



Universidade Federal do ABC

TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Engenharia Biomédica

Metodologias para estudo do efeito fotodinâmico em *Candida albicans*.

Trabalho submetido à
Universidade Federal do ABC
como parte dos requisitos para a
aprovação da disciplina de
trabalho de graduação III do
curso de Engenharia Biomédica.

Camila Campos Santos – RA: 11033508

Santo André – São Paulo

Maio – 2014

Camila Campos Santos

Metodologias para estudo do efeito fotodinâmico em *Candida albicans*.

Trabalho submetido à Universidade Federal do ABC como parte dos requisitos para a aprovação da disciplina de trabalho de graduação III do curso de Engenharia Biomédica.

Prof^a. Dr^a. Patricia Aparecida da Ana

Orientadora

Centro de engenharia e ciências sociais aplicadas
(CECS)- UFABC

Santo André, São Paulo, Maio – 2014.

Ficha Cartográfica

Campos Santos, Camila.

Metodologias para estudo do efeito fotodinâmico em *Candida albicans*. Santo André, 2014.

Trabalho de graduação – Universidade Federal do ABC.
Centro de engenharia e ciências sociais aplicadas.

1.Terapia fotodinâmica 1 2. *Candida albicans* 1 3.Laser-terapia
I. Universidade Federal do ABC. CECS

*Dedico este trabalho a Universidade Federal do
ABC, pela oportunidade de estudo e trabalho.*

Agradecimentos

Agradeço a UFABC, pelo incentivo a pesquisa científica.

Também as professoras Ilka Tiemy Kato e Patricia Aparecida da Ana, pela orientação, paciência e acompanhamento ao longo deste trabalho científico.

Aos professores Martha Simões Ribeiro e Renato Araújo Prates que também considero como orientadores.

Ao aluno Caetano P. Sabino, que também desenvolveu trabalho no mesmo período.

Ao professor Victor Elias Arana Chaves, do laboratório de biologia oral-USP, por todos os subsídios oferecidos com a microscopia eletrônica de transmissão.

Aos pesquisadores que participam do laboratório de fotoprocessos não térmicos e que colaboraram para o desenvolvimento do projeto, seja em metodologia, análise de dados, etc.

A minha família/amigos e a Deus, que nos possibilita todas estas e demais oportunidades.

Muito obrigada!

Camila Campos Santos

Resumo:

Modelos experimentais para estudo de terapia fotodinâmica em espécies fúngicas, tal como *Candida albicans*, são importantes em diversos aspectos, uma vez que aludem a formas alternativas para tratamentos de doenças diretamente relacionadas a resistência antimicrobiana. Estudos *in vitro* são fundamentais para o estabelecimento de protocolos, relacionando desde a concentração de fármacos até a porcentagem de morte esperada para determinada cepa fúngica. No entanto, a forma como estes protocolos se processam varia minimamente de acordo com qualquer alteração de parâmetro. É imprescindível que o modelo utilizado seja bem estabelecido e satisfaça a todas as especificações do estudo. Neste caso é notável a relevância do sistema de entrega de radiação, do meio absorvedor de energia e de diversos parâmetros intrínsecos ao sistema. Dado este contexto, este trabalho sugeriu o estudo e avaliação de protocolos para terapia fotodinâmica em *Candida albicans* (cepa - ATCC 90028), utilizando-se, como formas de avaliação a variação de concentração do fármaco azul de metileno (fotossensibilizador), além da variação de fontes de luz ativadoras destes materiais e da constatação de seus efeitos através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. O efeito da PDT em *C. albicans* com expressão de bombas de transporte ativo mostrou-se eficiente na concentração 10 mM de AM, já o melhor tempo de irradiação ao utilizar-se LED com 50µM de concentração de AM foi de 18 minutos. Através da microscopia eletrônica de transmissão verificou-se uma expressiva alteração de parede celular nas células do grupo Letal e desorganização do material citoplasmático, com rompimento de membrana nucléica.

Palavras-chave: Terapia antifúngica, Terapia fotodinâmica, *Candida spp.*

Sumário

Resumo.....	6
1. Introdução.....	8
2. Objetivos.....	10
3. Revisão Bibliográfica.....	11
3.1. Terapia fotodinâmica	11
3.2. Mecanismos de interação entre moléculas.....	13
3.3. Fotossensibilizador – Fenotiazina.....	13
3.4. Fontes de energia.....	15
3.5. Parâmetros da fonte de luz associados a PDT.....	16
3.5.1. Absorção e comprimento de onda da fonte de luz.....	16
3.5.2. Potência.....	17
3.5.3. Intensidade (densidade de potência ou taxa de fluência).....	17
3.5.4. Dose (densidade de energia ou fluência).....	17
3.5.5. Cálculo do tempo de exposição.....	17
3.6. Parâmetros associados ao fotossensibilizador.....	18
3.6.1. Tempo de pré-irradiação (TPI).....	18
3.6.2. Concentração do fotossensibilizador.....	18
3.7. Microscopia eletrônica de transmissão.....	18
4. Procedimento experimental (Metodologia).....	20
4.1. Materiais e métodos.....	21
4.1.1. Cepas fúngicas e cultivo.....	21
4.1.2. Preparo do fotossensibilizador.....	21
4.1.3. Metodologia de quantificação celular.....	22
4.2. Análise da ação microbiana <i>in vitro</i> , após irradiação com LASER.....	23
4.3. Análise da ação microbiana <i>in vitro</i> , após irradiação com LED (parâmetros letais).....	24
4.4. Análise da ação microbiana <i>in vitro</i> , após irradiação com LED (parâmetros sub-letais).....	24
4.5. Preparo da amostra para microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	25
4.5.1. Fixação.....	25
4.5.2. Lavagem.....	25
4.5.3. Pós fixação com Tetróxido de ósmio(OsO ₄)	26
4.5.4. Desidratação.....	26
4.5.5. Infiltração.....	26
4.5.6. Inclusão.....	26
5. Resultados e discussões.....	28
6. Conclusões.....	33
7. Referências Bibliográficas.....	34

1. Introdução

O fungo *Candida albicans* (Figura 1) vive naturalmente na flora gastrointestinal e trato reprodutivo humano, no entanto, quando há uma falha nos mecanismos do sistema imunológico em conjunto com outros fatores, tais como a concentração hormonal ou o estado (qualitativo) do substrato de crescimento do fungo, surge a oportunidade deste microrganismo se proliferar de forma exacerbada e causar a infecção. Os tratamentos existentes para a candidíase com antifúngicos ou antimicóticos não são suficientes para combater a proliferação ou reinfestação do fungo após o período do tratamento, e por isso, faz-se necessário o uso de novas modalidades terapêuticas que tentem solucionar estes problemas (HAMAD *et al*, 2004).

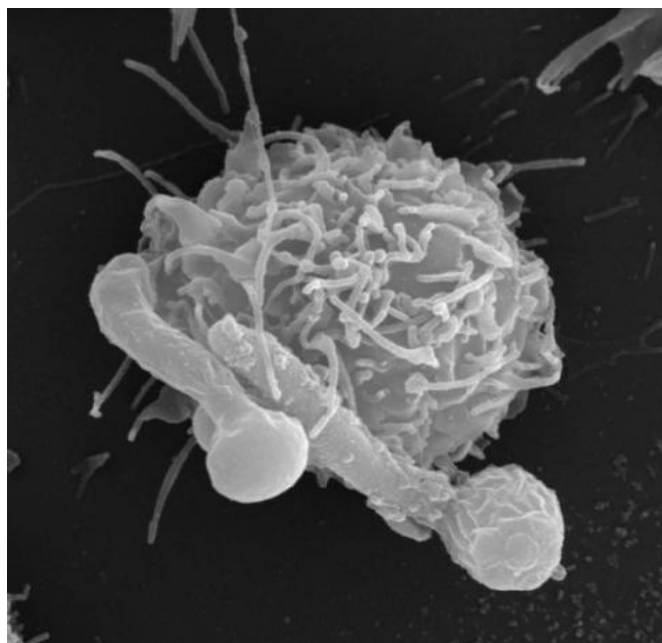


Figura 1: Eletromicrografia do fungo *C. albicans* em contato com células do sistema imunológico (macrófagos), microscopia eletrônica de varredura (REALES *et al*, 2012).

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é uma modalidade terapêutica que combina o uso de um fármaco fotossensibilizador e de uma fonte de luz a fim de promover morte celular. Os fármacos utilizados para terapia fotodinâmica são conhecidos como fotossensibilizadores (FS), e possuem pouca ou nenhuma toxicidade às células na ausência de luz. (GAD F, 2004).

No processo fotodinâmico a molécula do fotossensibilizador (FS) é excitada para o seu estado singleto como resultado da absorção da luz. Após decaimento para o estado tripleto via cruzamento intersistemas, o FS pode transferir energia para o

oxigênio molecular ou pode participar de um processo de transferência de elétrons que leva à formação de radicais livres (tóxicos as células). Todos estes efeitos podem ser observados no diagrama de Jablonski, conforme a Figura 2. Estas transferências resultam na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como radicais superóxido, radicais hidroxil e oxigênio singleto, que possuem efeitos citotóxicos e podem levar à morte celular (HAMBLIN, 2004).

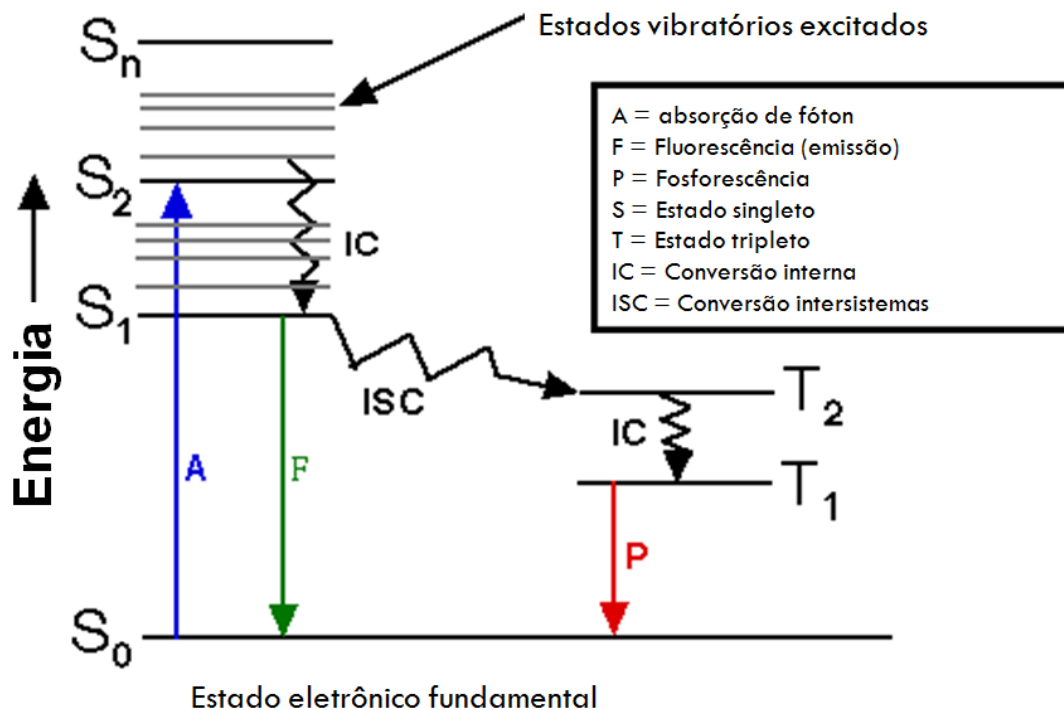


Figura 2: Diagrama de Jablonski elucidando os fotoprocessos envolvidos na excitação de uma molécula fotossensibilizadora (CHASTEEN, 2012).

