

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA INTEGRADO DE DOUTORADO EM ODONTOLOGIA UFPB/UFBA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ESTOMATOLOGIA**

**Andréa Sarmiento Queiroga**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA SOBRE A INATIVAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO  
*Candida*: ESTUDO *IN VITRO***

**JOÃO PESSOA  
2010**

**Andréa Sarmento Queiroga**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA SOBRE A INATIVAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO  
*Candida*: ESTUDO *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa Integrado de Doutorado em Odontologia UFPB/UFBA em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Estomatologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Junior

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edeltrudes de Oliveira Lima

**JOÃO PESSOA  
2010**

**Andréa Sarmiento Queiroga**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA  
SOBRE A INATIVAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*: ESTUDO *IN*  
*VITRO***

Tese apresentada ao Programa Integrado de  
Doutorado em Odontologia UFPB/UFBA em  
cumprimento às exigências para obtenção do  
título de Doutor em Odontologia. Área de  
concentração: Estomatologia.

Aprovada em: 19 de agosto de 2010

---

Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aparecida Maria Cordeiro Marques  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marleny Elizabeth M.M. Gerbi  
Universidade de Pernambuco – UPE

---

Prof. Dr. Fabiano Gonzaga Rodrigues  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Lemos C. Rodrigues  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

## DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Roque e Terezinha** que sempre me incentivaram em tudo, não medindo esforços para ver-me feliz. Agradeço a Deus a benção de ter me presenteado com pais tão maravilhosos, que com suas atitudes me ensinaram o caminho de uma vida honesta, justa e feliz.

**Ao meu noivo Roberto**, que está sempre do meu lado, apoiando-me e dedicando-me todo o amor e carinho. Obrigada pela compreensão deste momento tão difícil e importante pelo qual passamos e por me incentivar com seu amor!

**Aos meus irmãos Amanda e Alexandre**, tive a sorte de ter como irmãos verdadeiros amigos. Tenho certeza que posso contar com o apoio de vocês a qualquer instante.

**ESSA CONQUISTA TAMBÉM É DE VOCÊS!**

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus**, que está sempre junto de mim inspirando-me e dando-me inteligência e força para superar qualquer obstáculo.

**Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior**, pela orientação deste trabalho e pelos conhecimentos compartilhados desde minha vida acadêmica. Obrigada por me orientar no caminho do conhecimento, da dedicação, do desempenho e da atuação clínica sempre com muito carinho, paciência e ética. Por mais que expresse, minhas palavras não seriam capazes de traduzir a gratidão e o respeito que tenho pela sua pessoa.

**A Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima**, pela co-orientação deste trabalho e por toda paciência, carinho e dedicação em me ensinar a trabalhar no laboratório. A senhora é um exemplo de pessoa, professora e pesquisadora.

**A Profa. Dra. Heloísa Helena P. Veloso** por todos os conhecimentos compartilhados, pelas oportunidades a mim concedidas e por torcer pelo meu sucesso. Você é exemplo de que o sucesso vem com dedicação e amor ao que fazemos.

**A Jussara Chaves**, minha cunhada e amiga, por não medir esforços em me ajudar com a formatação de meus trabalhos e aulas e por me fazer rir sempre com seu humor contagiante. Obrigada cunhada!

**A amiga Isabel Vasconcelos** por toda ajuda com a análise estatística deste trabalho.

**As minhas amigas Maysa, Geovanna, Renata, Carolina, Gimena, Ana Carolina, Roseane, Nadja, Priscila e Luciana** pelo incentivo e por estarem sempre dispostas a me ajudarem no que for preciso.

**Aos meus colegas de doutorado, Airton, Giliara Carol, João Frank, Betânia, Danilo e em especial Késia, Ana Karine e Ana Carolina** pelo excelente convívio e amizade desenvolvida nesses dois anos de doutorado.

**A todos os professores do Programa de Pós – Graduação em Odontologia da UFPB** pelo incentivo e apoio durante todas as atividades do doutorado.

**Ao Vinícius Trajano, aluno do Programa de Pós-Graduação em produtos sintéticos e bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmecêutica da UFPB** por todo o auxílio e conhecimentos compartilhados durante a realização do experimento. Muito obrigada Vinícius. Sem a sua ajuda eu não teria conseguido.

**A acadêmica de Odontologia da UFPB Fernanda,** pela indispensável colaboração durante a fase experimental do trabalho.

**As funcionários do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB: Jaqueline e Raíssa** por estarem sempre dispostas a nos ajudar.

**À CAPES,** pelos recursos financeiros

## EPÍGRAFE

“ Mas é preciso ter **manha**

É preciso ter **graça**

É preciso ter **sonho** sempre

Quem traz na pele essa marca

Possui a estranha mania

De ter **fé** na vida...”

**Fernando Brant e Milton Nascimento**

## RESUMO

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota comensal da cavidade bucal da maioria dos indivíduos saudáveis.. A emergência de novas espécies de *Candida* e a seleção de linhagens tolerantes aos antifúngicos convencionais estimula o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por espécies de *Candida*. Nesse contexto destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD) que é capaz de eliminar células fúngicas através da administração de uma substância fotosensibilizadora seguido da aplicação de luz em comprimento de onda visível e compatível. Este estudo avaliou, *in vitro*, a eficácia da TFD na fotoinativação de espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii*) por meio do agente fotossensibilizador azul de metileno (150µg/ml) e da irradiação com um Diodo Laser (660nm, 40mW)). Inicialmente os microrganismos avaliados foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido e incubados *overnight* a 37°C. Em seguida foram obtidas suspensões celulares contendo 10<sup>6</sup> ufc/ml, as quais foram transferidas para placas de 96 orifícios e expostas a 03 doses de luz Laser (Grupo1- 60J/cm<sup>2</sup> (2,4J), Grupo2- 120J/cm<sup>2</sup> (4,8J), Grupo 3-180J/cm<sup>2</sup> (7,2J). Suspensões adicionais foram tratadas apenas com o fotossensibilizador, apenas com a luz Laser ou com solução salina 0,85% (grupos controle). Cada condição experimental foi realizada 2 vezes. Após a aplicação dos tratamentos, alíquotas de 1µl das suspensões foram plaqueadas em Agar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48h e após esse período foi realizada a contagem das colônias (ufc/ml). As três doses avaliadas determinaram inativação significativa de *Candida spp.* ( $p < 0,05$ ). A dose de 180J/cm<sup>2</sup> foi a mais eficaz, inativando 78% das ufc seguida pelas doses de 120J/ cm<sup>2</sup> e 60J/cm<sup>2</sup> com inativação média de 62% e 42% respectivamente. Não foi verificada diferença estatística significativa entre as taxas de inativação de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* nas doses de 60 J/cm<sup>2</sup> e 120 J/cm<sup>2</sup> ( $p > 0,05$ ). No entanto, na dose de 180 J/cm<sup>2</sup> *C. albicans* foi a espécie mais susceptível aos efeitos da TFD. Conclui-se que a terapia fotodinâmica (PDT) demonstrou efetividade na inativação de *Candida spp.*

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica. *Candida*. Azul de metileno. Laser.

## ABSTRACT

*Candida* species are part of the commensal microbiota of the oral cavity of most healthy individuals. The emergence of new species of *Candida* and the selection of lines tolerant to conventional antifungal agents stimulates the development of new therapies for the treatment of infections caused by species of *Candida*. In this context stands the photodynamic therapy (PDT) which is capable of killing fungal cells by administration of a photosensitizing substance followed by the application of light in the visible wavelength. This study evaluated, *in vitro*, the efficacy of PDT in photoinactivation of *Candida* species (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. guilhermondii*) using the photosensitizing agent methylene blue (150µg/ml) and irradiation with a diode laser operating in the visible red (λ660nm, 40mW). Initially, the tested microorganisms were inoculated in test tubes containing liquid culture medium and incubated overnight at 37°C. Then cell suspensions were obtained containing 10<sup>6</sup> cfu / ml. These suspensions were transferred to 96-holes plates and exposed to 03 doses of laser light (Group 1- 60J/cm<sup>2</sup> (2,4J), Group 2- 120J/cm<sup>2</sup> (4,8J), Group 3-180J/cm<sup>2</sup> (7,2J)). Additional suspensions were treated with only the photosensitizer, with only the laser light or with 0.85% saline (control group). Each experimental condition was performed twice. After the treatments, 1µl aliquots of the suspensions were plated on Sabouraud Dextrose Agar. The plates were incubated at 37°C for 24-48h and after this period there was the counting of colonies (cfu / ml). The three doses evaluated determined significant inactivation of *Candida spp.* (P <0.05). The 180J/cm<sup>2</sup> dose was the most effective, inactivating 78% of cfu/ml followed by doses of 120J/ cm<sup>2</sup> and 60J/cm<sup>2</sup> with inactivation average of 62% and 42% respectively. A statistically significant difference between the rates of inactivation of *C. albicans*, *C.krusei*, *C. tropicalis* and *C. guilhermomdii* at doses of 60 J/cm<sup>2</sup> and 120 J/cm<sup>2</sup> (p> 0.05) was not verified. However, at a dose of 180 J/cm<sup>2</sup> *C. albicans* was the most susceptible species to the effects of PDT. We conclude that photodynamic therapy (PDT) has demonstrated effectiveness in the inactivation of *Candida spp.*

**Keywords:** Photodynamic therapy. *Candida*. Methylene blue. Laser.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                 |    |
|-------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Irradiação das amostras ..... | 56 |
| <b>Figura 2</b> – Semeadura em placas.....      | 57 |
| <b>Figura 3</b> – Contagem de ufc .....         | 57 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - ufc/ml de <i>Candida spp.</i> após aplicação da TFD com Laser na dose de 60J/cm <sup>2</sup> .....                                                                                                                                          | 60 |
| <b>Tabela 2</b> - ufc/ml de <i>Candida spp.</i> após aplicação da TFD com Laser na dose de 120J/cm <sup>2</sup> .....                                                                                                                                         | 61 |
| <b>Tabela 3</b> - ufc/ml de <i>Candida spp.</i> após aplicação da TFD com Laser na dose de 180J/cm <sup>2</sup> .....                                                                                                                                         | 61 |
| <b>Tabela 4</b> - Taxa de inativação de ufc/ml de <i>Candida spp.</i> após aplicação da TFD com Laser nas doses de 60J/cm <sup>2</sup> , 120J/cm <sup>2</sup> e 180J/cm <sup>2</sup> .....                                                                    | 62 |
| <b>Tabela 5</b> - Taxa de inativação de ufcs/ml de <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. guilhermodii</i> após aplicação da TFD com Laser nas doses de 60J/cm <sup>2</sup> , 120J/cm <sup>2</sup> e 180J/cm <sup>2</sup> ..... | 64 |

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – ufc/ml de *Candida spp.* nos grupos submetidos a TFD e nos grupos-controle ..... 62
- Gráfico 2** – Taxa de inativação de ufc/ml de *Candida spp.* após aplicação da TFD nas doses de 60 J/cm<sup>2</sup>, 120 J/cm<sup>2</sup> e 180 J/cm..... 63
- Gráfico 3** – Percentual de inativação de ufc/ml das espécies de *Candida* avaliadas ..... 64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                       |                                                                                                                |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AIDS</b>           | síndrome da imunodeficiência adquirida                                                                         |
| <b>ALA</b>            | ácido 5- aminolevulínico                                                                                       |
| <b>AM</b>             | azul de metileno                                                                                               |
| <b>ASD</b>            | agar saboraud dextrose                                                                                         |
| <b>AT</b>             | azul de toluidina                                                                                              |
| <b>BHI</b>            | brain and heart infusion                                                                                       |
| <b>cm<sup>2</sup></b> | centímetro quadrado                                                                                            |
| <b>DNA</b>            | ácido desoxirribonucléico                                                                                      |
| <b>EROS</b>           | espécies reativas de oxigênio                                                                                  |
| <b>FS</b>             | fotossensibilizador                                                                                            |
| <b>GaAIAs</b>         | arseneto de Gálio e Alumínio                                                                                   |
| <b>HeNe</b>           | hélio - neônio                                                                                                 |
| <b>InGaAlP</b>        | fosfeto de de índio-gálio-alumínio                                                                             |
| <b>J</b>              | joule                                                                                                          |
| <b>L</b>              | litro                                                                                                          |
| <b>LASER</b>          | Light Amplification By Stimulated Emission of Radiation Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação |
| <b>LED</b>            | Light Emmiting Diode (Diodo Emissor de Luz)                                                                    |
| <b>Log</b>            | logaritmo                                                                                                      |
| <b>MG</b>             | miligrama                                                                                                      |
| <b>ml</b>             | mililitro                                                                                                      |
| <b>mW</b>             | miliwatts                                                                                                      |
| <b>nm</b>             | nanômetro                                                                                                      |

|              |                                                                                         |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PhBPs</b> | phenothiazinium based photosensitisers ( fotossensibilizadores baseados na fenotiazina) |
| <b>TFD</b>   | terapia fotodinâmica                                                                    |
| <b>TFDA</b>  | terapia fotodinâmica antimicrobiana                                                     |
| <b>ufc</b>   | unidades formadoras de colônias                                                         |
| <b>W</b>     | Watts                                                                                   |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                |                     |
|----------------|---------------------|
| $\text{O}^2$   | oxigênio molecular  |
| %              | por cento           |
| $\lambda$      | comprimento de onda |
| $^1\text{O}_2$ | oxigênio singleto   |
| ®              | Marca registrada    |
| °C             | graus Celsius       |

## SUMÁRIO

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 Introdução</b>                                                               | 19 |
| <b>2 Revisão da literatura</b>                                                    | 23 |
| 2.1 <i>Candida spp.</i> e candidose                                               | 23 |
| 2.2 Terapia fotodinâmica                                                          | 28 |
| 2.3 Terapia fotodinâmica antimicrobiana                                           | 31 |
| 2.4 Fotossensibilizadores                                                         | 35 |
| 2.5 Fontes de luz                                                                 | 39 |
| 2.6 Terapia fotodinâmica e inativação de<br><i>Candida spp.</i>                   | 41 |
| <b>3 Objetivos</b>                                                                | 51 |
| 3.1 Objetivo geral                                                                | 51 |
| 3.2 Objetivos específicos                                                         | 51 |
| <b>4 Materiais e métodos</b>                                                      | 53 |
| 4.1 Delineamento                                                                  | 53 |
| 4.2 Considerações éticas                                                          | 53 |
| 4.3 Local do estudo                                                               | 53 |
| 4.4 Instrumentos                                                                  | 53 |
| 4.4.1 Espécies fúngicas                                                           | 53 |
| 4.4.2 Meio de cultura                                                             | 54 |
| 4.4.3 Laser                                                                       | 54 |
| 4.4.4 Fotossensibilizador                                                         | 54 |
| <b>4.5 Procedimentos</b>                                                          | 55 |
| 4.5.1 Preparo da suspensão das leveduras                                          | 55 |
| 4.5.2 Condições experimentais avaliadas                                           | 55 |
| 4.5.3 Contagem das unidades formadoras<br>e colônias                              | 58 |
| <b>4.6 Análise Dos Dados</b>                                                      | 58 |
| <b>5 Resultados</b>                                                               | 61 |
| 5.1 Aplicação da terapia fotodinâmica com<br>Laser na dose de 60J/cm <sup>2</sup> | 61 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2 Aplicação da terapia fotodinâmica com<br>Laser na dose de 120J/cm <sup>2</sup> .....                                                                                                                                                                              | 61 |
| 5.3 Aplicação da terapia fotodinâmica com<br>Laser na dose de 180J/cm <sup>2</sup> .....                                                                                                                                                                              | 62 |
| 5.4 Taxa percentual de inativação das<br>ufc/ml de <i>Candida spp.</i> após aplicação<br>da TFD com laser nas doses de<br>60J/cm <sup>2</sup> , 120J/cm <sup>2</sup> e 180J/cm <sup>2</sup> .....                                                                     | 63 |
| 5.5 Taxa percentual de inativação de ufc/ml<br>de <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> e<br><i>C. guilhermodii</i> após aplicação da TFD<br>com Laser nas doses de 60J/cm <sup>2</sup> ,<br>120J/cm <sup>2</sup> e 180J/cm <sup>2</sup> ..... | 64 |
| <b>6 Discussão</b> .....                                                                                                                                                                                                                                              | 67 |
| <b>7 Conclusão</b> .....                                                                                                                                                                                                                                              | 74 |
| <b>Referências</b> .....                                                                                                                                                                                                                                              | 76 |
| <b>Anexos</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 92 |
| ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em<br>Pesquisa.....                                                                                                                                                                                                              | 93 |

## *INTRODUÇÃO*

## 1 Introdução

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota comensal da cavidade bucal da maioria dos indivíduos saudáveis. Entretanto, na presença de fatores predisponentes podem se tornar patogênicas, produzindo infecções que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas (DEREPENTIGNY et al., 2000, LEUNG et al., 2000).

Os fatores que predispoem à infecção por *Candida* podem ser classificados em: fatores intrínsecos ou próprios do hospedeiro, como neoplasias, diabetes, hemopatias diversas, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e todas as condições que alteram a imunidade celular, como a velhice, gravidez, prematuridade, entre outros; fatores extrínsecos, como antibioticoterapia, corticoidoterapia, cirurgia de transplantes e ambientes hospitalares contaminados (GOMPERTZ et al., 2008).

A infecção da cavidade bucal por *Candida spp.* denominada de candidose é uma infecção significativa em pacientes submetidos à terapia antineoplásica (quimioterapia e radioterapia) bem como em pacientes imunocomprometidos em decorrência de infecção pelo vírus HIV (CORMICK, 2009). É considerada uma das infecções oportunistas mais comumente observadas em pacientes portadores de AIDS e, quando não corretamente tratada e prevenida, pode contribuir consideravelmente para a mortalidade desses pacientes (SARAMANAYAKE, 1992; THULER et al., 1998).

O tratamento da candidose com agentes antifúngicos como os derivados poliênicos (nistatina e anfotericina B) ou com clotrimazol apenas resulta em uma melhora transitória do quadro, sendo a recorrência um problema comum especialmente quando está relacionado à deficiência do sistema imune do hospedeiro. Resultados mais promissores são obtidos com agentes antifúngicos sistêmicos como o cetoconazol, fluconazol e itraconazol, no entanto, estes fármacos provocam efeitos colaterais indesejáveis como diarreia, náusea, vômito e efeitos hepatotóxicos e desenvolvimento de resistência microbiana (NEVILLE et al., 2004; WILSON; MIA, 1993).

