utilizando biofilmes microcosmos de cárie de dentina de pacientes, alguns autores encontraram reduções microbianas de 1,5, 1,3 e 1,9 Log₁₀ com o fotossensibilizador azul de metileno (Méndez et al., 2018b) e 1,5, 1,7 e 2,3 Log₁₀ quando a curcumina foi usada como fotossensibilizador (Cusicanqui Méndez et al., 2018; Méndez et al., 2018b). Provavelmente, a maior atividade fotodinâmica do FTC possa estar relacionada às cargas positivas das clorinas, ação predominantemente via mecanismo tipo II com rendimentos quânticos de oxigênio singlete de 0,5 a 0,8 (Cieplik et al., 2018) e alta capacidade de penetração nas células bacterianas (Hu et al., 2018; Nie et al., 2020).

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a investigar os efeitos da TFDa mediada por FTC em biofilmes microcosmos. Até agora, este novo fotossensibilizador foi estudado em biofilmes monoespécies formados por *S. mutans*. Terra-Garcia et al., (2021) aplicaram a TFDa mediada por FTC em biofilmes de *S. mutans* formados pela cepa ATCC UA159 ou cepas clínicas isoladas de cárie dentária, verificando-se reduções microbianas entre 5 a 6 Log₁₀ para as cepas clínicas e inibição total para a cepa ATCC. Usando um fotossensibilizador similar, também derivado da clorina-e6, Nie et al. (2020) encontraram uma redução bacteriana de 5 a 6 Log₁₀ de *S. mutans* (UA159) em biofilmes monoespécies tratados com TFDa. De forma promissora, os resultados do presente estudo em modelos microcosmos demonstraram que *S. mutans* permaneceu suscetível à TFDa mediada por FTC mesmo quando associado à um biofilme polimicrobiano complexo.

Além de permanecerem suscetíveis à TFDa mediada por FTC em biofilmes microcosmos, os estreptococos do grupo mutans foram os microrganismos mais suscetíveis a esta terapia, sendo totalmente erradicados nos biofilmes microcosmos dos pacientes 1 e 2. Em relação ao biofilme do paciente 3, os estreptococos do grupo mutans foram também mais suscetíveis à TFDa do que lactobacilos e leveduras. Nós hipotetizamos que a maior suscetibilidade de *S. mutans* à TFDa mediada por FTC possa estar associada à taxa de crescimento, composição celular microbiana ou organização espacial dos biofilmes. As taxas de crescimento e os tempos de geração de células de *S. mutans* são mais elevados do que as células de *Lactobacillus* (Llena

et al., 2019), o que poderia influenciar a estrutura e permeabilidade da membrana celular. A composição celular de bactérias e leveduras também é considerada um fator importante na suscetibilidade à TFDa. Devido à presença de uma parede celular com camada porosa de peptidoglicano, bactérias Gram-positivas como *S. mutans* são mais suscetíveis à TFDa do que células fúngicas como *Candida* spp. que apresentam uma parede celular de quitina com uma camada menos porosa de beta-glucana (K. Sharma et al., 2012). Além disso, a organização espacial das células de *S. mutans* com outros microrganismos em biofilmes polimicrobianos pode afetar sua suscetibilidade a tratamentos antimicrobianos (Kim et al., 2020). Usando biofilmes mistos de duas espécies, estudos anteriores mostraram que *S. mutans* utilizam células de *Candida* como suporte para sua adesão (Barbosa et al., 2016; Metwalli et al., 2013). Segundo esses autores, as células de *S. mutans* têm afinidade pelas hifas de *C. albicans*, aparecendo posicionadas sobre a superfície das hifas em imagens de MEV (Barbosa et al., 2016; Metwalli et al., 2013). Este fato pode deixar o *S. mutans* mais exposto à ação da TFDa. No entanto, estudos futuros são necessários para desvendar a estrutura espacial dos biofilmes cariogênicos e desenvolver terapias voltadas para as infecções polimicrobianas (Kim, Koo, 2020).

A análise de MEV realizada no presente estudo confirmou a capacidade dos biofilmes microcosmos em reproduzir o microbioma da cárie dentária. Os biofilmes dos grupos não tratados apresentaram uma estrutura formada por comunidades heterogêneas e complexas embebidas em uma matriz extracelular. A TFDa mediada por ambos os fotossensibilizadores foi capaz de diminuir o número de células microbianas e desagregar a estrutura do biofilme, expondo a superfície dentinária, entretanto é notório a maior ação na eliminação e desagregação de biofilme tratado pela TFDa com FTC. Em um artigo de revisão, Hu et al. (2018) relataram que a TFDa não apenas mata as células bacterianas e fúngicas presentes nos biofilmes, mas as ROS geradas podem concomitantemente degradar a estrutura da matriz por atacar várias biomoléculas. Durante a reação de TFDa, a explosão de ROS causa dano oxidativo em múltiplos alvos, como aminoácidos, ácidos nucleicos, lipídios, etc. Portanto, a TFDa pode desagregar os biofilmes por uma ação sinérgica nas células microbianas e na matriz extracelular. Esses fatores tornam a TFDa uma abordagem atraente para infecções crônicas por biofilme (Hu et al., 2018).

Uma vez que a produção de ácidos orgânicos por células microbianas em biofilmes é um determinante do desenvolvimento de cárie dentária (Meyer et al., 2021), neste estudo também avaliamos a influência da TFDa na acidogenicidade dos biofilmes. A TFDa causou uma redução substancial na produção de ácido láctico para os três biofilmes analisados neste estudo, provavelmente como consequência da diminuição do número de bactérias acidogênicas. Por outro lado, Cusicanqui Méndez et al. (2018); e Méndez et al. (2018) não observaram reduções na produção de ácido láctico quando os biofilmes microcosmos de dentina foram tratados com TFDa mediada por azul de metileno (Méndez et al., 2018b) ou curcumina (Cusicanqui Méndez et al., 2018). Esses autores não encontraram correlações entre as reduções na contagem de UFC e a produção de ácido láctico, levantando a hipótese de que as células sobreviventes à TFDa poderiam ter aumentado sua capacidade de produção de ácido, o que resultou na manutenção da acidogenicidade dos biofilmes. No entanto, pensamos que as reduções bacterianas causadas pela TFDa encontrado por esses autores podem não ter sido suficientes para resultar em uma diminuição na produção de ácido porque as reduções de UFC foram menores do que as reduções microbianas encontradas em nosso estudo.

1.7 CONCLUSÃO

Concluimos que a TFDa foi eficaz contra biofilmes microcosmos, principalmente à TFDa mediada por FTC, que levou a reduções mais significativas nos microrganismos totais, estreptococos, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e leveduras do que o AM. Os estreptococos do grupo mutans foram os microrganismos mais suscetíveis à TFDa mediada por FTC, apresentando erradicação total após esta terapia. Além disso, a TFDa foi capaz de desagregar a estrutura do biofilme e reduzir a concentração de ácido láctico. Portanto, o FTC pode ser um fotossensibilizador promissor para TFDa direcionada ao controle de biofilmes cariogênicos e cárie dentária.

2 NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O CONTROLE DE BIOFILMES ORAIS: sistema carreador de antimicrobianos

2.1 INTRODUÇÃO

A candidose bucal é uma infecção fúngica causada por leveduras do gênero *Candida*, principalmente a espécie *C. albicans* (Nouraei et al., 2020; Quindós et al., 2019). O desenvolvimento da candidose depende dos fatores de virulência das espécies de *Candida* e do estado imunológico do hospedeiro. Entre os fatores de virulência de *C. albicans*, estão a presença de adesinas, formação de hifas, produção de enzimas histolíticas e formação de biofilmes. Quando em condições de debilidade do sistema imunológico, esse fungo oportunista multiplica-se, rapidamente, na cavidade bucal e consegue penetrar nos tecidos epiteliais, causando diferentes manifestações clínicas. Desse modo, a candidose bucal ocorre principalmente em indivíduos idosos e pacientes imunocomprometidos.

A falta ou ineficácia de tratamento das infecções por *Candida* pode trazer riscos ao paciente, como o desenvolvimento de infecções sistêmicas (Hellstein, Marek, 2019; Kadry et al., 2018). O uso indiscriminado de medicamentos nas últimas décadas, levou ao surgimento de cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos disponíveis, resultando em dificuldades no tratamento desses pacientes e em altas taxas de recorrência (Mundula et al., 2019). Além disso, esses fármacos apresentam vários efeitos colaterais ao paciente, principalmente nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, o que acaba trazendo sofrimento ao paciente e algumas vezes necessidade de interrupção da terapia. Diante desse cenário atual, descrita como era pós-antimicrobiana, o desenvolvimento de novos fármacos torna-se uma emergência de saúde pública e uma das prioridades da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Lee et al., 2021).

O Ester fenetil do ácido caféico, do inglês *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE), é um composto bioativo derivado da própolis, que tem se apresentado como um possível agente antifúngico. Estudos prévios demonstraram que esse fármaco possui atividade anti-inflamatória (Olgierd et al., 2021), antioxidante (Wan et al., 2019), antimicrobiana (Barros et al., 2021), imunomodulatória e cicatrizante (Zaitone et al.,

2019). Entretanto, do ponto de vista clínico, sua forma de aplicação ainda é limitada, sendo necessário o desenvolvimento de formulações eficazes para sua aplicação tópica sobre infecções localizadas, como a candidose bucal.

O uso de biomateriais como carreadores de fármacos mostra-se promissor para o tratamento de infecções localizadas, por possibilitar um sistema de liberação controlada de concentrações específicas do fármaco no local da infecção, minimizando a possibilidade do desenvolvimento de resistência microbiana, uma vez que evita a necessidade do uso sistêmico de medicamentos. Nas últimas décadas, diferentes tipos de biomateriais têm sido empregados no desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos (Shukla et al., 2012, 2011; Zhang et al., 2008), como o *gellan gum* que vem sendo utilizado para carrear fármacos voltados para infecções oftalmológicas, vaginal, nasal e oral.

Diante do exposto, o segundo estudo desse trabalho teve como objetivo investigar o *gellan gum* como possível biomaterial para carregamento do Ester fenetil do Ácido Caféico contra células e biofilmes de *C. albicans*.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 Candidose bucal e biofilmes de *Candida* spp.

Candida é um fungo comensal e oportunista, que quando em ambiente disbiótico pode causar doenças locais ou sistêmicas (Kadosh, 2019; Quindós et al., 2019). Candidose é o termo utilizado para as infecções por *Candida* spp.. Essa denominação é ampla e se refere a qualquer tipo de infecção causada por esse gênero (Pappas et al., 2018). Infecções por *Candida* são muito frequentes na cavidade bucal e, atualmente, também, estão entre as infecções mais prevalentes em pacientes em unidade de terapia intensiva (Mba, Nweze, 2020). O gênero *Candida* abrange mais de 200 espécies, mas somente algumas foram isoladas de infecções humanas (Hellstein, Marek, 2019). *C. albicans* é a espécie mais comumente encontrada em infecções bucais, mas outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis* também são encontradas na cavidade bucal (Silva et al., 2011).

A patogenicidade das espécies de *Candida* envolve diversos mecanismos e vias. Sua capacidade de transição morfológica de levedura comensal para forma invasiva de hifa é crucial no momento de driblar o sistema imune do hospedeiro (Kadosh, 2019). Essas duas formas são independentes e possuem funções distintas. As leveduras são responsáveis pela disseminação, já a penetração no tecido é função das hifas (Lim et al., 2012; Zhang et al., 2016). Para a adesão das células fúngicas ao tecido do hospedeiro é necessário que ocorra interações físico-químicas e liberação de exoenzimas, como fosfolipases e proteinases (Nouraei et al., 2020).

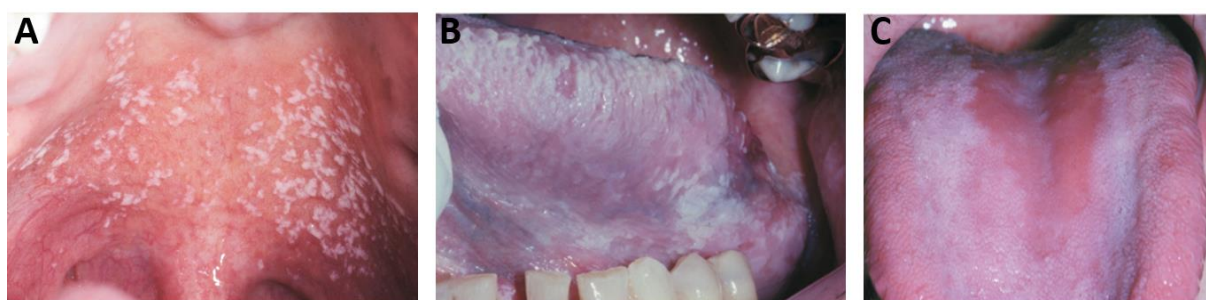
Candida spp. também formam biofilmes nos tecidos, duros e moles, do hospedeiro. A aderência pode ser considerada a primeira etapa da formação de biofilme, seguida por proliferação celular, que resulta em um biofilme estruturado, espesso e tridimensional, contendo leveduras, hifas, pseudo-hifas e uma matriz extracelular composta por carboidratos, proteínas e hexosaminas. O biofilme formado e estruturado oferece proteção para *Candida* contra o sistema imune do hospedeiro, podendo ser de 30 a 200 vezes mais resistentes aos medicamentos do que as células fúngicas planctônicas. A matriz extracelular tem papel importante nessa proteção, já

que atua como uma barreira física dificultando a penetração do fármaco, além de ajudar a manter a estrutura desse biofilme (Gulati, Nobile, 2015; Nobile, Johson, 2015; Tournu, Van Dijck, 2012).

As proteinases aspárticas secretadas (Sap) também são importantes na virulência de *Candida* spp., pois ao clivarem diferentes peptídeos do hospedeiro, podem levar o desequilíbrio da homeostase (Gow et al., 2017; Rapala-Kozik et al., 2018). As Saps possuem uma família de 10 genes (Sap 1 a Sap 10), cujas funções variam dependendo da necessidade fúngica, podendo facilitar a entrada de nutrientes na célula do fungo, bloquear componentes do sistema complemento e levar à liberação de peptídeos pró-inflamatórios. Além disso, as Saps são fundamentais na adesão das células fúngicas às células epiteliais do hospedeiro e na evasão às células de defesa, pois são capazes de degradar substratos importantes como: albumina, imunoglobulina e proteínas da pele (Khan et al., 2020; Zawrotniak et al., 2017).