A inativação de microorganismos em infecção fúngica, como as ocasionadas por *C. albicans*, utilizando a PDT é uma hipótese promissora, pois resultados *in vitro* sugerem que esta terapia pode ser uma alternativa de tratamento antimicrobiano.

Dentre os diversos fármacos utilizados em PDT destaca-se o azul de metileno para a fotoinativação microbiana sendo que sua alta efetividade já foi demonstrada em bactérias, fungos e vírus (GABRIELLI *et al*, 2004). O AM é um composto pertencente à família das fenotiazinas e apresenta duas principais bandas de absorção na região visível do espectro eletromagnético, uma referente ao componente monomérico ($A_{max} \sim 664\text{nm}$) e outra referente a sua forma dimerizada ($A_{max} \sim 600\text{nm}$) (GABRIELLI *et al*, 2004).

O aumento da resistência antimicrobiana tornou-se um dos paradigmas da ciência, uma vez que a utilização inadequada de antifúngicos resulta na seleção de espécies resistentes de determinados microorganismos. Desta forma, o estudo de

terapia fotodinâmica, como modalidade terapêutica antimicrobiana, torna-se uma alternativa em potencial. Outra vantagem do uso da PDT é que se trata de uma terapia minimamente invasiva e com bons índices de melhora em pacientes que apresentavam deficiência em imunidade (LI *et al.*, 2010). Trabalhos recentes apontam que, quando se determina a concentração ideal do fármaco utilizado na PDT, obtém-se uma considerável redução microbiana (NÚÑEZ, 2007). Apesar da vasta quantidade de trabalhos encontrados na literatura relatando o potencial terapêutico do efeito fotodinâmico, ainda há pouca informação sobre a distribuição da luz no tecido biológico, bem como os resultados da ação do efeito da luz nas organelas citoplasmáticas e membrana celular. Dos modelos encontrados, grande parte se concentra em estabelecer a dosimetria da luz para o tratamento fotodinâmico de tumores (LI, *et al.*, 2008).

A descontaminação profilática local das áreas de risco potencial para infecção, por um método que não promova o surgimento de cepas resistentes, não apresente efeitos colaterais e não comprometa o estado clínico do paciente, é extremamente desejável. Neste contexto, estudos *in vitro* já demonstraram o potencial da terapia fotodinâmica contra *C. albicans* (WAINWRIGHT *et al.*; 1997; PRATES *et al.*, 2009).

Desta maneira, este trabalho teve como hipótese que a utilização de modelos *in vitro* para o fungo *Candida albicans* podem ser fotoinativados com o uso de diferentes fontes luz, considerando o mesmo tipo de fotossensibilizador, com comprimentos de onda apropriados, considerando a terapia fotodinâmica como uma alternativa terapêutica antimicrobiana eficaz para inativação de *C.albicans* com alterações moleculares passíveis de serem detectadas por técnicas de microscopia eletrônica de transmissão.

2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivo avaliar efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em *Candida albicans* (ATCC 90028) conforme variações de concentração do fármaco fotossensibilizador e fontes de luz distintas. Também se estudou mecanismos intrínsecos a alterações celulares após aplicação da técnica de PDT, por meio de micrografias eletrônicas de transmissão.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Terapia fotodinâmica

As primeiras experiências com a terapia fotodinâmica datam de aproximadamente 100 anos, relatadas por Raab, que observou que a combinação do corante acridina com luz podia ser letal ao paramécio, o protozoário causador da malária. Ele postulou que este efeito era causado pela transferência da energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre no processo de fotossíntese através da absorção da luz pela clorofila. A utilização da luz ou do corante isoladamente não apresentou qualquer efeito aparente sobre os paramécios, mas em conjunto, foram altamente citotóxicos (NELSON, *et al.*, 1997).

A PDT consiste na associação de um composto, normalmente exógeno, e uma fonte de luz, com o objetivo de provocar necrose (utilizada em tratamento de tumores) ou morte microbiana. Os compostos em questão são chamados fotossensibilizadores e, sob iluminação em comprimento de onda adequado, produzem espécies reativas de oxigênio (ERO). As subseqüentes reações das EROs no meio biológico resultam em inativação e/ou morte das células alvo. A iluminação precisa da área alvo aumenta a seletividade da terapia, uma vez que somente na área irradiada acontece o processo fotodinâmico.

O mecanismo de ação se dá quando o agente fotossensibilizador absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado. Na presença de um substrato, como por exemplo, o oxigênio, o fotossensibilizador ao retornar ao seu estado fundamental, transfere sua energia ao substrato. Esta interação pode, por exemplo, ocorrer pela transferência de elétrons para o oxigênio levando a formação do radical peróxido, ou pode ainda ocorrer abstração do hidrogênio de uma biomolécula.

Em ambos os casos o resultado final é um radical com potencial para causar danos às áreas circunvizinhas (Reações Tipo I). O estado tripleto do fotossensibilizador pode também transferir sua energia de excitação para o oxigênio molecular no estado fundamental. A molécula resultante será então o oxigênio singleto (Reações Tipo II), que é um poderoso agente oxidante e altamente tóxico para as células (WAINWRIGHT, 1996).

A busca por novos fotossensibilizadores levou à descoberta de um grupo de substâncias já conhecidas desde a metade do século XIX, as porfirinas. A porfirina, ou mais precisamente a hematoporfirina, foi descoberta por Schere em 1841, quando este estudava componentes do sangue. Este composto foi utilizado então por Hausmann em 1911, para demonstrar o efeito da associação da hematoporfirina

intravenosa com a luz branca, sobre microorganismos, células do sangue e pele de rato (WAINWRIGHT, 1996).

Atualmente, os derivados da hematoporfirina são os primeiros fotossensibilizadores aprovados pelo FDA (*Food and Drugs Administration*, Estados Unidos) para o tratamento de tumores e degeneração macular (*Photofrin*®, *Levulan*® e *Visudyne*®). Nas últimas décadas, diversos autores se voltaram para o primeiro estudo de Raab, investigando a eliminação de microorganismos pela terapia fotodinâmica. A PDT com finalidade antimicrobiana encontra-se bem estabelecida na literatura, tanto sua ação sobre diferentes bactérias como sua ação antifúngica, principalmente em casos de infecções localizadas, como as de ocorrência mais freqüente na cavidade oral (SARKAR E WILSON, 1993; DORTBUDAK *et al.*, 2001; CHAN *et al.*, 2003).

A grande vantagem deste tipo de abordagem terapêutica em relação a atual terapia antibiótica é sua ação localizada e que principalmente devido ao mecanismo pelo qual esta terapia leva à destruição da célula alvo, não há evidências de surgimento de microorganismos resistentes após sua aplicação. Outra promissora vantagem apontada é a possibilidade de atuação em fungos e vírus (SARKAR E WILSON, 1993). Continuamente têm sido observados novos mecanismos de resistência microbiana, sendo que, o aparecimento de cepas resistentes tem ocorrido com uma freqüência crescente, requerendo desta forma o desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos (STREIT *et al.*, 2004).

A eficiência da terapia fotodinâmica é, essencialmente, dependente de três fatores (RIBEIRO e ZECELL, 2004):

Biológicos:

- ✓ Seletividade e retenção do fotossensibilizador na área alvo;

Físicos:

- ✓ Intensidade da radiação eletromagnética que chega à região de tratamento (propriedades ópticas do tecido);
- ✓ Eficiência da absorção dos fótons ativadores;
- ✓ Eficiência da transferência de energia de excitação da molécula fotossensibilizadora para o substrato;

Químicos:

- ✓ Efeito oxidante na molécula, a molécula fotossensibilizadora deve possuir tempo de vida de estados excitados razoavelmente longo, para permitir a transferência de energia.

3.2. Mecanismos de interação entre moléculas

Quando uma molécula absorve luz com determinada energia, pode-se ocorrer transição eletrônica para o estado singleto excitado. Dependendo da estrutura molecular e do ambiente em que se encontra, a molécula pode, então, perder esta energia por processos físicos ou eletrônicos, assim retornando ao estado fundamental, ou ainda, sofrer uma transição para o estado tripleto excitado. Neste estágio, a molécula pode novamente sofrer decaimento eletrônico e voltar ao nível fundamental.

Também podem ocorrer reações de óxido-redução (redox) em seu ambiente, ou sua energia de excitação ser transferida ao oxigênio molecular conduzindo à formação do oxigênio singleto instável.

Para fotossensibilizadores, é importante que o estado tripleto T^1 seja bem povoado e com duração da ordem de milissegundos. Se isto acontecer, o fotossensibilizador excitado tem tempo de reagir com seu ambiente (por transferência eletrônica/reações redox) ou transferir sua energia de excitação a uma molécula de oxigênio e produzir o oxigênio singleto altamente reativo.

Quando estas reações são iniciadas em meio biológico, por exemplo, em um tecido tumoral ou na parede celular fúngica, pode ser ocasionado o fenômeno de morte celular programada e/ou necrose.

Dois tipos de reações químicas podem ocorrer, a reação do tipo I em que o fotossensibilizador pode sofrer degradação, por ação direta da luz, levando-o a uma transformação química, que resulta na formação das EROs (peróxido de hidrogênio, íons hidroxila, radicais hidroxila, ânion superóxido, etc), tóxicas ao microrganismo; E a reação tipo II, em que a molécula do fotossensibilizador é preservada, participando do processo apenas como um elemento capaz de transferir a energia da fonte de luz ao oxigênio molecular, levando-o a um estado singleto excitado. Neste estado, o oxigênio é quimicamente reativo, o que causa oxidação a componentes das células, levando-as à morte (Reys, 2004).