A terapia antifúngica é limitada a um grupo restrito de medicamentos quando comparada com a terapia antibiótica. Frequentemente, os tratamentos são

prolongados e efeitos colaterais bem como interações medicamentosas são comuns. Além disso, a incidência de resistência aos agentes antifúngicos tem crescido havendo o aparecimento de cepas resistentes causando infecções em pacientes de alto risco como os pacientes HIV positivos (DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008)

O aumento de casos de infecções causadas por cepas de *Candida* e conseqüentemente a utilização excessiva de antimicrobianos, favoreceu nas últimas décadas a resistência dessas leveduras aos agentes antifúngicos convencionais (PINTO; WEIKERT-OLIVEIRA; LYON, 2008). Esses agentes antifúngicos demonstram efeito mais fungistático do que fungicida, resultando em uma profilaxia inadequada (DONNELLY et al., 2007).

Frente às limitações da terapia antifúngica convencional, torna-se importante o estudo de terapias alternativas para tratar as infecções causadas por estes microrganismos como a terapia fotodinâmica (TFD). Esta técnica foi originalmente desenvolvida para o tratamento de lesões cancerosas e vem sendo aplicada com sucesso na área da Oncologia, promovendo danos irreversíveis nas células do tecido neoplásico (MACHADO, 2000).

A terapia fotodinâmica (TFD) baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda específico. Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador (FS) ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singlete. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; LAMBRECHTS et al., 2005)

As espécies reativas de oxigênio geradas na TFD são citotóxicas para a célula alvo, causando desordens na parede celular e danos ao DNA (MACHADO, 2000; ROMANOVA et al., 2003), levando à morte do microrganismo. Adicionalmente, a TFD apresenta efeitos colaterais mínimos, ausência de reações sistêmicas, baixo custo e não leva a seleção de cepas resistentes (GARCEZ et al., 2003).

Alguns estudos têm demonstrado o potencial da TFD na inativação microbiana, incluindo alguns tipos de vírus, bactérias e fungos (MACHADO, 2000). É

possível observar na literatura que vários compostos químicos como as fototiazinas (azul de metileno e azul de toluidina), derivados da hematoporfirina (Photofrin, Photogem e Photosan), porfirinas catiônicas e ácido 5-aminolevulínico têm sido utilizados associados a diferentes fontes de luz como os Laseres e os Diodos Emissores de Luz (LED) na tentativa de inativar os microrganismos (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; DONNELLY et al., 2007, 2008; DOVIGO, 2007; JUNQUEIRA et al., 2009; LAMBRECHTS, 2005).

Dentre os compostos químicos utilizados como fotossensibilizador (FS) destaca-se o azul de metileno (AM) porque além de, apresentar baixa toxicidade, ausência de efeitos sistêmicos e ser de fácil aplicação, é um fotossensibilizador de baixo custo (GARCEZ et al., 2003; TEICHERT et al., 2002). O AM apresenta absorção máxima de luz na região do vermelho (pico de absorção em 665nm) que corresponde ao comprimento de onda emitido pelos diodo lasers que emitem luz no espectro vermelho. Sendo assim, esse FS deve ser associado a esta fonte de luz na tentativa de fotoinativar microrganismos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana da TFD na inativação de cepas de *Candida spp.* submetidas a TFD com azul de metileno e diodo Laser de Índio-Gálio-Alumínio-Fóforo (InGaAlP).

*REVISÃO DA LITERATURA*

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Candida* spp. e candidose

O fungo *Candida* pode ser encontrado em aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos saudáveis (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003) como um organismo comensal, não causando danos aparentes nem induzindo inflamação nos tecidos adjacentes (AKPAN; MORGAN, 2002; DONGARI-BAGTZPCLOU; FIDEL, 2005; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). Contudo, sob certas condições predisponentes, o fungo pode multiplicar-se, tornando-se patogênico, e penetrar nos tecidos do hospedeiro causando inflamação e destruição tecidual (DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005; KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006).

O gênero *Candida* apresenta espécies frequentemente denominadas dimórficas, pois dependendo das condições ambientais, como pH, temperatura e reservas nutricionais, alteram seu fenótipo, passando de blastoconídeos para crescimento micelial, devido à formação de pseudohifas. Também podem se desenvolver como hifas verdadeiras e clamidoconídeos. É caracterizada primariamente pela morfologia colonial em meio de cultura Agar Sabouraud, formação de tubo germinativo, assimilação de carbono e capacidade fermentativa. Seu crescimento é favorecido em temperaturas variando de 20°C a 38°C. O pH ácido favorece sua proliferação, sendo que a faixa ideal de pH para seu crescimento varia de 2,5 até 7,5. As células leveduriformes são de formato esférico, medindo 3 a 5µm de diâmetro (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas, mas somente 10% estão relacionadas a doenças nos seres humanos (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). Na cavidade bucal humana, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas; dentre estas, nove espécies do gênero *Candida* foram consideradas patogênicas: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata* (MCINTYRE, 2001). A espécie *C. dubliniensis* tem sido descrita mais recentemente com o advento da AIDS e possui características fenotípicas e genotípicas semelhantes às de *C. albicans*.

(CHAVASCO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2004). Deve ser ressaltada a importância das leveduras do gênero *Candida* em relação às infecções hospitalares. *C.albicans* e outras espécies do gênero em particular, *C.tropicalis* e *C. parapsilosis*, são importantes patógenos responsáveis por quadros de candidemias (infecções sanguíneas) nos hospitais, estimando-se em 10% a 12% seu valor sobre todas as infecções (GOMPERTZ et al., 2008).

Dentre as espécies deste gênero, *Candida albicans* é a mais frequentemente isolada em infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo (MIRANDA, 2007), sendo considerado o patógeno oportunista mais comum na espécie humana. Sua distribuição é ampla, podendo ser encontrada tanto no meio ambiente como fazendo parte da microbiota normal do homem, no trato gastrointestinal, mucosa bucal e vaginal (AKPAN; MORGAN, 2002; PAULA, 1998). É importante ressaltar que, apesar de *C.albicans* continuar sendo a principal causa de infecções, a proporção de atribuições destas a outras espécies tem aumentado consideravelmente (PONTON, 2000).

As leveduras do gênero *Candida* têm um potencial patogênico conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, variabilidade fenotípica ("switching") e a produção de toxinas e de enzimas como proteinases e fosfolipases (RIBEIRO et al., 2004). Mattheus (1994) destaca que o mecanismo "switching", de alta frequência e reversibilidade, presenciado nas leveduras do gênero *Candida*, conduz a alterações morfológicas das colônias fúngicas e das propriedades de superfície celular, além de favorecer também mudanças na sensibilidade à drogas antifúngicas

A infecção causada por espécies de *Candida* é denominada de candidose e geralmente compromete a cavidade oral, o trato gastrointestinal, região perianal, unhas, endocárdio, pulmões, trato urinário, pele e vagina. As infecções podem permanecer localizadas ou podem disseminar-se. Das lesões localizadas, os microrganismos podem ser disseminados por via hemática ou diretamente. A partir da infecção inicial, em geral localizada no revestimento cutâneo da pele e na mucosa oral de um hospedeiro imunocomprometido, os fungos podem invadir vasos sanguíneos e disseminar-se por quase todas as áreas do organismo. A candidose superficial está entre as infecções mais comuns da pele e mucosas, e tanto a

candidose superficial como a profunda são problemas de saúde pública (OLIVEIRA, 2009).

Uma das formas de candidose orofaríngea frequente na prática clínica do cirurgião-dentista é a estomatite por dentadura que é definida como um processo inflamatório na mucosa subjacente a uma prótese total ou parcial removível, geralmente associada a presença do fungo *C. albicans* (COCO et al., 2008; FIGUEIRAL et al., 2007). Clinicamente, a estomatite por dentadura apresenta-se como uma doença recorrente, que afeta o palato de 11 a 67% dos usuários de prótese removível superior. É mais comum em mulheres e indivíduos imunocomprometidos e sua prevalência aumenta com a idade (FIGEUIRAL et al., 2007).

Vários fatores podem predispor a infecção por *Candida*, visto que é um microrganismo oportunistas. Dentre estes fatores destacam-se: hipossalivação, idade do indivíduo, uso de próteses dentárias, uso de fumo, má nutrição, antibioticoterapia, terapia hormonal, contigüidade na mucosa bucal, higiene bucal deficiente, diabetes, AIDS, imunodeficiências associadas com corticoterapia, quimioterapia, radioterapia, câncer, transplantes e leucopenia (ALMEID; SCULLY, 2002; DANILUK et al., 2006; KOGA-ITO; LYON; RESENDE, 2008; LYON; RESENDE, 2006). Os extremos do ciclo de vida humana, infância e velhice, constiuem as fases de existência do homem onde os relatos de ocorrência de candidose são mais propícios em decorrência do aprimoramento ou deficiência do sistema imune. (DONGARI-BAGTZOCLOU; FIDEL, 2005; RIBEIRO et al., 2004).

Alguns estudos reportam maior prevalência de espécies de *Candida* em portadores de síndrome de Sjogren, síndrome de Down, hipofunção de glândulas salivares, diminuição do fluxo ou do pH salivar, em portadores de diabete mellitus, pacientes HIV-positivos (sendo esta última considerada população de maior risco que as outras) e câncer em estágio avançado (CAMPISI et al., 2001; DAVIES et al., 2002; SPOLIDORIO et al., 2001; VARGAS; JOLY, 2002).

A candidose orofaríngea é extremamente comum em indivíduos portadores do vírus HIV, especialmente quando a quantidade de células CD4+é menor que 200 células por microlitro de sangue (DONGARI-BAGTAZOGLOU;FIDEL, 2005). Sabe-se que a susceptibilidade dos pacientes acometidos pelo HIV às infecções oportunistas depende do grau de imunossupressão do indivíduo. A combinação de drogas, incluindo agentes microbianos, corticóides e antiinflamatórios utilizados no

tratamento, pode desencadear a proliferação de várias espécies de leveduras, inclusive *Candida*. Nos pacientes com HIV, as lesões por *Candida* apresentam uma maior gravidade e resistência à terapia convencional, as lesões bucais são muito mais extensas e podem propagar-se por continuidade à faringe, laringe, esôfago e, mais raramente, disseminar-se por via hematogênica (GOMPERTZ et al., 2008; PAPPAS et al., 2006).

O tratamento das candidoses bucais é feito através do uso de agentes antimicóticos sintéticos tópicos e/ou sistêmicos. Em decorrência das características inerentes aos seres eucariotos, presenciadas tanto nos fungos como no hospedeiro humano, as drogas antifúngicas detêm, em sua maioria, baixa toxicidade seletiva. Isto ocasiona uma considerável redução do arsenal terapêutico antifúngico (RIBEIRO et al., 2004).

Os principais grupos de agentes antifúngicos, em uso com ação sobre espécies de *Candida*, compreendem os antibióticos poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os derivados azólicos, que possuem dois ou três átomos de nitrogênio no anel azólico e são denominados como imidazólicos (cetoconazol e miconazol) ou triazólicos (itraconazol, fluconazole voriconazol) (RIBEIRO et al., 2004).

A maioria dos agentes antifúngicos atua sobre os esteróis da membrana celular fúngica ou contra enzimas que regulam a síntese de ácidos nucleicos (URIZAR, 2002). Embora os agentes antifúngicos sejam eficazes, recorrências após a interrupção do tratamento são comuns em alguns pacientes. Além disso, o uso indiscriminado de antifúngicos tem proporcionado resistência adquirida nas espécies *C. albicans* e *C. não-albicans* (CITAK et al., 2005).

Os medicamentos de uso tópico, como a nistatina e o miconazol, são normalmente aplicados nos primeiros episódios de candidose de um paciente e se mostram efetivos para aliviar os sinais e sintomas clínicos da infecção associada à *Candida spp.* (BANTING; HILL, 2001). No entanto, esses medicamentos mostram resultados efêmeros, pois não eliminam completamente esses microrganismos (KONSBERG; AXELL, 1994). Essa deficiência ocorre devido à diminuição da concentração do agente tópico nos tecidos infectados associada aos efeitos diluentes da saliva e aos movimentos da língua (BANTING; HILL, 2001). Como consequência da reduzida ação do agente antifúngico tópico, a recolonização do microrganismo é frequente após o tratamento, o que leva a uma recidiva da infecção (MATHABA; DAVIES; WARMINGTON, 1995).

A medicação sistêmica é outra opção de tratamento, a qual é usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecção recorrentes (PEREZOUS et al., 2005). Nesses casos, medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B podem ser utilizados. A anfotericina B possui atividade fungicida *in vivo* e *in vitro* contra leveduras (*Candida spp* e *C. neoformans*) e fungos filamentosos (*Aspergillus spp.*), além dos fungos dimórficos, no entanto, sua formulação endovenosa limita o seu uso devido à alta toxicidade hepática, freqüentemente associada com disfunção renal (WHITE et al., 1998; PEREZOUS et al., 2005). Efeitos colaterais menos danosos e de mais fácil administração tornam as drogas azólicas mais atrativas (GHANNOUM; RICE, 1999; WHITE, 1998).

Outro aspecto importante a ser analisado na terapia com antifúngicos tópicos ou sistêmicos se refere à resistência que as espécies de *Candida* podem apresentar a esses medicamentos. A resistência das espécies de *Candida* ante aos antifúngicos vem se tornando um dos maiores problemas entre os indivíduos que utilizam esses agentes, especialmente o fluconazol, para o tratamento de infecções oportunistas (PEREZOUS et al., 2005). O uso indiscriminado dos azólicos na prevenção das micoses, especialmente sistêmicas, em pacientes com comprometimento imunológico (portadores do vírus HIV e transplantados) induziu à seleção de cepas resistentes a este procedimento terapêutico (MAHMOUD; LOUIS, 1999).

Apesar de a *C. albicans* ser considerada, na maioria dos casos, susceptível aos medicamentos do tipo azol, a persistência ou a recorrência da candidose após o tratamento com esses agentes não é incomum. Isso provavelmente ocorre em consequência da característica fungistática das drogas azóis, que não são capazes de eliminar totalmente o microrganismo (PEREZOUS et al., 2005). As espécies não-*albicans*, resistentes ao fluconazol compreendem *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C. Kefyr* e *C. krusei*. Além disso, espécies como *C.glabrata* e a *C. krusei* são intrinsecamente resistentes aos medicamentos antifúngicos e vêm sendo frequentemente isoladas de infecções (CARTLEDGE; MIDGLEY; GAZZARD, 1999; HUNTER et al., 1998; WHITE; MARR; BOWDEN, 1998). Colombo; Guimarães (2003) relataram que *C. krusei* é problemática pela sua resistência quase universal aos derivados azólicos (ex. fluconazol), podendo também ter reduzida suscetibilidade para outras alternativas terapêuticas e *C. tropicalis* comumente ao cetoconazol.

A resistência a drogas antifúngicas também está associada a fármacos mais recentes como a 5 – fluorcitosina (flusitosina) que tem sido utilizada contra *C. albicans* e *C. glabrata*, mas além da emergência de amostras resistentes um outro fator que limita o seu uso é o surgimento de depressão da medula óssea como reação adversa (GOMPERTZ et al., 2008; SILVA, 1997)

Também tem sido relatado que as espécies de *Candida* possuem a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência às drogas por meio de mutações genéticas nas células fúngicas. Dessa forma, após o uso prolongado de agentes antifúngicos, as células dos microrganismos expostos tendem a sofrer modificações que resultam em menor susceptibilidade aos medicamentos. De acordo com Sanguineti et al. (2005), os principais mecanismos de resistência da *Candida* aos medicamentos do tipo azol incluem mutações genéticas na enzima alvo da célula fúngica e a diminuição da captação do antifúngico para o interior da célula.

A eficácia da terapêutica antifúngica depende diretamente da precocidade do diagnóstico, assim como do estado imunológico do paciente. Portanto, pacientes com depressão do sistema imunológico podem não responder satisfatoriamente ao tratamento independentemente das propriedades do antifúngico utilizado (COSTA et al., 1999; PINTO, 2003;).

As dificuldades impostas pelo surgimento da resistência microbiana associadas ao crescente número de pacientes imunocomprometidos e às limitações das drogas atualmente disponíveis para o tratamento da candidose eleva o grau de atenção a infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* e estimula o desenvolvimento de pesquisas que busquem terapias alternativas para o tratamento destas infecções.

## 2.2 Terapia fotodinâmica

O termo terapia fotodinâmica foi usado pela primeira vez por fisiologistas alemães, no início do século XX, para descrever danos em tecidos vivos, provocados pela combinação de três fatores: fotossensibilizador, luz e oxigênio (STRAKHOVSKAYA; ZHUKHOVITSKII; MIRONOV, 2002). A técnica tem sido

empregada no tratamento de uma ampla variedade de doenças nos últimos 15 anos (DOS SANTOS; ERIKSSON, 2006).

O conceito de terapia fotodinâmica é a indução de fototoxicidade letal nas células alteradas através de uma fonte de luz, um fármaco fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). Nesta terapia, moléculas do FS no estado excitado mediam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) que por sua vez induzem ao processo de destruição oxidativa causando desintegração estrutural e inibição de atividades funcionais de estruturas celulares e como consequência a inativação celular é observada (STRAKHOVSKAYA et al., 2002)

Durante a TFD, o FS presente na célula é ativado com a presença de luz. Essa ativação leva o FS do estado fundamental ao estado excitado chamado tripleto. Na etapa posterior, as moléculas do FS podem retornar ao estado fundamental emitindo energia, através da liberação de fótons ou progredir na cadeia de reações químicas. (BONINI, 2006).

A interação do FS no estado excitado com o meio pode ocorrer em duas formas, descritas como reações do tipo I e do tipo II. Na reação do tipo I ocorre a transferência de energia do FS excitado a um substrato oxidável. A transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio gera um radical no substrato semi-oxidado e corante semi-reduzido. A subsequente reação de ambos com o oxigênio levam à formação de substrato oxidado, à volta do FS ao estado fundamental e a produção de espécies reativas de oxigênio (MARTIN; LOGSDON, 1987). Na reação do tipo II, o estado tripleto do FS transfere sua energia de excitação para o oxigênio molecular no estado fundamental, a molécula resultante é então o oxigênio singleto, que é um poderoso agente oxidante e altamente tóxico para as células. Sendo assim, os FSs, sob iluminação com comprimento de onda compatível para o seu pico de absorção, são excitados para promover a produção de espécies reativas de oxigênio. As subseqüentes reações das EROs no meio biológico resultam em inativação das células-alvo através de reações de óxido-redução com lipídeos da membrana celular, ácidos nucleicos e proteínas. A iluminação precisa da área alvo aumenta a seletividade da terapia, uma vez que somente na área impregnada com o FS e irradiada com a fonte de luz é que ocorre o efeito fotodinâmico (WAINWRIGHT, 1998).

As EROs podem atuar em diferentes componentes celulares e, usualmente, por sua alta reatividade atuam sobre o componente mais próximo. Os danos

causados em microrganismos podem ser intercalação do FS com DNA e posterior oxidação da base guanina, peroxidação de lipídeos das membranas plasmáticas, inibição da síntese de proteínas por danos a estruturas celulares. Todos esses danos são causados pela oxidação ou redução dos componentes celulares, ou pela formação de espécies radicalares (MAISCH, 2007).