Na cavidade bucal, a candidose é classificada de 4 formas clínicas: pseudomembranosa, eritematosa aguda, eritematosa crônica e hiperplásica (Lewis, Williams, 2017). Independentemente se a infecção é causada por *C. albicans* ou espécies não *albicans*, as manifestações clínicas das lesões são as mesmas (figura 27) (Vila et al., 2015). Todas essas formas de infecções são oportunistas e se desenvolvem por um desequilíbrio da resposta imune do hospedeiro, podendo ser manifestado mais de um tipo de lesão ao mesmo tempo (Sultan et al., 2018). Baixa salivação, uso de prótese de forma inadequada, uso de medicações como corticoides e antibióticos, utilização de tabaco e alterações sistêmicas, são fatores cruciais para o favorecimento da candidose bucal (Hellstein, Marek, 2019).

Figura 27- Manifestações bucais da candidose



Legenda: A) candidose pseudomembranosa; B) candidose hiperplásica; C) candidose eritematosa

Fonte: Adaptado do livro Patologia Oral e Maxilofacial de Neville Damm Allen Chi

Os fármacos antifúngicos são os medicamentos de escolha para tratamento das infecções por *Candida*, entretanto, diferente dos antibióticos, que tem ampla variedade, existem apenas três classes de antifúngicos para tratamento da candidose: os polienos, os azóis e as equinocandinas (Khan et al., 2020). Por um uso em abundância, a resistência a esses medicamentos é um problema de grande relevância. Essa escassez de classes antifúngicas se dá pela falta de alvos específicos nas células fúngicas, já que são eucarióticas assim como as células humanas. Desse modo, atualmente as pesquisas se empenham no desenvolvimento de novos antifúngicos, que tenham como alvo os fatores de virulência de *Candida spp.* (Romo et al., 2017).

2.2.2 Ester fenetil do ácido caféico e gellan gum

A diversidade de compostos farmacologicamente ativos que a natureza apresenta é imensa, estima-se que, aproximadamente 25% dos medicamentos modernos são, direta ou indiretamente, derivados de plantas (Pompilho et al., 2013). A ideia de utilizar plantas medicinais para tratamento de enfermidades não é inovadora, existem relatos desse tipo de conduta à milênios. Entretanto, com o avanço das pesquisas, está sendo possível melhorar as técnicas de síntese e aplicação desses compostos (Lv et al., 2021).

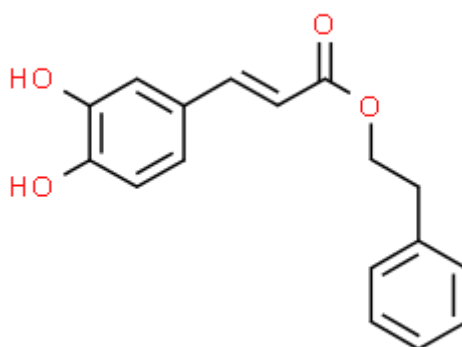
A própolis é um produto vegetal, coletado das plantas e processado pelas abelhas, apesar de sua variação de acordo com a zona geográfica produzida, sua composição é basicamente uma mistura de resina com óleos essenciais, pólen e outros componentes orgânicos. Suas ações farmacológicas são muito utilizadas na medicina popular (Ara et al., 2006), mas seu uso integral deve ser feito com cautela, pois pode acarretar em algumas reações adversas, como problemas estomacais. Assim, estudos têm sido realizados para avaliar a ação dos compostos da própolis, e até o momento, mais de 300 foram identificados, sendo os compostos fenólicos os de maior abundância (Kurek-Górecka et al., 2014).

Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais abundantes das plantas, estando presentes em alimentos como: frutas, vegetais, azeitonas e

chocolate, ou seja, estão presentes diariamente na dieta humana (Dai, Mumper, 2010). Esses compostos apresentam uma variedade estrutural e são divididos em: flavonoides, taninos e ácidos fenólicos, esse por sua vez, constituem um terço do total fenólico consumido em uma dieta. O ácido cafeico é proveniente dos ácidos fenólicos, e em sua maioria se apresenta na forma de éster (Rahman et al., 2022).

O CAPE, foi identificado como um componente da própolis em 1987 e hoje é considerado um dos ingredientes bioativos mais promissores da própolis (Olgierd et al., 2021). Sua fórmula molecular é $C_{17}H_{16}O_4$ (figura 28) e a presença do grupo hidroxila no anel catecol é responsável por muitas das suas atividades biológicas (Murtaza et al., 2014; Olgierd et al., 2021). A literatura mostra que a atividade antifúngica do CAPE contra *C. albicans* ocorre com concentrações inibitórias mínimas de 32 a 64 $\mu\text{g/mL}$ (Barros et al., 2021). O CAPE comercial se apresenta como um pó cristalino e insolúvel em água, mas solúvel em etanol, metanol e dimetilsulfóxido (DMSO), nos quais sua solubilidade é em média 10 mg/mL . O CAPE apresenta como vantagens: proteção da ação de radicais livres e atividades imunomodulatória, anti-inflamatória e antitumoral (Coleman et al., 2017; Tolba et al., 2016).

Figura 28- Fórmula molecular do ester fenetil do ácido cafeico (CAPE)



Fonte Adaptado do CHemSpider Search and share chemistry.

Apesar dos ótimos indícios da ação antifúngica do CAPE, sua administração via oral para possível tratamento da candidose bucal é questionável, pois sua

liberação, nesse caso, é sistêmica e imediata. Por isso, torna-se importante o desenvolvimento de sistemas carreadores de liberação lenta e localizada do CAPE. Nesse sentido, os hidrogéis são promissores, pois possuem um conjunto de características que os tornam excelentes biomateriais para liberação controlada de fármacos, sendo já explorados na dermatologia, cardiologia e oftalmologia (Mohamed et al., 2018).

Dentre a classe dos hidrogéis, podemos destacar o *gellan gum*, que é um biopolímero natural produzido por membros do gênero bacteriano *Sphingomonas*, sendo formado por uma cadeia polimérica de unidades repetitivas de tetrasacarídeos de dois resíduos de D-glucose, um resíduo de L-rhamnose e um resíduo de D-glucuronato (Leone et al., 2020), formando redes tridimensionais altamente hidratadas, o que favorece o carreamento de fármacos (Zhang et al., 2008). Apesar da facilidade do seu uso em formulações terapêuticas, o processo de encapsulamento do fármaco é minucioso, e mudanças no aquecimento, resfriamento ou valores de pH podem alterar suas cadeias poliméricas, gerando produtos não desejáveis (Maiti et al., 2011; Zhao and Wang, 2019).

O *gellan gum* é um biopolímero de alta adaptabilidade, pois sua forma pode variar de fluída/viscosa até sólida/consistente como uma goma de mascar, além disso possui estabilidade em diferentes valores de pH (3,5 a 8). Essas características favorecem sua aplicação clínica, já que cada local de tratamento exige uma formulação específica. O que determina a consistência do *gellan gum* é a porcentagem do biopolímero na formulação, quanto maior, mais consistente o produto final será (Osmalek et al., 2014). A liberação do fármaco incorporado em sua estrutura está diretamente relacionada a sua consistência. Em formulações mais fluídas, a liberação tende a ser mais rápida e imediata, devido a sua trama tridimensional mais frouxa. Entretanto, formulações mais consistentes, que possuem a estrutura tridimensional mais rígida, levam a uma liberação lenta e contínua do produto (Chang et al., 2012; Osmalek et al., 2014). A liberação do fármaco pelo *gellan gum* não é influenciada por meios aquosos, pois esse hidrogel é capaz de absorver água e/ou fluídos biológicos sem se dissolver, e essa capacidade se mantém constante independentemente do pH do meio (Leone et al., 2020; Zhu et al., 2019).

Diferente dos biopolímeros sintéticos, o *gellan gum* é ecológico e sustentável, e por isso está sendo amplamente estudado e utilizado. O uso comercial do *gellan*

gum é aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo muito utilizado como aditivo alimentar (Maiti et al., 2011). Atualmente, a maior aplicação do *gellan gum* é feita pela indústria alimentícia, mas sua utilização também tem ganhado destaque na indústria biomédica (Bonifacio et al., 2018; Osmalek et al., 2014). Devido ao *gellan gum* não apresentar toxicidade ao ser humano, oferecer boa proteção ao fármaco encapsulado, possibilitar o preparo de formulações em diferentes consistências, exibir facilidade de administração e ter baixo custo (de Alvarenga et al., 2020; Osmalek et al., 2014), consideramos o *gellan gum* uma opção promissora como carreador do CAPE para uso terapêutico na cavidade bucal.

2.3 PROPOSIÇÃO

2.3.1 Objetivos gerais

Avaliar a eficácia do *gellan gum* como carreador do antifúngico ester fenetil do ácido caféico (CAPE) contra *C. albicans*.

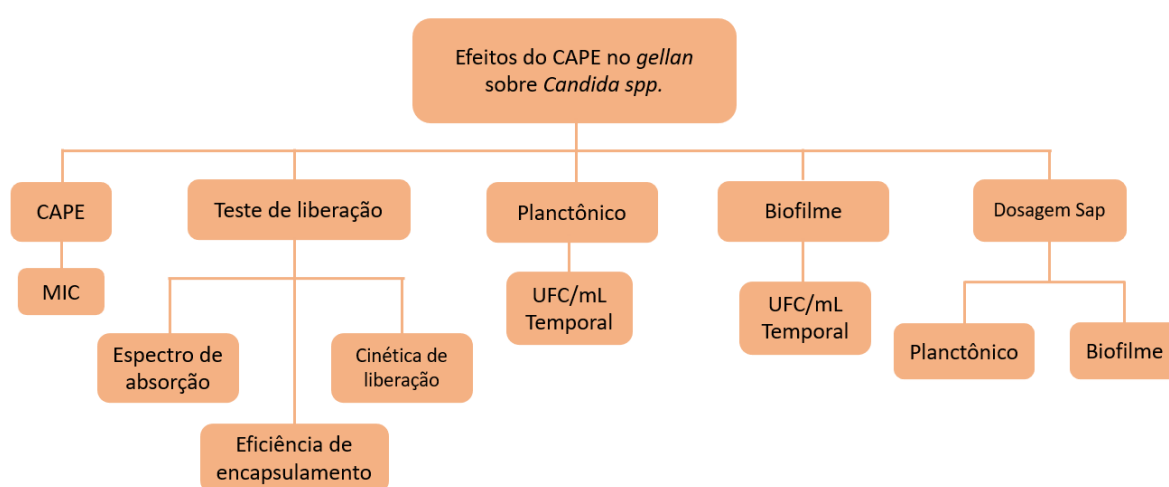
2.3.2 Objetivos específicos

- a) incorporar o CAPE em diferentes formulações do *gellan gum*
- b) avaliar a liberação do CAPE nas diferentes formulações do *gellan gum*
- c) avaliar a ação antifúngica do CAPE incorporado ao *gellan gum* em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*
- d) investigar os efeitos do CAPE incorporado ao *gellan gum* sobre a atividade proteolítica de *C. albicans*

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para melhor entendimento das etapas desse estudo, a figura 29 representa um fluxograma com todos os testes realizados.

Figura 29- Fluxograma do estudo dos efeitos do *gellan* gum como carreador de CAPE sobre *C. albicans*



Legenda: Fluxograma das etapas experimentais do segundo estudo.

Fonte: Elaborado pela autora.

2.4.1 Ativação do microrganismo

Para realização deste estudo, foram utilizadas duas cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 18804 e SC5314) e uma cepa clínica de *C. albicans* (70) que é resistente ao fluconazol (isolada de candidose orofaríngea de paciente HIV positivo). As cepas estão mantidas no freezer -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/Unesp.

Para ativação, esses microrganismos foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (humedia Laboratories, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C. Após esse período,

colônias isoladas foram transferidas para caldo YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose) e incubadas por 24 h a 37°C. Posteriormente, o crescimento foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em PBS. Esse processo foi repetido duas vezes, então o número de células viáveis foi padronizado em câmara de Newbauer.

2.4.2 Preparo do *gellan gum* e do CAPE

Para o preparo do CAPE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) inicialmente o pó foi pesado e diluído em DMSO para uma solução mãe de 10.000 µg/mL, então a partir dessa solução foram feitas as demais diluições necessárias em água destilada.

O *gellan gum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), inicialmente, foi preparado em diferentes concentrações (0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1% p/v). Para isso, o pó de *gellan gum* foi adicionado em 45 mL de água destilada e agitado a 85-90°C até a dissolução completa, depois foi levado a autoclave para sua esterilização. Após a esterilização, quando a temperatura do *gellan* foi reduzida a 36°C, 2 mL de CAPE (em concentrações pré-determinadas) foi adicionado, e por fim 3 mL de CaCl₂ (1 mM) foi adicionado para completar sua geleificação.

2.4.3 Teste de concentração inibitória mínima

As cepas foram submetidas aos ensaios de microdiluição em caldo para determinar os valores de concentração inibitória mínima, do inglês *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC), para o CAPE incorporado ao *gellan gum* e para o CAPE livre, seguindo a metodologia de Barros et al., (2021), com algumas modificações. O CAPE incorporado em *gellan gum* ou isolado foram diluídos em RPMI sucessivamente em placas de 96 poços, então foram acrescentadas alíquotas de suspensões de *C. albicans*, previamente, padronizadas em 10³ células/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 48h, então foi feita a leitura em espectrofotômetro (Epoch, Biotek Instruments, Winooski, EUA).

2.4.4 Espectroscopia de absorção UV-Vis do CAPE e *gellan gum*

Os espectros de absorção na região do Ultravioleta-Visível do CAPE, do *gellan gum* e da sua associação foram obtidos para construção das curvas de calibração e para a determinação da concentração do CAPE encapsulado no *gellan gum*. Para esse teste, o CAPE foi diluído em várias concentrações, de 512 a 0,0065 µg/mL, e então 100 µL de cada diluição foi colocado em placas de 96 poços específicas para leitura em UV (Corning, Nova York, EUA). Nessa parte do experimento, foi considerado um n=5. A placa foi levada para leitura em espectrofotômetro UV (Epoch, Biotek Instruments, Winooski, EUA) na programação *Scanning absorption* para fazer a varredura de 240 a 700 nm, com espaçamento de 1 nm. Esse mesmo teste foi realizado com o *gellan gum* isolado e com o *gellan gum* associado ao CAPE, para se confirmar o comprimento de onda do pico de absorção do CAPE.