3.3. Fotossensibilizador – Fenotiazina

Conforme já mencionado, a PDT consiste na utilização de um fotossensibilizador com banda de absorção ressonante com o comprimento de onda da fonte de luz a ser utilizada. Um agente fotossensibilizador ideal deve apresentar as seguintes características: estabilidade biológica, eficiência fotoquímica, seletividade pela célula alvo e mínimo efeito tóxico às células normais (Wainwright, 1996).

Dentre os fotossensibilizadores mais empregados na terapia fotodinâmica estão as fenotiazinas que, por consistirem como objetivo deste estudo, serão os únicos compostos relatados neste trabalho. As fenotiazinas são compostos heteroaromáticos tricíclicos, corantes azuis, como o azul de toluidina e o azul de metileno. Esses corantes, em baixas concentrações, não produzem ação citotóxica e a dose necessária para a morte bacteriana é menor que a dose necessária para causar danos a células, como queratinócitos e fibroblastos (Soukos *et al.*, 1996). Os principais alvos destes fotoabsorvedores parecem ser componentes do DNA e da membrana celular (WAINWRIGHT, 1998).

O azul de metileno (Figura 3) é bastante utilizado, principalmente na Europa, na inativação viral de componentes sanguíneos. O efeito fotodinâmico parece ser sobre a membrana plasmática. Os corantes azuis têm uma especificidade restrita, podendo provocar danos a proteínas plasmáticas. Para contornar este problema, o azul de metileno tem sido utilizado associado a anticorpos específicos ao microorganismo alvo.

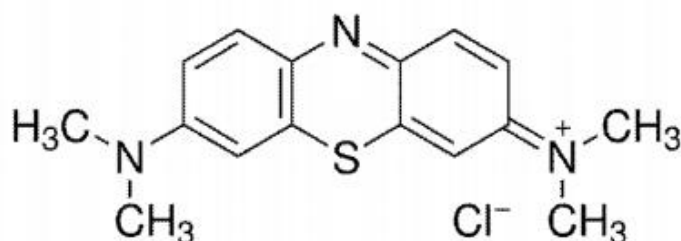


Figura 3: Fórmula estrutural do AM (Hashimoto, 2010)

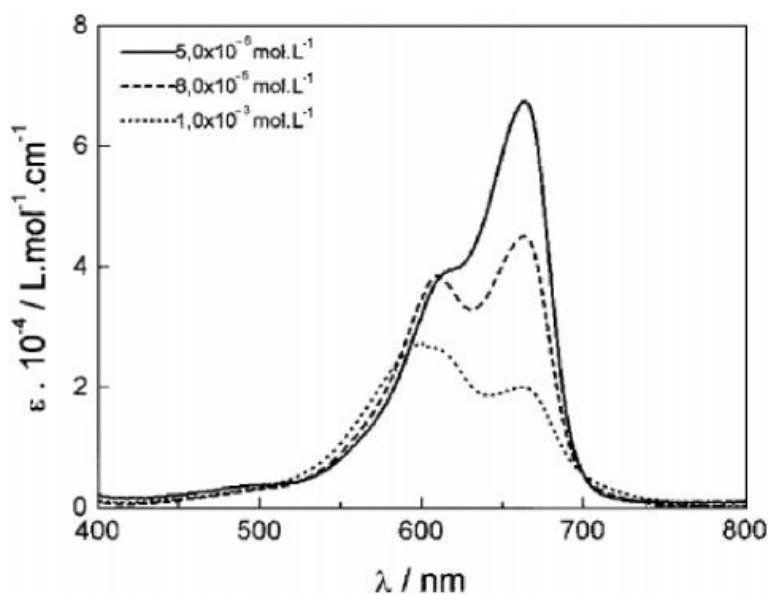


Figura 4: Espectro de absorção óptica do AM, absorção entre $\lambda= 550$ nm e $\lambda= 670$ nm (adaptado de Hashimoto, 2010)

O fungo *Candida albicans*, em sua forma levedura ou hifa, também é sensível a PDT com os corantes azuis (Jackson *et al.*, 1999). O AM absorve luz entre $\lambda = 550$ nm e $\lambda = 670$ nm (Figura 4) e uma de suas principais aplicações está na PDT antimicrobiana.

3.4. Fontes de energia

As primeiras fontes de luz utilizadas em terapia fotodinâmica foram lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática, além de um forte componente térmico associado. Com o desenvolvimento dos Lasers, esta fonte de luz se mostrou mais eficiente que lâmpadas comuns para uso em terapia fotodinâmica. Os Lasers produzem luz monocromática (emissão de um único comprimento de onda) e por isso podem ser associados a fotossensibilizadores conhecidos, com banda de absorção ressonante ao comprimento de onda do Laser, ou seja, capazes de absorver a maior parte da radiação emitida pela fonte de luz. Assim, a dose de radiação é facilmente calculada, a área de radiação pode ser bem controlada, focalizando o tratamento. Além disso, a radiação pode ser transmitida por fibra óptica, sendo que estas fibras podem receber adaptações para melhor acessar a lesão alvo, como microlentes e difusores (Ackroyd *et al.* 2001).

As fontes Laser podem ter emissão nos mais variados comprimentos de onda, o qual deve ser ressonante com o corante utilizado. Entretanto, atualmente são utilizados Lasers de diodo de emissão vermelha, pois os Lasers de diodo podem ter maior potência em relação ao LED, além de serem compactos, robustos, com sistemas ópticos relativamente simples e de custo mais acessível.

Fontes de luz alternativas para PDT são os LEDs (*light emitting diodes* – diodos emissores de luz), os quais foram utilizados com sucesso, principalmente no tratamento de melanomas, pois apresentam um baixo componente térmico além de largura de banda estreita. Entretanto, o acoplamento em fibras ainda apresenta desvantagens quando comparados aos Lasers (Corazza, 2005).

Diversas fontes Laser foram utilizadas ao longo dos anos, tais como Lasers de He-Ne, de corantes, de vapores de metais e os Lasers de diodo, normalmente utilizando-se comprimentos de onda próximos ao vermelho visível devido a maior penetração deste comprimento de onda nos tecidos biológicos. Além disso, alguns trabalhos mostram que o tratamento com luz vermelha, ou azul, pode ser empregado como método terapêutico, para inativar determinadas bactérias patogênicas, que sintetizam

porfirinas, que são cromóforos endógenos naturais absorvedores de luz, sem o uso de um fotossensibilizador externo. Portanto, ambas as técnicas (luz ou luz + fotossensibilizador) podem ser propostas como potenciais terapias, de baixo custo, para o tratamento e prevenção de patologias e infecções locais. O importante na terapia fotodinâmica é a capacidade de excitar o fotossensibilizador em seu alvo com mínimo efeito circunvizinho.

Nesta terapia, as densidades de potência (intensidades ou taxa de fluência) utilizadas são baixas, com unidades em W/cm^2 . Vale ressaltar que os efeitos obtidos por esta terapia não são por aumento de temperatura, e sim por reações químicas entre fotossensibilizador, luz e substrato. Mantendo-se a mesma dose (densidade de energia ou fluência), porém, variando-se a intensidade ou o tempo de exposição, pode-se obter diferentes resultados, sendo que os efeitos também podem ser dependentes da concentração do fotossensibilizador e do tempo de pré-irradiação, ou seja, o tempo que o corante fica em contato com o microorganismo sem exposição à luz.

3.5. Parâmetros da fonte de luz associados a PDT

Os parâmetros da radiação que são significantes para a obtenção de bons resultados conseguidos com a PDT são a escolha do comprimento de onda, que deve ser ressonante com a banda de absorção do fotossensibilizador, assim como a densidade de energia (dose ou fluência) e densidade de potência (intensidade) desta fonte.

3.5.1. Absorção e comprimento de onda da fonte de luz

Ao selecionar-se um determinado composto para uso em terapia fotodinâmica, a primeira característica que deve ser avaliada é o seu espectro de absorção óptica, ou seja, os comprimentos de onda que este fotossensibilizador é capaz de absorver. Neste caso, é necessário que o composto absorva a energia da fonte de luz para poder então passar pelo processo de transição eletrônica que possibilita sua ação fotodinâmica. Sendo assim, conhecendo-se a faixa do espectro eletromagnético na qual este composto absorve luz, é possível escolher a fonte de ativação adequada para obtenção do efeito fotodinâmico.

3.5.2. Potência

Deve-se conhecer a potência média da fonte de excitação para o cálculo da dose a ser administrada. Quando Lasers são utilizados, o regime dos mesmos pode ser contínuo ou pulsado. Quando o Laser é pulsado, a potência varia entre um valor máximo (potência pico) e zero, de forma que neste caso, o significativo para o cálculo da dose é a potência média do Laser. Se o regime de operação do Laser for contínuo, a potência do Laser permanece constante por todo período de tempo e é igual à potência média.

3.5.3. Intensidade (densidade de potência ou taxa de fluência)

É a potência de saída da luz, por unidade de área, geralmente medida em watt (W)/cm², sendo a grandeza física que avalia a possibilidade de efeito térmico. A equação matemática usada para calcular a intensidade é:

$$I = P \times A \quad (I)$$

Em que *I* é a intensidade, *P* é a potência da luz utilizada e *A* é a área de saída do feixe de luz (Ribeiro e Zezell, 2004).

3.5.4. Dose (densidade de energia ou fluência)

A dose é a quantidade de energia por unidade de área transferida ao alvo e é medida em joule (J)/cm².

3.5.5. Cálculo do tempo de exposição

O tempo de exposição pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$t = \frac{D \times A}{P} \quad (II)$$

Em que “*t*” é o tempo de exposição medido em segundos, “*D*” é a dose a ser transferida em J/cm², “*A*” é a área irradiada, que muitas vezes coincide com a área do feixe Laser, calculada em unidades de cm² e “*P*” é a potência média medida em W.

3.6. Parâmetros associados ao fotossensibilizador

3.6.1. Tempo de pré-irradiação (TPI)

A interação do agente fotossensibilizador com o substrato, muitas vezes é um ponto crítico para o sucesso da terapia. Caso o fotossensibilizador não estiver próximo ao alvo, sua ativação pela fonte de energia poderá resultar na formação das espécies tóxicas em locais não desejados.

Portanto, o tempo de pré-irradiação, que significa o tempo decorrido entre a “aplicação” do fotossensibilizador no alvo e sua ativação pela fonte de luz, varia de acordo com a interação desejada. Para a PDT anti-neoplásica, o fotossensibilizador é aplicado por via endovenosa e o tempo de pré-irradiação pode chegar a 48 h. Nas aplicações tópicas da PDT, principalmente antimicrobiana, espera-se que o corante integre-se ao microorganismo, ou mesmo chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular, localizando-se no citoplasma da célula ou mesmo intercalando-se com o DNA do núcleo. Os tempos de pré-irradiação típicos utilizados em PDT antimicrobiana vão de 1 a 10 minutos para o Azul de Metileno.