Os tipos de reações com o FS podem ocorrer simultaneamente e de forma competitiva, e a razão entre elas é influenciada pelas características do FS, substratos intracelulares e concentração de oxigênio no meio celular (SIBATA et al., 2000).

Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas é influenciada pelas características do FS, substratos intracelulares e concentração de oxigênio do meio. Na ausência de oxigênio, o efeito é praticamente inexistente. Em condições de anóxia tecidual ou concentração de oxigênio inferior a 2%, as células tumorais se mostram resistentes à citotoxicidade induzida pela TFD (GOMER; RAZUM, 1984; GROSSMAN, 1997; TOREZAN, 2000).

O fotoproceto do tipo II é geralmente aceito como o principal mecanismo de dano foto-oxidativo na célula microbiana. Um FS com suficiente população de estado tripleto e disponibilidade de oxigênio tem o potencial de causar dano numa variedade de biomoléculas por um ou ambos os mecanismos (HARRIS; CAHTFDIELD; PHOENIX, 2006).

A produção de oxigênio singlete é o mecanismo mais importante para a TFD, porém outro importante mecanismo já comprovado, é a indução da morte celular por apoptose (morte celular programada), que pode ocorrer via mitocondrial ou por alteração da membrana plasmática, através da inibição das proteínas da família Bcl-2 (inibidoras da apoptose celular) e ativação das caspases (proteínas iniciadoras e executoras da apoptose). A droga excitada por si só, é um agente reativo dentro da célula, destruindo vários substratos celulares importantes (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002).

Os principais alvos para TFD em células de mamíferos são lisossomos, mitocôndrias e membranas plasmáticas, enquanto que em células microbianas o dano à membrana externa desempenha um papel importante, pois pode impedir o dano ao DNA. Os sítios ricos em elétrons, presentes nas células-alvo, tendem a serem os mais facilmente modificados, como por exemplo, a guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxôfre, ligações duplas

de esteróides e lipídeos insaturados. Isso resulta em danos à parede celular, mitocôndria, e lisosomos, comprometendo a integridade celular. Nenhum efeito mutagênico sobre as células sadias tem sido reportado, o que amplia a segurança de aplicação dessa modalidade terapêutica (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004)

A TFD tem sido aplicada com sucesso no tratamento de neoplasias malignas, particularmente em tumores da região de cabeça e pescoço e também na fotoinativação de bactérias, vírus e fungos (SIMPLICIO MAIONCHI; HIOKA, 2002; STENSTROM et al., 1980; TEICHERT et al., 2002; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; WILLIAMS et al., 2003; WILSON; MIA, 1993). A TFD também representa uma modalidade terapêutica potencialmente aplicável para o tratamento da doença periodontal e da cárie (CHAN; LAI, 2003; CHONDROS et al., 2008; KOMERIK et al., 2003; KRESPI et al., 2005; PAULINO et al., 2005)

### 2.3 Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A primeira demonstração da fotoinativação de células microbianas foi descrita por Oscar Raab, no ano de 1900 em Munique, em que era estudante de medicina, durante seus estudos com acridina no tratamento da malária e constatou a morte de infusória, uma espécie de paramécio, quando exposta a certos comprimentos de onda da luz na presença de vermelho de acridina (RAAB 1900, apud BONINI, 2006). Mais tarde, Von Tappeiner relatou que esses efeitos tóxicos não se deviam apenas à presença de luz, demonstrou a necessidade da presença de oxigênio e criou o termo “reação fotodinâmica” (PERUSSI, 2007).

A inativação fotodinâmica de microrganismos baseia-se no princípio de que, se um microrganismo demonstra seletividade por um determinado corante, que também é FS, deve ser possível destruí-lo expondo-o à luz após a aplicação do corante (WAINWRIGHT, 2000). A aplicabilidade desta técnica foi demonstrada em bactérias, vírus e protozoários bem antes da segunda guerra, mas foi abandonada devido à popularização das sulfonamidas e da penicilina. O retorno da aplicação antimicrobiana de FSs na última década é resultado de dois fatores: a disseminação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) devido ao HIV e o enorme

crescimento das infecções hospitalares devido às bactérias resistentes aos fármacos (PERUSSI, 2007)

A emergência de doenças infecciosas resistentes aos tratamentos convencionais estimulou o desenvolvimento de estudos objetivando o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a inativação de microrganismos patogênicos. A TFD parece oferecer muitas vantagens para o tratamento de infecções originadas por microrganismos, tais como um amplo espectro de ação, a inativação de microrganismos resistentes e o baixo potencial mutagênico nas células expostas. A TFD tem se mostrado capaz de promover atividades citotóxicas contra uma grande variedade de bactérias, fungos e protozoários. No entanto, a foto-inativação de fungos parece ser mais difícil de ser atingida, devido ao maior tamanho celular desses microrganismos, que exige uma maior quantidade de oxigênio singleto para que a inativação celular ocorra, em comparação com bactérias. Particularmente no caso da candidose, a aplicação tópica de FS associada à luz para a inativação microbiológica parece oferecer um importante avanço para o tratamento de pacientes imunocomprometidos, como os HIV positivos (JORI et al., 2006).

Os danos fotodinâmicos nas células estão bem estabelecidos em alguns sistemas biológicos, particularmente em bactérias e leveduras e, de maneira geral, não diferem muito dos danos observados nas células de eucariotos superiores (WAINWRIGHT, 1998). As reações do tipo I com a água, no interior da célula microbiana, geram radicais hidroxila, que reagem com biomoléculas ou combinam-se, originando peróxido de hidrogênio in situ com efeitos citotóxico. Tipicamente, as reações do tipo I incluem a remoção de hidrogênios de moléculas insaturadas, como os fosfolipídios presentes na membrana plasmática (WAINWRGHT, 1998). A peroxidação de lipídios afeta a estrutura e o funcionamento da membrana celular, diminuindo a sua fluidez e aumentando sua permeabilidade a íons. Também pode ocorrer a inativação de receptores celulares e de enzimas localizados na membrana plasmática (WAINWRGHT, 2000).

Os processos do tipo II são geralmente aceitos como os principais responsáveis pelo dano foto-oxidativo à célula microbiana. Como nas reações tipo I citadas anteriormente, o oxigênio singleto também poderá reagir com as moléculas envolvidas na manutenção da estrutura e funcionamento da parede e da membrana celular, como os fosfolipídios, peptídeos e esteróides (no caso dos fungos). Também

podem ocorrer reações entre o oxigênio singleto e outras moléculas da parede e da membrana. O aminoácido triptofano reage com o oxigênio singleto e o produto intermediário instável degrada-se, formando derivados reativos capazes de provocar ligações cruzadas nos peptídeos. Os resíduos de metionina são oxidados pelo oxigênio singleto, com a formação de sulfóxido de metionina. A reação com os ácidos nucleicos ocorre principalmente através dos resíduos de guanosina e, novamente, existe uma diferença entre a seletividade dos processos do tipo I e do tipo II. No primeiro caso, o açúcar é atacado pelo radical hidroxila e, no segundo, a base nitrogenada é atacada pelo oxigênio singleto. A multiplicidade de sítios-alvo afetados durante a TFD faz com que a seleção de linhagens e /ou espécies tolerantes seja extremamente improvável, o que é uma das vantagens da técnica em relação à quimioterapia antimicrobiana convencional (KOMERIK; MacROBERT, 2006; MAISCH et al., 2004).

Uma vez que os FSs agem via produção de oxigênio singleto, não existe resistência microbiana natural, assim, não importa se a cepa é resistente a uma ou muitas classes de agentes antibacterianos, dado que o FS é capturado pelo microrganismo (PERUSSI, 2007). O padrão de modificação celular fotoinduzida também dificulta o reparo das moléculas danificadas e a expressão de genes envolvidos na resposta celular ao estresse oxidativo (JORI, 2006).

Embora o tipo predominante de ação fotodinâmica seja frequentemente determinado pela classe do composto, o modo exato de ação do FS também é fortemente influenciado pelo sítio de ação (WAINWRGHT, 2000). O sítio de ação, por sua vez, depende das características físico-químicas da interação entre a célula e o FS. Os parâmetros importantes do FS para a interação incluem: solubilidade relativa em água e lipídios, constante de ionização (pKa) e outros fatores mais específicos, como as características de absorção da luz (o comprimento de onda do pico de absorção,  $\lambda_{max}$ , e a intensidade de absorção) e a eficiência da formação do estado tripleto ou da produção de oxigênio singleto (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; WAINWRGHT, 1998).

Fotossensibilizadores que exibem um efeito maior em microrganismos do que em células animais sugerem que o dano foto-oxidativo é direcionado a sítios específicos e altamente suscetíveis (como a membrana externa das bactérias) e a membrana plasmática das células fúngicas (KOMERIK; MacROBERT, 2006). A morfologia da célula microbiana apresenta uma ampla variação, tanto entre

espécies, como entre linhagens. A variação da morfologia do microrganismo modula a interação dos FS exógenos com os constituintes celulares, afetando a eficiência e os caminhos dos processos de fotossensibilização. A interação primária do FS ocorre geralmente com a parede celular, que envolve grande parte das células microbianas. (HAMBLIM; HASAN, 2004; JORI, 2006; KOMERIK; MacROBERT, 2006; WAINRIGHT, 1998)

A parede celular dos diferentes grupos de microrganismos apresenta uma grande variabilidade na sua complexidade, arquitetura estrutural, permeabilidade e a capacidade de associação com moléculas externas (HAMBLIM; HASAN, 2004; JORI, 2006). A célula fúngica é circundada por uma rígida parede celular composta principalmente por polissacarídeos solúveis e insolúveis, como quitina,  $\beta$ -glucana e glicoproteínas (EISENMAN et al., 2005).

Mesmo sendo um alvo celular maior e mais complexo do que bactérias e vírus, os fungos podem ser inativados pelos mesmos FSs e sob condições similares às aplicadas aos outros grupos microbianos (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; ZEINA et al., 2001; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004). A eliminação de fungos pode ser obtida por condições moderadas de irradiação (pequeno tempo de exposição, baixas irradiâncias) e por concentrações do FS que garantem a seletividade da fotossensibilização em relação às células dos tecidos do hospedeiro, como fibroblastos e queratinócitos. (MAISCH et al., 2004; ZEINA et al., 2001).

A descoberta e a utilização dos antibióticos a partir de meados do século passado fizeram com que as propriedades antimicrobianas da TFD fossem esquecidas, atrasando significativamente o desenvolvimento da técnica. A emergência de novas espécies de bactérias e de fungos patogênicas, o surgimento de linhagens tolerantes aos quimioterápicos utilizados, o reduzido número de antifúngicos disponíveis e o alto custo do desenvolvimento de novos antibióticos criaram um cenário que favoreceu a retomada de estudos para a utilização da TFD como uma alternativa à quimioterapia convencional (KOMERIK; MacROBERT, 2006; MAISCH et al., 2004).

A maioria dos estudos de fotossensibilização foi conduzida *in vitro* e os dados a respeito da TFD *in vivo* para o tratamento de micoses em animais-modelo e em pacientes ainda são escassos (HAMBLIN; HASAN, 2004; KOMERIK; MacROBERT, 2006). A fotossensibilização *in vivo* ou em sistemas biológicos mais complexos normalmente é mais difícil e requer concentrações maiores do fotossensibilizador e

maiores doses de luz. Isso ocorre porque a matéria orgânica presente no meio pode inativar tanto o FS como as EROS produzidas durante a fotossensibilização (KOMERIK; WILSON, 2002).

A utilização da TFD pela área odontológica vem sendo amplamente estudada, a fim de se desenvolverem métodos auxiliares nos tratamentos preventivo e restaurador. Os alvos são os microrganismos envolvidos no desenvolvimento da cárie e da doença periodontal (DOBSON; WILSON, 1992; CHAN; LAI; 2003; CHONDROS et al., 2008; KOMERIK et al., 2003; KRESPI et al., 2005; PAULINO et al., 2005).

O desenvolvimento de técnicas alternativas para o controle de *Candida spp.* é de extrema importância devido à alta incidência de candidose em pacientes imunocomprometidos que atualmente são tratados com antifúngicos sistêmicos. A utilização prolongada da quimioterapia convencional nesses pacientes favorece a seleção de linhagens tolerantes aos quimioterápicos (WILSON; MIA, 1994).

Diversos estudos têm mostrado que a TFD pode ser um métodos alternativo promissor para o controle de diversas espécies de fungos patogênicos capazes de causar micoses superficiais e/ou invasivas em humanos, como *Trichophyton rubrum* (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; SMIJS; SCHUITMAKER, 2003; SMIJS et al., 2004), *Aspergillus fumigatus* (FRIEDBERG et al., 2001), *Neurospora crassa* (SHIMIZU; EGASHIRA; TAKAHAMA, 1979), *Kluyveromyces marxianus* (STRAKHOVSKAYA; ZHUKHOVITSKII; MIRONOV, 2002) e *Candida albicans* (BLISS et al., 2004; STRAKHOVSKAY; ZHUKHOVITSKII; MIRONOV, 2002; WAINWRIGHT, 1998; WILSON; MIA, 1993). Embora as micoses superficiais e localizadas sejam as mais indicadas para serem tratadas pela TFD, o tratamento de infecções profundas, como abscessos, será possível com o aperfeiçoamento das técnicas para distribuição do fármaco e com a utilização de sistemas ópticos mais sofisticados, que permitem levar a luz a diversas partes do organismo (DERYCKE; WITTE, 2004; JORI, 2006; KOMERIK; MacROBERT, 2006)

## 2.4 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz na região do visível (JORI, 2006). Quando o fotossensibilizador é exposto à radiação com comprimentos de onda específicos, sua molécula é excitada, levando a uma série de transferências moleculares de energia que normalmente originam espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), o ânion superóxido e o ânion radical hidroxila, que são extremamente reativos e citotóxicos (FRIEDBERG et al., 2001; HAMBLIN et al., 2002; SMIJS et al., 2004; SOUKOS et al., 1998). De acordo com Sibata et al. (2000) os fótons são absorvidos na banda do espectro eletromagnético de absorção dos FS, podendo transferir essa energia a outras moléculas, especialmente ao oxigênio molecular que resultará na liberação de espécies energéticas de meia vida curta, levando ao dano do sistema biológico envolvido.

Embora o conceito de morte celular induzida pela interação entre a luz e substâncias químicas seja conhecido há mais de um século (ACKROYD et al., 2001), o interesse por FSs tem aumentado nos últimos anos e novos FSs estão sendo desenvolvidos em virtude do uso desse grupo de substâncias no tratamento de tumores e na fotoinativação de microrganismos em diversos sistemas biológicos tanto *in vitro*, como *in vivo* (BLISS et al., 2004; GORMAN; BROWN; GRIFFITHS, 2006; STRAKHOVSKAYA; ZHUKHOVITSKII; MIRONOV, 2002; TEGOS et al., 2005; ZEINA et al., 2001).

O FS ideal deve possuir as seguintes características: atoxicidade ou pouca toxicidade no escuro; estabilidade cinética e termodinâmica; síntese rápida, barata e com alto rendimento; especificidade pela célula – alvo; curto intervalo de tempo entre a sua administração e a máxima absorção pelas células – alvo; rápida eliminação pelas células não-alvo; ativação em um comprimento de onda considerado ótimo para a absorção de luz; alta capacidade de produção de oxigênio singleto e ausência de mutagenicidade (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005).

Os primeiros FSs utilizados na prática clínica da TFD foram os derivados da hematoporfirina (HpD). Estes FSs são comercializados em diversas proporções de monômeros, dímeros e oligômeros de derivados da hematoporfirina, como Photofrin®, Photosan®, Photocan® e Photogem®. O Photofrin é o mais conhecido, tendo sido autorizado para uso clínico em 1998 nos Estados Unidos (FERREIRA et al., 2006 ). Esses FSs apresentam algumas limitações como fotossensibilidade

cutânea tardia, o que requer que os pacientes evitem a luz solar por cerca de oito semanas, falta de absorção em um comprimento de onda maior que 650nm e ação antineoplásica pouco eficaz (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

O ácido aminolevulínico (ALA), precursor da hematoforirina também é bastante difundido na prática clínica. A administração de ALA leva à formação de protoporfirina IX (PpIX), um precursor do heme, que se forma e acumula preferencialmente em tecidos com rápida renovação. É utilizado no tratamento de lesões tumorais e pré-tumorais, desordens vasculares proliferativas, queratose actínica e carcinoma de células basais. Como o organismo elimina PpIX rapidamente, o risco de fotossensibilidade é limitado a 1 ou 2 dias (PERUSSI, 2007).

Fotossensibilizadores de segunda geração foram desenvolvidos posteriormente e são geralmente substâncias simples (porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, phtalocianinas, hipericinas e fenotiazinas), com seletividade e atividades melhoradas. Têm baixa toxicidade no escuro, composição constante e são sintetizados com alto rendimento. Apresentam grande seletividade pelo tumor, mas não são retidos no corpo por muito tempo, podendo ser aplicados por via intravenosa ou tópica (GABRIELLI, 2007).

Para a aplicação clínica da TFD antimicrobiana, os compostos fenotiazínicos, mais especificamente o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina (AT), apresentam-se como bons candidatos, devido aos seus comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{660\text{nm}}$  e  $\lambda_{630\text{nm}}$ , respectivamente) que apresentam maior penetração relativa na pele, a sua comprovada ação antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus, sua disponibilidade, já que os compostos comerciais apresentam a mesma efetividade dos purificados, e sua baixa toxicidade, uma vez que, estes compostos são utilizados na área médica para uma série de finalidades terapêuticas como tratamento de metahemoglobinemia, antídoto para envenenamento por monóxido de carbono e cianureto e como marcador cirúrgico na ressecção de tumores, em concentrações muito superiores às utilizadas em TFD (NUNEZ, 2007).