2.4.5 Eficiência de encapsulamento

Uma vez que o *gellan gum* e o CAPE não absorvem na mesma região, foi possível identificar e determinar a absorbância deles no comprimento de onda de absorção máxima para a construção da curva de calibração. Para isso, novamente 100 µL de cada diluição do CAPE foram colocados em placas de 96 poços específicas para leitura em UV. A placa foi levada para leitura em espectrofotômetro UV (Epoch, Biotek Instruments, Winooski, EUA), no comprimento de onda encontrado no teste anterior, assim foi obtida a equação da reta.

2.4.6 Cinética de liberação

Por fim, foi realizado o teste de liberação do CAPE incorporado ao *gellan gum*. Para isso, foram adicionados 9 mL de PBS em tubos Falcon de 50 mL e sacos de biopsia de 0,2 mm de diâmetro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) contendo 1

mL da formulação do CAPE em *gellan gum*. Esses tubos Falcon foram levados a agitação de 130 rpm. Então, alíquotas de 100 µL foram removidas e colocadas em placa UV de 96 poços (n=5) e levadas para leitura em espectrofotômetro. Após a retirada dessas alíquotas para análise, foi adicionado o mesmo volume de água, para ser mantido um volume fixo.

2.4.7 Teste em culturas planctônicas de *C. albicans*

Inicialmente, as células de *Candida* foram padronizando em 10^3 células/mL em caldo YNB com 0.2% de albumina, então em uma placa de 24 poços foi acrescentado 1 mL da suspensão padronizada e 1 mL de PBS, CAPE ou a formulação, de acordo com cada grupo. As placas foram levadas em agitação de 90 rpm a 37°C. Alíquotas foram retiradas a cada 2 h em um período de 12 h, sendo diluídas e semeadas em placas de ágar Sabouraud. Após incubação a 37°C por 24 h, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

2.4.8 Formação do biofilme de *C. albicans*

O biofilme foi crescido em placas de 24 poços. Para isso, 1 mL de suspensão de *C. albicans* previamente padronizada em 10^7 células/mL foi adicionado nos poços. As placas foram incubadas a 37°C em 90 rpm agitação por 90 min, para promover a adesão inicial. Após esse período, a suspensão foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com PBS para remover as células fracamente aderidas. Então, foi adicionado 1 mL de YNB acrescido com 0,2% de albumina, e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após esse período, foi aspirado o sobrenadante e os poços foram lavados novamente com PBS, seguido pelo tratamento com PBS, CAPE ou as formulações de CAPE em *gellan gum*. O tratamento ficou em contato com os biofilmes por 2 ou 12 h. A seguir, o sobrenadante foi aspirado e os poços lavados duas vezes com PBS e então foi realizado o desprendimento do biofilme por meio de um

homogeneizador ultra-sônico com potência de 25 W por 30 s. A partir da solução obtida, foi realizado diluições seriadas, das quais alíquotas de 10 µL foram semeadas em triplicata nas placas de ágar Sabouraud Dextrose e incubadas em estufa a 37°C por 48 h. Após esse período, as colônias de *Candida* foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

2.4.9 Avaliação da atividade proteolítica (Sap)

Para a dosagem da Sap, 100 µL do sobrenadante da cultura planctônica ou do biofilme foi aspirado e transferido para 400 µL de tampão citrato de sódio 0,1 M contendo 1% de BSA. As amostras foram, então, incubadas por 1 h a 37°C. A atividade proteolítica foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético a 5% (TCA) e incubação por 1 h a 4°C. A seguir, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante colocado em placas de 96 poços UV-transparentes. Foi realizada a medida da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 280 nm (BioTek, Winooski, EUA). O grupo controle negativo foi feito pela adição de ácido tricloroacético a 5% (TCA) já na primeira reação.

2.4.10 Análise estatística

Os resultados obtidos na contagem de células viáveis (UFC/mL) e na atividade proteolítica foram analisados por ANOVA e teste de Tukey usando o programa GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) com nível de significância de 5%.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

No teste de determinação do MIC em cepas de *C. albicans* com o CAPE livre, foi encontrado o valor de 32 a 64 µg/mL. Quando incorporamos o CAPE em diferentes concentrações do *gellan gum* (0,6 a 1%), os valores de MIC variaram de 64 a >512 µg de acordo com as formulações (tabela 1).

Tabela 1- Dados de MIC para o CAPE livre e CAPE em *gellan gum* encontrados nas diferentes cepas de *C. albicans*. As formulações de CAPE foram preparadas em concentrações de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 e 1% de *gellan*

Grupo	18804	5314	70
CAPE livre	32 µg	64 µg	32 µg
Gellan 0,6%+CAPE	64 µg	512 µg	128 µg
Gellan 0,7%+CAPE	128 µg	512 µg	128 µg
Gellan 0,8%+CAPE	256 µg	>512 µg	256 µg
Gellan 0,9%+CAPE	256 µg	>512 µg	256 µg
Gellan 1%+CAPE	512 µg	>512 µg	512 µg

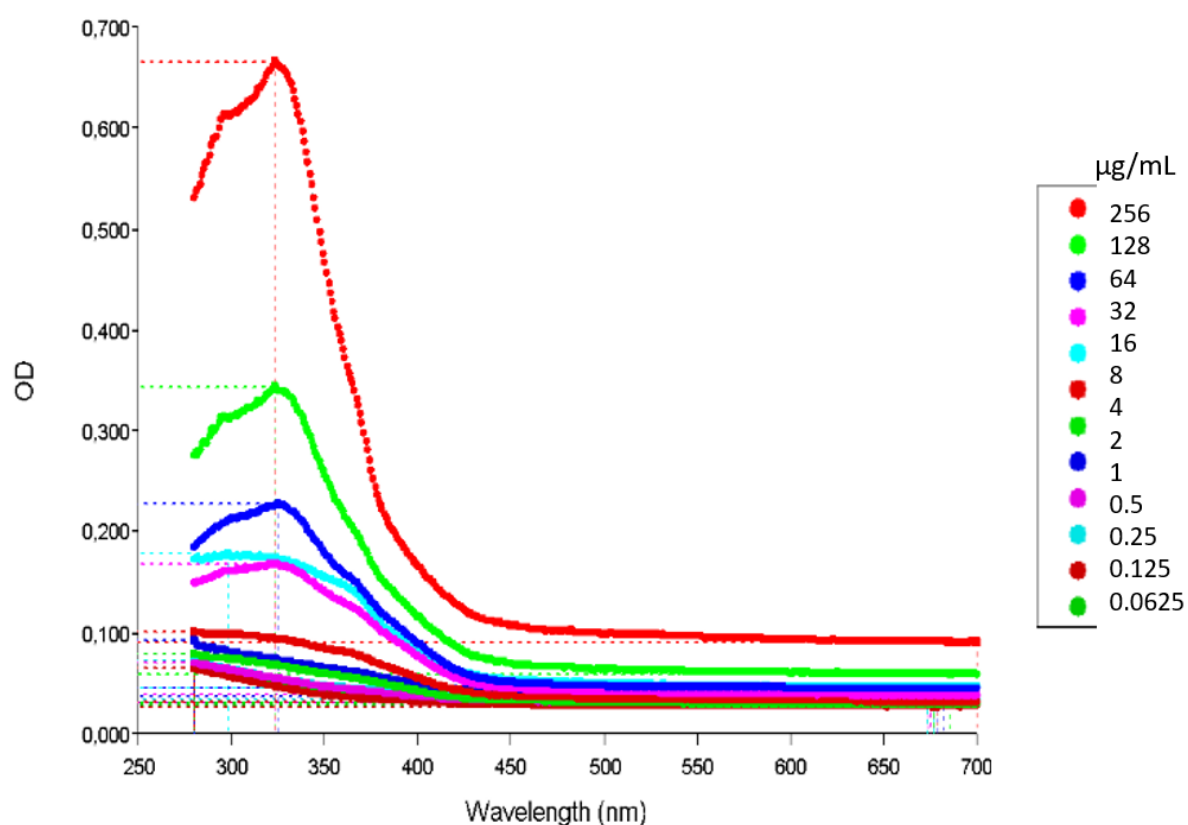
Fonte: Elaborado pela autora.

2.5.2 Espectro de absorção do CAPE em *gellan gum*

A fim de determinar o espectro de absorção do CAPE, foi feito a varredura em espectrofotômetro em diferentes comprimentos de onda (240 a 700 nm) em várias concentrações de CAPE. Como resultado, podemos observar na figura 30, que independente da concentração do CAPE, a banda de absorção foi sempre de 325 nm. Então, após esse achado, passamos a associar o CAPE às diferentes concentrações do *gellan gum*. A figura 31 mostra que o pico de absorção do *gellan gum* sozinho foi

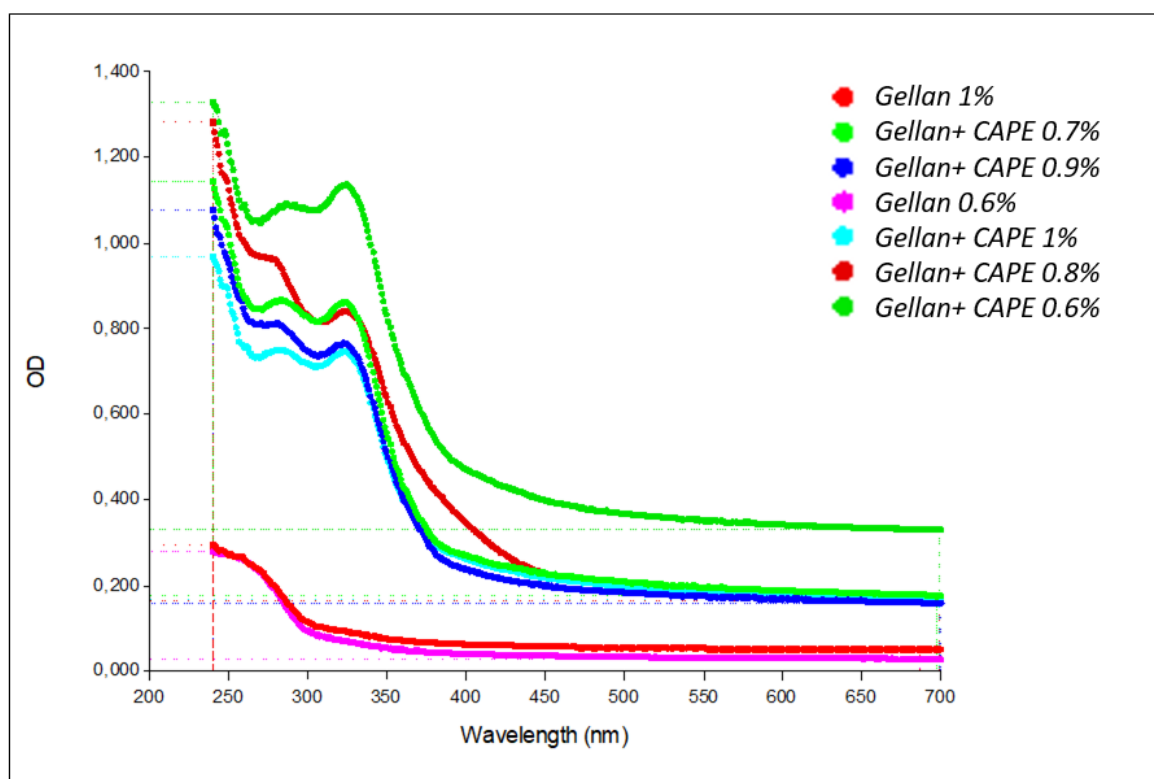
na região de 240 nm, e que os grupos com associações de gellan e CAPE apresentaram dois picos, um em 240 nm e outro em 325 nm. A partir dessas informações, foi possível fazer a curva padrão. Esse teste mostrou que os resultados obtidos foram diretamente proporcionais à concentração do fármaco, onde o coeficiente de correlação linear obtido a partir da curva foi $r=0,9937$ (figura 33)

Figura 30- Espectro de absorção Uv-vis do CAPE

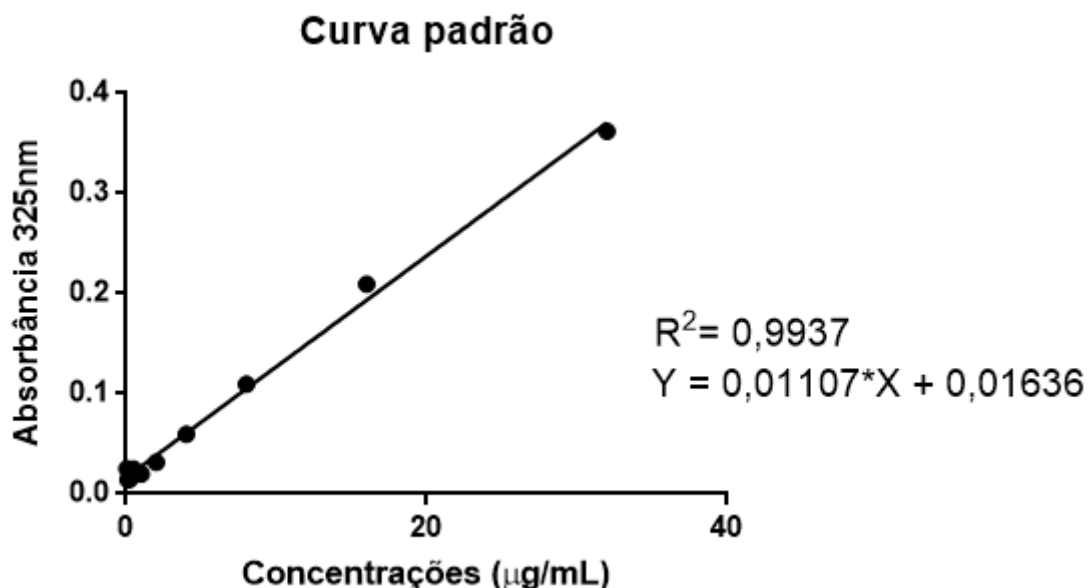


Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 31- Espectro de absorção Uv-vis do CAPE associado ao *gellan gum*



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 32- Curva padrão do *gellan gum*