3.6.2. Concentração do fotossensibilizador

A concentração do corante é outro fator de relevância para o sucesso da terapia. Devem ser utilizadas concentrações não tóxicas, ou seja, a concentração escolhida não deve produzir danos ao alvo sem a ativação pela fonte de luz (toxicidade no escuro). As concentrações utilizadas variam de um fotossensibilizador para outro de acordo com as características químicas de cada composto e de sua toxicidade. As concentrações típicas utilizadas em PDT antimicrobiana são da ordem de $\mu\text{g/ml}$ (ou μM).

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica sofisticada que consiste em transmitir um feixe de elétrons através de uma amostra ultra-fina a fim de se obter sua imagem com elevada resolução espacial (Slayter e Slayter, 1992). A imagem é formada por meio da interação dos elétrons transmitidos através da amostra e pode ser dimensionada e focada com um dispositivo de transmissão de imagens, como por

exemplo, uma tela fluorescente ou uma câmera (charge coupled device) CCD (Willians e Carter, 1996).

A menor distância entre dois pontos que se pode enxergar com a visão humana (limite de resolução), é de cerca de 0,1mm a 0,2mm (Willians e Carter, 1996). A resolução obtida com a microscopia de transmissão está associada, através da relação de De Broglie (equação III), com o comprimento de onda do elétron, e portando pode atingir valores ínfimos da escala nanométrica, dependendo do material de estudo.

$$\lambda = \frac{1,22}{E^{1/2}} \quad (III)$$

Neste caso, a equação relaciona que o comprimento de onda do elétron está associado com a sua energia, em eV e λ em nm. Então, a partir da equação III é possível inferir que, para um elétron com energia de 100keV, o comprimento de onda aproximado é de $\lambda \sim 4\text{pm}$ (0,004nm), o que é muito menor do que o diâmetro de um átomo. Este valor de resolução é cerca de 1000 vezes maior do que o obtido com microscopia óptica comum que está em torno de 200nm (Willians e Carter, 1996). Microscópios de transmissão, podem ser considerados como de alta tecnologia, não só por seu design e construção, mas também por sua operação e manutenção (Slayter e Slayter, 1992).

A passagem do feixe de elétrons requer um alto vácuo na coluna do microscópio. O nível do vácuo deve ser suficiente para que não ocorra contaminação com materiais residuais que possam surgir a partir da interação com o feixe de elétrons, pois esta contaminação pode ocasionar modificação nas propriedades do instrumento e no sistema de captação de imagem (Slayter e Slayter, 1992).

As partes constituintes do microscópio de transmissão estão ilustradas na Figura 5 A, e seu sistema real completo em 5 B. O “electron gun” ou “filamento emissor” é responsável pela emissão de elétrons. O bombardeio de elétrons é o principal responsável pela alta resolução obtida na MET. As lentes de condensação, representado pelo “condensor aperture”, tem a função de reforçar o sistema de foco, já iniciado pela arma de elétrons. O condensador também serve para estabelecer a convergência do feixe, que também é outro fator importantíssimo para sistemas de alta resolução.

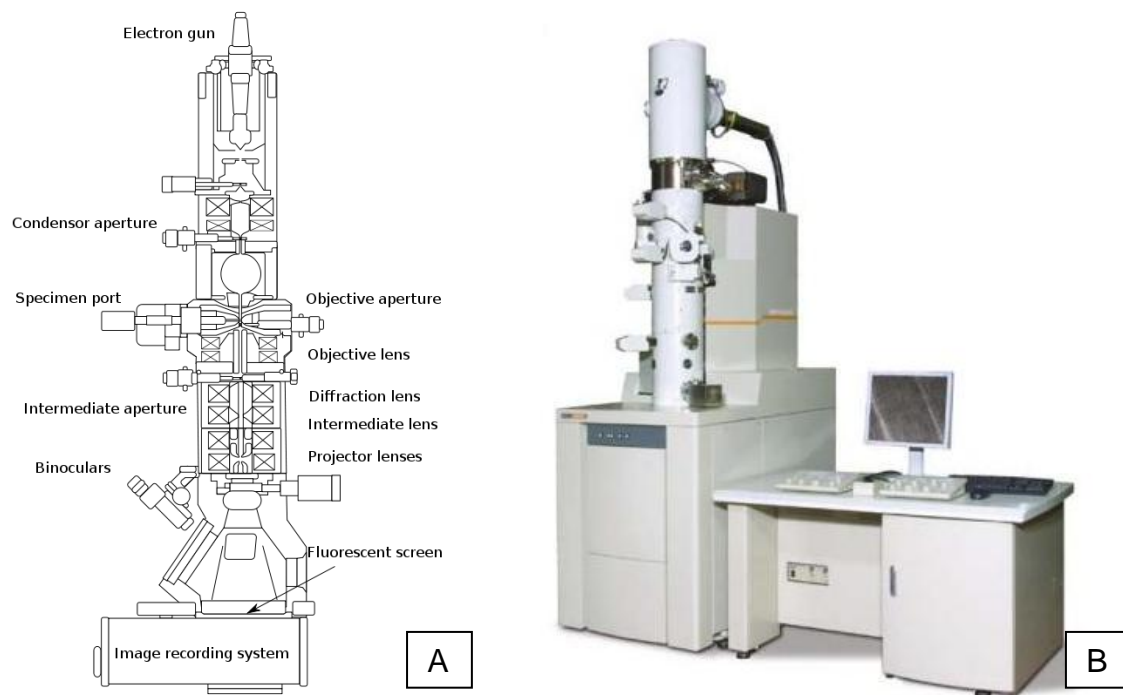


Figura 5: Microscópio eletrônico de transmissão adaptado. A) Representação das partes que compõe o sistema de aquisição de imagens do MET. B) Representação do modelo JEOL 200KeV TEM/STEM (Williams *et al*, 1996).

O sistema de projeção: “Diffraction lens”, “Intermediate lens” e “Projecture lens” atuam conjuntamente de modo a gerar uma larga escala de magnitudes possíveis de serem obtidas para cada amostra (Slayter e Slayter, 1992).

Em microscópios de eletrônicos de transmissão, a imagem é formada em uma tela fluorescente. Após a seleção de uma área da espécie e de focá-la na tela, a imagem pode ser transmitida para uma câmera CCD (Slayter e Slayter, 1992)..

4. Procedimento experimental

A metodologia deste projeto foi composta por três etapas experimentais distintas, a 1ª para a caracterização da fonte de luz empregada no processo de terapia fotodinâmica a fim de se estabelecer os parâmetros adequados para distribuição luminosa; a 2ª para o estudo do efeito fotodinâmico em *Candida albicans* cepa ATCC 90028 (etapa *in vitro*) e por fim a 3ª, relativa a análise morfofuncional observada por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão em células fúngicas após tratamento com terapia fotodinâmica. As metodologias descritas foram divididas em tópicos, conforme cada momento experimental.

4.1. **Materiais**

Dentre os reagentes, materiais e equipamentos para todos os procedimentos, foram utilizados meio líquido e sólido de Sabouraud Dextrose (ASD), ágar Sabouraud, PBS (solução tampão fosfato), azul de metileno (Sigma-Aldrich St. Louis), Espectrofotômetro, Centrífuga, Placas de petri, Micropipetas automáticas, estufa, câmara de fluxo laminar, vórtex, autoclave, freezer -80°C, destilador, medidor de pH e medidor de potência.

4.1.1. **Cepas fúngicas e cultivo**

Na etapa de cultivo celular foi utilizada *Candida albicans* cepa ATCC 90028. Amostras da levedura foram retiradas de um estoque, onde eram mantidas em um freezer -80°C. Foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida foi realizado um novo cultivo em meio líquido de Sabouraud Dextrose com incubação a 37°C por 24h a 48h. Após este período, as células foram lavadas por duas vezes em PBS (solução tampão fosfato) para a preparação do inóculo.

O procedimento de lavagem consistiu na centrifugação do meio de cultura (3000 rpm por 10 min), remoção do sobrenadante e ressuspensão das células em PBS. A concentração de células de cada inóculo foi ajustada em função da transmitância das suspensões medidas em espectrofotômetro sob irradiação $\lambda=540$ nm. Nos experimentos foram utilizados valores de transmitância entre 12% e 60%, que resultou em concentrações entre 1×10^7 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL (PRATES *et al*, 2009).

4.1.2. **Preparo do fotossensibilizador**

A solução de azul de metileno foi preparada pela diluição do pó (Sigma Ltd., Poole, UK) em água destilada na concentração de 10 mM. Este estoque foi filtrado em uma membrana estéril (0,22 μ m, Millipore, São Paulo, Brasil).

O fotossensibilizador foi adicionado à suspensão microbiana em diversas proporções, resultando em concentrações finais de 0,1 mM; 0,5 mM; 1mM; 5mM e 10mM.

4.1.3. Método de quantificação celular

A avaliação da morte celular após tratamento foi realizada por cultura microbiológica, que permitiu a quantificação dos fungos.

O plaqueamento (Figura 6) consistiu na diluição em até 1000 vezes da solução readquirida após as irradiações com Laser e com LED e deposição de 10 μ L de cada diluição em colunas paralelas em placas de Petri contendo o meio característico ágar Sabouraud (JETT *et al*, 1997).