Os FSs baseados na fenotiazina (PhBPs, phenothiazinium based photosensitisers), como o azul de metileno, possuem estrutura heteroaromáticas planas que conferem às suas moléculas propriedades fotossensibilizadoras. Os PhBPs têm mostrado potencial para serem utilizados na terapia fotodinâmica como agentes antitumorais e como antimicrobianos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX,

2006). A ação fotossensibilizadora de PhBPs, como o AM em bactérias gram-negativas, gram-positivas, leveduras e vírus é conhecida há décadas (AL-RUBEAI; ELHASSI, 1986; ITO, 1977; MACMILLAN; MAXWELL; CHICHESTER; 1966; WAINWRIGHT, 1996). Um dos fatores que determinam a seletividade desses compostos para células microbianas é a interação eletrostática entre as cargas positivas dos PhBPs e a membrana externa (no caso de bactérias gram-negativas) e a membrana plasmática (no caso de bactérias gram-positivas e de fungos) da célula-alvo. A ação do fotossensibilizador envolve a modificação de lipídeos e/ou lipopolissacarídeos (no caso de bactérias gram-negativas) e a inativação de proteínas e enzimas essenciais, presentes na membrana plasmática, provocando a morte da célula. Esses compostos também podem ser internalizados pela célula durante o processo de fotossensibilização, infligindo danos a um grande número de sítios intracelulares. Em células bacterianas, embora o principal sítio interno de ação seja o DNA, os PhBPs podem exibir múltiplos sítios de ação dentro de um tipo específico de células e mostram diferentes sítios de ação entre diferentes espécies de microrganismos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). A multiplicidade de sítios-alvo das Eros produzidas durante a inativação fotodinâmica faz com que a emergência de microrganismos resistentes à fotossensibilização seja extremamente improvável e torna os PhBPs uma alternativa interessante aos antibióticos convencionais (RODRIGUES, 2008).

O AM é o protótipo dos PhBPs e está bem estabelecido que sua toxicidade para humanos é baixa. O uso seguro do AM é atestado há quase um século e suas aplicações, entre outras, incluem sua administração tópica oral como anti-séptico, desinfetante e antídoto para envenenamento por nitrato (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006).

De acordo com Teichert et al. (2002) o AM pode ser administrado por via oral ou intravenosa em humanos, em altas doses sem causar efeitos tóxicos. Além disso, o AM é fortemente absorvido quando exposto a comprimentos de onda maiores que 620nm. A baixa toxicidade para humanos, a ampla utilização do AM na área médica e seu potencial antimicrobiano estimula o desenvolvimento de estudos utilizando o AM na destruição de fungos. A baixa toxicidade para humanos e o fato de serem FSs eficientes, tanto em células de leveduras, como em conídios de fungos filamentosos, podem apressar os estudos clínicos desses PhBPs na TFD (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001).

Uma grande variedade de fontes de luz, como lasers, light-emitting diode (LEDs) e vários tipos de lâmpadas incandescentes tem sido utilizada para a fotoativação dos PhBPs, tanto na TFD, como na TFDA (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). O AM, como outros PhBPs, apresenta absorção máxima de luz na região do vermelho (pico de absorção em 665nm), que é a janela desejável para a terapêutica. Essa região espectral é ideal para a TFD e para TFDA, pois as biomoléculas apresentam absorção mínima nessa região espectral, permitindo uma penetração mais profunda da luz nos tecidos humanos durante a TFD. A química do AM está bem estabelecida e diversos estudos têm mostrado que as modificações químicas do corante produzem derivados que mantêm as características desejáveis de absorção de luz do composto original, mas que apresentam uma maior fototoxicidade para as células-alvo (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006).

## 2.5 Fontes de luz

Existe uma ampla variedade de fontes de luz, coerentes e não coerentes, que podem ser utilizadas no processo de fotossensibilização, como os Lasers (de diversos tipos), os diodos emissores de luz (LEDs), lâmpadas incandescentes e lâmpadas fluorescentes (BRANCALEON; MOSELEY, 2002). A melhor fonte de radiação tem sido descrita como sendo a que por um baixo custo forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do FS, sem efeitos térmicos significativos. (MACHADO et al., 2000).

As primeiras fontes de luz usadas em TFD foram lâmpadas convencionais em que o emissor era definido por filtros. A desvantagem do uso dessas fontes era o efeito térmico e a imprecisão para o cálculo dosimétrico, apesar de serem atraentes pelo preço e facilidade de uso. Historicamente, Lasers de argônio e de vapor de metal são as escolhas iniciais para TFD, apesar do seu alto custo. Esses Lasers combinam muitas características como alta potência, comprimento de onda ajustável, maior facilidade para o cálculo dosimétrico e a possibilidade de acoplamento de fibras ópticas para uso em procedimentos endoscópicos (NOWIS et al., 2005).

O aspecto prioritário que deve ser considerado para a escolha da fonte de luz é sua habilidade de excitar o FS, provocando um efeito adverso mínimo nas células não-alvo (WAINWRIGHT, 1998, 2000). A região do espectro eletromagnético de emissão da fonte de luz deverá ser escolhida levando em consideração as bandas de absorção dos FSs e a profundidade desejável de penetração da luz nos tecidos biológicos (NOWIS et al., 2005).

Os valores de irradiância (intensidade de radiação), doses e tempo de exposição necessários para a eliminação dos microrganismos usualmente não provocam um efeito térmico significativo e podem ser facilmente obtidos através de fontes de luz não coerentes, de baixo custo, que requerem tecnologia simples e medidas de proteção mínimas, tanto para o operador, quanto para o paciente (JORI, 2006). Os lasers equipados com fibras ópticas revolucionaram a TFD e TFDA por tornarem possível a distribuição da luz em praticamente todos os sítios do corpo humano (LUKSIENE, 2003).

Os Lasers são os sistemas ópticos mais indicados para a fotossensibilização, devido às suas propriedades de monocromaticidade, coerência e alta intensidade. Além disso, a luz Laser pode ser aplicada em regiões de difícil acesso, por meio de fibras ópticas (DOVIGO, 2007). Os Lasers para geração de luz na região do vermelho (aproximadamente entre os comprimentos de onda de 625-740nm) mais utilizados para TFD são: Laser de corante bombeado por um Laser de argônio (com potência em torno de 3W), permitindo ampla variação de comprimento de onda, o suficiente para atuar em praticamente todos os FSs já desenvolvidos; Lasers de diodo de alta potência (potência em torno de 2W), este sistema tem a limitação de operar em apenas um comprimento de onda, não possuindo a flexibilidade de ajuste de acordo com o fármaco a ser utilizado (BONINI, 2006).

Uma alternativa de custo intermediário são os Lasers de diodo. Existem Lasers de diodo cobrindo praticamente todo o espectro visível e infravermelho próximo, podendo assim atender boa parte dos agentes fototerapêuticos já existentes no mercado. Os Lasers de diodo são capazes de fornecer luz pulsada de considerável potência com precisão sobre o tecido a ser irradiado, graças a sistemas de distribuição baseados em feixes de fibras ópticas (MACHADO et al., 1999).

Raramente têm sido empregadas lâmpadas de arco de xenônio, as quais requerem o emprego de filtros adequados para a seleção do comprimento de onda

de irradiação, um sistema óptico bastante eficiente a fim de dirigir a radiação ao local de irradiação com um mínimo de perdas. Com esse objetivo, feixes de fibras ópticas têm sido empregados para dirigir a radiação ao local a ser irradiado. Um eficiente sistema de dissipação do calor gerado pela lâmpada é requerido, a fim de minimizar os efeitos térmicos sobre o tecido a ser irradiado e seus arredores. Um aspecto bastante desfavorável refere-se à potência requerida para a lâmpada, para que forneça radiação com a fluência adequada no comprimento de onda requerido. (MACHADO et al., 1999).

Como outras fontes de luz, pode-se citar os dispositivos a base de LEDs com as vantagens de serem menores, portáteis, confiáveis, de fácil manejo e comparativamente mais baratos do que as fontes de luz laser, com banda de emissão variando de 5-10nm e intensidade de 150mW/cm<sup>2</sup> em áreas de até 20cm<sup>2</sup> sendo ajustável a área de irradiação. Como inconveniente, apresentam comprimento de onda fixo, dificultando o uso para mais de um FS e intensidade relativamente baixa, entretanto, o advento de novos avanços tecnológicos nessa área poderá melhorar esses aspectos desses aparatos (PATTERSON; WILSON, 1999).

## 2.6 Terapia fotodinâmica e inativação de *Candida spp.*

Jackson et al. (1999) estudaram os efeitos da TFD sobre leveduras e hifas de *C.albicans* utilizando o AT como fotossensibilizador e um Laser de Helio-Neônio (λ632,8nm; 35mW) como fonte de luz. Os autores avaliaram variações nas concentrações de AT (3,12, 6,25, 12,5, 25,5 3 100µg/ml), nas doses de luz (4,2, 10,5, 21 e 42J) e no tempo de pré-irradiação (5, 10, 60 e 180minutos). Os autores também avaliaram os efeitos da TFD sobre duas cepas de *C.albicans* resistentes ao fluconazol que foram submetidas à incubação durante 5 minutos com 25mg/L de AT e irradiadas com 21J de luz.Os grupos controle foram constituídos por amostras da suspensão celular tratadas somente com a luz Laser,outras tratadas apenas com o AT e por amostras que não receberam nenhum tratamento. Os resultados mostraram que a luz Laser combinada com o AT inativou uma quantidade expressiva de leveduras e hifas, destacando a dose de 42J como a mais efetiva e o tempo de pré-irradiação de 5 minutos como o mais efetivo. Com relação à

concentração do AT observou-se que a de 12,5µg/ml foi mais efetiva contra as hifas e a de 25µg/ml mais efetiva contra as leveduras. Os autores observaram que o tempo de pré-irradiação não aumenta o potencial de inativação. Além disso, as duas cepas resistentes ao fluconazol foram inativadas pela TFD, no entanto, a redução obtida foi menor em relação aos demais resultados obtidos.

Zeina et al. (2001) estudaram a fotoinativação de microrganismos cutâneos utilizando o AM como fotossensibilizador e um projetor de slides como fonte de luz policromática. Suspensões celulares de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *Candida albicans* foram semeadas em placas de Petri nas quais adicionou-se 1ml do AM a 100mg/L e em seguida as amostras foram iluminadas com intensidades de luz que variaram de 1,6 a 42mW/cm<sup>2</sup>. A luz foi aplicada durante 60 minutos, no entanto a cada 10 minutos, alíquotas de 1mL eram removidas da placa de Petri, diluídas e plaqueadas. A quantidade de redução das espécies testadas foi realizada por análise de regressão. Também foram obtidos os “valores-D”, correspondentes ao tempo mínimo de exposição necessário para promover uma redução na contagem de colônias viáveis. Os valores-D obtidos para *C.albicans* foram maiores em comparação aos das bactérias visto que uma iluminação durante 660 segundos reduziu apenas 0,09 logufc/ml. Os autores justificaram que o maior tamanho das células de *C.albicans*, maior cerca de 25-50 vezes que as bactérias testadas aliado a presença de membrana nuclear constituem fatores que dificultam a penetração do FS, tornando *C.albicans* mais resistente a TFD em relação às bactérias.

Strakhovskaya et al. (2002) avaliaram, *in vitro*, o efeito antifúngico da TFD com duas clorinas contra *C.albicans* e *C. guilhermondii*. Os autores empregaram o Laser semiconductor (690nm; 20mW/cm<sup>2</sup>) e uma lâmpada de mercúrio como fonte de luz visível de 400 a 600nm e taxa de fluência de 5mW/cm<sup>2</sup>. O tempo de pré-irradiação não alterou os resultados já que, em 30 segundos, houve diminuição significativa da capacidade de formação de colônias, ao passo que períodos mais prolongados não intensificaram a inativação da amostra. A lavagem das células após incubação com o corante também reduziu a sensibilidade da amostra. Para *C.guilhermondii*, a sensibilidade foi 1,6 a 1,7 vezes maior que a das amostras de referência de *C.albicans*. A TFD com Laser inativou as leveduras, mesmo quando a concentração de células era alta, o que não ocorreu com a TFD com lâmpada de

mercúrio, pois a fotossensibilidade das células diminuía abruptamente com o aumento da densidade óptica da cultura.

Teichert et al. (2002) avaliaram o efeito da TFD no tratamento de candidose oral induzida na língua de camundongos com imunodeficiência. Setenta e cinco camundongos foram inoculados durante quatro semanas com uma cepa de *C.albicans* azol-resistente e distribuídos em 15 grupos. Os animais foram anestesiados e foi realizada uma coleta, por meio de swab para determinar o número de ufc/ml presentes na língua dos animais. Os grupos controle foram constituídos por camundongos que foram inoculados, mas que não foram submetidos ao tratamento e por camundongos que foram tratados apenas com o azul de metileno (fotossensibilizador) ou apenas com a luz Laser. Os grupos experimentais foram constituídos por camundongos que foram tratados com diferentes concentrações do AM (275, 300, 350, 400, 450 e 500µg/ml). Após um período de 10 minutos os animais foram irradiados com um diodo Laser (664nm, 275J/cm<sup>2</sup>, 400mW) durante 687, 5 segundos. Após o tratamento foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) e os animais foram sacrificados. Os resultados indicaram um efeito dependente da dose de AM utilizada. As concentrações de 250 até 400µg/ml reduziram o crescimento fúngico, mas não eliminaram totalmente as cepas de *C. albicans*. As concentrações de 450 e 500µg/ml erradicaram totalmente as cepas de *C.albicans*. Os autores sugerem que a TFD com azul de metileno pode ser utilizada para tratar a candidose oral em pacientes imunodeficientes.

Bliss et al. (2004) avaliaram a susceptibilidade de diferentes espécies de *Candida* a TFD utilizando o Photofrin® como fotossensibilizador. Suspensões celulares contendo 10<sup>5</sup> células viáveis/ml de cada espécie de *Candida* avaliada (*C.albicans*, *C.krusei* e *C.glabrata*) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C durante 30 minutos com o Photofrin® em concentrações que variaram de 10 a 0,01µg/ml. A tampa da placa de 96 poços foi removida e as amostras foram iluminadas com uma lâmpada de arco (mercúrio) durante 10 minutos a 15mW/cm<sup>2</sup> (9J/cm<sup>2</sup>). A toxicidade para as células após a irradiação foi verificada por meio do teste de viabilidade celular (XTT – Sigma). Análises em microscopia de fluorescência e confocal também foram realizadas para verificar a captação do Photofrin® pelas células fúngicas. Os grupos controle foram constituídos de suspensões não irradiadas de *Candida spp.* associadas tanto a solução salina como

ao Photofrin®(suspensões não iluminadas). Os resultados demonstraram que a *C. albicans* foi a espécie mais susceptível a TFD, seguida de *C. krusei* e *C.glabrata*. O Photofrin ® na concentração de 1µg/ml reduziu em mais 50% a viabilidade celular para *C. krusei* e *C. albicans* e quando utilizou-se a concentração de 10µg/ml esse percentual foi de 80%. Considerando-se a espécie *C.glabrata* o percentual de redução foi de 30% quando da utilização do Photofrin®a 10µg/ml. As análises microscópicas detectaram fluorescência na presença de 10mg/L de Photofrin® em todas as espécies testadas, no entanto para *C.glabrata* essa fluorescência foi mínima. Os autores concluíram que a efetividade da TFD está relacionada com a presença do FS no interior da célula e que *C.glabrata* é menos susceptível a TFD em relação as demais espécies avaliadas.

Monfrecola et al. (2004) realizaram estudo *in vitro* para avaliar o efeito do ácido 5-aminolevulínico (ALA) associado a irradiação com luz visível na fotoinativação de *C. albicans*. Uma suspensão celular contendo 10ufc/µl foi obtida e amostras de 30µl desta suspensão foram incubadas no escuro por 3 horas com concentrações crescentes de ALA (125, 250, 300, 350, 400,450, 500, 600,750, 1000 mg/ml). Após o período de incubação, as amostras foram irradiadas com uma dose fixa de 40J/cm<sup>2</sup> utilizando um projetor de slide equipado com uma lâmpada de tungstênio cujo espectro de emissão varia entre 400 e 700nm com pico em 630nm. Após a irradiação, as suspensões de *C.albicans* foram semeadas em placas contendo Agar Saboroud Dextrose (ASD ) e após 48 horas o desenvolvimento de colônias foi mensurado. Foram feitos quatro grupos controle:1- suspensão de *C.albicans* que não receberam nenhum tratamento, 2- suspensão de *C.albicans* incubadas com ALA nas diferentes concentrações; 3- suspensão de *C.albicans* irradiadas com 40J/cm<sup>2</sup>, mas sem ALA; 4- suspensões de *C.albicans* irradiadas imediatamente após a adição de ALA, mas sem as 3 horas de incubação. Os resultados demonstraram que em nenhum dos grupos controle houve modificação no desenvolvimento das colônias e que nos grupos em que a irradiação foi aplicada associada ao ALA observou-se que a inibição do crescimento das colônias estava relacionada a concentração utilizada. A concentração de 300mg/ml reduziu em 50% o número o número de colônias e houve completa inibição nas concentrações de 600, 750 e 1000mg/ml.

Demidova e Hamblin (2005) testaram o efeito da TFD na fotoinativação cepas de *Escherichia coli*, *S. aureus* e *C.albicans* em suspensões celulares com diferentes

concentrações celulares ( $10^9$ - $10^7$ ). Os fotossensibilizadores testados foram o rose bengal, azul de toluidina e conjugado de poli-lisina associados a uma fonte de luz não coerente. As suspensões celulares foram incubadas com os FSs em concentrações variadas durante 20 minutos. Após o período de incubação, alíquotas de 200µl das suspensões foram transferidas para uma placa de 96 poços e iluminadas com doses de luz que variaram entre 0 e 200J/cm<sup>2</sup>. Os comprimentos de onda (λ) utilizados foram 552nm para as amostras impregnadas com o rose bengal, 620nm para as amostras tratadas com o azul de toluidina e 400nm para as amostras tratadas com o conjugado de poli-lisina. Após a irradiação foram obtidas diluições seriadas de cada amostra que foram plaquedadas e mantidas a 37° por 48 horas para a obtenção do número de ufc/ml. Alíquotas adicionais foram utilizadas para verificar se os FSs permanecem ligados a membrana celular dos microrganismos ou se são captados para o interior da célula. Os resultados demonstraram que quanto maior a concentração celular da suspensão, uma maior concentração do FS é necessária. O FS mais eficiente na fotossensibilização das espécies testadas foi o conjugado de poli-lisina. *C. albicans* foi a espécie mais resistente aos efeitos da TFD. Os autores concluíram que, por possuir um tamanho 10 a 50 vezes maior que a célula bacteriana, a célula fúngica necessita de uma maior quantidade de oxigênio singlete para sua inativação e que a membrana nuclear das células fúngicas podem atuar como uma barreira adicional para a penetração do FS.