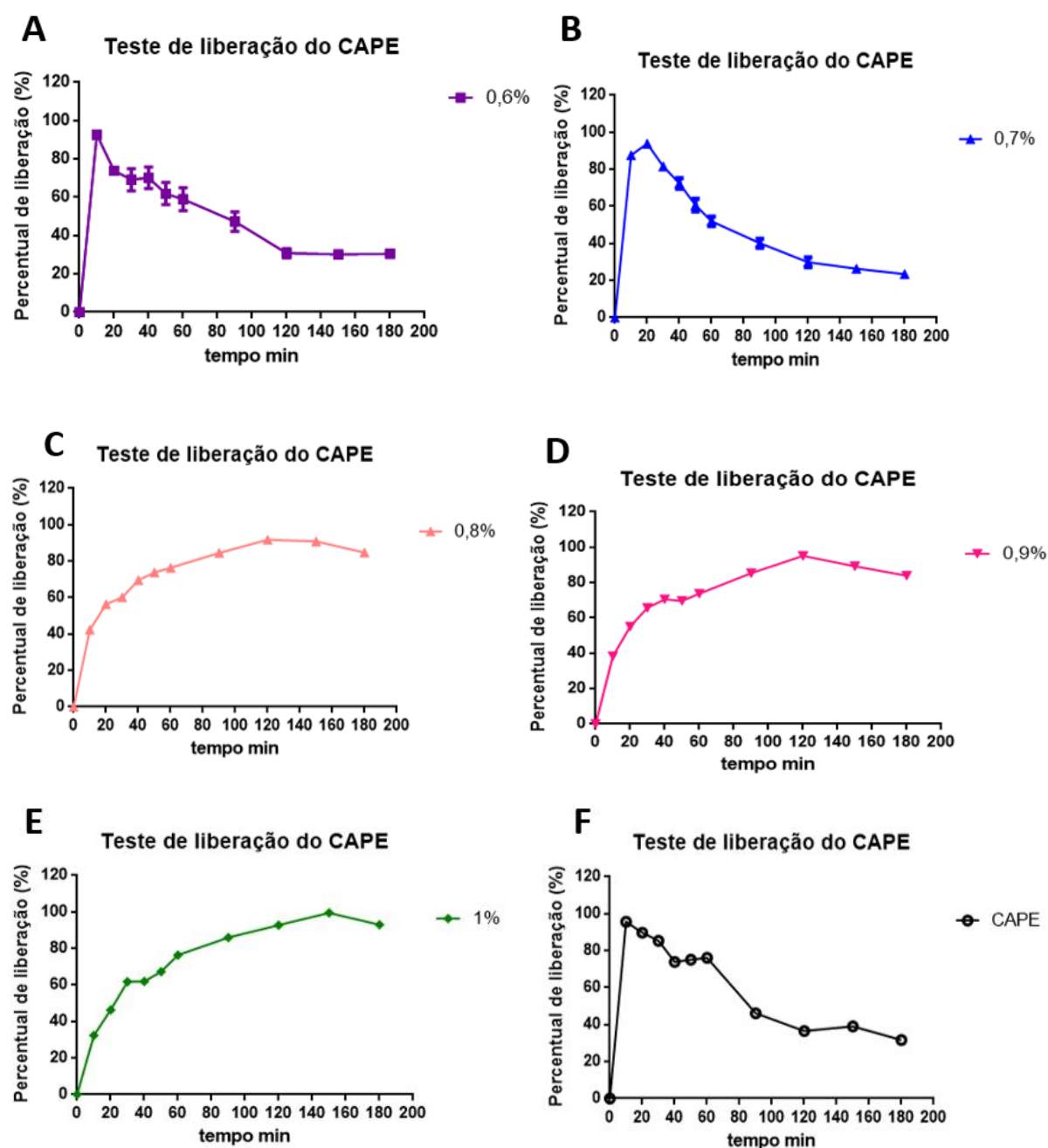
Legenda: Nesse gráfico o eixo X representa a concentração de CAPE isolado presente em cada uma das leituras, e no eixo Y as absorbâncias, diante disso foi gerada a equação da reta.

Fonte: Elaborado pela autora.

2.5.3 Cinética de liberação do CAPE do *gellan gum*

Os ensaios de liberação foram conduzidos tanto para o CAPE livre quanto para as formulações de CAPE em *gellan*, nos tempos de 10 a 180 min, onde na primeira hora a coleta foi de 10 em 10 min e depois nas horas restantes de 30 em 30 min. O perfil encontrado foi de uma liberação mais rápida e semelhante ao CAPE livre nas formulações de CAPE em 0,6 e 0,7% de *gellan*, com pico de liberação próximo ao 100% nos tempos de 10 e 20 min, respectivamente. Uma liberação mais lenta e linear foi encontrada nas formulações de CAPE em 0,8; 0,9 e 1% de *gellan*, sendo a formulação 1% a mais lenta e constante no período analisado (figura 33).

Figura 33- Cinética de liberação do CAPE



Legenda: A) Curva de liberação da formulação do *gellan gum* a 0,6% com CAPE; B) Curva de liberação da formulação do *gellan gum* a 0,7% com CAPE; C) Curva de liberação da formulação do *gellan gum* a 0,8% com CAPE; D) Curva de liberação da formulação do *gellan gum* a 0,9% com CAPE; E) Curva de liberação da formulação do *gellan gum* a 1% com CAPE; F) Curva de liberação do CAPE isolado.

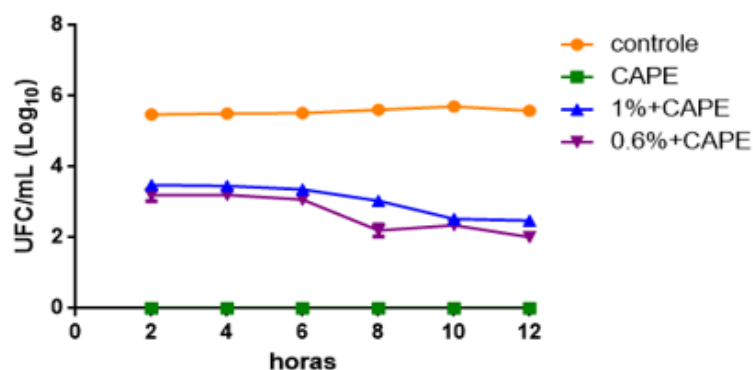
Fonte: Elaborado pela autora.

2.5.4 Ação do CAPE associado ao *gellan gum* sobre culturas planctônica de *C. albicans*

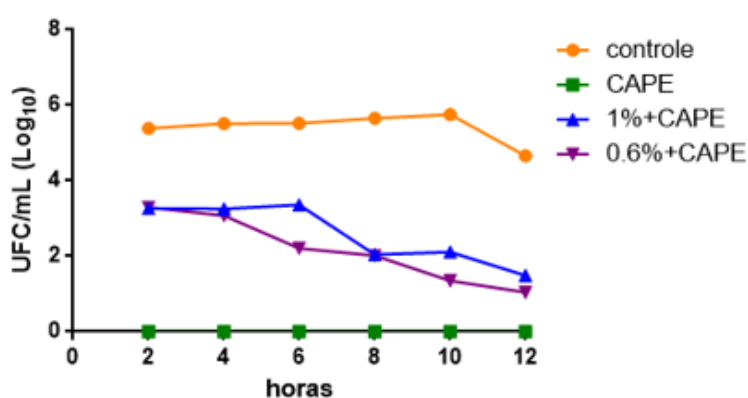
A contagem de UFC/mL nessa etapa do estudo foi realizada a cada duas horas até completar 12h após o tratamento com CAPE livre ou com as formulações de CAPE em *gellan gum*. O grupo controle não tratado apresentou contagem inicial de células de *C. albicans* entre 5,6 a 5,9 Log10 e final de 4,6 a 5,1 Log10. O grupo tratado com CAPE apresentou inibição completa em todos os tempos avaliados. Para os grupos tratados com as formulações de CAPE em 0,6 e 1% de *gellan*, também houve redução das células fúngicas, nas quais as cepas ATCC18804 (figura 34A) e SC5314 (figura 34B) exibiram comportamento semelhante, com variação média entre as formulações de 0,3 Log10. Entretanto, na cepa 70 (figura 34C), a diferença de inibição fúngica entre as formulações variaram mais, na qual a formulação a 0,6% chegou a inibir 1,6 Log10 a mais que a formulação 1%.

Figura 34- Contagem de UFC/mL (Log₁₀) das células planctônicas de *C. albicans* em diferentes tempos após o tratamento com CAPE livre ou CAPE em *gellan gum*

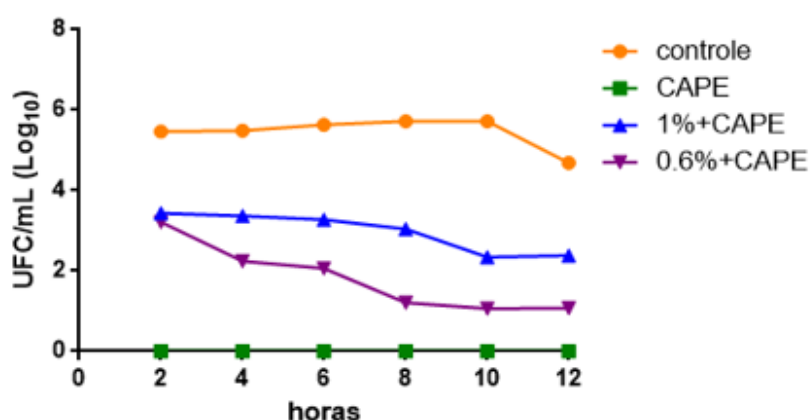
A Planctônico *Candida albicans* 18804



B Planctônico *Candida albicans* SC 5314



C Planctônico *Candida albicans* 70



Legenda: A linha de cor laranja está representando o grupo controle, a cor verde o grupo tratado com CAPE isolado, azul a formulação do *gellan gum* a 1% associado ao CAPE e a linha roxa a formulação do *gellan gum* a 0.6% associado ao CAPE. A) contagem temporal (2 a 12h) de UFC/mL da cepa ATCC 18804; B) contagem temporal (2 a 12h) de UFC/mL da cepa ATCC SC 5314; C) contagem temporal (2 a 12h) de UFC/mL da cepa clínica 70.

Fonte: Elaborado pela autora.

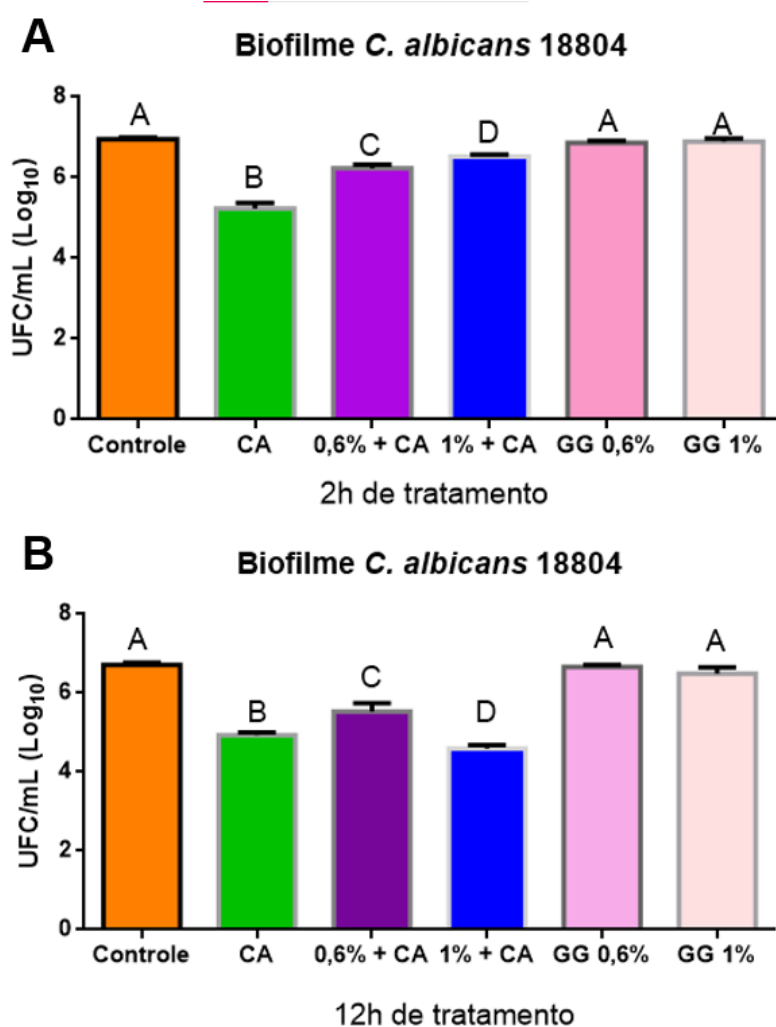
2.5.5 Ação do CAPE associado ao *gellan gum* sobre biofilmes de *C. albicans*

Os tratamentos com as formulações de CAPE em *gellan gum* ou CAPE livre foram realizados por 2 ou 12 h sobre biofilmes maduros (formados por 24 h). Na cepa ATCC 18804, os grupos controles de ambos os tratamentos (2 ou 12 h) apresentaram crescimento médio de 7 Log₁₀. No tratamento de 2 horas, o CAPE isolado apresentou inibição de 1,7 Log₁₀, já as formulações de CAPE em 0,6 e 1% de *gellan* causaram reduções de 0,7 e 0,4 Log₁₀, respectivamente. No tratamento de 12 h, o CAPE isolado apresentou a mesma inibição do tratamento de 2 h, que foi 1,7 Log₁₀. As formulações de CAPE em 0,6 e 1% de *gellan gum* apresentaram 1,1 e 2,1 Log₁₀, respectivamente. Os grupos com *gellan* isolado não se diferiram do grupo controle em nenhum dos tempos de tratamento (figura 35).

Na cepa SC5314, no tratamento de 2 h, o grupo controle teve crescimento médio de 6,7 Log₁₀. O CAPE isolado apresentou redução de 1,3 Log₁₀ e as formulações de CAPE em 0,6 e 1% de *gellan* demonstraram redução de 0,4 e 0,3 Log₁₀, respectivamente. As inibições do tratamento de 12 h foram mais significativas. O grupo do CAPE isolado teve inibição de 1,7 Log₁₀, enquanto os grupos das formulações de CAPE em *gellan gum* tiveram inibições de 0,4 Log₁₀ para a formulação 0,6% e de 1,2 Log₁₀ para a formulação 1%. Os grupos somente com *gellan* não apresentaram diferença com o grupo controle (figura 36).

Por fim, no tratamento do biofilme da cepa clínica 70, os grupos controles apresentaram crescimento médio de 6,7 Log₁₀ em ambos os tempos de tratamento. No tratamento de 2 h, o CAPE isolado causou redução de 1,2 Log₁₀, já as formulações de CAPE em *gellan* levaram a reduções de 0,5 Log₁₀ para a formulação 0,6% e de 0,3 Log₁₀ para a formulação de 1%. Após o tratamento de 12 h, as inibições foram de 2,1 Log₁₀ para o CAPE isolado, 1 Log₁₀ para formulação de 0,6% e de 2,2 Log₁₀ para formulação de 1%. Novamente, os grupos contendo *gellan* sozinho não apresentaram diferenças em relação aos grupos controles (figura 37).