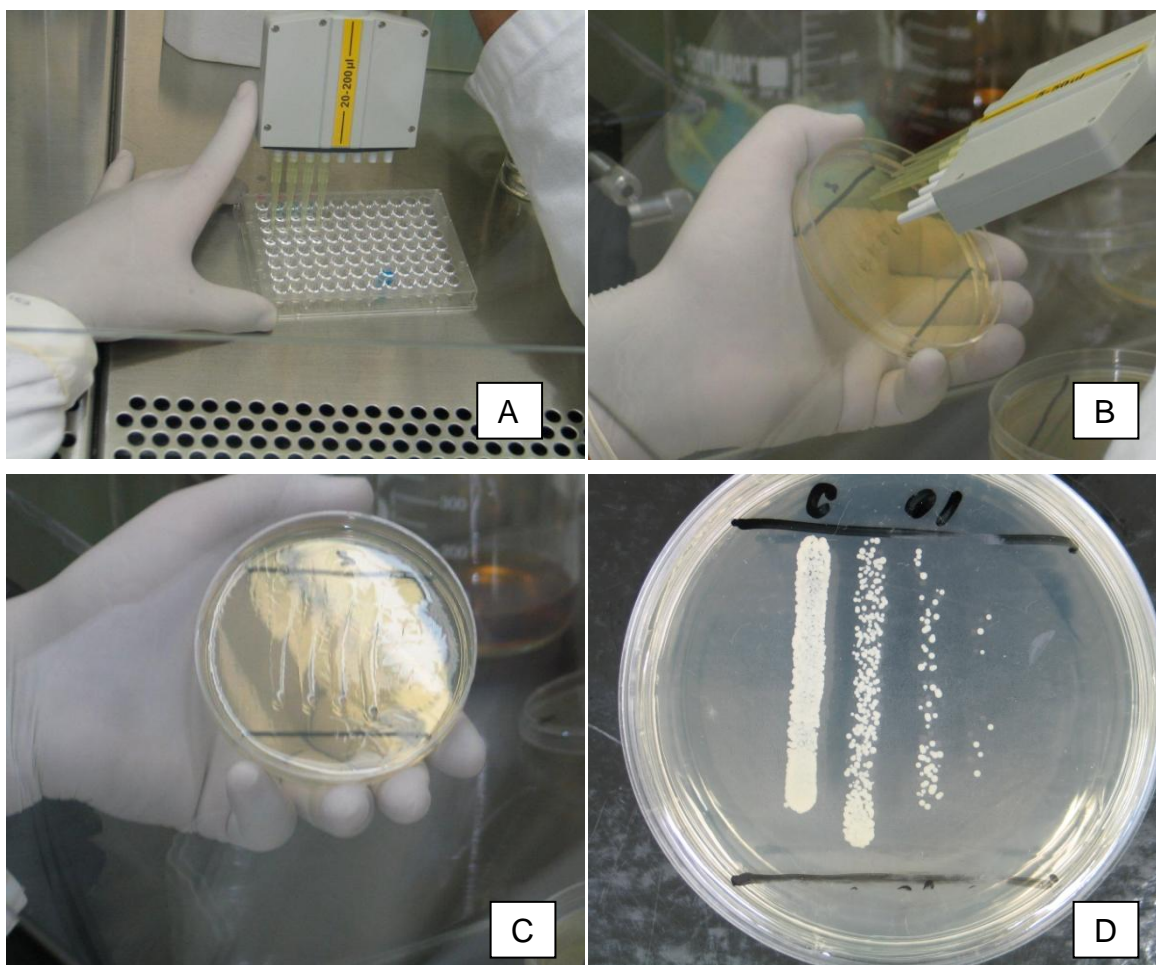


Figura 6: Procedimento para análise quantitativa por cultura microbiológica. A) Diluição da solução após procedimento de PDT. B) Deposição da solução na placa com ágar Sabouraud. C) Deslizamento uniforme da solução sobre a placa. D) Crescimento das células fúngicas após período de incubação (Primeira coluna da esquerda para a direita com concentração original; Segunda coluna diluída em 10 vezes; terceira coluna diluída em 100 vezes e quarta coluna, diluída em 1000 vezes).

As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e, após este período, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

4.2. Análise da ação microbiana *in vitro*, após irradiação com LASER

Foram feitas curvas de morte em função do tempo de irradiação para avaliar a fotoinativação da cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) por meio da PDT. Suspensões de células com transmitância de 12% ($\sim 10^7$ céls/mL) e 60% ($\sim 10^6$ céls/mL) foram incubadas com o fotossensibilizador azul de metileno em concentração final de 100 μ M, por 30 min no escuro. Após a incubação, as amostras sofreram o processo de irradiação conforme medidas expostas na tabela 1. Foram testados os grupos PDT utilizando-se o Laser, existindo grupos apenas com azul de metileno e grupos controle.

Tabela 1: Condições de irradiação nas amostras de *C. albicans* (ATCC 90028) irradiação com o Laser.

Tempo (min)	3	6	9
Fluência (J/cm ²)	60	120	190
Energia (J)	18	36	54
Potência (mW)	100		
Taxas de fluência (mW/cm ²)	334		

A irradiação foi realizada com Laser diodo InGaAIP (PhotonLase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de emissão em $\lambda=660$ nm. Alíquotas de 200 μ L das suspensões foram colocadas em poços de uma placa de micro-titulação de 96 poços.

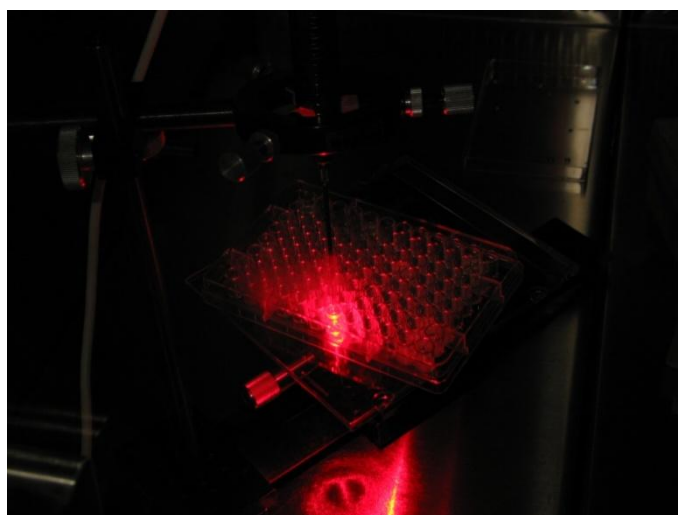


Figura 7: Montagem do sistema para irradiação com Laser, ação da terapia fotodinâmica.

A irradiação foi feita de cima para baixo (para o Laser), com o feixe Laser ajustado com área de 0,3 cm², correspondente à área de abertura de um poço da referida placa

(Figura 7). Sob potência de 100 mW, as amostras foram irradiadas por 0, 3, 6 e 9 minutos. As amostras foram diluídas seriadamente (1:1 a 1:1000) em placas de microtitulação de 96 poços contendo PBS e as diluições foram plaqueadas em ágar Sabouraud. Alíquotas de 10 µL de cada diluição foram estriadas, em triplicata, em placa de petri com ágar Sabouraud e, estas foram devidamente incubadas a 37°C para formação de unidades formadoras de colônias.

4.3. Análise da ação microbiana *in vitro* após irradiação com LED (parâmetros letais)

Também foi realizada a fotoinativação da cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) por meio da PDT, utilizando-se de suspensões de células com transmitância entre 7% e 8% (~ 10⁷céls/mL - espectro em 540nm). Em seguida a suspensão de células foi incubada com o fotossensibilizador azul de metileno em concentração final de 50µM por 10min no escuro (990µl de inóculo e 10µl de MB).

A irradiação foi realizada com o LED cujo comprimento de onda de emissão era de $\lambda=660$ nm. Alíquotas de 1mL das suspensões foram colocadas em poços de uma placa de micro-titulação de 24 poços. A irradiação foi feita de cima para baixo, com o feixe LED ajustado com o diâmetro de 1,59 cm, correspondente à área (2cm²) de abertura de um poço da referida placa. Sob potência de 350 mW (Corrente I=619mA) e Voltagem V=2,6V). As amostras foram irradiadas por 0,12,15 e 18 minutos, o que resultou em fluências de 126 a 189 J/cm² (Tabela 2).

Tabela 2: Condições de irradiação nas amostras de *C. albicans* LETAL(utilização de LED)

Tempo (min)	12	15	18
Fluência (J/cm ²)	126	157,5	189
Energia (J)	252	315	378
Potência (mW)	350		
Taxas de fluência (mW/cm ²)	175		

4.4. Análise da ação microbiana *in vitro*, após irradiação com LED (parâmetros sub-letais)

Foi realizado procedimento semelhante ao da PDT Letal (item 3.3) para a preparação do inóculo.

A irradiação neste caso, também foi realizada com LED cujo comprimento de onda de emissão era de $\lambda=660$ nm. Alíquota de 1mL da suspensão foi colocada em poço de uma placa de micro-titulação (24 poços). A irradiação foi feita de cima para baixo, com o feixe LED ajustado com o diâmetro de 1,59 cm, correspondente à área (2cm²) de abertura de um poço da referida placa. Sob potência de 175 mW (Corrente I= 312mA) e Voltagem V=2,2V). As amostras foram irradiadas por 0, 6, 8 e 10 minutos, o que resultou em fluências de 31,5 a 52,5 J/cm² (Tabela 3).

Tabela 3: Condições de irradiação nas amostras de *C. albicans* SUBLETAL(utilização de LED)

Tempo (min)	6	8	10
Fluência (J/cm ²)	31,5	42	52,5
Energia (J)	63	84	105
Potência (mW)	175		
Taxas de fluência (mW/cm ²)	87,5		

4.5. Preparo da amostra para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após a realização do procedimento de PDT com parâmetros letais e sub-letais, o material foi depositado em um tubo *ependorf* para posterior obtenção do pellet através do método de centrifugação com retirada do líquido sobrenadante. Em seguida, foram realizados 6 passos experimentais, antes que a amostra estivesse pronta para corte e visualização ao microscópio eletrônico.

4.5.1. Fixação

Foi preparada a solução de fixação com 2% de glutaraldeído a 25% de solução aquosa EMS e 2,5% de formaldeído em pó paraformaldeído em solução tampão cacodilato 0,1 M com pH 7,4.

Adicionou-se 1mL da solução fixadora de modo a não re-suspender as células mantendo as amostras a temperatura ambiente por 4 h, sendo a adição do líquido pela parede do *ependorf*. Após este período, a amostra foi colocada em ambiente refrigerado por 24h na solução fixadora.

4.5.2. Lavagem

Foi preparada a solução tampão cacodilato 0,05 M com pH 7,4 para ser utilizada como solução de lavagem celular. Cuidadosamente, as células foram re-suspendidas em 1mL da solução de cacodilato por cinco vezes, com intervalos de 10 minutos, em que permaneciam embebidas nesta solução.

4.5.3. Pós fixação com Tetróxido de ósmio (OsO₄)

Após preparada a solução de Tetróxido de ósmio a 1%, esta foi adicionada em quantidade suficiente para submersão do pellet. Manteve-se a solução por 1h.

4.5.4. Desidratação

Foram utilizadas soluções com 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100% de etanol. Estas soluções foram utilizadas para a desidratação do pellet, adicionando-se cada solução continuamente em ordem crescente com intervalos de repouso de 10min mantendo o pellet embebido na solução por este determinado período. A desidratação em etanol 100% foi repetida. Por fim, desidratou-se o pellet, com solução de acetona 100% por duas vezes.