Lambrechts; Aalders; Van Marle (2005) avaliaram os mecanismos de inativação celular da TFD mediada por uma porfirina catiônica. Foram obtidas suspensões celulares de *C.albicans* nas concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  células/ml. Em seguida, essas suspensões foram incubadas com a porfirina catiônica TriP [4], na concentração de 25µM, durante 1, 15 ou 30 minutos. Alíquotas de 1mL da suspensão foram transferidas para uma placa de orifícios e iluminadas com uma lâmpada halógena de intensidade de 30mW/cm<sup>2</sup>. Suspensões incubadas durante 30 minutos também foram lavadas duas vezes e em seguida iluminadas, para que fosse possível a distinção entre o efeito da porfirina em solução, do efeito da porfirina que ficou ligada às células. A sobrevivência do fungo foi verificada pelo método da contagem de colônias viáveis, e foi expressa como uma porcentagem relativa ao observado nas suspensões controles. Os resultados demonstraram que a sobrevivência do fungo foi reduzida gradativamente com o aumento da dose de luz. A aplicação de 12,6 J/cm<sup>2</sup> promoveu a completa eliminação do microrganismo. As

análises realizadas para a avaliação do mecanismo de ação da porfirina catiônica foram: análise do espectro de absorção do FS, microscopia de fluorescência, microscopia confocal e técnica de fratura por congelamento associada à microscopia eletrônica. Essas análises demonstraram que, após a incubação das suspensões com o FS, esse foi capaz de se ligar a parede celular da *C.albicans*, previamente a exposição luminosa. Durante a iluminação, ocorreram danos na membrana celular, que se tornou mais permeável a entrada do FS. Após o influxo do FS para o interior da célula, organelas intracelulares também foram atingidas pelos processos fotodinâmicos. O aumento no tempo de incubação não alterou a quantidade de FS que entrou na célula previamente a iluminação, nem tão pouco a efetividade da TFD. Os autores concluíram que a *C. albicans* pôde ser inativada pela porfirina catiônica e a membrana citoplasmática foi a principal organela atingida no processo de inativação celular.

Souza et al. (2006) avaliaram os efeitos da radiação Laser (685nm, 35mW) associada ao AM na fotoinativação de diferentes espécies do gênero *Candida*. Foram utilizadas suspensões contendo  $10^6$  ufc/ml referente a cada espécie estudada (*C.albicans*, *C. dubliniensis*, *C.krusei* e *C.tropicalis*). Para cada espécie, 10 amostras da suspensão celular foram irradiadas com o Laser ( $28\text{J}/\text{cm}^2$ ) na presença de AM (0,1mg/ml); 10 amostras foram tratadas apenas com AM; 10 amostras foram tratadas apenas com a luz Laser e 10 amostras não receberam nenhum tratamento. De cada amostra foram obtidas diluições seriadas ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e alíquotas de 0,1ml de cada diluição foram plaquedadas em ASD. Após incubação a  $37^\circ\text{C}$  por 48 horas, o número de ufc/ml foi obtido e os dados submetidos a análise estatística. A irradiação com o Laser na presença do AM reduziu em 88,6% o número de ufc/ml para *C.albicans*, 84,8% para *C.dubliniensis*, 91,6% para *C.krusei* e 82,3% para *C. tropicalis*. A irradiação Laser ou AM quando aplicados isoladamente não reduziram significativamente o número de ufc/ml de *Candida*, exceto *C.tropicalis*.

Munin et al. (2007) estudaram o efeito da TFD sobre a formação de tubo germinativo de cepas de *C.albicans*. Suspensões celulares contendo  $1-5 \times 10^7$  células viáveis/ml foram obtidas e transferidas para placas de 96 poços e mantidas no escuro por 5 minutos com diferentes concentrações de AM que variaram de 0,027 até 13,37mM. Após o período de incubação as placas foram irradiadas com um diodo Laser (683nm, 0,035W,  $28\text{J}/\text{cm}^2$ ). Amostras das suspensões celulares incubadas apenas com solução salina estéril constituíram o grupo controle. Após a

irradiação, 50µl das suspensões irradiadas e não irradiadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo ASD na ausência e na presença de goat serum (utilizado para induzir a formação de tubo germinativo). As amostras foram incubadas a 37°C por 3 horas e após esse período a formação de tubo germinativo foi expressa como percentual de células formando tubos em relação ao número total de células. Os resultados mostraram que concentrações de AM variando entre 0,013 até 0,134mM sem irradiação não modificou o percentual de células formando tubo germinativo. As células tratadas com AM (0,013Mm) associada com a irradiação com luz Laser apresentaram mínima ou nenhuma formação de tubo germinativo.

Costa et al. (2008) avaliaram a ação da TFD no desenvolvimento de biofilmes formados *in vitro* por *C.albicans*. Os biofilmes foram formados em discos de resina acrílica esterilizados e colocados em placas de 24 poços com 2ml de caldo de BHI (Brain and heart infusion) sacarosado. Cada poço da placa contendo um corpo de prova e o caldo BHI foi inoculado com 100µl da suspensão fúngica. As placas foram mantidas incubadas em estufa por 5 dias para a formação dos biofilmes. Após este período foi avaliada a ação do AM na concentração de 0,1mg/ml e aplicação do Laser ( AsGaAl, 660nm, 100mW, 10,42J/cm<sup>2</sup>, 9,8J) isoladamente e em conjunto, seguido da semeadura em placas de Petri contendo ASD e incubadas a 37°C/48h. As ufc/ml foram transformadas em log e os resultados mostraram que o AM juntamente com o Laser promoveu a redução de 1,04log em relação ao grupo controle com estatística significativa (p< 0,05) demonstrando a ação antifúngica da TFD em biofilmes de *C.albicans*.

Rossoni et al. (2008) avaliaram os efeitos da fotossensibilização do azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita por Laser de baixa intensidade (InAsGaAl, 660nm, 35mW) nas densidades de energia de 15,8, 26,3 e 39,5 J/cm<sup>2</sup> (6, 10 e 15J respectivamente) sobre *Candida albicans*. A partir de suspensões padronizadas de *C. albicans* foram realizados 120 ensaios para cada corante, divididos em quatro grupos de acordo com as seguintes condições experimentais: irradiação com laser e FS, irradiação somente com laser, tratamento somente com o FS, e ausência de Laser e FS. A seguir, foram realizadas diluições seriadas e semeaduras para contagem de ufc/ml. Todos os FSs testados foram eficazes na redução de *C. albicans* após a realização da terapia fotodinâmica. A redução de ufc/mL foi entre 0,54 log<sub>10</sub> e 3,07 log<sub>10</sub> e foi dependente da densidade de energia

testada. Concluiu-se que todos os fotossensibilizadores estudados foram eficazes na terapia fotodinâmica contra *C. albicans*.

Peloi et al. (2008) propuseram a utilização de um diodo emissor de luz (LED) como fonte de luz para a PDT. Os autores construíram um sistema LED emissor de luz vermelha com 5mW de potência no comprimento de onda de 633nm e como FS utilizaram o AM. Os microrganismos submetidos à PDT foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os grupos teste foram preparados adicionando-se 400µl da suspensão celular ( $10^8$  ufc/ml) a 100µl do AM em diferentes concentrações variando de 7 a 140,8µM. A concentração do AM utilizado em *C. albicans* foi de 63,20 +/- 11,30 µM e os tempos de irradiação foram de 10, 20 e 30 min. Dentre os principais resultados destacou-se que utilizando o AM na concentração de 35,2µM e um tempo de irradiação de 20 minutos foi possível obter uma taxa de inativação de 93,33% para a cepa de *C.albicans*.

Soares et al. (2009) investigaram a efetividade da TFD em inativar três diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Suspensões celulares contendo  $10^6$  ufc/ml foram obtidas e submetidas ao tratamento utilizando o azul de toluidina na concentração de 25µM como fotossensibilizador associado a irradiação com a luz de um LED (630nm, 100mw) durante 15 minutos. Os grupos que foram tratados apenas com o azul de toluidina ou apenas com a luz LED e o grupo que não recebeu nenhum tratamento constituíram os grupos controle. Os resultados mostraram que a TFD reduziu o crescimento das cepas de *Candida* com uma média de redução de  $\log_{10}$  3.41. Não houve diferença estatística entre os grupos controle sugerindo que o AT ou a luz LED quando aplicados isoladamente não são capazes de inibir o crescimento fúngico.

Junqueira et al. (2009) avaliaram o efeito da TFD no tratamento de candidose oral induzida na língua de ratos. Setenta e dois ratos foram inoculados durante 3 dias com uma suspensão celular de *C.albicans* preparada com uma cepa isolada de um paciente portador de candidose associada ao uso de prótese. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: G1- animais tratados com o FS azul de metileno (0,1mg/ml) durante cinco minutos e irradiados com um diodo laser (660nm, 50mw, 10J, 26J/cm<sup>2</sup>); G2- animais tratados apenas com a luz Laser; G3-animais tratados apenas com o azul de metileno e G4- animais que não receberam nenhum tratamento. Os animais foram sacrificados depois de 1 e 5 dias subseqüentes a

aplicação dos tratamentos para análise microscópica do dorso da língua. O grupo submetido à TFD exibiu poucas alterações epiteliais e discreta resposta inflamatória crônica quando comparado ao grupo que não recebeu nenhum tratamento. O grupo tratado apenas com a luz Laser apresentou alterações epiteliais e resposta inflamatória crônica mais intensa quando comparados aos animais com os animais dos demais grupos. Os animais tratados apenas com o AM mostraram alterações teciduais semelhantes aos animais que não receberam nenhum tratamento. Os autores concluíram que os animais tratados com a TFD desenvolveram lesões de candidose mais discretas quando comparados aos demais animais.

Dovigo et al. (2010) avaliaram a efetividade da TFD na inativação de *C.albicans* e *C. glabrata*, ATCC e resistente ao fluconazol, por meio da utilização do agente fotossensibilizador Photogem® e da iluminação com LEDs de comprimento de onda azul (455nm, 12,5mW/cm<sup>2</sup>). Suspensões celulares das espécies de *Candida* avaliadas foram transferidas para placas de 96 orifícios, tratadas com diferentes concentrações de Photogem® (2,5, 5, 10, 25 e 50 µg/ml) e expostas a quatro doses de luz (10,5; 18; 25,5 e 37,5J/cm<sup>2</sup>). Suspensões adicionais foram tratadas somente com as cinco concentrações do FS ou apenas com as quatro doses de luz. Após a realização do experimento, foram obtidas diluições seriadas de cada amostra (10<sup>-1</sup> e 10<sup>-3</sup>), e alíquotas de 25µl dessas diluições foram plaqueadas em ASD. As placas foram incubadas a 37°C por 48horas. Após a incubação, foi realizada a contagem de ufc/ml. Os resultados demonstraram que a dose de luz mínima que promoveu a completa inativação das duas origens de *C.albicans* foi 18J/cm<sup>2</sup>, em associação com 50mg/L de Photogem®. Observou-se diferenças estatisticamente significantes na obtenção da inativação total das duas origens de *C.glabrata*. Para ATCC não houve crescimento de colônias viáveis após o tratamento com 10, 25 e 50mg/L de Photogem® seguido de iluminação a 37,5J/cm<sup>2</sup>. No entanto, somente as concentrações de 25 e 50mg/L foram capazes de eliminar a *C.glabrata* resistente a fluconazol nas doses de 25,5 e 37,5J/cm<sup>2</sup>.

*OBJETIVOS*

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica utilizando o azul de metileno como substância fotossensibilizadora associado a um diodo Laser de Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP, 660nm) na inativação de espécies do gênero *Candida*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica com azul de metileno (150µg/ml) e diodo Laser de Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP, 660nm) nas doses de 60J/cm<sup>2</sup>, 120J/cm<sup>2</sup> e 180J/cm<sup>2</sup> na inativação de espécies do gênero *Candida*.
- Avaliar se há diferença de susceptibilidade à inativação pela terapia fotodinâmica entre as espécies de *Candida* avaliadas.

## *MATERIAIS E MÉTODOS*

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 Delineamento

Estudo experimental verdadeiro com grupo controle pré e pós- teste.

### 4.2 Considerações éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba (protocolo CEP/HULW N°337-10 – ANEXO A).

### 4.3 Local do estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba no período de agosto de 2009 a fevereiro de 2010.

### 4.4 Instrumentos

#### 4.4.1 Espécies fúngicas

Foram utilizadas as cepas de *C. albicans* (ATCC76645, ATCC13803, LM018F, LMMD37, LM968), *C.tropicallis* (LM28, LM708, LM01, LM759, LM14), *C.guilliermondii* (LM70, LM405, LM01, LM2101, LM708) e *C.krusei* (ATCC6258,

ATCC6358, LM08, LM12, LM120) pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) cedidas para esta pesquisa. Foram utilizadas cepas de referência (ATCC) e cepas isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores de infecção por *Candida spp.* (cepas LM).

#### 4.4.2 Meio de cultura

Para a execução do ensaio foi utilizado o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose- ASD (Difco Lab®.), preparado e utilizado segundo as recomendações do fabricante.

#### 4.4.3 Laser

O aparelho de Laser utilizado foi um Diodo Laser (Twin-Flex®, GaAlAs, InGaAlP,  $\lambda 780\text{nm}$  e  $\lambda 660\text{nm}$ , MM OPTICS LTDA, São Carlos, SP – Brasil). Neste equipamento a forma de emissão da luz é contínua (CW) e a área da ponteira (spot) é de  $0,04\text{ cm}^2$ . O protocolo de irradiação estabelecido para este estudo está descrito no item 4.5.2.

#### 4.4.4 Fotossensibilizador

Foi empregado o corante azul de metileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), preparado como solução de estoque na concentração de  $300\mu\text{g/ml}$  em pH 7. O corante foi acondicionado em recipiente de cor âmbar, mantido sob proteção da luz e acondicionado em geladeira à temperatura de  $4^\circ\text{C}$  a  $8^\circ\text{C}$ . Para aplicação do tratamento, o corante foi utilizado na concentração de  $150\mu\text{g/ml}$ . Esta concentração foi determinada em um estudo piloto realizado previamente.

## 4.5 Procedimentos

### 4.5.1 Preparo da suspensão das leveduras

Para o preparo das suspensões, as cepas selecionadas foram mantidas no meio de cultura, durante 24-48 horas a 35-37°C. O mesmo foi preparado e padronizado em solução fisiológica a 0,9% e esterilizada, comparando-se com uma suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland. Após agitação com o auxílio do aparelho Vortex (Fanem®) durante 2 minutos, a suspensão foi ajustada para 90% (530nm) de transmitância no espectrofotômetro (Leitz-photometer 340-800), para conter cerca de  $10^6$  ufc/ml (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

### 4.5.2 Condições experimentais avaliadas

A seguir estão descritas as etapas realizadas para a avaliação da efetividade da terapia fotodinâmica na inativação das cepas de *Candida*. As vinte cepas selecionadas foram testadas em todas as condições experimentais descritas a seguir e todas as condições foram realizadas em duplicata.

#### a) Grupos controle

- Grupo solução salina (controle negativo)

Nesta condição experimental, alíquotas de 100µl da suspensão celular de cada cepa avaliada foram transferidas individualmente para um dos poços de uma placa de microdiluição com 96 poços de fundo em U (ALAMAR TECNO CIENTIFICA

LTDA). A seguir, o mesmo volume de solução salina 0,9% estéril foi transferido para o poço e permaneceram em repouso durante 5 minutos ( tempo de pré-irradiação). Neste grupo não foi aplicado nenhum tratamento. Os resultados obtidos com as culturas dessas amostras foram utilizados como parâmetro para comparação com aqueles obtidos com as culturas das amostras submetidas às condições experimentais.

- Grupo azul de metileno (controle positivo)

Para que fosse avaliada a existência de efeitos tóxicos do azul de metileno sobre as suspensões celulares, foram incluídas neste estudo amostras sensibilizadas com esse fotossensibilizador e que não foram irradiadas com o Laser. Para cada cepa de *Candida* avaliada, alíquotas de 100µl da suspensão celular foram transferidas individualmente para um dos poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, acrescentou-se alíquotas de 100µl de azul de metileno a 300 µg/ml para obtenção da concentração final de corante de 150µg/ml. O sistema de ensaio foi mantido no escuro por 5 minutos para obtenção da toxicidade intrínseca do azul de metileno. O tempo de incubação e a concentração do azul de metileno foram definidos de acordo com trabalhos anteriores que também utilizaram o azul de metileno como fotossensibilizador (GIROLDO et al., 2009; JUNQUEIRA et al., 2009; MARINHO, 2006; MUNIN et al., 2007; ROSSONI et al., 2008; SOUZA et al., 2006;)

- Grupo Laser (controle positivo)

Nesta condição experimental, foi avaliado se a aplicação da luz Laser, na ausência do fotossensibilizador (azul de metileno), poderia apresentar efeitos tóxicos para as cepas de *Candida* avaliadas. Assim, alíquotas de 100µl da suspensão celular de cada cepa avaliada foram transferidas individualmente para um dos poços de uma placa de 96 poços. A seguir, o mesmo volume de solução salina 0,9% estéril foi transferido para o poço. O sistema de ensaio foi mantido no escuro por 5 minutos

e em seguida foi realizada a irradiação com um diodo Laser de comprimento de onda vermelho (660nm) e potência de 40mW. As cepas foram distribuídas em três grupos de acordo o protocolo de irradiação estabelecido:

- **Grupo 1:** irradiação com uma dose de  $60\text{J}/\text{cm}^2$  durante 1 minuto. A energia aplicada foi de 2,4J.

- **Grupo 2 :** irradiação com uma dose de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  durante 2 minutos. A energia aplicada foi de 4,8J.

- **Grupo 3:** irradiação com uma dose de  $180\text{J}/\text{cm}^2$  durante 3 minutos. A energia aplicada foi de 7,2J.

Nos três grupos a aplicação foi única. A ponteira do equipamento foi colocada perpendicularmente a abertura dos poços e a irradiação foi efetuada com ângulo de incidência de  $90^\circ$  (figura 1). Para evitar um possível efeito cumulativo devido ao espalhamento da radiação, cada amostra era irradiada e coletada individualmente.



Figura 1- Irradiação das amostras

a) Grupos Terapia Fotodinâmica

Para cada cepa de *Candida* avaliada, alíquotas de 100µl da suspensão celular contendo  $10^6$ ufc/ml, em solução salina, foram transferidas individualmente para um poço de uma placa de microdiluição com 96 poços. Em seguida, acrescentou-se alíquotas de 100µl de azul de metileno a 300µg/ml para obtenção da concentração final de corante de 150µg/ml. O sistema de ensaio foi mantido no escuro por 5 minutos e em seguida foi realizada a irradiação com um diodo Laser seguindo o mesmo protocolo estabelecido para o grupo Laser.

#### 4.5.3 Contagem das unidades formadoras de colônias

Após a realização de cada condição experimental, 1 µl da solução contendo as leveduras foi semeado em placa de Petri (90/15mm/DISPO-PETRI) contendo ASD e incubadas em estufa de crescimento a 37 °C por 24 - 48h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias dos grupos teste e controle, sendo expressas em ufc/ml e em percentual de inativação (figuras 2 e 3).