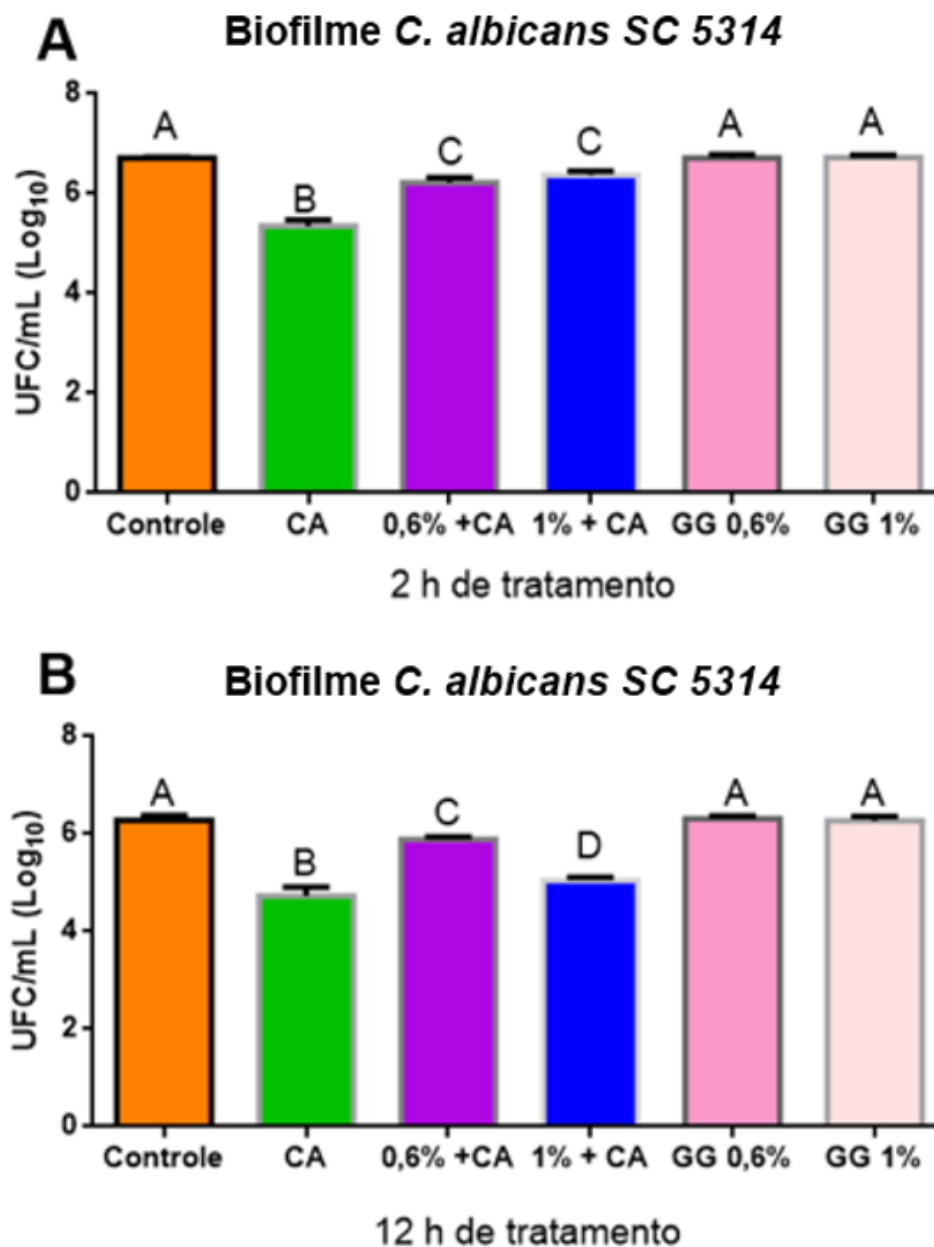
Figura 35- Contagem de UFC/mL (Log₁₀) de biofilme de *C. albicans* (ATCC 18804)



Legenda: Grupo controle; Grupo CAPE (CA); grupo formulação de *gellan gum* 0.6% + CAPE (0.6%+CA); grupo formulação de *gellan gum* 1% + CAPE (1%+CA); grupo *gellan gum* 0.6% (GG 0.6%); grupo *gellan gum* 1% (GG 1%). A) contagem de UFC/mL da cepa ATCC 18804 após 2 h de tratamento; B) contagem de UFC/mL da cepa ATCC 18804 após 12 h de tratamento. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

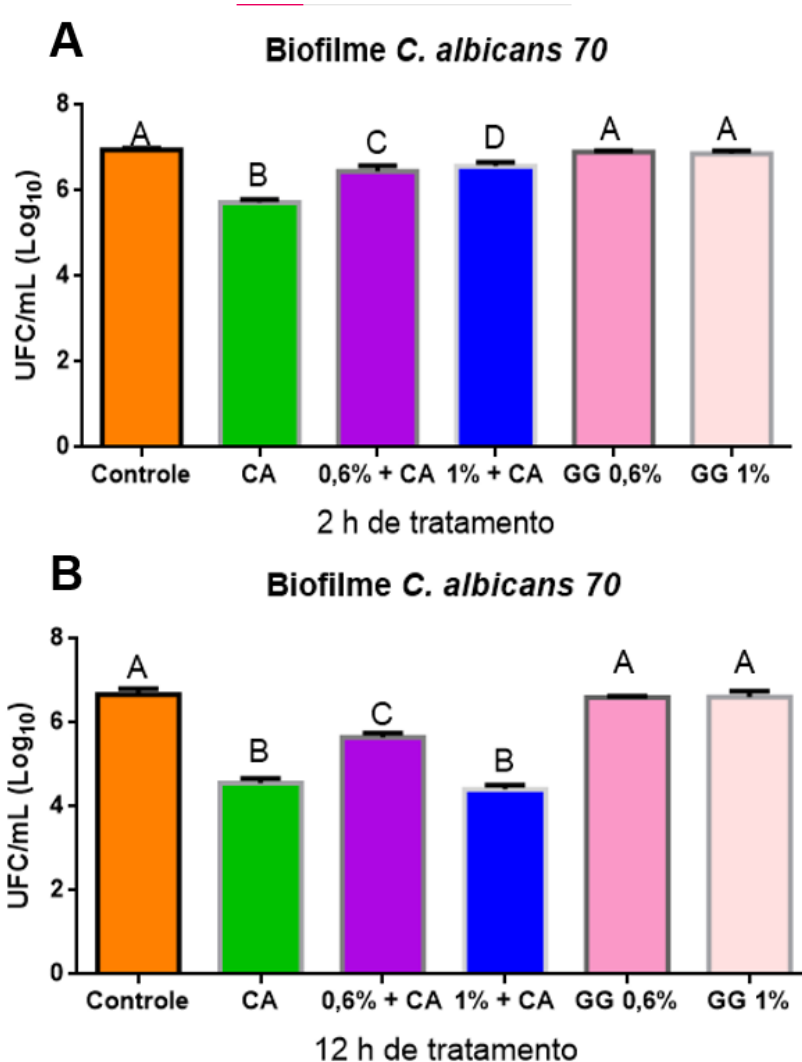
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 36- Contagem de UFC/mL (Log₁₀) de biofilme de *C. albicans* (SC 5314)



Legenda: Grupo controle; Grupo CAPE (CA); grupo formulação de *gellan gum* 0.6% + CAPE (0.6%+CA); grupo formulação de *gellan gum* 1% + CAPE (1%+CA); grupo *gellan gum* 0.6% (GG 0.6%); grupo *gellan gum* 1% (GG 1%). A) contagem de UFC/mL da cepa ATCC SC 5314 após 2 h de tratamento; B) contagem de UFC/mL da cepa ATCC SC 5314 após 12 h de tratamento. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).
 Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 37- Contagem de UFC/mL (Log₁₀) de biofilme de *C. albicans* (cepa clínica 70)



Legenda: Grupo controle; Grupo CAPE (CA); grupo formulação de *gellan gum* 0.6% + CAPE (0.6%+CA); grupo formulação de *gellan gum* 1% + CAPE (1%+CA); grupo *gellan gum* 0.6% (GG 0.6%); grupo *gellan gum* 1% (GG 1%). A) contagem de UFC/mL da cepa clínica 70 após 2 h de tratamento; B) contagem de UFC/mL da cepa clínica 70 após 12 h de tratamento. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

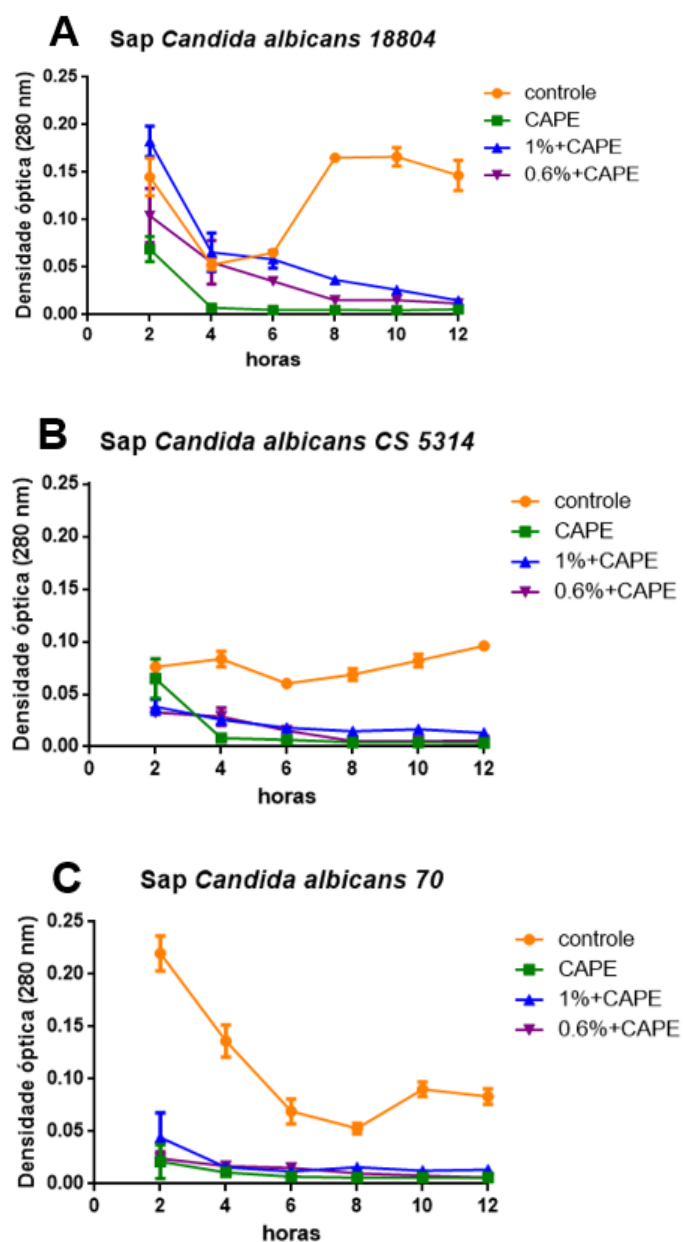
2.5.6 Análise da produção de Sap

A análise da atividade proteolítica foi realizada tanto na cultura planctônica quanto em biofilme de *C. albicans*.

Na cultura planctônica, essa análise foi feita de 2 a 12 h com intervalos de 2 h após os tratamentos com CAPE livre ou as formulações de CAPE em *gellan gum*. Verificamos que os grupos tratados apresentaram uma redução significativa da atividade proteolítica em relação ao grupo não tratado (figura 38). Na cepa 18804 as reduções foram observadas a partir de 4 h. O grupo tratado só com CAPE teve atividade proteolítica praticamente nula, já nos grupos tratados com as formulações de CAPE em *gellan*, a inibição foi acontecendo ao longo do tempo, quase igualando-se ao grupo de CAPE livre no tempo de 12 h (figura 38 A). Na cepa SC5314, a atividade proteolítica do grupo controle não foi tão alta igual as demais cepas. Novamente a partir do tempo de 4 h a atividade de Sap no grupo tratado com CAPE isolado foi quase nula. Nas formulações de CAPE em *gellan*, a partir de 8 h não foi verificada diferença em relação ao grupo tratado só com CAPE (figura 38 B). A cepa 70 foi a que apresentou atividade proteolítica maior no grupo controle. Em contraste, todos os grupos tratados apresentaram inibições da atividade proteolítica muito satisfatórias desde a primeira dosagem, diferindo-se entre si apenas no tempo de 2 h (figura 38 C).

Nos biofilmes, a dosagem da atividade proteolítica foi realizada 2 ou 12 h após os tratamentos com CAPE livre ou formulações de CAPE em *gellan gum*. No tempo de 2 horas, a cepa com maior atividade proteolítica no grupo controle foi a 70. Nos grupos com tratamentos, todas as cepas apresentaram diferença estatística em relação aos grupos controles não tratados. Quando as formulações foram comparadas entre si, a formulação de CAPE em 0,6% de *gellan* foi a única que diferiu estatisticamente em relação ao controle (figura 39). Após o tratamento de 12 h, a maior atividade proteolítica do grupo controle ficou por conta da SC 5314, e a menor foi da ATCC18804. Em relação aos grupos tratados, todos apresentaram reduções estatisticamente significantes em relação ao grupo controle e não diferiram entre si, em nenhuma das cepas estudadas (figura 40)

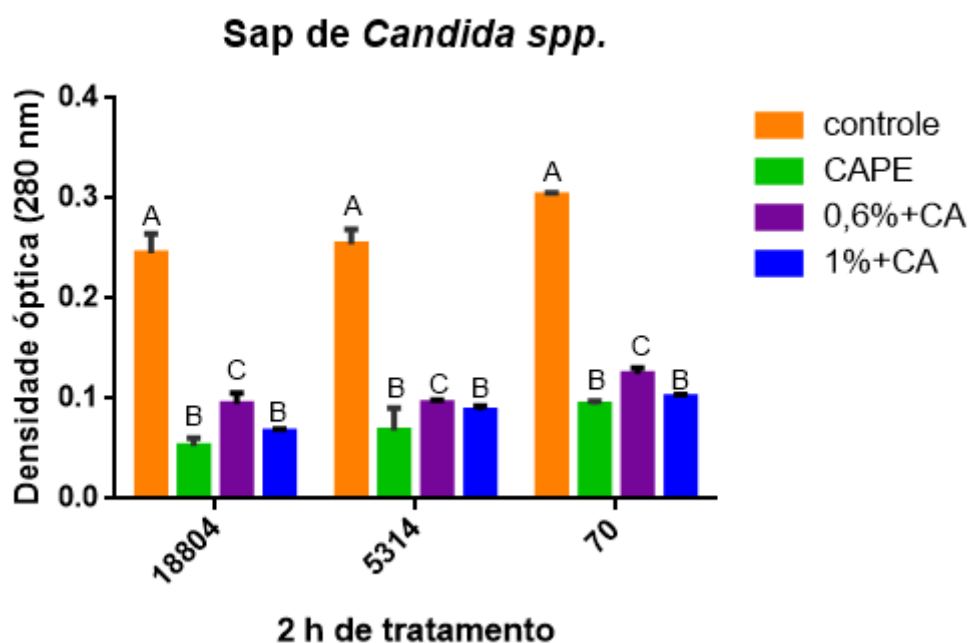
Figura 38- Dosagem temporal da atividade proteolítica em culturas planctônicas de *C. albicans*



Legenda: Grupo controle; Grupo CAPE (CA); grupo formulação de *gellan gum* 1% + CAPE (1%+CA); grupo formulação de *gellan gum* 0.6% + CAPE (0.6%+CA). A) dosagem temporal da atividade proteolítica da cepa de *C. albicans* 18804; B) dosagem temporal da atividade proteolítica da cepa de *C. albicans* SC5314; C) dosagem temporal da atividade proteolítica da cepa de *C. albicans* 70.