4.5.5. Infiltração

Após a desidratação da amostra, esta foi incubada com solução de resina Spurr (solução de baixa viscosidade) e acetona na proporção 1:1 por 90min e repetido o procedimento com a mesma solução na proporção 1:3 por 150min. Em seguida, a amostra foi incubada com Resina Spurr 100% por 24h de modo a recobrir todo o pellet.

4.5.6. Inclusão

O material novamente foi re-suspendido em resina Spurr desta vez recobrimdo todo o volume do *ependorf* e mantido em estufa a 70° por 3 dias. Ao término do procedimento, foram obtidas as amostras da figura 8.



Figura 8: Amostras obtidas para procedimento de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao término destes procedimentos, as amostras obtidas foram submetidas a corte em ultra-microtomo que resultou em amostras com espessuras entre 30nm e 60nm para melhor resolução conforme Figura 9.

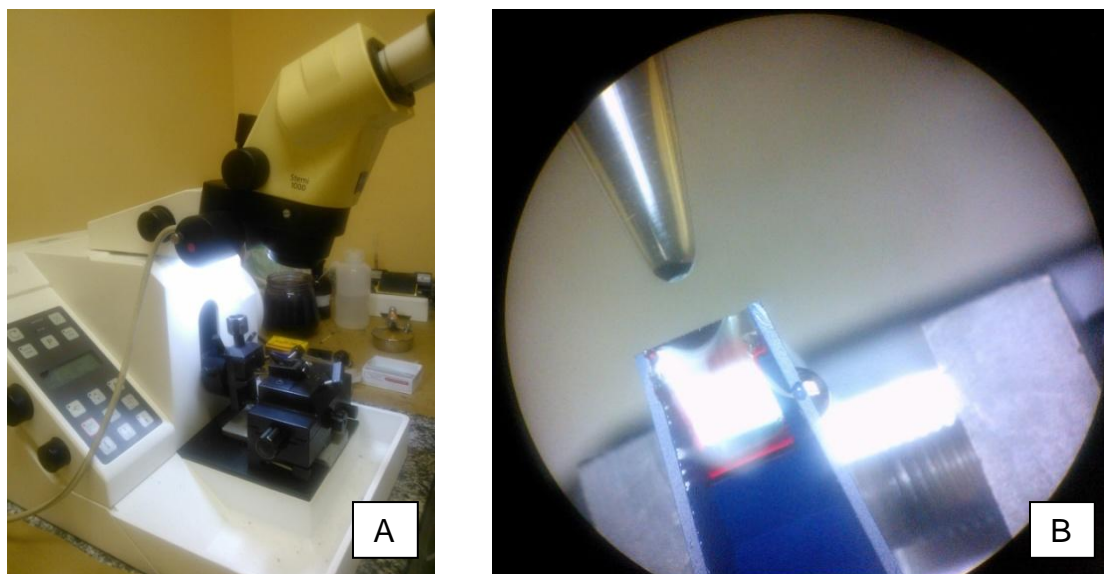


Figura 9: Preparo das amostras para corte. A) Microtomo comum para avaliação da qualidade da amostra. B) Detalhe do pellet formado após procedimentos (15X).

A visualização das amostras foi realizada através do microscópio eletrônico de transmissão *JEOL JEM1010* representado na figura 10.



Figura 10: Microscópio eletrônico de transmissão *JEOL JEM1010*.

5. Resultados e discussões

A Figura 11 mostra a curva de morte para a *C. albicans* ATCC 90028, em diferentes concentrações do fotossensibilizador Azul de metileno (0,5mM, 1mM, 5mM e 10mM) e sua ação após a aplicação da terapia fotodinâmica com o uso do Laser.

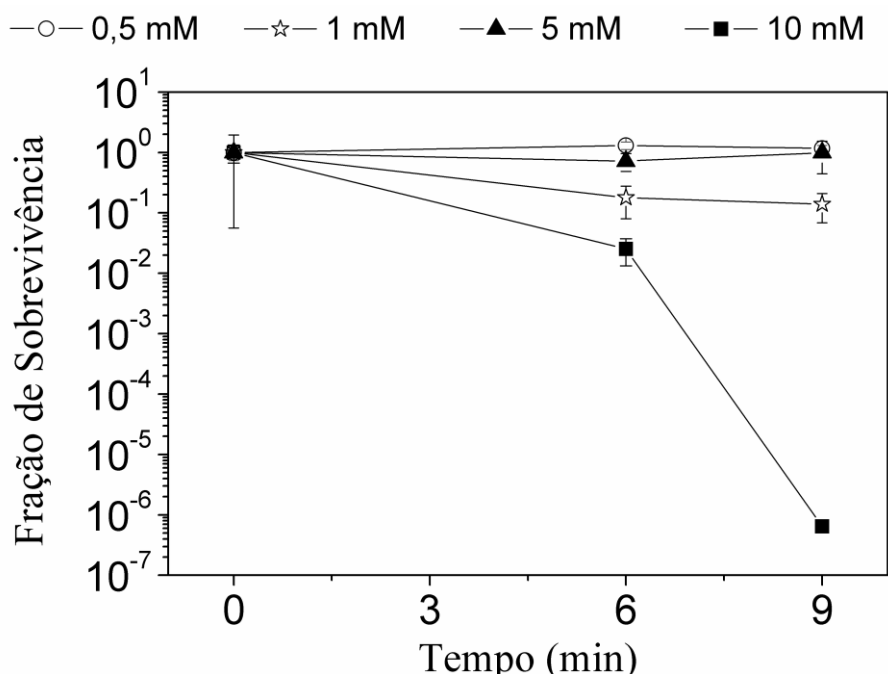


Figura 11: Fração de sobrevivência de *C. albicans* (cultura planctônica) em função do tempo de irradiação. Células foram incubadas com AM em concentrações de 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM e irradiadas com Laser. Dados representam os valores médio e as barras, os desvios padrão.

Os resultados demonstram que no experimento com células em suspensão, as maiores concentrações de AM foram mais eficientes para a terapia fotodinâmica nesta cepa de *C. albicans*. Observou-se que a PDT realizada com AM em concentração de 10 mM resultou na redução de aproximadamente 6 logs de células.

A literatura reporta que o efeito fotodinâmico pode variar em função da concentração celular (DEMIDOVA e HAMBLIM, 2005) e que o fotossensibilizador AM pode funcionar como substrato para as bombas de transporte ativo presentes na parede celular das células fúngicas. No entanto, observou-se que o aumento da concentração de AM utilizada acompanhou o aumento do número de células mortas por PDT. Em nenhuma das concentrações testadas foram observados efeitos tóxicos quando testadas apenas com o fotossensibilizador azul de metileno. Os dados obtidos sugerem que a PDT mediada por AM é alternativa antifúngica eficiente mesmo em cepas de *C. albicans* que apresentam mecanismo de resistência relacionada à expressão de bombas de transporte ativo.

Em sequência, foi realizado teste da ação microbiana *in vitro* com a utilização do LED para parâmetros letais e subletais. O objetivo desta investigação foi a de determinar comparativamente, o melhor parâmetro de tempo para terapia fotodinâmica quando utilizado o LED como fonte de luz de entrega de energia ao variar-se a potência do mesmo. Sabe-se que o acoplamento em fibras do sistema que compõe o LED apresenta desvantagens quando comparados aos Lasers (RORAZZA, 2005), por este motivo utilizou-se o AM com concentração de 50 μ M, que o melhor parâmetro apresentado nos resultados do experimento com Laser. A Figura 12 evidencia o resultado referente aos experimentos de ação microbiana com parâmetros de irradiação considerado como letais, isto é, com formas de irradiação que possivelmente resultam em efetiva morte celular, e parâmetros sub-letais, que demonstram um estado intermediário que consiste na observação de morte celular não significativa que permite a reinfestação pelo microorganismo, mas que podem refletir em algum tipo de alteração celular com mecanismos a serem estudados.

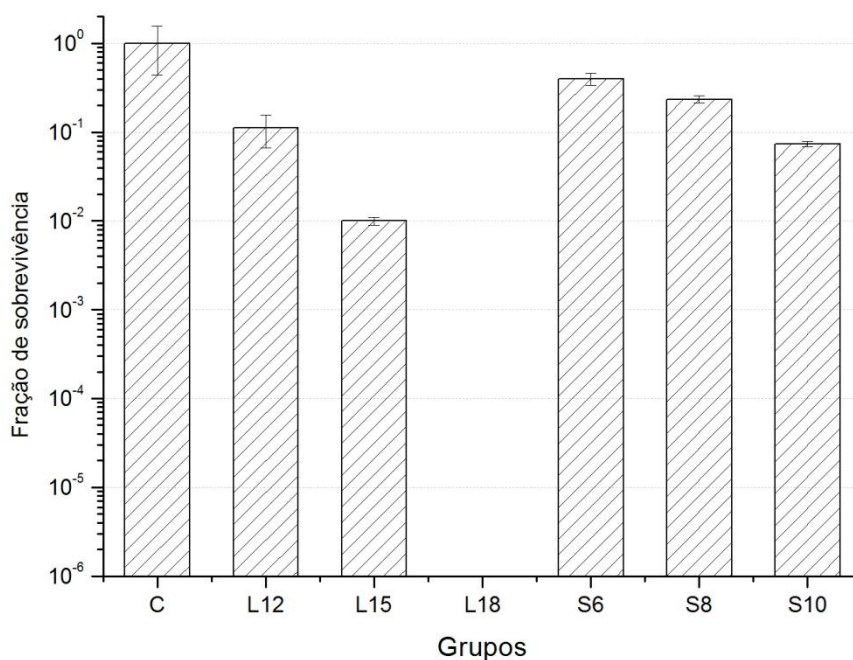


Figura 12: Fração de sobrevivência de *C. albicans* em função do tempo de irradiação (grupos L- Letal, grupos S- Sub-letal, grupo C – Controle). Dados representam os valores médios e as barras, os desvios padrão.

Pelo gráfico infere-se que no grupo letal (grupo L) a concentração de células reduziu em 2 logs, para o tempo de 15 minutos de irradiação e que para o tempo de 18 minutos a eliminação celular foi total. Este dado sugere que o tempo de 18 minutos pode ser sugerido como tempo ideal para evidencia de morte celular para a

concentração em estudo. Já a variação da redução obtida com os parâmetros sub-letais (grupo S) entre tempos distintos, mostraram-se baixos, com discreta evidencia de morte celular no grupo com 10 minutos de irradiação.