**Figura 2 – Semeadura em placas**

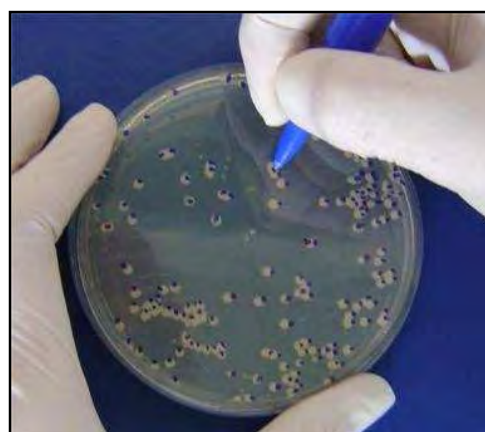


**Figura 3 – Contagem de ufc**

#### 4.6 Análise dos dados

Inicialmente foram calculadas as médias resultantes das duas aplicações com cada cepa, de forma que todas as análises posteriores foram realizadas com estas médias, tanto para os dados expressos em ufc/ml e os dados expressos em percentual. Assim, realizou-se Análises de Variância para medidas repetidas (teste de Friedman), para observar se havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à TFD e os grupos controle, bem como para observar se havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos em que foi aplicada a TFD. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para observar se as taxas de inativação proporcionadas pelas diferentes doses empregadas variaram em função das quatro espécies e testes de Mann-Whitney, para identificar onde estavam tais diferenças. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5%.

## *RESULTADOS*

## 5 Resultados

### 5.1 Aplicação da terapia fotodinâmica com Laser na dose de 60J/cm<sup>2</sup> (2,4J)

O valor médio de ufc/ml de *Candida spp.* obtido após a aplicação da TFD com Laser (660nm, 40mW) na dose de 60J/cm<sup>2</sup> foi de 337.675. Os valores mínimo e máximo de ufc/ml entre as amostras foram de 134.500 e 540.000 respectivamente. Ao aplicar-se o teste de Friedman para amostras pareadas, o valor de ufc/ml de *Candida spp.* exibiu diferença significativa entre o grupo submetido a TFD na dose de 60J/cm<sup>2</sup> e os grupos-controle (tabela 1).

Tabela1: ufc/ml de *Candida spp.* após aplicação da TFD com Laser na dose de 60J/cm<sup>2</sup>

| GRUPOS                    | Média  | Desvio Padrão | Mediana | Valor Mínimo | Valor Máximo |
|---------------------------|--------|---------------|---------|--------------|--------------|
| Solução salina            | 580100 | 181976,8      | 547000  | 289500       | 930000       |
| Azul de metileno          | 545100 | 182630,3      | 520000  | 247500       | 925000       |
| Laser 60J/cm <sup>2</sup> | 575625 | 181324,4      | 547750  | 288000       | 930000       |
| TFD 60J/cm <sup>2</sup>   | 337675 | 104975,7      | 325500  | 134500       | 540000       |

Fr=91,261; gl=5; p<0,001.

### 5.2 Aplicação da terapia fotodinâmica com Laser na dose de 120J/cm<sup>2</sup> (4,8J)

O valor médio de ufc/ml de *Candida spp.* obtido após a aplicação da TFD com Laser (660nm, 40mW) na dose de 120J/cm<sup>2</sup> foi de 215.825. Os valores mínimo e máximo de ufc/ml entre as amostras foram de 89.000 e 294.000 respectivamente. Ao aplicar-se o teste de Friedman para amostras pareadas, o valor de ufc/ml de *Candida spp.* exibiu diferença significativa entre o grupo submetido a TFD na dose de 120J/cm<sup>2</sup> e os grupos-controle (tabela 2).

Tabela2: ufc/ml de *Candida spp.* após aplicação da TFD com Laser na dose de 120J/cm<sup>2</sup>

| GRUPOS         | Média  | Desvio Padrão | Mediana | Valor Mínimo | Valor Máximo |
|----------------|--------|---------------|---------|--------------|--------------|
| Solução salina | 580100 | 181976,8      | 547000  | 289500       | 930000       |

|                            |        |          |        |        |        |
|----------------------------|--------|----------|--------|--------|--------|
| Azul de metileno           | 545100 | 182630,3 | 520000 | 247500 | 925000 |
| Laser 120J/cm <sup>2</sup> | 568525 | 181233,3 | 539250 | 283000 | 917500 |
| TFD 120J/cm <sup>2</sup>   | 215825 | 63320,7  | 235250 | 89000  | 294000 |

Fr=91,261; gl=5; p<0,001.

### 5.3 Aplicação da terapia fotodinâmica com Laser na dose de 180J/cm<sup>2</sup> (7,2J)

O valor médio de ufc/ml obtido após a aplicação da TFD com Laser (660nm, 40mW) na dose de 180J/cm<sup>2</sup> foi de 127.200. Os valores mínimo e máximo de ufc/ml entre as amostras foram de 89.000 e 294.000 respectivamente. Ao aplicar-se o teste de Friedman para amostras pareadas, o valor de ufc/ml de *Candida spp.* exibiu diferença significativa entre o grupo submetido a TFD na dose de 180J/cm<sup>2</sup> e os grupos-controle (tabela 3).

Tabela 3: ufc/ml de *Candida spp.* após aplicação da TFD com Laser na dose de 180J/cm<sup>2</sup>

| GRUPOS                     | Média  | Desvio Padrão | Mediana | Valor Mínimo | Valor Máximo |
|----------------------------|--------|---------------|---------|--------------|--------------|
| Solução salina             | 580100 | 181976,8      | 547000  | 289500       | 930000       |
| Azul de metileno           | 545100 | 182630,3      | 520000  | 247500       | 925000       |
| Laser 180J/cm <sup>2</sup> | 561550 | 181932,5      | 533500  | 281000       | 910500       |
| TFD 180J/cm <sup>2</sup>   | 127200 | 49071,8       | 123750  | 41000        | 220000       |

Fr=91,261; gl=5; p<0,001

O gráfico 1 representa os resultados obtidos para os grupos-teste e os grupos controle após a aplicação da TFD sobre as amostras de *Candida spp.* com o Laser nas diferentes doses empregadas.

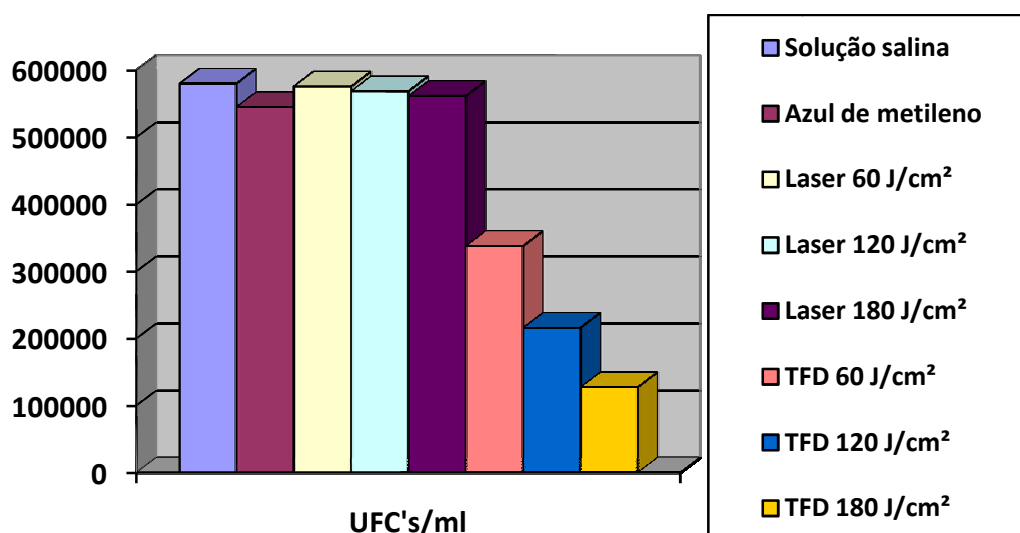


Gráfico 1 – ufc/ml de *Candida spp.* nos grupos submetidos à TFD e nos grupos-controle.

#### 5.4 Taxa percentual de inativação das ufc/ml de *Candida spp.* após aplicação da TFD com Laser nas doses de 60J/cm<sup>2</sup>, 120J/cm<sup>2</sup> e 180J/cm<sup>2</sup>

O cálculo da taxa de inativação de ufc/ml de *Candida spp.* após aplicação da TFD com o Laser nas diferentes doses forneceu os seguintes resultados: 41,08% (DP=9,23%) de inativação para a dose de 60 J/cm<sup>2</sup>, 62,04% (DP=7,91%) para a dose de 120J/cm<sup>2</sup> e 77,95% (DP=5,56%) para a dose de 180J/cm<sup>2</sup>. Quando submetidos ao tratamento estatístico (teste de Friedman) esses valores exibiram diferença estatisticamente significativa (tabela 4, gráfico 2).

Tabela 4 – Taxa de inativação de ufc/ml de *Candida spp.* após aplicação da TFD com Laser nas doses de 60J/cm<sup>2</sup>, 120J/cm<sup>2</sup> e 180J/cm<sup>2</sup>

| Doses                | Média   | Desvio Padrão | Mediana | Valor Mínimo | Valor Máximo |
|----------------------|---------|---------------|---------|--------------|--------------|
| 60J/cm <sup>2</sup>  | 41,0885 | 9,23291       | 42,4700 | 23,88        | 56,59        |
| 120J/cm <sup>2</sup> | 62,0545 | 7,90829       | 64,0300 | 43,46        | 72,79        |
| 180J/cm <sup>2</sup> | 77,9570 | 5,56247       | 76,7450 | 70,71        | 86,83        |

Fr=40,000; gl=2; p<0,001

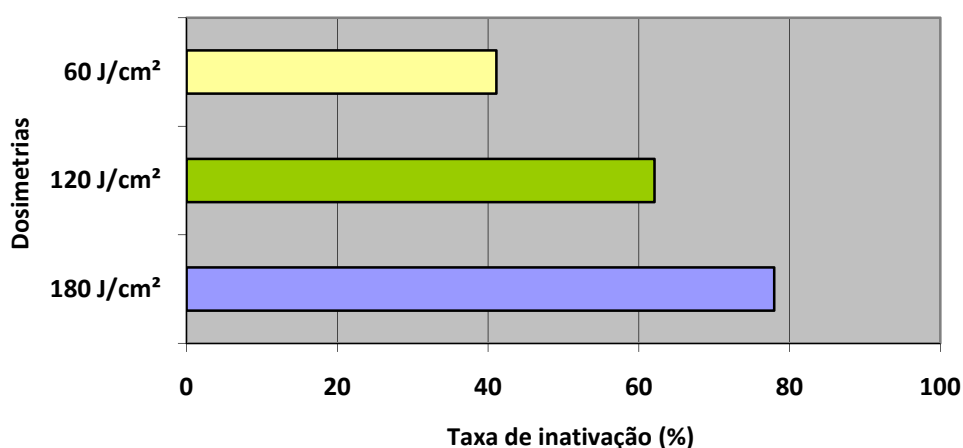


Gráfico 2 - Taxa de inativação de ufc/ml de *Candida spp.* após aplicação da TFD com Laser nas doses de 60J/cm<sup>2</sup>, 120J/cm<sup>2</sup> e 180J/cm<sup>2</sup>

5.5 Taxa percentual de inativação de ufc/ml de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* após aplicação da TFD com Laser nas doses de 60J/cm<sup>2</sup>, 120J/cm<sup>2</sup> e 180J/cm<sup>2</sup>

A tabela 5 especifica as taxas de inativação de ufc/ml após a aplicação da TFD com o Laser nas diferentes dosimetrias empregadas considerando as diferentes espécies de *Candida* avaliadas. O teste estatístico de Kruskal-Wallis foi aplicado para observar se havia diferença significativa entre a mediana da taxa de inativação proporcionada pelas diferentes doses em função das espécies. Não foi verificada diferença estatística significativa entre as taxas de inativação de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* nas doses de 60J/cm<sup>2</sup> ( $p=0,155$ ) e 120J/cm<sup>2</sup> ( $p=0,197$ ). No entanto, na dose de 180J/cm<sup>2</sup>, houve diferença significativa entre as espécies ( $p=0,011$ ). Comparações emparelhadas posteriores apontam diferença entre *C. albicans* e *C. krusei* ( $p=0,009$ ), *C. albicans* e *C. tropicalis* ( $p=0,028$ ) e *C. albicans* e *C. guilhermondii* ( $p=0,009$ ) sugerindo que *C. albicans* foi a espécie mais susceptível aos efeitos da terapia fotodinâmica na dose de 180J/cm<sup>2</sup>.

Tabela 5- Taxa de inativação de ufc/ml de *C. albicans*, *C.krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* após aplicação da TFD nas doses de 60J/cm<sup>2</sup>, 120J/cm<sup>2</sup> e 180J/cm<sup>2</sup>

| Espécies                | Doses (J/cm <sup>2</sup> ) | Média   | Desvio Padrão | Mediana                    | Valor Mínimo | Valor Máximo |
|-------------------------|----------------------------|---------|---------------|----------------------------|--------------|--------------|
| <i>C. albicans</i>      | 60                         | 46,7400 | 8,27036       | 46,0500                    | 35,40        | 56,59        |
|                         | 120                        | 67,4500 | 5,21197       | 68,5400                    | 58,72        | 72,79        |
|                         | 180                        | 85,0960 | 1,85234       | <b>86,0500<sup>A</sup></b> | 82,59        | 86,83        |
| <i>C. guilhermondii</i> | 60                         | 37,9120 | 7,44869       | 40,0500                    | 26,27        | 45,73        |
|                         | 120                        | 59,6940 | 12,21915      | 65,6500                    | 43,46        | 71,04        |
|                         | 180                        | 74,7420 | 3,80759       | <b>73,3300<sup>B</sup></b> | 71,37        | 81,16        |
| <i>C. krusei</i>        | 60                         | 34,8900 | 10,49981      | 33,8400                    | 23,88        | 51,21        |
|                         | 120                        | 59,5940 | 6,82266       | 61,6900                    | 52,57        | 68,47        |
|                         | 180                        | 77,3160 | 2,19021       | <b>77,1500<sup>C</sup></b> | 74,91        | 80,84        |
| <i>C. tropicalis</i>    | 60                         | 44,8120 | 7,27323       | 46,6100                    | 32,18        | 50,41        |
|                         | 120                        | 61,4800 | 4,76597       | 61,7300                    | 55,59        | 66,36        |
|                         | 180                        | 74,6740 | 5,79924       | <b>71,8300<sup>D</sup></b> | 70,71        | 84,70        |

O gráfico 3 ilustra o percentual de inativação de ufc/ml de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* após aplicação da TFD com Laser nas doses de 60J/cm<sup>2</sup>, 120J/cm<sup>2</sup> e 180J/cm<sup>2</sup>.

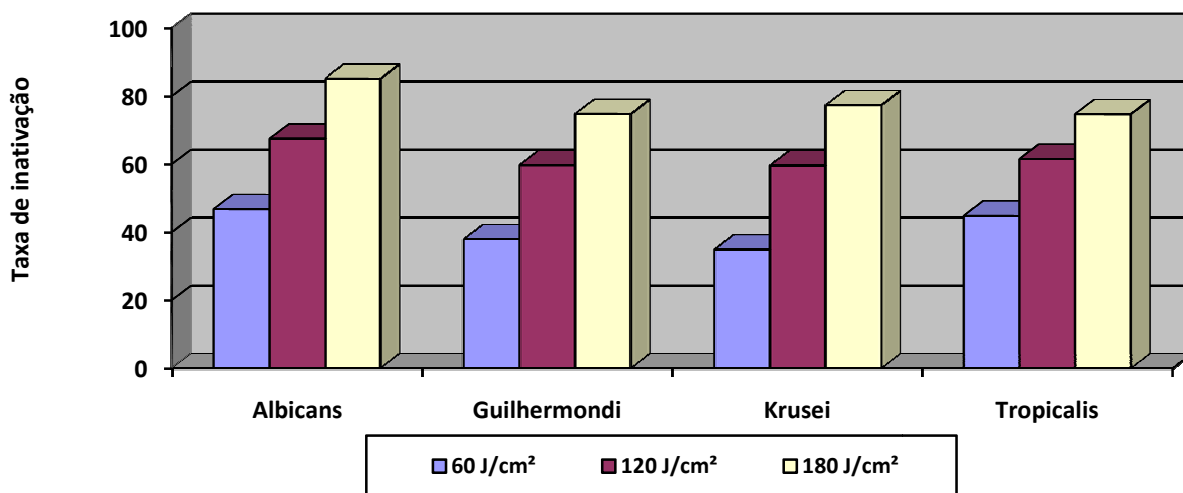


Gráfico3 – Percentual de inativação de ufc/ml das espécies de *Candida* avaliadas

*DISCUSSÃO*

## 6 Discussão

O interesse por tratamentos fungicidas eficientes vem aumentando devido ao crescente número de patógenos fúngicos causados pela ocorrência maior de infecções nosocomiais ou micoses oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Infelizmente, agentes seguros e específicos são escassos e a maioria deles é somente fungistática, ou seja, não provocam a morte, apenas inibem a multiplicação. Além disso, o uso rotineiro de antibioticoterapia leva progressivamente ao aparecimento de linhagens resistentes (PERUSSI, 2007).

Atualmente, muitos compostos antifúngicos estão disponíveis no mercado, entretanto possuem limitações, por apresentarem toxicidade ao hospedeiro e por desenvolverem resistência pelos microrganismos do gênero *Candida* (DONNELLY et al., 2008).

O aumento de casos de infecções causadas por cepas de *Candida* e conseqüentemente a utilização excessiva de antimicrobianos, favoreceu nas últimas décadas a resistência dessas leveduras aos agentes antifúngicos convencionais (PINTO; WEIKERT-OLIVEIRA; LYON, 2008). Esses agentes antifúngicos demonstram efeito mais fungistático do que fungicida, resultando em uma profilaxia inadequada (DONNELLY et al., 2007). Assim, torna-se necessário o estudo de métodos alternativos de controle desses microrganismos, como a terapia fotodinâmica que quando utilizada com o objetivo de verificar o efeito antimicrobiano recebe em inglês a denominação de PACT ( Photodynamic Antimicrobial Therapy).

Este estudo avaliou, *in vitro*, o efeito antimicrobiano da TFD na fotoinativação de espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii*) por meio do agente fotossensibilizador azul de metileno (150µg/ml) e da irradiação com um Diodo Laser operando no espectro visível vermelho (660nm, 40mW) em três dosimetrias (densidade de energia) distintas: 60, 120 e 180J/cm<sup>2</sup>.

As três doses avaliadas determinaram inativação significativa de *Candida spp.* A dose de 180J/cm<sup>2</sup> foi a mais eficaz, inativando 78% das ufc/ml seguida pelas doses de 120J/cm<sup>2</sup> e 60J/cm<sup>2</sup> com inativação média de 62% e 42% respectivamente. Vários estudos também observaram a redução do número de ufc de *Candida spp.* utilizando o AM como agente fotossensibilizador associado a um Laser como fonte de luz (COSTA et al., 2008; GIROLDO et al., 2009; JUNQUEIRA et al., 2009; MUNIN

et al., 2007; ROSSONI et al., 2008; SOUZA et al., 2006; TEICHERT et al., 2002). Alguns estudos utilizando outras fontes de luz e outros fotossensibilizadores também observaram a fotoinativação de *Candida spp.* (BLISS et al., 2004; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; LAMBRECHTS; ADELERS; VAN MARLE, 2005; MONFRECOLA et al., 2004; PELOI et al., 2008; STRAKHOVSKAYA et al., 2002).