Fonte: Elaborado pela autora.

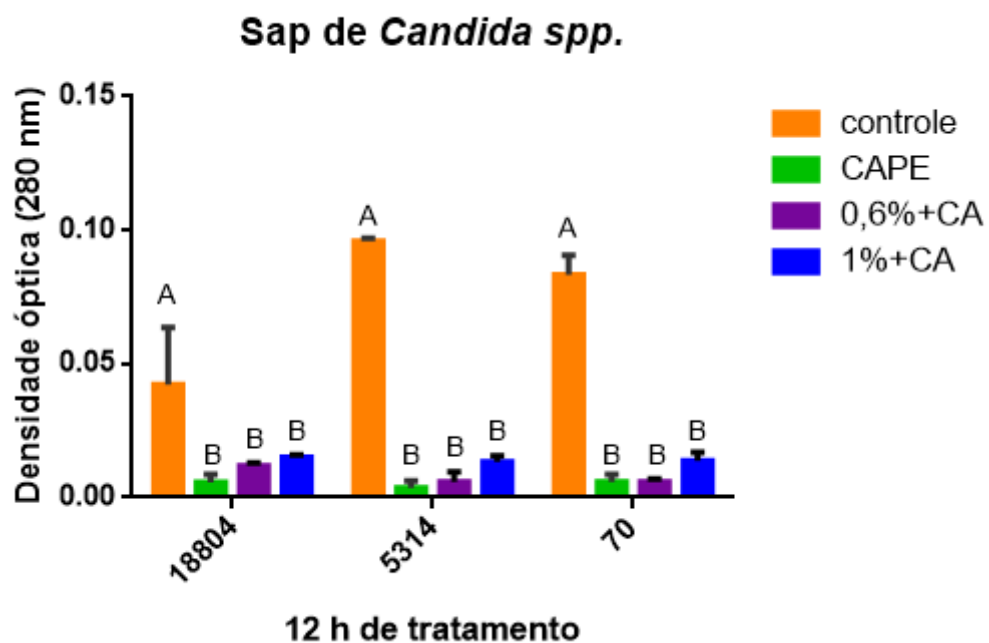
Figura 39- Dosagem da atividade proteolítica do biofilme de *C. albicans* após 2 h de tratamento



Legenda: Grupo controle; Grupo CAPE (CA); grupo formulação de *gellan gum* 0.6% + CAPE (0.6%+CA); grupo formulação de *gellan gum* 1% + CAPE (1%+CA). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 40- Dosagem da atividade proteolítica do biofilme de *C. albicans* após 12 h de tratamento



Legenda: Grupo controle; Grupo CAPE (CA); grupo formulação de *gellan gum* 0.6% + CAPE (0.6%+CA); grupo formulação de *gellan gum* 1% + CAPE (1%+CA). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

2.6 DISCUSSÃO

A candidose bucal é uma doença de grande relevância clínica, pois é uma infecção muito frequente na população, e seu avanço em pacientes imunocomprometidos pode causar o envolvimento sistêmico, com altas taxas de mortalidade. Os fármacos disponíveis estão limitados à poucas classes de antifúngicos e apresentam dificuldades em relação à biodisponibilidade, efeitos colaterais e resistência microbiana. Considerando essas limitações para o tratamento da candidose bucal, o presente estudo avaliou uma formulação de *gellan gum* associado ao CAPE como um possível agente terapêutico contra *C. albicans*.

A ação antifúngica do CAPE foi previamente estudada pelo nosso grupo de pesquisa tanto *in vitro* quanto em dois modelos *in vivo*, de *Galleria mellonella* e candidíase orofaríngea em camundongos imunossuprimidos (Barros et al., 2021). Foi constatado que o CAPE teve ação antifúngica e foi capaz de desestruturar os biofilmes maduros de *C. albicans*, além de estimular o sistema imunológico contra a infecção por *Candida*. Mas devido ao curto tempo de permanência do CAPE na cavidade bucal dos animais, sua ação ficou comprometida, o que nos levou a investigar a aplicação do *gellan gum* como sistema carreador do CAPE.

Para isso, realizamos um estudo para avaliar o sistema de liberação do *gellan gum*, utilizando-se metodologias baseadas em determinação de densidades ópticas (DO). Primeiramente, verificamos se as bandas de absorções do CAPE e do *gellan gum* não se cruzavam. Assim, fizemos a varredura de absorção e encontramos como absorção máxima do CAPE em 325 nm. Bai et al. (2014) encontraram 330 nm como absorção máxima, essas pequenas variações de absorção podem ocorrer devido a diferença de veículo utilizado para diluição (Świsłocka, 2013). Nossos achados com o pico de absorção do *gellan* (240 nm) também corroboraram com a literatura, que mostra a absorção máxima do *gellan gum* variando de 240 a 260 nm, e isso se deve ao ácido glucorânico presente na molécula do *gellan gum* (Ismail et al., 2019; Kemer et al., 2021; N. Zhang et al., 2020).

A seguir, avaliamos a velocidade de liberação do CAPE em diferentes concentrações do *gellan* para averiguar a sua aplicabilidade no contexto clínico. Observamos uma alta liberação do CAPE nos minutos iniciais para as formulações

com concentrações mais baixas de *gellan* (0,6 e 0,7%), enquanto as formulações mais altas de *gellan* (0,8 a 1%) apresentaram liberações mais controladas do CAPE. Essas diferenças também foram encontrada no estudo de Fernandes et al. (2018), que relataram que a menor quantidade de camadas em polímeros menos concentrados, facilitaram a migração do fármaco para o meio externo, favorecendo uma maior taxa de liberação inicial.

Apesar de uma literatura rica em estudos com a utilização do CAPE como anti-inflamatório (Murtaza et al., 2014), anticancerígeno (Hou et al., 2021), anti-oxidante (Bai et al., 2014) e em doenças oftalmológicas (Dai et al., 2020), poucos estudos investigaram sua ação antifúngica. Como já mencionado, existe um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa avaliando o CAPE como antifúngico em 40 cepas diferentes de *C. albicans*, no qual o MIC encontrado variou de 16 a 64 µg/mL (Barros et al., 2021). Outro estudo que também testou a ação do CAPE em cepas de *C. albicans* e não-*albicans* apresentou resultados de MIC com variações de 12,5 a 100 µg/mL (Alfarayeh et al., 2021). No presente estudo, o MIC para o CAPE isolado apresentou variações de 32 a 64 µg/mL, concordante com a literatura. Quando o CAPE foi associado ao *gellan gum* esses valores de MIC aumentaram. No estudo de Zimmermann et al. (2021), que investigaram o *gellan gum* como carreador de nanopartículas antifúngicas, também foi observado um aumento do MIC quando o antifúngico foi incorporado no *gellan gum*. Entretanto, até onde sabemos esse é o primeiro estudo que avaliou o efeito do CAPE incorporado ao *gellan gum* sobre células de *C. albicans*, por isso não foi possível comparar os resultados de MIC do CAPE associado ao *gellan gum* com a literatura.

Quando passamos para os estudos antifúngicos do CAPE associado ao *gellan* em culturas planctônicas e biofilmes, foi notório que a ação das formulações foi estritamente ligada ao tempo de tratamento. A ação antifúngica do CAPE foi observada nas três cepas de *C. albicans*, incluindo a cepa clínica 70 que é resistente ao fluconazol. Em culturas planctônicas, as inibições foram de aproximadamente 2 Log10 para todas as cepas, já em biofilme as inibições variaram de 0,4 a 0,7 Log10 no tratamento de 2 h e de 1 a 2,1 Log10 no tratamento de 12h. Ribeiro et al. (2020) utilizaram o *gellan gum* para incorporação de probióticos a fim de tratar candidose bucal, como resultado verificaram inibições de aproximadamente 2,5 Log10 para diferentes cepas de *C. albicans*.

As Sap são importantes enzimas produzidas por *C. albicans* por estarem associadas a sua patogenicidade, possuindo capacidade de degradar proteínas que estão relacionadas a defesa imunológica do hospedeiro (Bochenskaa et al., 2013). Algumas dessas enzimas estão estritamente ligadas as infecções orais, pois são expressas durante a formação das hifas e invasão tecidual (Meylani et al., 2021). Por isso, torna-se importante o estudo de antifúngicos que tenham como alvo de ação as Saps. Em nosso estudo, o CAPE e suas formulações em *gellan gum* foram capazes de inibir a atividade proteolítica das culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Esses resultados são interessantes, uma vez que tem sido sugerido que o tratamento com antifúngicos convencionais leva ao aumento da atividade proteolítica de *Candida* como um mecanismo compensatório. Costa et al. (2010) verificaram que o fluconazol e voriconazol aumentaram a atividade da enzima Sap extracelular em cepas resistentes a esses fármacos, alguns estudos justificam esse aumento devido ao mecanismo de efluxo que regula o transporte de Sap (Bochenskaa et al., 2016; Nawaz et al., 2015). No presente estudo, foi avaliada apenas a atividade proteolítica de *C. albicans* e não a expressão de Saps. Isso pode ser considerado uma limitação já que cada um dos genes de Saps são vinculados à mecanismos de virulência específicos. Assim, estudo futuros são necessários para investigar os efeitos do CAPE e suas formulações nos diferentes tipos de Saps produzidas por *C. albicans*.

2.7 CONCLUSÃO

Concluimos que as formulações em *gellan gum* foram capazes de promover uma liberação controlada de CAPE, inibindo significativamente o crescimento planctônico, biofilmes e atividade proteolítica de *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

- Alfarayeh I, Pollák E, Czéh Á, Vida A, Das S, Papp G. Antifungal and anti-biofilm effects of caffeic acid phenethyl ester on different candida species. *Antibiotics*. 2021;10(11). doi: 10.3390/antibiotics10111359.
- Alkhars N, Zeng Y, Alomeir N, Al Jallad N, Wu TT, Aboelmagd S, et al. Oral Candida Predicts streptococcus mutans emergence in underserved us infants. *J Dent Res*. 2022;101(1):54–62. doi: 10.1177/00220345211012385. PMID: 34018817.
- de Alvarenga JA, de Barros PP, de Camargo Ribeiro F, Rossoni RD, Garcia MT, dos Santos Velloso M, et al. Probiotic effects of lactobacillus paracasei 28.4 to inhibit streptococcus mutans in a gellan-based formulation. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020;13(2):506–17. doi: 10.1007/s12602-020-09712-0. PMID: 32980974.
- Ara C, Esrefoglu M, Polat A, Isik B, Aladag M, Gul M, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on bacterial translocation and intestinal damage in cholestatic rats. *Dig Dis Sci*. 2006;51(10):1754–60. doi: 10.1007/s10620-006-9130-4. PMID: 16983503.
- Araujo PV, Correia-Silva J de F, Gomez RS, Massara M de L de A, Cortes ME, Poletto LT de A. Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real time PCR methods. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(3):401–7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.06.003. PMID: 26093167.
- Astasov-Frauenhoffer M, Kulik EM. Cariogenic Biofilms and caries from birth to old age. *Monogr Oral Sci*. 2020;29:53–64. doi: 10.1159/000510200. PMID: 33427220.
- Bai H, Liu R, Chen HL, Zhang W, Wang X, Zhang X Di, et al. Enhanced antioxidant effect of caffeic acid phenethyl ester and Trolox in combination against radiation induced-oxidative stress. *Chem Biol Interact*. 2014;207(1):7–15. doi: 10.1016/j.cbi.2013.10.022.
- Banas JA, Vickerman MM. Squamous Cell Carcinoma of the Oral. *Int J Gerontol*. 2003;3(1):75–80. doi: 10.1016/S1873-9598(09)70023-7.
- Bandara HMHN, Panduwawala CP, Samaranayake LP. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. *Oral Dis*. 2019;25(2):363–71. doi: 10.1111/odi.12899. PMID: 29786923.
- Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, De Alvarenga JA, Velloso MDS, De Azevedo Prata MC, et al. Streptococcus mutans can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of Candida albicans. *PLoS One*. 2016;11(3):1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0150457. PMID: 26934196.

Barros PP de, Rossoni RD, Garcia MT, Kaminski V de L, Loures FV, Fuchs BB, et al. The anti-biofilm efficacy of caffeic acid phenethyl ester (cape) in vitro and a murine model of oral candidiasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(July):1–18. doi: 10.3389/fcimb.2021.700305. PMID: 34408988.

Bayona AMDP, Mroz P, Thunshelle C, Hamblin MR. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des.* 2017;89(2):192–206. doi: 10.1111/cbdd.12792.

Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 2012;6(1):46–56. doi: 10.1038/ismej.2011.85. PMID: 21716308.

Bhaumik D, Manikandan D, Foxman B. Cariogenic and oral health taxa in the oral cavity among children and adults: a scoping review. *Arch Oral Biol.* 2021;129(March):105204. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105204. PMID: 34246103.

Bochenskaa O, Rapala-Kozika M, Wolaka N, Aoki W, Ueda M, Kozik A. The action of ten secreted aspartic proteases of pathogenic yeast *Candida albicans* on major human salivary antimicrobial peptide, histatin 5 *. *ABP Biochim Pol.* 2016;63(3):403–10. doi: http://dx.doi.org/10.18388/abp.2016_1318.

Bochenskaa O, Rapala-Kozika M, Wolaka N, Brasa G, Kozika A, Dubina A, et al. Secreted aspartic peptidases of *Candida albicans* liberate bactericidal hemocidins from human hemoglobin. *Peptides.* 2013;48:49–58. doi: 10.1016/j.peptides.2013.07.023.