Analisando comparativamente ambos experimentos relatados, tanto a luz Laser, quanto a luz LED são efetivos para a existência de morte celular em tratamento com *C.albicans*; No entanto, os parâmetros relacionados a concentração do fármaco necessários para redução microbiana com o LED devem ser maiores em relação ao exigido pelo Laser. Este dado sugere que possivelmente os valores da banda de emissão do espectro eletromagnético do LED sejam relevantes nos resultados do experimento, e que não necessariamente os efeitos físicos de coerência e colimação sejam os principais responsáveis pelas variações observadas, uma vez que a morte celular é relatada em ambos os casos.

Após a constatação da eficácia do tratamento de terapia fotodinâmica com o LED sob diferentes parâmetros de irradiação (parâmetros letais e sub-letais), investigou-se as possíveis variações estruturais que poderiam ocorrer no interior das células fúngicas. Para tanto, utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de transmissão avaliando os tipos celulares pertencentes aos grupos L15 (parâmetro Letal com 15 minutos de irradiação) e o grupo S10 (parâmetro Sub-letal com 10 minutos de irradiação). A seguir serão relatadas as principais observações das imagens obtidas.

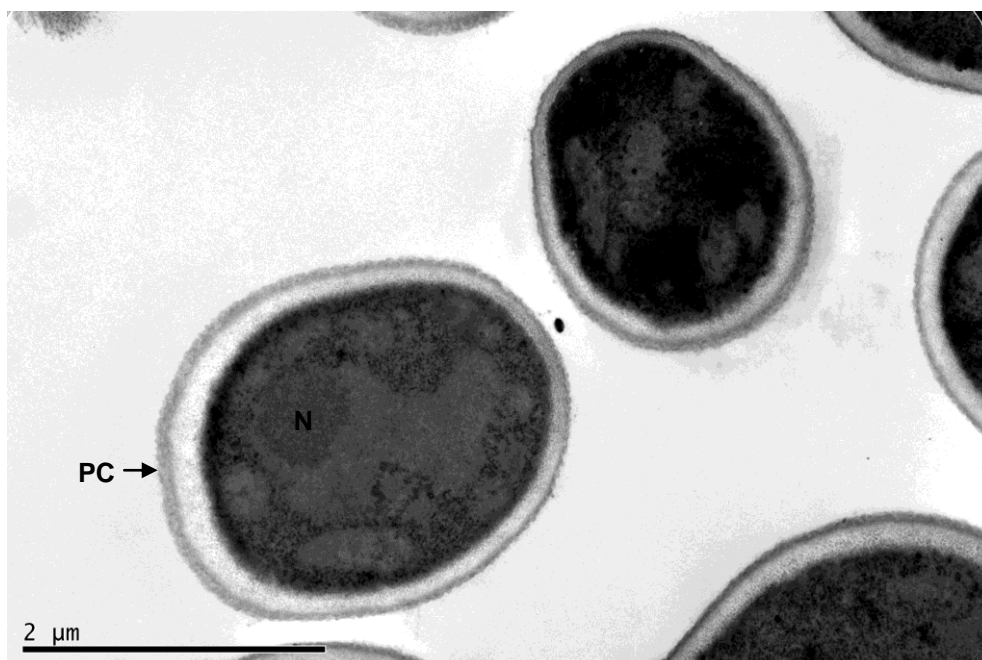


Figura 13: Micrografia eletrônica de *C.albicans* grupo controle, PC – parede celular; N – núcleo, 30.000 X.

A Figura 13 evidencia a observação do núcleo e da parede celular preservada da *C.albicans*, no grupo controle. O material celular aparenta ser homogêneo e de composição semelhante ao longo de todo o grupo.

Também foi observado ao longo do grupo controle diversas evidencias de divisão celular conforme observado na Figura 14.

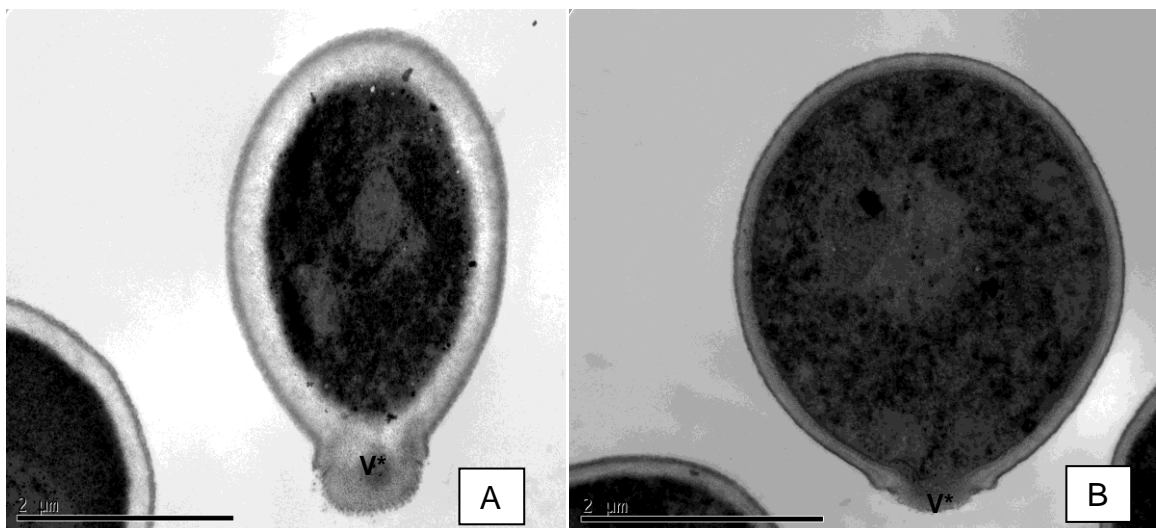


Figura 14: Micrografia eletrônica de *C.albicans* grupo controle A) e B) Casos de divisão celular (V* - vesícula secretiva) 30.000 X.

Também observou-se possível processo de brotamento no grupo subletal (Figura 15), o que evidencia a continuidade de divisão celular mesmo após o processo de terapia fotodinâmica, quando utilizado parâmetros intermediarios para irradiação.

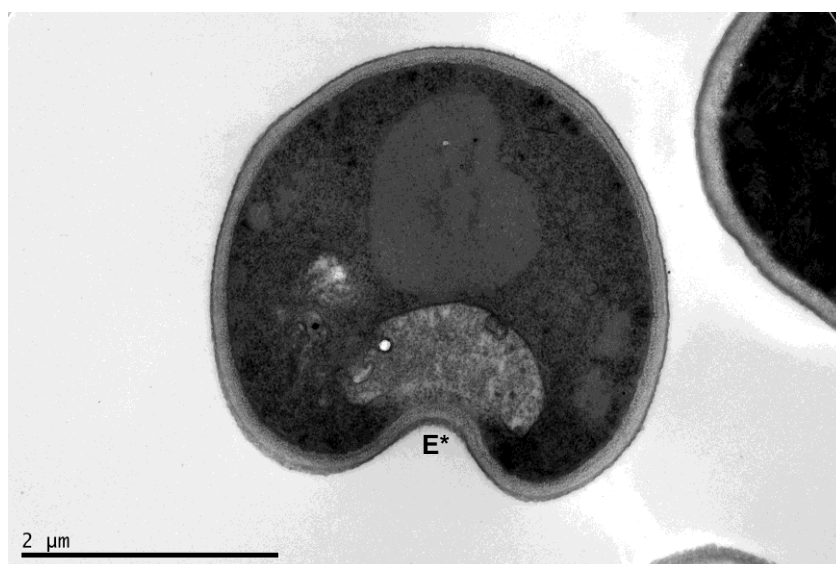


Figura 15: Micrografia eletrônica de *C.albicans* grupo Sub-lethal com possível caso de divisão celular (E* - envaginação celular) 30.000 X.

As células observadas ao longo de todo o grupo subletal mostraram-se uniformes, com poucas evidências de alteração celular. Tal constatação, pode estar associada ao fato de, mesmo após a ocorrência da terapia fotodinâmica, ainda existirem tipos celulares com potencial poder de reprodução que mantiveram-se com uma taxa de reprodução maior do que a taxa de morte proporcionada com a PDT, já no grupo letal, as observações foram diferentes.

Comparando-se os grupos Letal e controle, observa-se significativa diferença da organização celular interna das células pertencentes ao primeiro (GC) em relação ao segundo (GL). As células do GC apresentam material citoplasmático bem organizados, com estruturas como núcleo e parede celular melhor definidos.

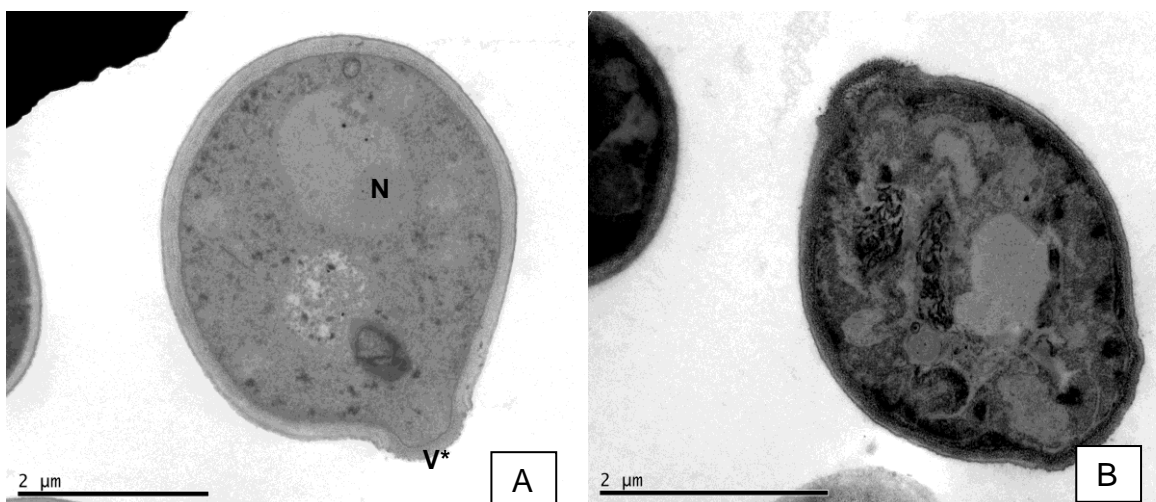


Figura 16: Micrografia eletrônica de *C. albicans*. A) Grupo controle, 25.000 X. B) Grupo Letal apresentando alteração de parede celular (V* - vesícula secretiva; N - núcleo) 30.000 X.

No grupo letal, estiveram presentes um maior número de ocorrências de tipos celulares semelhantes ao observado nas Figuras 16 B e 17, em que se observou uma significativa desorganização interna que pode evidenciar o processo de morte e danos celulares, principalmente devido a desestruturação da parede celular evidenciada e rompimento de organelas citoplasmáticas, tal qual o envelope nuclear.