Neste estudo, utilizou-se o azul de metileno como FS devido ao seu comprimento de onda de absorção máxima (660nm) que corresponde ao comprimento de onda emitido pelo diodo Laser que foi utilizado para a irradiação das amostras. De acordo com Nunez (2007) o AM apresenta maior penetração relativa na pele, possui comprovada ação antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus, é uma substância com baixa toxicidade, uma vez que, este composto é utilizado na área médica para uma série de finalidades terapêuticas como tratamento de metahemoglobinemia, antídoto para envenenamento por monóxido de carbono e cianureto e como marcador cirúrgico na ressecção de tumores, em concentrações muito superiores às utilizadas em TFD, além de ser de baixo custo (NUNEZ, 2007). Outra vantagem do AM destacada por Teichert et al. (2002) é que sua aplicação tópica conforme é proposta para a inativação de *Candida spp.* minimiza a interação com outros medicamentos. Antifúngicos convencionais como o Fluconazol interage com algumas drogas como Rifampicina, Zidovudina e Ciclosporina que são frequentemente utilizadas em pacientes imunocomprometidos (RIBEIRO et al., 2004).

O tempo de pré-irradiação do FS preconizado na TFD antimicrobiana varia de 1 a 10 minutos (RIBEIRO et al., 2005). Este tempo é necessário para que o FS possa se ligar à célula microbiana fotossensibilizando-a. No presente estudo, a permanência do AM em contato com as suspensões celulares foi de 5 minutos. Este tempo está de acordo com trabalhos anteriores que também utilizaram o azul de metileno como fotossensibilizador (GIROLDO et al., 2009; JUNQUEIRA et al., 2009; MARINHO, 2006; MUNIN et al., 2007; ROSSONI et al., 2008; SOUZA et al., 2006). De acordo com Lambrechts; Aalders; Van Marle (2005), o aumento no tempo de incubação não altera a quantidade de FS que entra na célula previamente à iluminação, nem tão pouco a efetividade da TFD.

Os corantes fenotiazícos (azul de metileno e azul de toluidina) se acumulam na membrana plasmática da célula fúngica durante o período de pré-irradiação e consequentemente esta é a estrutura celular danificada durante a irradiação. Tem

sido proposto que o aumento da permeabilidade da membrana resultante desse dano é que contribui para a morte celular (DONNELLY et al., 2008; GIROLDO et al., 2009). De acordo com Jori (2006) o aumento da permeabilidade de membrana durante os processos fotoquímicos iniciais é fundamental para acentuar o efeito fotodinâmico em células fúngicas, pois a inativação ocorre efetivamente após a captação do FS para o interior da célula. Tal fato pode ser comprovado pelos resultados de Lambrechts; Aalders; Van Marle, (2005).

A redução de ufc/ml de *Candida spp.* aumentou conforme foram utilizadas densidades de energia mais altas do Laser. Este resultado pode estar relacionado com o tempo de aplicação da terapia, visto que no grupo em que a dose utilizada foi de 60J/cm<sup>2</sup> o tempo de aplicação foi de apenas 1 minuto, no grupo de 120J/cm<sup>2</sup> o tempo foi de 2 minutos e no grupo de 180J/cm<sup>2</sup> foi de 3 minutos. Considerando que a inativação das células fúngicas pela TFD está relacionada a produção de radicais tóxicos como o oxigênio singleto, o tempo de aplicação da terapia pode ser considerado um fator importante na obtenção de resultados satisfatórios, visto que quanto maior for este tempo, maior será a quantidade de radicais tóxicos gerados os quais irão inativar enzimas intracelulares rompendo o metabolismo determinando a morte celular.

Poucos estudos investigaram a variação dos parâmetros de irradiação como potência e densidade de energia utilizando o Laser como fonte de luz. A maioria dos estudos sobre fotoinativação de *Candida spp.* investigaram variações no tipo ou na concentração dos fotossensibilizadores. Assim como neste estudo, Jackson et al. (1999), Rossoni et al. (2008) e Marinho (2006) observaram que densidades de energia mais elevadas proporcionaram maior inativação de *Candida spp.* utilizando o Laser como fonte de luz. Dovido et al. (2010) também observaram maiores índices de inativação de *Candida spp.* utilizando densidades de energia mais elevadas utilizando um LED como fonte de luz.

Todas as espécies de *Candida* avaliadas mostraram-se significativa redução no número de ufc/ml após a aplicação da TFD. No entanto, a espécie *C. albicans* apresentou-se mais sensível do que as demais espécies avaliadas nas três dosimetrias avaliadas, embora somente na dose de 180J/cm<sup>2</sup> esta diferença tenha sido estatisticamente significativa. Este resultado é animador tendo em vista que *C. albicans* é a espécie predominante do fungo na cavidade oral (AKPAN; MORGAN, 2002; MIRANDA, 2007). Outros estudos também observaram maior susceptibilidade

de *C.albicans* aos efeitos da TFD (MARINHO et al., 2007; SOUZA et al., 2006). No entanto, Wilson; Mia (1993) observaram apenas 42% de inativação de *C.albicans* utilizando o AM (0,1mg/ml) como FS e Laser (660nm) como fonte de luz. A diferença nos resultados pode ser atribuída aos parâmetros utilizados para a irradiação.

A susceptibilidade de *C. krusei* aos efeitos da TFD nas três doses empregadas neste estudo pode ser considerado um resultado importante considerando que esta espécie é intrinsecamente resistente a várias drogas antifúngicas e tem sido frequentemente isolada em pacientes imunocomprometidos particularmente quando há relato de resistência ao fluconazol (MUNOZ et al., 2005). Souza et al. (2006) também observaram excelentes resultados da TFD na inativação de *C. krusei* (91, 6% de inativação). No entanto, Bliss et al. (2004) relatam maior resistência das cepas de *C. krusei* aos efeitos da TFD. De acordo com Saramanayake et al. (1995) a espécie *C. krusei* possui maior hidrofobicidade superficial em comparação a *C.albicans*, sendo esta característica a responsável pela maior tendência que as células de *C.krusei* possuem de se agregar umas as outras quando estão na forma de leveduras. Essa agregação das células por sua vez, poderia dificultar a associação do oxigênio singlete a superfície das células diminuindo a efetividade da terapia (BOCKING et al., 2000). A inativação de *C. tropicalis* obtida neste estudo também deve ser ressaltada tendo em vista que esta espécie é pouco sensível a maioria das drogas antifúngicas convencionais.

Embora vários trabalhos relatem a susceptibilidade de espécies de *Candida* a TFD, poucos estudos observaram inativação total de *Candida spp.* Lambrechts et al. (2005) utilizaram uma porfirina catiônica associada a luz halógena (12,6J/cm<sup>2</sup>) e observaram ausência de colônias viáveis de *C.albicans* após 48 horas, no entanto também observaram danos consideráveis aos fibroblastos quando esse FS foi avaliado. Teichert et al. (2002) observaram completa eliminação desse microrganismo da cavidade bucal de ratos imunossuprimidos, após irradiação com 275J/cm<sup>2</sup> de laser diodo. Os autores utilizaram concentrações superiores de AM (450µg/L a 500µg/L), e uma maior dose de luz (275J/cm<sup>2</sup>) em comparação com a concentração de AM e dose de luz utilizados neste estudo. Dovigo et al. (2010) também observaram total inativação de *Candida spp.* utilizando o Photogem® como FS e um LED azul como fonte de luz. A desvantagem desse FS é o seu alto custo.

A inativação dos microrganismos pela TFD depende de parâmetros relacionados ao Laser como o comprimento de onda, densidade de potência e a

densidade de energia que é responsável pelos efeitos desejáveis da radiação. Estes efeitos promovem alterações no gradiente de concentração iônica na mitocôndria, inibindo ou estimulando a síntese de ATP e ao mesmo tempo produzindo oxigênio singlete que é tóxico para as células (BORTOLETTO et al., 2004). Outros fatores que podem influenciar o número de microrganismos afetados pela TFD são o tipo e a concentração do FS, tipo de microrganismo e o período de incubação do FS previamente a irradiação (WILSON; MIA, 1993).

Zeina et al. (2001) relataram que *C. albicans* assim como outros fungos são menos susceptíveis aos efeitos da TFD do que as bactérias gram-positivas, necessitando de maiores doses de luz e de maiores concentrações do FS. Isto pode ser atribuído a presença da membrana nuclear nos fungos, ao maior tamanho celular e ao reduzido número de sítios para o oxigênio singlete por unidade de volume (DEMIDOVA, HAMBLIN, 2005; ZEINA et al., 2001).

Neste estudo a TFD foi aplicada em *Candida spp.* na forma de levedura. De acordo com Jackson et al. (1999), tanto a forma de levedura como a forma filamentosa de *Candida spp.* são sensíveis à terapia, embora a hifa seja mais susceptível. De acordo com os autores, a parede celular passa por algumas modificações antes, durante e após a alteração morfogênética para a forma de hifas, que resultam na maior sensibilidade do microrganismo a fotoinativação. Os autores também justificaram que na forma de hifa há uma menor quantidade de Glutathione, um antioxidante que protege as células contra radicais tóxicos, e essa característica também contribui para que a forma de hifa seja mais susceptível aos efeitos da TFD. Podemos supor que se 77,95% das leveduras do presente estudo foram sensíveis a TFD na dose de  $180\text{J}/\text{cm}^2$ , é provável que as hifas, que constituem a forma patogênica da candidose, o sejam em maior grau. Esta suposição deve ser investigada através de estudos *in vitro* com indução de formação de hifas.

Neste estudo a aplicação isolada do AM não promoveu inativação significativa das cepas de *Candida spp.* sugerindo que o AM não possui efeitos tóxicos para *Candida spp.* Este resultado corrobora o de outros estudos (COSTA et al., 2008; JUNQUEIRA et al., 2009; MUNIN et al., 2008; TEICHERT et al., 2002; SOUZA et al., 2006). No entanto, alguns estudos reportaram atividade antifúngica do azul de metileno sem a irradiação da luz (USACHEVA et al., 2001; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002; WILSON; MIA, 1993). Estes achados sugerem que a densidade

de energia pode ter sido a responsável pelo efeito antimicrobiano da TFD obtidos neste estudo.

Também não foi observado inativação significativa de *Candida spp.* quando da utilização da irradiação Laser na ausência do AM. No entanto, Rossoni et al. (2008) observaram redução significativa de *C. albicans* e Souza et al. (2006) observaram redução significativa de *C. tropicalis* quando utilizaram a radiação Laser sugerindo uma susceptibilidade intrínseca dessas espécies à irradiação Laser. Souza et al. (2006) sugeriram a presença de fotossensibilizadores endógenos nesses microrganismos. De acordo com Karu(1989) , a irradiação de células no comprimento de onda visível e sua conseqüente absorção por moléculas dos tecidos podem causar um efeito proliferativo ou inibitório. Esse efeito pode ser elucidado por um processo que envolve excitação eletrônica com transferência de energia ao oxigênio do meio, desde que o citocromo age como um FS, fazendo com que o dano fotodinâmico ocorra sem a presença de um FS externo.

Uma das grandes vantagens de se utilizar a TFD na fotoinativação de *Candida spp.* é que não há o desenvolvimento de resistência das cepas a esta terapia. De acordo com Donnelly et al. (2008) os efeitos bioquímicos e funcionais da fotoinativação incluem a inativação de enzimas e a peroxidação de lipídeos causando danos a membrana celular, lisossomos e mitocôndrias. Ainda de acordo com estes autores, o oxigênio singleto gerado pela excitação do FS é um agente oxidante não específico e conseqüentemente não há defesa celular contra o mesmo. Além disso, enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase são inativadas pelo oxigênio singleto. Os autores afirmam ainda que não há relatos de mutações genéticas em microrganismos decorrentes da TFD. Outros fatores que contribuem para que os fungos não desenvolvam resistência é o fato de que o oxigênio singleto está presente apenas durante a irradiação e os fungos não são constantemente expostos ao mesmo como são aos antifúngicos convencionais.

As vantagens acima descritas estimulam o desenvolvimento de pesquisas clínicas com o uso da TFD no tratamento da candidose bucal principalmente em pacientes imunocomprometidos que são os mais acometidos por esta infecção oportunista , cujo tratamento com antifúngicos convencionais não promove melhora satisfatória do quadro.

*CONCLUSÃO*

## 7 Conclusão

1. A terapia fotodinâmica com azul de metileno (150µg/ml) e Laser InGaAlP (660nm, 40mW) nas dosimetrias de 60J/cm<sup>2</sup>, 120J/cm<sup>2</sup> e 180 J/cm<sup>2</sup>, promoveu inativação significativa das espécies de *Candida* avaliadas (*C.albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilhermondii* e *C. krusei*).
2. Não houve diferença significativa de sensibilidade aos efeitos da TFD entre as espécies considerando as dosimetrias de 60J/cm<sup>2</sup> e 120J/cm<sup>2</sup>.
3. A dosimetria de 180J/cm<sup>2</sup> foi a mais eficaz determinando 77,95% de inativação das cepas de *Candida* avaliadas
4. Na dosimetria de 180J/cm<sup>2</sup> a espécie *C.albicans* mostrou maior sensibilidade aos efeitos da TFD em relação às demais espécies (*C. tropicalis*, *C. guilhermondii* e *C. krusei*).

## *REFERÊNCIAS*

## REFERÊNCIAS

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n.922, p.455-459, Aug. 2002.

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M.; The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, n.5, p. 656-669, Nov. 2001.

ALMEID, O. P.; SCULLY, C. Fungal infections of the mouth. **Brazilian Journal of Oral Science**, v.1, n. 1, p. 19-26, abr./jun. 2002.

AL-RUBEAI, M. A.; EL-HASSI, M.F. Inactivation of wild type and mutant *Aspergillus nidulans* conidia by far-UV, near-UV, visible and sun light. **Environmental and Experimental Botany**, v.26, n.3, p. 243-252, July, 1986.

BANTING, D.W.; HILL, S.A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Special Care in Dentistry**, v. 21, n.1, p.4-8, 2001.

BLISS, J.M.; BIGELOW, C.E.; FOSTER, T.H.; HAIDARIS, C.G. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n.6, p.2000-2006, June, 2004.

BOCKING, T.; BARROW, K.D.; NETTING, A.G.; CHILCOTT, T.C. COSTER, H.G.L.; HOFER, M. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v.267, n.6, p.1607-1618, Mar. 2000.

BORTOLETTO, R.; SILVA, N.S.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T.T.; DA MATA, R.A.; PACHECO-SOARES, R.A. Mitochondrial membrane potential after low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, v.18, n.4 p. 204-206, 2004.

BONINI, D. **Correlação entre bioquímica celular e necrose tecidual em regimes de fracionamento de doses de luz em terapia fotodinâmica**. 2006, 65f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de química da Universidade de São Paulo, São Carlos.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n.3, p.173-186, Aug. 2002.

CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M.; SALA, A.R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v.78, n.1, p.1-6, Jan. 2005.

CAMPISI, G.; PIZZO, G.; MANCUSO, S.; MARGIOTTA, V. Gender differences in HIV related oral lesions: an italian study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.91, n.5, p.546-551, May, 2001.

CARTLEDGE, J.G.; MIDGLEY, J.; GAZZARD, B.J. Non-*albicans* oral candidosis in HIV positive patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n.3, p.410-422, Mar. 1999.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Phothodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004.

CHAM, Y.; LAI, C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v.18, n.1, p.51-55, 2003.

CHAVASCO, J.K.; PAULA, C.R.; HIRATA, M.H.; ALEVA, N.A.; MELO, C.E.; GAMBALE, W.; FRANCO, M.C. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV- positive and HIV- negative patients in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.1, p. 21-26, Jan./Feb. 2006.

CHONDROS, P.; NIKOLIDAKIS, D.; CHRISTODOULIDES.; ROSSLER, R.; GUTKNECHT, N.; SCULEA, A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontalmaintenance: a randomized controlled clinical trial. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n.5, p.681-688, Sept. 2008.

CITAK, S.; OZÇELIK, B.; CESUR, S.; ABBASOGLU, U. *In vitro* susceptibility of *Candida* species isolated from blood culture to some antifungal agents. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 58, n.1, p.44-46, Feb. 2005.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. **Evaluation of New Antimicrobials in vitro and experimental animal infections.** In: LORIAN, V. Antibiotics in laboratory medicine. 3 ed. New York, 1991.

COCO, B.J.; BAGG, J.; CROSS, L.J.; RAMAGE, G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n.5, p.377-383, Oct. 2008.

CORMICK, M.P.; ALVAREZ, M.G.; ROVERA, M.; DURANTINI, E.N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.4, p.1592-1599, Apr. 2009.

COSTA, L.J; BIRMAN, E.G.; ALVES, S.H. A.; CURY, A.E. Antifungal susceptibility of *C. albicans* isolated from oral mucosa of patients with cancer. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n.3, p.1-8, July/Sept. 1999.

DANILUK, T.; TOKAJUK, G.; STOKOWSKA, W.; FIEDORUK, K.; SCIEPUK, M.; ZAREMBA, M.L.; ROZKIEWICZ, D.; CYLWIK-ROKICKA, D.; KEDRA, B.A.; ANIELSKA, I.; GÓRSKA, M.; KEDRA, B.R. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. **Advances in Medical Science**, v. 51, supl. 1, p. 77-80, 2006.

DAVIES, A.N.; BRASILFORD, S.; BROADLEY, K.; BEIGHTON, D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. **Oral Microbiology and Immunology**, v.17, n.2, p.79-84, Apr. 2002.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.17, n.3, p.245-254, Sept./Dec. 2004.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2329-2335, June, 2005.

DE REPENTIGNY, L; AUMONT, F; BERNARD, K; BELHUMEUR, P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.68, n.6, p.3172-3179, June, 2000.

DERYCKE, A.S.; DE WITTE, P.A.; Liposomes for photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n.1, p.17-30, Jan. 2004.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low power laser. **Archives of Oral Biology**, v.37, n.11, p.883-887, Nov. 1992.

DONNELLY, R.F.; McCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M.; WOOLFSON, A.D. Potencial of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterization of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v.86, n.1, p.59-69, Jan. 2007.

DONNELLY, R.F.; McCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v.163, n.1, p.1-12, Jan. 2008.

DONGARI-BAGTZOGLOU, A; FIDEL, P.L. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. **Journal of Dental Research**, v. 84, n.11, p. 966-977, Nov. 2005.