Bonifácio D, Martins C, David B, Lemos C, Neves MGPMS, Almeida A, et al. Photodynamic inactivation of *Listeria innocua* biofilms with food-grade photosensitizers: a curcumin-rich extract of *Curcuma longa* vs commercial curcumin. *J Appl Microbiol.* 2018;125(1):282–94. doi: 10.1111/jam.13767.

Bonifacio MA, Cometa S, Cochis A, Gentile P, Ferreira AM, Azzimonti B, et al. Antibacterial effectiveness meets improved mechanical properties: Manuka honey/gellan gum composite hydrogels for cartilage repair. *Carbohydr Polym.* 2018;198(April):462–72. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.115. PMID: 30093023.

Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018;26(3):229–42. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008.

Bowen WH, Koo H. Biology of streptococcus mutans- derived glucosyltransferases : role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45:69–86. doi: 10.1159/000324598.

Calvasina P, O'Campo P, Pontes MM, Oliveira JB, Vieira-Meyer APGF. The

association of the Bolsa Familia Program with children's oral health in Brazil. *BMC Public Health*. 2018;18(1):1186. doi: 10.1186/s12889-018-6084-3. PMID: 30340475.

Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *HHS Public Access*. 2016;26(5):1011–4. doi: 10.1002/jmri.23741.Proton. PMID: 24655651.

Carvalho TP, , Tamires Timm MASKEa, Cácia SIGNORIA KV Brauner, Elenara Ferreira de OLIVEIRAa MSCenci. Biofilme simplificado in vitro : um estudo piloto. *Rev Odontol UNESP*. 2018;47(1):40–4.

Chang SJ, Huang YT, Yang SC, Kuo SM, Lee MW. In vitro properties of gellan gum sponge as the dental filling to maintain alveolar space. *Carbohydr Polym*. 2012;88(2):684–9. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.01.017.

Chen X, Daliri EBM, Tyagi A, Oh DH. Cariogenic biofilm: Pathology-related phenotypes and targeted therapy. *Microorganisms*. 2021;9(6). doi: 10.3390/microorganisms9061311.

Chenicheri S, R U, Ramachandran R, Thomas V, Wood A. Insight into oral biofilm: primary, secondary and residual caries and phyto-challenged solutions. *Open Dent J*. 2017;11(1):312–33. doi: 10.2174/1874210601711010312.

Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(5):571–89. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876. PMID: 29749263.

Coleman JJ, Komura T, Munro J, Wu MP, Busanelli RR, Koehler AN, et al. The immunomodulatory activity of caffeic acid phenethyl ester in *Caenorhabditis elegans* is mediated by the CED-10 (Rac-1)/PAK1 pathway. *Future Med Chem*. 2017;71(10):643. doi: 10.2307/j.ctvnwc0d0.18. PMID: 29070408.

Costa CR, Jesuino RS, de Aquino Lemos J, de Fátima Lisboa Fernandes O, Hasimoto e Souza LK, Passos XS, do Rosário Rodrigues Silva M. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. *Mycopathologia*. 2010 Feb;169(2):91-8. doi: 10.1007/s11046-009-9232-6. Epub 2009 Aug 15. PMID: 19685156.

Creeth JE, Karwal R, Hara AT, Zero DT. A Randomized in situ Clinical Study of Fluoride Dentifrices on Enamel Remineralization and Resistance to Demineralization: Effects of Zinc. *Caries Res*. 2018;52(1–2):129–38. doi: 10.1159/000479823.

Cusicanqui Méndez DA, Gutierrez E, José Dionisio E, Afonso Rabelo Buzalaf M, Cardoso Oliveira R, Andrade Moreira Machado MA, et al. Curcumin-mediated

antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;24(August):102–8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.09.007. PMID: 30240927.

Dai G, Jiang Z, Sun B, Liu C, Meng Q, Ding K, et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents colitis-associated cancer by inhibiting nlrp3 inflammasome. *Front Oncol*. 2020;10(May):1–12. doi: 10.3389/fonc.2020.00721.

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313–52. doi: 10.3390/molecules15107313. PMID: 20966876.

Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine Biofouling. 2013;29(9):1057–67. doi: 10.1080/08927014.2013.827668.

Esberg A, Sheng N, Mårell L, Claesson R, Persson K, Borén T, et al. *Streptococcus mutans* adhesin biotypes that match and predict individual caries development. *EBioMedicine*. 2017;24:205–15. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.09.027.

Fekrazad R, Bargrizan M, Sajadi Sepideh, Sajadi Soodabeh. Evaluation of the effect of photoactivated disinfection with Radachlorin® against *Streptococcus mutans* (an in vitro study). *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2011;8(3):249–53. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.03.337. PMID: 21864798.

Fernandes FP, Fortes AC, Da Cruz Fonseca SG, Breitzkreutz J, Ferraz HG. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films based on pectin and gellan gum containing triamcinolone acetonide. *Int J Polym Sci*. 2018; Article ID 2403802 doi: 10.1155/2018/2403802.

Frazão Câmara JV, Araujo TT, Mendez DAC, da Silva NDG, de Medeiros FF, Santos LA, et al. Effect of a sugarcane cystatin on the profile and viability of microcosm biofilm and on dentin demineralization. *Arch Microbiol*. 2021;203(7):4133–9. doi: 10.1007/s00203-021-02403-6. PMID: 34059945.

Garcia MT, Correia Pereira AH, Jorge AOC, Strixino JF, Junqueira JC. Photodynamic Therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against *Streptococcus mutans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;24(August):256–61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.08.012>. PMID: 30157462.

Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *The Fungal Kingdom*. 2017(5):267–92. doi: 10.1128/9781555819583.ch12.

Guilherme A de A, Pinto GAS, Rodrigues S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. *Ciência e Tecnol*

Aliment. 2009;29(4):738–47. doi: 10.1590/s0101-20612009000400007.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2015;18(5):310–21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002. PMID: 26806384.

Hakimiha N, Khoei F, Bahador A, Fekrazad R. The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(2):80–4. doi: 10.1590/1678-775720130038. PMID: 24676576.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980;44(2):331–84. PMID: 6446023.

Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *HHS Public Access.* 2016;33:67–73. doi: 10.1016/j.mib.2016.06.008. Antimicrobial.

Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: red and white manifestations in the oral cavity. *Head Neck Pathol.* 2019;13(1):25–32. doi: 10.1007/s12105-019-01004-6. PMID: 30693459.

Da Hora Machado AE. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova.* 2000;23(2):237–43. doi: 10.1590/S0100-40422000000200015.

Hou C-P, Tsui K-H, Chang K-S, Sung H-C, Hsu S-Y, Lin Y-H, et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits the growth of bladder carcinoma cells by upregulating growth differentiation factor 15. *Biomed J.* 2021(October):1–13. doi: 10.1016/j.bj.2021.10.006.

Hu C, Wang LL, Lin YQ, Liang HM, Zhou SY, Zheng F, et al. Nanoparticles for the treatment of oral biofilms: current state, mechanisms, influencing factors, and prospects. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(24). doi: 10.1002/adhm.201901301.

Hu X, Huang YY, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. *Front Microbiol.* 2018;9(JUN):1–24. doi: 10.3389/fmicb.2018.01299.

Ibanez Simplicio F, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova.* 2002;25(5):801–7. doi: 10.1590/S0100-40422002000500016.

Ismail NA, Amin KAM, Razali MH. Antibacterial study of gellan gum (GG) film incorporated norfloxacin. *J Pure Appl Microbiol.* 2019;13(2):1095–102. doi:

10.22207/JPAM.13.2.48.

Issa MCA, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol*. 2010;85(4):501–11. doi: 10.1590/S0365-05962010000400011. PMID: 20944910.

Jardine AP, Montagner F, Quintana RM, Zaccara IM, Kopper PMP. Antimicrobial effect of bioceramic cements on multispecies microcosm biofilm: a confocal laser microscopy study. *Clin Oral Investig*. 2019;23(3):1367–72. doi: 10.1007/s00784-018-2551-6. PMID: 30022269.

de Jesus VC, Khan MW, Mittermuller BA, Duan K, Hu P, Schroth RJ, et al. Characterization of supragingival plaque and oral swab microbiomes in children with severe early childhood caries. *Front Microbiol*. 2021;12(June):1–13. doi: 10.3389/fmicb.2021.683685.

Junqueira JC, Jorge AOC, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, Costa ACBP, et al. Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis(phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). *Lasers Med Sci*. 2012;27(6):1205–12. doi: 10.1007/s10103-012-1050-2.

Kadosh D. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2019;52:27–34. doi: 10.1016/j.mib.2019.04.005. PMID: 31129557.

Kadry AA, El-Ganiny AM, El-Baz AM. Relationship between Sap prevalence and biofilm formation among resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Afr Health Sci*. 2018;18(4):1166–74. doi: 10.4314/ahs.v18i4.37. PMID: 30766582.

Kamer DDA, Gumus T, Palabiyik I, Demirci AS, Oksuz O. Grape pomace as a promising source for gellan gum production. *Food Hydrocoll*. 2021;114(August 2020):106584. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106584.

Khademi H, Torabinia N, Allameh M, Jebreilamtigh HR. Comparative evaluation of photodynamic therapy induced by two different photosensitizers in rat experimental candidiasis. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014;11(4):452–9. PMID: 25225558.

Khan MSA, Alshehrei F, Al-Ghamdi SB, Bamaga MA, Al-Thubiani AS, Alam MZ. Virulence and biofilms as promising targets in developing antipathogenic drugs against candidiasis. *Futur Sci OA*. 2020;6(2). doi: 10.2144/fsoa-2019-0027.

Kim D, Barraza JP, Arthur RA, Hara A, Lewis K, Liu Y, et al. Spatial mapping of polymicrobial communities reveals a precise biogeography associated with human dental caries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(22). doi: 10.1073/pnas.1919099117. PMID: 32424080.

Kim D, Koo H. Spatial Design of Polymicrobial Oral Biofilm in Its Native Disease State. *J Dent Res*. 2020;99(6):597–603. doi: 10.1177/0022034520909313. PMID: 32142402.

Kim Y-S, Kang S-M, Lee E-S, Lee JH, Kim B-R, Kim B-I. Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. *J Biomed Opt*. 2016;21(10):101409. doi: 10.1117/1.jbo.21.10.101409. PMID: 26950795.

Kim YS, Lee ES, Kwon HK, Kim B II. Monitoring the maturation process of a dental microcosm biofilm using the Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). *J Dent*. 2014;42(6):691–6. doi: 10.1016/j.jdent.2014.03.006. PMID: 24657554.

Klinke T, Urban M, Lück C, Hannig C, Kuhn M, Krämer N. Changes in *Candida* spp., mutans streptococci and lactobacilli following treatment of early childhood caries: A 1-year follow-up. *Caries Res*. 2014;48(1):24–31. doi: 10.1159/000351673. PMID: 24216710.

Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, et al. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries Development in vivo. *Caries Res*. 2010;44(2):116–26. doi: 10.1159/000296306. PMID: 20234135.

Kou J, Dou D, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*. 2017;8(46):81591–603. doi: 10.18632/oncotarget.20189. PMID: 29113417.

Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*. 2014;19(1):78–101. doi: 10.3390/molecules19010078. PMID: 24362627.

Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. vol. 16 2018. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x.

Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem Rev*. 2021;121(6):3390–411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199. PMID: 32441527.

Leone G, Consumi M, Pepi S, Pardini A, Bonechi C, Tamasi G, et al. Enriched Gellan Gum hydrogel as visco-supplement. *Carbohydr Polym*. 2020;227(August 2019):115347. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115347. PMID: 31590845.

Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J*. 2017;223(9):675–81. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.886. PMID: 29123282.

Lim CSY, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: Back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(1):21–31. doi: 10.1007/s10096-011-

1273-3. PMID: 21544694.

Llena C, Almarche A, Mira A, López MA. Antimicrobial efficacy of the supernatant of streptococcus dentisani against microorganisms implicated in root canal infections. *J Oral Sci.* 2019;61(1):184–94. doi: 10.2334/josnurd.18-0239. PMID: 30918216.

Lourenço LMO, Rocha DMGC, Ramos CI V, Gomes MC, Almeida A, Faustino MAF, et al. Photoinactivation of planktonic and biofilm forms of *Escherichia coli* through the action of cationic Zinc(II) Phthalocyanines . *ChemPhotoChem.* 2019;3(5):251–60. doi: 10.1002/cptc.201900020.

Lv L, Cui H, Ma Z, Liu X, Yang L. Recent progresses in the pharmacological activities of caffeic acid phenethyl ester. *Arch Pharmacol.* 2021:1327–39.

Maiti S, Ranjit S, Mondol R, Ray S, Sa B. Al +3 ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. *Carbohydr Polym.* 2011;85(1):164–72. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.02.010.

Mba IE, Nweze EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(10):1797–819. doi: 10.1007/s10096-020-03912-w. PMID: 32372128.

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

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

Mesquita MQ, Dias CJ, Neves MGPMS, Almeida A, Faustino MAF. Revisiting current photoactive materials for antimicrobial photodynamic therapy. *Molecules.* 2018;23(10). doi: 10.3390/molecules23102424.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS Pathog.* 2013;9(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1003616. PMID: 24146611.

Meyer F, Enax J, Eppele M, Amaechi BT, Simader B. Preventive Agents. *Dent J.* 2021;9(88):1–11.

Meylani V, Sembiring L, Fudholi A, Wibawa T. Differentiated sap (4–6) gene expression of *Candida albicans* isolates from HIV-positive patients with oral candidiasis and commensals in healthy individuals. *Microb Pathog.*

2021;158(July):105075. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105075. PMID: 34224845.

Mohamed HA, Radwan RR, Raafat AI, Ali AEH. Antifungal activity of oral (Tragacanth/acrylic acid) Amphotericin B carrier for systemic candidiasis: in vitro and in vivo study. *Drug Deliv Transl Res*. 2018;8(1):191–203. doi: 10.1007/s13346-017-0452-x. PMID: 29280061.

Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, et al. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(11):2005–19. doi: 10.1007/s10096-019-03641-9.

Mundula T, Ricci F, Barbetta B, Baccini M, Amedei A. Effect of Probiotics on Oral Candidiasis : A Systematic. *Nutrients*. 2019;11(2449):1–19.

Murtaza G, Karim S, Akram MR, Khan SA, Azhar S, Mumtaz A, et al. Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi: 10.1155/2014/145342. PMID: 24971312.

Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RSS, Graciano AX, et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012;9(2):122–31. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.11.006. PMID: 22594982.

Nawaz A, Pärnänen P, Kari K, Meurman JH. Proteolytic activity and cytokine up - regulation by non - albicans *Candida albicans*. *Arch Microbiol*. 2015;533–7. doi: 10.1007/s00203-015-1083-6.

Neves PAM, Lima LA, Rodrigues FCN, Leitão TJ, Ribeiro CCC. Clinical effect of photodynamic therapy on primary carious dentin after partial caries removal. *Braz Oral Res*. 2016;30(1):1–8. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0047. PMID: 27223131.

Nie M, Deng DM, Wu Y, Oliveira KT de, Bagnato VS, Crielaard W, et al. Photodynamic inactivation mediated by methylene blue or chlorin e6 against *Streptococcus mutans* biofil. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020:101219. doi: 10.1016/j.procpolymsci.2020.101219.

Nobile CJ, Johson alexandre D. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Microbiol*. 2015;176(3):139–48. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330.Candida.

Nouraei H, Pakshir K, ZareShahrabadi Z, Zomorodian K. High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. *Microb Pathog*. 2020;149(October):104574. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104574. PMID: 33075515.

Olgierd B, Kamila Ž, Anna B, Emilia M. The pluripotent activities of caffeic acid phenethyl ester. *Molecules*. 2021;26(5):1–15. doi: 10.3390/molecules26051335. PMID: 33801469.

Oliveira LG de. Influência da maturação sobre a viabilidade de *Mycobacterium bovis* em queijos tipo Minas artesanal e seu antagonismo por bactérias ácido-láticas [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2018.

Osmalek T, Froelich A, Tasarek S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int J Pharm*. 2014;466(1–2):328–40. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.03.038. PMID: 24657577.

Palumbo FS, Federico S, Pitarresi G, Fiorica C, Giammona G. Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydr Polym*. 2020;229(September 2019):115430. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115430. PMID: 31826518.

Papadimitriou K, Alegría Á, Bron PA, de Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):837–90. doi: 10.1128/mmbr.00076-15. PMID: 27466284.

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4(May):1–20. doi: 10.1038/nrdp.2018.26. PMID: 29749387.

Perussi JR. Inativação Fotodinâmica De Microrganismos. *Quim Nova*. 2007;30(4):988–94. doi: 10.1590/S0100-40422007000400039.

Pinheiro SL, Segatti B, Pucca DS, Dutra PT. Dental acid etchant as a sensitizing agent in photodynamic therapy to reduce *S. mutans* in dentinal carious lesions. *Lasers Med Sci*. 2019;34(2):305–9. doi: 10.1007/s10103-018-2590-x.

Pires JG, Braga AS, Andrade FB, Saldanha LL, Dokkedal AL, Oliveira RC, et al. Effect of hydroalcoholic extract of on the viability and activity of microcosm biofilm and on enamel demineralization Abstract. *J Appl Oral Sci*. 2019;1:1–9.

Pitts N, Zero D, Marsh P, Ekstrand K, Weintraub J, Ramos-Gomez F, et al. This is a repository copy of Dental caries . White Rose Research Online URL for this paper : Version : Accepted Version Article : © 2017 , The Author (s). Published by Nature Publishing Group . This is an author produced version of a paper published in. *Nat Rev Dis Prim*. 2017:45.

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3(May). doi: 10.1038/nrdp.2017.30. PMID: 28540937.

Pompilho WM, Borges FV, Miguel E de C. Biotecnologia E Biodiversidade: As florestas brasileiras como fonte de novos fármacos com propriedades antitumorais. *Acta Sci Tech.* 2013;1(1). doi: 10.17648/uezo-ast-v1i1.2.

Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N, et al. Management options for low-dose methotrexate-induced oral ulcers: A systematic review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2019;24(2):e172–80. doi: 10.4317/medoral.22978. PMID: 30818309.

Quishida CCC, de Oliveira Mima EG, Dovigo LN, Jorge JH, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine® and LED light after one and three successive applications. *Lasers Med Sci.* 2015:2303–12. doi: 10.1007/s10103-015-1811-9.

Rahman M, Rahaman S, Islam R, Rahman F, Mithi FM, Alqahtani T, et al. Role of Phenolic Compounds in Human Disease : Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules.* 2022:1–36. doi: doi.org/10.3390/ molecules27010233.

Rapala-Kozik M, Bochenska O, Zajac D, Karkowska-Kuleta J, Gogol M, Zawrotniak M, et al. Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. *Mol Oral Microbiol.* 2018;33(2):113–24. doi: 10.1111/omi.12206. PMID: 29139623.

Ribeiro F de C, Junqueira JC, dos Santos JD, de Barros PP, Rossoni RD, Shukla S, et al. Development of probiotic formulations for oral candidiasis prevention: Gellan Gum as a Carrier to Deliver *Lactobacillus paracasei* 28.4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(6):1–16. doi: 10.1128/AAC.02323-19. PMID: 32253208.

Romo JA, Pierce CG, Chaturvedi AK, Lazzell AL, McHardy SF, Saville SP, et al. Development of anti-virulence approaches for candidiasis via a novel series of small-molecule inhibitors of *Candida albicans* filamentation. *MBio.* 2017;8(6):1–16. doi: 10.1128/mBio.01991-17. PMID: 29208749.

Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, et al. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J Appl Microbiol.* 2012;113(6):1540–53. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05439.x.A.

Sande FH van de, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011;27(9):1057–63. doi: 10.1080/08927014.2011.625473. PMID: 22044385.

Santos DMS dos, Pires JG, Braga AS, Salomão PMA, Magalhães AC. Comparison between static and semidynamic models for microcosm biofilm formation on dentin. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:1–6. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0163. PMID: 30624468.

Sharma S, Dai T, B. Kharkwal G, Huang Y-Y, Huang L, J. Bil De Arce V, et al. Drug

discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr Pharm Des.* 2012;17(13):1303–19. doi: 10.2174/138161211795703735. PMID: 21504410.

Shukla A, Fang JC, Puranam S, Hammond PT. Release of vancomycin from multilayer coated absorbent gelatin sponges. *J Control Release.* 2012;157(1):64–71. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.062. PMID: 21939701.

Shukla A, Fuller RC, Hammond PT. Design of multi-drug release coatings targeting infection and inflammation. *J Control Release.* 2011;155(2):159–66. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.06.011. PMID: 21699932.

Signori C, Hartwig AD, Silva-Júnior IF da, Correa MB, Azevedo MS, Cenci MS. The role of human milk and sucrose on cariogenicity of microcosm biofilms. *Braz Oral Res.* 2018;32:e109. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0109.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2011;19(5):241–7. doi: 10.1016/j.tim.2011.02.003. PMID: 21411325.

Sultan AS, Kong EF, Rizk AM, Jabra-Rizk MA. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. *PLoS Pathog.* 2018;14(1):10–5. doi: 10.1371/journal.ppat.1006719. PMID: 29370304.

Sun L, Liao K, Hang C. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances the antifungal activity of fluconazole against resistant *Candida albicans*. *Phytomedicine.* 2018;40(October 2017):55–8. doi: 10.1016/j.phymed.2017.12.033. PMID: 29496175.

Świsłocka R. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV absorption, ¹H and ¹³C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++G** level) studies on alkali metal salts of caffeic acid. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2013;100:21–30. doi: 10.1016/j.saa.2012.01.048. PMID: 22369898.

Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The Caries microbiome: implications for reversing dysbiosis. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):78–85. doi: 10.1177/0022034517736496. PMID: 29355414.

Terra-Garcia M, de Souza CM, Ferreira Gonçalves NM, Pereira AHC, de Barros PP, Borges AB, et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with Fotoentocine on *Streptococcus mutans* isolated from dental caries. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;34(March):0–7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102303. PMID: 33887495.

Tolba MF, Omar HA, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Naim AB, Abdel-Rahman SZ. Caffeic Acid Phenethyl Ester: a review of its antioxidant activity, Protective Effects against Ischemia-reperfusion Injury and Drug Adverse Reactions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(13):2183–90. doi: 10.1080/10408398.2013.821967. PMID: 25365228.

Tournu H, Van Dijck P. Candida biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *Int J Microbiol.* 2012;2012:845352. doi: 10.1155/2012/845352. Epub 2011 Nov 14. PMID: 22164167; PMCID: PMC3227478.

Vahabi S, Fekrazad R, Ayremlou S, Tahari S, Zangeneh N. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlo- rin and toluidine blue on *Streptococcus mutans*: An in Vitro Study S. *Int J Dent Sci Res.* 2011;8(2):48–54. doi: 10.1016/j.ijdsr.2013.11.004. PMID: 25206182.

Valm A. Transition From Health To dental caries and periodontal disease. *J Mol Biol.* 2020;431(16):2957–69. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.016.The.

Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol.* 2018;200(4):525–40. doi: 10.1007/s00203-018-1505-3. PMID: 29572583.

Vertuan M, Machado PF, de Souza BM, Braga AS, Magalhães AC. Effect of TiF4/NaF and chitosan solutions on the development of enamel caries under a microcosm biofilm model. *J Dent.* 2021;111(June):103732. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103732. PMID: 34174348.

Vieira C, Santos A, Mesquita MQ, Gomes ATPC, Neves MGPMS, Faustino MAF, et al. Advances in aPDT based on the combination of a porphyrinic formulation with potassium iodide: Effectiveness on bacteria and fungi planktonic/biofilm forms and viruses. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2019;23(4–5):534–45. doi: 10.1142/S1088424619500408.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi.* 2020;6(1):1–28. doi: 10.3390/jof6010015.

Vila TVM, Quintanilha NS, Rozental S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms in vitro. *J Med Microbiol.* 2015;64(11):1436–49. doi: 10.1099/jmm.0.000175.

Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013a;69(1):137–43. doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.006. PMID: 23201354.

Wan T, Wang Z, Luo Y, Zhang Y, He W, Mei Y, et al. FA-97, a New synthetic caffeic acid phenethyl ester derivative, protects against oxidative stress-mediated neuronal cell apoptosis and scopolamine-induced cognitive impairment by activating Nrf2/HO-1 Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019. doi: 10.1155/2019/8239642. PMID: 31885818.

Zaitone SA, Ahmed E, Elsherbiny NM, Mehanna ET, El-Kherbetawy MK, ElSayed MH, et al. Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy. *Pharmacol Reports.* 2019;71(1):32–41. doi:

10.1016/j.pharep.2018.08.004. PMID: 30368226.

Zawrotniak M, Bochenska O, Karkowska-Kuleta J, Seweryn-Ozog K, Aoki W, Ueda M, et al. Aspartic proteases and major cell wall components in *Candida albicans* trigger the release of neutrophil extracellular traps. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(SEP):1–21. doi: 10.3389/fcimb.2017.00414. PMID: 28983472.

Zhang LF, Yang DJ, Chen HC, Sun R, Xu L, Xiong ZC, et al. An ionically crosslinked hydrogel containing vancomycin coating on a porous scaffold for drug delivery and cell culture. *Int J Pharm*. 2008;353(1–2):74–87. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.11.023. PMID: 18162343.

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

Zhang N, Li X, Ye J, Yang Y, Huang Y, Zhang X, et al. Effect of gellan gum and xanthan gum synergistic interactions and plasticizers on physical properties of plant-based enteric polymer films. *Polymers (Basel)*. 2020;12(1):1–13. doi: 10.3390/polym12010121.

Zhang Q, Qin S, Xu X, Zhao J, Zhang H, Liu Z, et al. Inhibitory Effect of *Lactobacillus plantarum* CCFM8724 towards *Streptococcus mutans* - and *Candida albicans* - Induced Caries in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020. doi: 10.1155/2020/4345804. PMID: 33414892.

Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother*. 2018;99(January):883–93. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.146. PMID: 29710488.

Zhao X, Wang Z. A pH-sensitive microemulsion-filled gellan gum hydrogel encapsulated apigenin: Characterization and in vitro release kinetics. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;178(October 2018):245–52. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.015. PMID: 30875583.

Zhu G, Guo N, Yong Y, Xiong Y, Tong Q. Effect of 2-deoxy-d-glucose on gellan gum biosynthesis by *Sphingomonas paucimobilis*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2019;42(5):897–900. doi: 10.1007/s00449-019-02078-w. PMID: 30671627.

Zimmermann ES, Ferreira LM, Denardi LB, Sari MHM, Cervi VF, Nogueira CW, et al. mucoadhesive gellan gum hydrogel containing diphenyl diselenide-loaded nanocapsules presents improved anti-candida action in a mouse model of vulvovaginal candidiasis. *Eur J Pharm Sci*. 2021;167(July). doi: 10.1016/j.ejps.2021.106011. PMID: 34537375.

APÊNDICE A – Artigo publicado referente a tese



pharmaceutics



Article

Susceptibility of Dental Caries Microcosm Biofilms to Photodynamic Therapy Mediated by Fotoenticine

Maíra Terra Garcia ¹, Rafael Araújo da Costa Ward ¹, Nathália Maria Ferreira Gonçalves ¹,
Lara Luise Castro Pedroso ¹, José Vieira da Silva Neto ², Juliana Ferreira Strixino ³ and Juliana Campos Junqueira ^{1,*}

¹ Department of Biosciences and Oral Diagnosis, Institute of Science and Technology/ICT, São Paulo State University /UNESP, São José dos Campos 12245-000, Brazil; maira.garcia@unesp.br (M.T.G.); r.ward@unesp.br (R.A.d.C.W.); nmf.goncalves@unesp.br (N.M.F.G.); lara.luise@unesp.br (L.L.C.P.)

² Associate Laboratory of Sensors and Materials/LABAS, National Institute for Space Research, São José dos Campos 12227-010, Brazil; jose.v.silva@inpe.br

³ Photobiology Applied to Health, Research and Development Institute IP&D, University of Vale do Paraíba/ UNIVAP, São José dos Campos 12244-390, Brazil; juferreira@univap.br

* Correspondence: juliana.junqueira@unesp.br

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111907>

ANEXO A – Comitê de ética

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

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR FOTOENTICINE® SOBRE *Streptococcus mutans* E BIOFILME MICROCOSMO ORAL

Pesquisador: Maira Terra Garcia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26421819.1.0000.0077

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

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.397.783

Apresentação do Projeto:

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido considerada um tratamento promissor para o controle da cárie dentária, entretanto existe a necessidade do desenvolvimento de novos fotossensibilizadores com maior eficácia antimicrobiana. Em estudo anterior, nosso grupo de pesquisa verificou que a TFD mediada por Fotoenticine®, um fotossensibilizador derivado da clorina recentemente sintetizado, foi capaz de inibir significativamente o