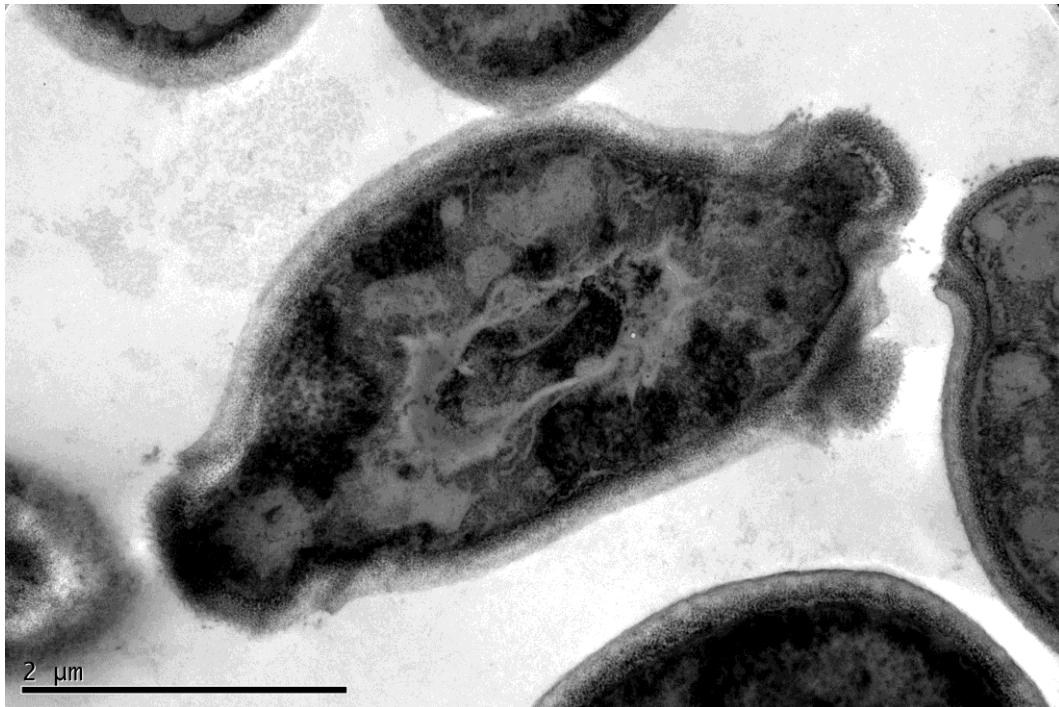


Figura 17: Micrografia eletrônica de *C.albicans*. Grupo letal, desorganização e danos celulares, 30.000 X.

Também se verificou diferenças na espessura da parede celular (Figura 17) em relação ao grupo controle, podendo este ser um indicio de alteração de membrana para posterior lise celular. A desorganização inespecífica pode estar associada as alterações promovidas pela geração de espécies reativas de oxigênio durante o processo de terapia fotodinâmica, que promove danos cromossômicos e celulares.

6. Conclusões

A utilização da PDT em *C. albicans* cepa ATCC 90028 mostrou-se eficiente para concentrações de AM de 10 mM. Os resultados obtidos demonstram que a adequação da concentração de fotossensibilizador e dos parâmetros de irradiação (bem como outra alternativa de fonte de luz) podem resultar na inativação fúngica. Este dado foi corroborado com os resultados obtidos ao trocar-se a alternativa de fonte de luz, de Laser para LED, sendo que o melhor parâmetro para eliminação fúngica foi o que se utilizou 50μM para concentração do fotossensibilizador AM, 350mW de potência e 189 J/cm² de fluência. A microscopia eletrônica de transmissão evidenciou as alterações celulares após a aplicação da terapia fotodinâmica, sendo notória a alteração de membrana celular e organização inespecífica do material intercelular.

7. Referências Bibliográficas

1. ACKROYD, R., KELTY, C., BROWN, N., REED, M. **The history of photodetection and photodynamic therapy.** Photochem. Photobiol., v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
2. ANVISA. **OPAS busca integração en el combate a la resistencia microbiana.** 2005. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/esp/divulga/noticias/010905.htm>.
Acesso em 30/04/2012.
3. CALDERON, L., WILLIAMS, R., MARTINEZ, M., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A. **Genetic susceptibility to vaginal candidiasis.** Medical Mycology, V.41, p.143-7, 2003.
4. CHAN Y, LAI C-H. **Bactericidal effects of different Laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy.** Lasers Med Sci, V.18, p.51-55, 2003.
5. CHASTEEN,T.G. **Jablonski Diagram: Relaxation mechanism for excited state molecules.**
Disponível em: <http://www.shsu.edu/chm_tgc/chemilumdir/JABLONSKI.html>
Acesso em: 6 maio 2014.
6. CLEMONS, K. V., J. L. SPEAROW, R. PARMAR, M. ESPIRITU; D. A. STEVENS. **Genetic Susceptibility of Mice to Candida albicans Vaginitis Correlates with Host Estrogen Sensitivity.** Infection And Immunity, V.72, p.4878-4880, 2004.
7. CORAZZA,A.V. **Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e o LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos.** USP, São Carlos (tese de mestrado), 2005.
8. DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R., **Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation.** Antimicrob. Agents Chemother. V.49 n.6, p. 2329-2335, 2005.

9. DORTBUDAK O, HAAS R, BERNHART T, POKORNY GM., **Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis.** Clin. Oral Impl. Res, V.12, p.104-108, 2001
10. GABRIELLI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A.J.; BAPTISTA, M.S. **Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions.** Photochem. Photobiol. v. 79, n. 3, p. 227-232, 2004.
11. GAD F, ZAHRA T, HASAN T, HAMBLIN M.R. **Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bacteria.** Antimicrob Agents Chemother, V.3, p. 2173-2178, 2004.
12. HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. **Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?** Photochem. Photobiol. Sci., v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.
13. HAMAD, M., K. H. ABU-ELTEEN, e M. GHALEB. **Estrogen-dependent induction of persistent vaginal candidosis in naïve mice.** Mycoses, V.47, p.304–309, 2004.
14. HASHIMOTO, M.C.E. **Terapia fotodinâmica em infecção induzida por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente. Estudo *in vivo***- IPEN, São Paulo (tese de doutorado), 2010.
15. JACKSON Z, MEGHJI S, MAC ROBERT A, HENDERSON B, WILSON M. **Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent.** Lasers Med Sci, V.14, p.150-157, 1999.
16. JETT, B.D., K.L. HATTER, M.M. HUYCKE, e M.S GILMORE. **Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria.** Biotechniques, V. 23, p. 648-650, 1997.
17. LI, J., e TC. ZHU. **Determination of in vivo light fluence distribution in a heterogeneous prostate during photodynamic therapy.** Phys Med Biol V.53, p. 2103-2014., 2008.

18. LI, L.; XI, J.; ZHANG, X.; CHEN, J.; LUO, Y.; ZHANG, L. e LUO, R. **Retrospective study of photodynamic therapy vs photodynamic therapy combined with chemotherapy and chemotherapy alone on advanced esophageal CANCER**. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, V.7, p. 139-143, 2010.
19. MIJS, T.G.; SCHUITMAKER, H.J. **Photodynamic inactivation of the dermatophyte Trichophyton rubrum**. Photochem. Photobiol., v. 77, n. 5, p. 556-560, 2003.
20. NELSON, J.S.; JEFFES, E.W.; MACCULLOUGH, J.L.; WEINSTEINS, G.D.; FERGIN, P.E.; SHULL, T.F.; SIMPSON, K.R.; BUKATY, L.M.; HOFFMAN, W.L.; FONG, N.L. – **Photodynamic therapy of actinic keratosis with topical 5-aminolevulinic acid. A pilot dose-ranging study**. Archives of Dermatology, v.6, n.133, p.727-732, 1997.
21. NÚÑEZ, S.C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica**. - IPEN, São Paulo (tese de doutorado), 2007.
22. PRATES, R.A.; SILVA, E.G.; YAMADA, A.M. ; SUZUKI, L.C. e RIBEIRO, M.S. **Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner**. Laser Phys., V. 19, p. 1038-1044, 2009.
23. REALES, J.A.C.; MARTÍNEZ, L.S.; MARTÍNEZ, M.G.; NOMBELA, C.; MOLERO, G.; GIL, C. **Interaccion Patogeno – Hospedador: The *C. albicans* - macrophage model**
- Disponível em: <<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/candida/inicio.html>>
Acesso em: 6 maio 2014.
24. REYS, E.R. **Glândula harderiana de ratos Wistar como modelo para o estudo de efeitos fotodinâmicos**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

25. RIBEIRO MS, ZECELL DM. **Laser de baixa intensidade.** In: **A Odontologia e o Laser. Atuação do Laser na especialidade odontológica.** Quintessence editora, São Paulo, Brasil, p.217-240, 2004.
26. SARKAR S, WILSON M. **Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis.** J Periodont Res, V.28, p.204-210, 1993.
27. SLAYTER, E.M.; SLAYTER, H.S. **Light and electron microscopy.** Cambridge University Press, New York, p.192-211, 1992.
28. SOUKOS NS, WILSON M, BURNS T, SPEIGHT PM. **Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro.** Lasers Surg Med, V.18, p.253-259, 1996.
29. STREIT JM, FRITSHE TR, SADER HS, JONES RN. **Worldwide assessment of dalbavancin activity and spectrum against over 6.000 clinical isolates.** Diagn Microbiol Infect Dis, V.48, p.137-43, 2004.
30. SUZUKI, L.C. **Desenvolvimento de biofilme formado por *C. albicans* in vitro para estudo de terapia fotodinâmica,** Instituto de pesquisas energéticas e nucleares – IPEN, São Paulo (tese de mestrado), 2009.
31. TEGOS, G.P.; HAMBLIN, M.R. **Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 50, n. 1, p. 196-203, 2006.
32. TEGOS, G.P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; HIGGINBOTHAM, A.; STERMITZ, F.R.; HAMBLIN, M.R. **Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 52, n. 9, p. 3202-3209, 2008.
33. WAINWRIGHT M. **Non-porphyrin photosensitisers in biomedicine.** Chem Soc Rev, V.25, p.351-358, 1996

34. WAINWRIGHT, M., PHOENIX, D.D.; MARLAND,J; WAREING, D.R.A.; BOLTON, E.F.J. **A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series.** FEMS Immunol Med Microbiol, V.19, p. 75-80, 1997.
35. WAINWRIGHT M. **Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)** – J Antimicrob Chemother, V.42, p.13-28, 1998.
36. WILLIAMS,D.B.; CARTER,C.B. **Transmission Electron Microscopy: A textbook for materials sciences.** Springer, p.11-13, 1996.