DOS SANTOS, D.J.; ERIKSSON, L. Permeability of psoralen derivatives in lipid membranes. **Biophysical Journal**, v.91, n.7, p.2464-2474, Oct. 2006.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, P. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n.12, p.889-905, June. 1998.

DOVIGO, L.N. **Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida spp.*** 2007, 149f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

DOVIGO, L.N. PAVARINA, A.N.; RIBEIRO, D.G.; ADRIANO, C.S.; BAGNATO, V.S. Photodynamic inactivation of four *candida* species induced by Photogem®. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.1, p.42-49, Jan./Mar.2010.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.11, p. 685-702, Nov. 2003.

EISENMAN, H.C.; NOSANCHUK, J.D.; WEBBER, J.B.W.; EMERSON, R.J.; CAMESANO, T.A.; CASADEVALL, A. Microstructure of cell wall-associated melanin

in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemistry**, v. 44, n.10, p.3683-3693, Mar. 2005.

FARAH, C.S.; ASHMAN, R.B.; CHALLACOMBE, S.J. Oral candidosis. **Clinics in Dermatology**, v.18, n.5, p.553-562, Sept./Oct. 2000.

FERREIRA, J.; KURACHI, C.; MORIYAMA, L.T.; MENEZES, P.F.C.; PERUSSI, J.R.; SIBATA, C.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO, O.; BAGNATO, V.S. Correlation between the photostability and photodynamic efficacy for different photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 3, n.2, p.91-95, 2006

FIGUEIRAL, M.H.; AZUL, A.; PINTO, E.; FONSECA, P.A.; BRANCO, F.M.; SCULLY, C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors – a large cohort. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.34,n.6, p. 448-455, June, 2007.

FRIEDBERG, J.S.; SKEMA, C.; BAUM, E.D.; BURDICK, J.; VINOGRADOV, S.A.; WILSON, D.F.; HORAN, A.D.; NACHAMKIN, I. In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, n.1, p.105-107, July. 2001.

GABRIELLI, D.S. **Eficiência fotodinâmica dos fenotiazínicos em mitocôndrias e células tumorais**. 2007, 68f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Instituto de química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

GARCEZ, A.A. et al. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 57, n. 3, p.223-225, maio/jun. 2003.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.501-517, Oct.1999.

GIROLDO, L.M.; FELIPE, M.P.; OLIVEIRA, M.A.; MUNIN, E.; ALVES, L.P.; COSTA, M.S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v.24, n.1, p.109-112, Jan. 2009.

GOMER, C.J.; RAZUM, N.J. Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. **Photochemistry and Photobiology**, v.40, n.4, p.435-439, Oct.1984.

GOMPERTZ, O.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORREA, B. Micoses oportunistas e outras micoses. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008, p.525-540

GORMAN, S.A.; BROWN, S.B; GRIFFITHS, J. Overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine and phenoathiazine photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.25, n. 1, p. 79-108, 2006.

GROSSMAN, M.C. What's new in cutaneous laser research? **Dermatologic Clinics**, v.15, n.1, p.1-8, Jan.1997.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choose. **Phytochemical Analysis**, v.11, n.3, p.137-147, 2000.

HAMBLIN, M.R.; O'DONNELL, A.; MURTHY, N.; CONTAG, C.H.; HASAN, T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v.75, p. 51-57, 2002.

HAMBLIN, M.R.; HASSAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & photobiological science: official journal of the European photochemistry association and the European society for photobiology**, v.3, n.5, p. 436-450, May, 2004.

HARRIS, F.; CAHTFDIELD, L.K.; PHOENIX, D.A. Phenotiazinium based photosensitizers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Current Drug Targets**, v.5, p. 615-627, 2006.

HOCKBERGER, P.E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v.76, n.6, p.561-579, Dec. 2002.

HUNTER, K.D.; GIBSON, J.; LOCKHART, P.; PITHIE, A.; BAGG, J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole –exposed HIV – positive patients. **Oral surgery Oral medicine Oral pathology Oral radiology and Endodontics**, v. 85, n.5, p. 558-564, May, 1998.

ITO, T. Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochemistry and Photobiology**, v.25, n.1, p. 47-53, Jan. 1977.

JACKSON, Z.; MEGHJI, S.; MacROBERT, A.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. **Lasers in Medical Science**, v.14, n.2, p.150-157, June, 1999.

JORGE, A.O.C. **Microbiologia Bucal**, 2ed. São Paulo: Editora Santos, 1998.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.25, n.1/2, p.505-519, 2006.

JUNQUEIRA, J.C.; COLOMBO, J.D.; MARTINS, C.Y.K.; ITO, Y.R.; JORGE, A.O.C. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. **Microbiol. Immunol.**, v.49, p.199-207, 2005.

JUNQUEIRA, J.C.; MARTINS, J.S.; FARIA, R.L.; COLOMBO, C.E.D.; JORGE, A.O.C. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. **Lasers in Medical Science**, v.24, n.6, p.877-884, Nov. 2009.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v.56, n.5 p.691-704, May. 1989.

KOCHEVAR, I.E.; LAMBERT, C.R.; LYNCH, M.C.; TEDESCO, A.C. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1280, n.2, p. 223-230, Apr. 1996.

KOGA-ITO, C.Y.; LYON, J.P.; RESENSE, M.A. COMPARISON BETWEEN E-TEST AND CLSI BROTH MICRODILUTION METHOD FOR ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF *Candida albicans* ORAL ISOLATES. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, v.50, n.10, p. 7-10, Jan./Feb. 2008.

KÖMERIK, N. et al. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 932-940, Mar. 2003.

KÖMERIK, N.; MacROBERT, A.J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v.25, n. 1/2, p. 487-504, 2006.

KOMERIK, N.; WILSON, N. Factors influencing the susceptibility of gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.4, p.618-623, 2002.

KONSBERG, R.; AXELL, T. Treatment of *Candida* infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 78, n.3, p.306-311, Sept.1994.

KOZIOL-MONTEWKA, M.; MADRYS, A.; PALUCH-OLEŚ, J.; BOGUT, A.; BUCZYŃSKI, K.; JABLONKA, S. MPO and cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. **Immunological Investigations**, v. 35, n.2, p.167-179, 2006.

KRESPI, Y.P. et al. Lethal photosensitization of oral pathogens via red-filtered halogen lamp. **Oral Disease**, v. 11, suppl. 1, p. 92-95, Mar. 2005.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAMBRECHTTS, S.A.G.; AALDERS, M.C.G.; VERBRAAK, F.D.; LAGERBERG, J.W.M.; DANKERT, J.B.; SCHUITMAKER, J.J. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v.79, n.1, p.51-57, Apr. 2005.

LAMBRECHTTS, S.A.G.; AALDERS, M.C.G.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.5, p. 2026-2034, May, 2005.

LAUSTRIAT, G. Molecular mechanism of photosensitization. **Biochimie**, v. 68, n.6, p. 771-778, June, 1986.

LEUNG, W.K; DASSANAYAKE, R.S; YAU, J.Y.Y; JIN, L.J; YAM, W.C; SAMARANAYAKE, L.P. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.6, p. 2219-2226, June, 2000.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina**, v.39, n.12, p.1137-1150, 2003.

LYON, J.P.; RESENDE, M.A. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v.102, n.55, p. 632-638, Nov. 2006.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 237-243, mar./abr. 2000.

MCINTYRE, G. T. Oral Candidosis. **Dental Update**. v. 28, p. 132-139, 2001.

MACMILLAN, J.D.; MAXWELL, W.A.; CHICHESTER, C.O. Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser. **Photochemistry and Photobiology**, v.5, n.7, p.55-65, July, 1966.

MAHMOUD, A.G.; LOUIS, B.R. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 501-517, Oct. 1999.

MAISCH, T.; SZEIMIES, R.M.; JORI, G.; ABELS, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, n.10, p.907-917, Oct. 2004.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v.22, n.2, p.83-91, June, 2007.

MARINHO, S.A. **Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida sp.* e de células epiteliais: estudo in vitro**. 161f. 2006. Tese (Doutorado em Estomatologia Clínica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARTIN, J.P.; LOGSDON, N. The role of oxygen radicals in dye mediated photodynamic effects in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.15, p. 7213-7219, May, 1987.

MATHABA, L.T.; DAVIES, G.; WARMINGTON, J.R. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. **Journal of Medical Microbiology**, v.42, n. 5, p. 372-379, May, 1995.

MATTHEWS, R.C. Pathogenicity determinants of *C. albicans*: potential targets for immunotherapy? **Microbiology**, v.140, p.1505-1511, July, 1994.

MIRANDA, L. N. **Colonização por *Candida* em indivíduos com candidemia**. 2007. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MONFRECOLA, G.; PROCACCINI, E.M.; BEVILACQUA, M.; MANCO, A.; CALABRO, G.; SATOIANNI, P. *In vitro* effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. **Photochemical and Photobiological Science**, v.3, n.5, p.419-422, May, 2004.

MUNIN, E.; GIROLDO, L.M.; ALVES, L.P.; COSTA, M.S. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v.88, n.1, p.16-20, July, 2007.

MUÑOZ, P.; SÁNCHEZ-SOMOLINOS, M.; ALCALÁ, L.; RODRÍGUES-CRÉIXEMS, M.; PELÁEZ, T.; BOUZA, E. *Candida krusei* fungemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, n.2, p.188-193, Feb. 2005.

NELSON, J.S.; MCCULLOUGH, J.L.; BERNIS, M.W. Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology. In: ARDNT, K.A.; DOVER, J.S.; OLBRIGHT, S.M. *Laser in cutaneous and aesthetic surgery*. Philadelphia, Lippincott-Raven, p.349, 382, 1997.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOUT, J.E. Doenças Fúngicas e Protozoárias. In: \_\_\_\_\_. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.183-204.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta biochimica polonica**, v.52, n.2, p.339-352, 2005.

NÚÑEZ, S.C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina na com relação à eficiência fotodinâmica**. 2007, 127f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.

OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELIXHENKO, I. The role apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochemistry and Photobiology Science**, v.1, p.1-21, 2002.

OLIVEIRA, C.E. ***Candida albicans* e estomatite por dentadura: avaliação da presença do fungo na lesão, na prótese total superior e no sangue.** 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de concentração: Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.

PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.20, n.3, p.485-505, Sept. 2006.

PATTERSON, M.S.; WILSON, B. Photodynamic therapy. In: J.V. Dyh (Ed.). **The Technology of Radiation Oncology**. Madison: Medical Physics Publishing, 1999. Photodynamic therapy, p.941-980.

PAULA, C.R. Candidiases. In: ZAITZ, C. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998, p.99-107.

PAULINO, T.P.; RIBEIRO, K.F.; THEDEI, G.; TEDESCO, A.C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Archives of oral biology**, v.50, n.3, p. 353-359, Mar. 2005.

PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Bioscience**, v.33, n.2, p.231-237, June, 2008.

PEREIRA, C.A.; COSTA, A.C.B.P.; FREIRE, F.; BERALDO, P.T.A.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Inativação fotodinâmica de biofilmes de *Candida albicans*. In: VIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008. São José dos Campos. Anais eletrônicos... São José dos Campos: VIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008. Disponível em: [http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2009/anais/arquivos/0422\\_0113\\_01.pdf](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/0422_0113_01.pdf). Acesso em 10 de janeiro de 2010.

PERUSSI, J.R. Photodynamic inactivation of microorganisms. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.4, jul./ago. 2007.

PEREZOUS, L.F. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 93, n.3, p.288-293, Mar. 2005.

PINTO, P. M. **Caracterização fenotípica e análise da variabilidade genética de espécies do gênero *Candida* isoladas de pacientes portadores ou não de**

**doenças de base, MG.** 2003,148p.Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

PINTO, P.M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B.; LYON, J.P. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. Obtained from patients with different predisposing factors to candidosis. **Microbiological Research**, v.163, n.5, p.579-585, Sept. 2008.

PONTON, J.; RUCHEL, R.; CLEMONS, K.V. Emerging pathogens. **Medical Mycology**, v.38, suppl.1, p.225-236, 2000.

PRATES, R.A. et al. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manne. **Laser Physics**, v.19, n.5, p. 1038-1044, 2009.

RAAB, O. Uber die wirkung fluorezirender stoffe auf infusorien. **Z. Biol**, v.39, p.524-536, 1900.

RIBEIRO, E.L.; GUIMARÃES, R.I.; INÁCIO, M.C.C.; FERREIRA, W.N.; CARDOSO, C.G.; DIAS, S.M.S. Aspecto das leveduras de *Candida* vinculada as infecções nosocomiais. **News Lab**, v.64, p.106-26, 2004.

RIBEIRO, M.S. et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. In: Livro virtual, 23<sup>o</sup> CIOSP, São Paulo, 2005, 26p. Disponível em: <http://www.netodonto.com.br/ciosp/index.php>. Acesso em 10 abril de 2010.

RODRIGUES, G.B. **Avaliações das atividades fotossensibilizadoras do azul de metileno, da cloro-alumínio ftalocianina e do nitrosilo de rutênio no fungo *Cryptococcus neoformans*.** 2008, 88f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ROMANOVA, N.A; BROVKO, L.Y; MOORE, L. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6393-6398, Nov. 2003.

ROSSONI, R.D.; SOUSA, R.C.; PEREIRA, C.A.; JORGE, A.O.C.; JUNQUEIRA, J.C. Comparação da eficácia fotodinâmica do azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita contra *Candida albicans*. In: VIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008. São José dos Campos. Anais eletrônicos. São José

dos Campos: VIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008. Disponível em: [http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2009/anais/arquivos/0422\\_0113\\_01.pdf](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/0422_0113_01.pdf). Acesso em 10 de janeiro de 2010.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.2, p.668-679, Feb. 2005.

SARAMANAYAKE, L.P. Oral mycoses in HIV infection. **Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology**, v.73, n.2, p. 171-80, Feb.1992.

SARAMANAYAKE, Y.H.; WU, P.C.; SARAMANAYAKE, L.P.; SO, M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.103, n.10, p.707-713, Oct. 1995.

SHIMIZU, M.; EGASHIRA, T.; TAKAHAMA, U. Inactivation of *Neurospora crassa* conidia by singlet molecular oxygen generated by a photosensitized reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n.2, p.293-296, May. 1979.

SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.8, p.869-880, Aug. 2000.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Photodynamic therapy: pharmacological aspects, applications and news from medications development. **Química Nova**, v.25, n.5, p.801-807, 2002.

SMIJS, T.G.; SCHUITMAKER, H.J.; Photodynamic inactivation of the Dermatophyte *Trichopyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n.5, p.556-560, May, 2003.

SMIJ, T.G.; VAN DER HASS, R.N.; LUGTENBURG, J.; LIU, H.; DE JONG, R.L.; SCHUITMAKER, H.J. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichopyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n.2, p.197-202, Sept./Oct. 2004.

SOARES, B.M.; SILVA, D.L.; SOUSA, G.R.; AMORIM, J.C.F.; RESENDE, M.A.; PINOTTI, M.; CISALPINO, P.S. In vitro photodynamic inactivation of *Candida spp.* growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v.94, n.1, p. 65-70, Jan. 2009.

SPOLIDORIO, D.M.; SPOLIDORIO, L.C.; BARBEIRO, R.H. Quantitative evaluation of *Streptococcus mutans* and *Candida* species and salivary factors in the oral cavity of patient undergoing radiotherapy. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.4, p.354-358, Oct./Dec. 2001.

SOUKOS, N.S.; FYVIE, L.A.X.; HAMBLIN, M.R.; SOCRANSKY, S.S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.10, p.2595-2601, Oct. 1998.

SOUZA, S.C.; JUNQUEIRA, J.C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, A.Y.; MUNIN, E.; JORGE, A.O.C. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v.83, n.1, p.34-38, Apr. 2006.

STRAKHOVSKAYA, M.G.; ZHUKHOVITSKI, V.G.; MIRONOV, A.F.; SEREGIN, A.M.; STRANADKO, E.F.; RUBIN, A.B. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. **Biochemistry and Biophysics**, v.384, p.155.158, My/June, 2002.

STENSTROM, K.; MOAN, J.; BRUNBORG, G.; EKLUND, T. Photodynamic inactivation of yeasts cells sensitized by hematoporphyrin. **Photochemistry and Photobiology**, v.32, n.3, p.349-352, Sept. 1980.

TEGOS, G.P.; DEMIDOVA, T.N.; ARCILA-LOPEZ, D.; LEE, H.; WHARTON, T.; GALI, H.; HAMBLIN, M.R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. **Chemistry & Biology**, v. 12, n.10, p.1127-1135, Oct. 2005.

TEICHERT, M.C.; JONES, J.W.; USACHEVA, M.N.; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v.93, n.2, p.155-160, Feb. 2002.

THULER, L.C.; HATHERL, A.L.; GOES, P.N. Mortality descriptors in HIV inpatients. **Revista de Saúde Pública**, v.32,n.6, p. 572-578, Dec. 1998.

TOREZAN, L.A.R.; **Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica com ácido 5-delta aminolevulínico (ALA) tópico no carcinoma basocelular**. 2000, 100f.

Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

URIZAR, J.M.A. Candidiasis orales. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.19, n.1, p.17-21, marzo, 2002.

USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.29, n.2, p.165-173, 2001.

VARGAS, K.G.; JOLY, S. Carriage frequency, intensity of carriage and strains of oral species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.2, p.341-350, Feb. 2002.

WAINWRGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v.35, p.351-359, 1996.

WAINWRGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **The journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, p.13-28, 1998.

WAINWRGHT, M. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n.4, p. 381-394, Dec. 2000.

WAINWRGHT, M.; CROSSLEY, K.B Methylene blue – a therapeutic dye for all seasons. **Journal of chemotherapy**, v.14, n.5, p.431-443, Oct. 2002.

WAINWRGHT, M.; CROSSLEY, K.B. Photosensitizing agents-circumventing resistance and breaking down films: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.53, n.2, p.119-126, Mar. 2004.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.2, p.308-402, Apr. 1998.

WILLIAMS, J.A.; PEARSON, G.J.; COLLES, M.J.; WILSON, M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v.37, n.3, p.190-193, May/June, 2003.

WILSON, M.; MIA, N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans* *in vitro*. **Lasers in Medical Science**, v. 9, n.2, p.105-109, June, 1994.

WILSON, M.; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low power laser light. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 22, n.8, p. 354-357, Sept. 1993.

VENEZIO, R.F.; VINCENZO, C.D; SHERMAN, R.; REICHMAN, M.; ORIGINATO, T.C.; THOMPSON, K.; REICHMAN, O.H. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **The Journal of Infectious Disease**, v.151, n.1, p. 166-169, Jan. 1985.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W.M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **The British Journal of Dermatology**, v.144, n.2, p. 274-278, Feb. 2001.

*ANEXOS*

## ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa