



Livia Nordi Dovigo



*Efetividade da Terapia Fotodinâmica
na inativação de Candida spp*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral (Área de Concentração: Prótese).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

Araraquara
2007

Dovigo, Livia Nordi

Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida spp* / Livia Nordi Dovigo . – Araraquara : [s.n.], 2007.
149 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

1. *Candida albicans* 2. *Candida glabrata* 3. Fotoquimioterapia
4. Hematoporfirinas 5. Resistência fúngica a drogas I. Título.

LÍVIA NORDI DOVIGO

*Efetividade da Terapia Fotodinâmica na
inativação de *Candida spp**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador - Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador - Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

3º Examinador - Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Araraquara, 16 de março de 2007.

Dados Curriculares

Livia Nordi Dovigo

NASCIMENTO	27/07/1983 – São Carlos – S.P.
FILIAÇÃO	Altair José Dovigo Mara Regina Petromilli Nordi Dovigo
2001/2004	Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia de Araraquara
2005/2007	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado – Reabilitação Oral – Área de Prótese, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2006	Estágio Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais *Altair* e *Mara*, que nunca mediram os esforços para me proporcionar tudo o que fosse realmente importante, e que são meus maiores exemplos de vida. Vocês, com uma dedicação infinita e amor incondicional, tornam a minha caminhada terrena uma passagem repleta de flores.

A minha irmã *Carla*, que mesmo distante esteve presente nos bons e “não tão bons” momentos.

Ao meu namorado e melhor amigo *Fábio*, que de longe conhece meus pensamentos, e com uma generosidade e amor imensos me auxilia em todas as dificuldades, compreende minhas falhas e me faz um ser humano melhor.

Nada seria possível sem vocês!

Agradecimentos especiais

À Deus.

“Ó Senhor, eu agradeço vosso amor, vossa verdade, porque fizeste muito mais que prometestes, naquele dia em que chamei, vós me escutastes e aumentastes a força de minha alma.”

(Sl 137)

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. *Ana Cláudia Pavarina*, por quem a convivência só fez aumentar o respeito e a admiração. Agradeço pela amizade, orientação segura e apoio com que me auxiliou na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. *Vanderlei Salvador Bagnato*, agradeço pela disponibilidade e oportunidades concedidas, que tornaram possível a execução desta pesquisa.

Aos professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, Prof^a. Dr^a. *Ana Lúcia Machado*, Prof^a. Dr^a. *Eunice Teresinha Giampaolo* e Prof. Dr. *Carlos Eduardo Vergani*, meu eterno agradecimento pela confiança depositada e pelo apoio com que me auxiliaram ao longo do curso de mestrado.

A querida Prof^a. Dr^a. *Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia*,
minha tia, amiga e inspiração para a vida. Muito obrigada pelos
exemplos de determinação, fé e busca pela perfeição, que representam
um guia em minha formação pessoal e profissional.

Aos amigos e fiéis companheiros *Ewerton* e *Daniela*, a quem quero
expressar tantos agradecimentos, mas para os quais não encontro
palavras. Obrigada pela imensa ajuda prestada na execução deste
trabalho e sobretudo pela amizade sincera. Vocês sempre serão meus
“orientadores” de coração!

À querida *Paula*, que esteve sempre pronta a me ajudar, em todos e
“tantos” momentos em que precisei. Obrigada pela oportunidade
convivermos e crescermos juntas durante esses dois anos que
passaram.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, na pessoa de sua diretora, Prof^a Dr^a. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, e seu vice-diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pela valiosa participação em meu crescimento profissional.

À todos os professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial aos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pela acolhida e alegre convivência.

À Prof^a. Dr^a. Denise Madalena Palomari Spolidório, responsável pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, onde foi realizada a fase experimental desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial as queridas amigas Sônia Vargas e Juliana Pirolla. Muito obrigada pelo carinho, atenção e eficiência nos trabalhos de laboratório.

À amiga Luciana F. Ballan pelo carinho, amizade e valioso auxílio na execução da fase experimental deste estudo.

Aos funcionários da Biblioteca, especialmente às senhoras Maria Helena Matsumoto K. Leves e Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, pelos auxílios na normalização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, pelos serviços prestados durante todo o curso.

Às Prof^{as}, Dr^{as}. Juliana Ferreira e Pricila Menezes, pesquisadoras do Laboratório de Biofotônica do IFSC – USP, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao engenheiro Orlando Guimarães, do Laboratório de Apoio Tecnológico do IFSC – USP, pela prontidão no desenvolvimento da *Bio Table*.

À CAPES e a FAPESP, pelo auxílio financeiro que propiciaram o bom andamento desta pesquisa.

Aos colegas do curso de mestrado, Alejandro, Caroline, Isabella, Juliê, Laiza, Luciano e Paula, agradeço por todos os momentos de agradável convivência e companheirismo.

Aos colegas de pós-graduação do atual curso de doutorado, em especial Andréa, Daniela, Ewerton, José Maurício, Mariana, Michael e Roberta, e as amigas Janaína, Karin, Nara e Vanessa. Agradeço pela atenção e apoio.

As alunas de iniciação científica Juliana A. de Oliveira e Luciana F. Ballan, muito obrigada pela oportunidade de crescermos juntas e pelo carinho e confiança que depositaram em mim.

À minha família, Altair, Mara, Carla e Milu. Obrigada por aceitarem as minhas opções e compreenderem meus limites de não ter conseguido dar-lhes a atenção que merecem durante esse tempo que priorizei a concretização desse trabalho.

A todos os meus familiares, tios, primos, e especial as minhas avós Dinorah e Paulina que com muito carinho sempre auxiliam em todos os momentos da minha vida.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meu sincero agradecimento.

Que Deus abençoe e proteja a todos vocês!

"A vida é generosa e, a cada sala que se entra, descobre-se tantas outras portas. E a vida enriquece quem se arrisca a abrir novas portas. "

Jeami Tiba

Sumário

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
3 PROPOSIÇÃO.....	60
4 MATERIAL E MÉTODO.....	62
5 RESULTADO.....	82
6 DISCUSSÃO.....	94
7 CONCLUSÃO.....	106
8 REFERÊNCIAS.....	108
9 APÊNDICES.....	116

Dovigo LN. Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida* spp. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Resumo

O surgimento da resistência antifúngica aos tratamentos convencionais tem proporcionado o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento da candidose bucal. Nesse contexto, a utilização da PDT vem sendo sugerida como método alternativo para a inativação de microrganismos patogênicos. Este estudo avaliou a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans* e *C. glabrata*, ATCC e resistente a fluconazol, por meio da utilização do agente fotossensibilizador Photogem[®] e da iluminação com LEDs de comprimento de onda azul. 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 das espécies de *Candida* avaliadas. Essas suspensões foram transferidas para placas de 96 orifícios, tratadas com cinco diferentes concentrações de Photogem[®] (2,5; 5; 10; 25 e 50mg/L) e expostas a quatro doses de luz (10,5; 18; 25,5 e 37,5J/cm²). Suspensões adicionais foram tratadas somente com as cinco concentrações do fotossensibilizador ou apenas com as quatro doses de luz. Cada condição experimental foi realizada três vezes. Após a realização desses experimentos, foram obtidas diluições seriadas de cada amostra (10⁻¹ a 10⁻³), e alíquotas de 25 µL dessas diluições foram plaqueadas, em triplicatas, em Sabouraud Dextrose Agar. Adicionalmente, alíquotas de 25 µL foram removidas das cavidades das placas de orifícios e transferidas diretamente para um quadrante da placa de Petri, sem a realização de diluição. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias viáveis (ufc/mL), e os valores obtidos foram analisados com o teste t de Student (p < 0,05). Os

resultados demonstraram que a inativação de *Candida* spp. ocorreu de forma concentração/dose dependente, que resultou na completa inativação desses microrganismos em determinadas condições experimentais. A dose de luz mínima que promoveu a completa inativação das duas origens de *C. albicans* foi 18 J/cm², em associação com 50mg/L de Photogem[®]. Após a aplicação de 25,5 e 37,5 J/cm², baixas concentrações de fotossensibilizador foram requeridas para a inativação total dessa espécie, sendo que diferenças estatisticamente significantes foram apontadas entre os valores obtidos para as duas origens de *C. albicans*. Também foram observadas diferenças estatisticamente significantes na obtenção da inativação total das duas origens de *C. glabrata*. Para a ATCC, não houve crescimento de colônias viáveis após o tratamento com 10, 25 e 50 mg/L de Photogem[®] seguido de iluminação a 37,5 J/cm². No entanto, somente as concentrações de 25 e 50 mg/L foram capazes de eliminar a *C. glabrata* resistente a fluconazol, nas doses de 25,5 e 37,5 J/cm². Assim, a fotoativação do Photogem[®] pela luz do LED demonstrou efetividade na inativação das duas espécies de *Candida* avaliadas, ATCC e resistente a fluconazol.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Candida glabrata*; fotoquimioterapia; hematoporfirinas; resistência fúngica a drogas.

Dovigo LN. Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida* spp. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Abstract

Oral candidosis is an opportunistic infection that affects a significant percentage of the population. The oral infection caused by *Candida* spp. is usually treated with topical and systemic antifungal drugs. However, the widespread use of these agents has resulted in an alarming increase in the rate of antifungal resistance. Recently, the photodynamic therapy (PDT) has been studied as an alternative modality of killing microorganisms, including viruses, fungi and bacteria. The aim of this study was to determine whether *Candida albicans* and *C. glabrata*, ATCC and fluconazole-resistant strains, could be photosensitized by Photogem® in combination with blue Light Emitted Diode (LED). Suspensions of each *Candida* strain, containing 10^6 viable cells per milliliter, were treated with five concentrations of Photogem® (2.5, 5, 10, 25 and 50 mg/l), followed by LED irradiation in four light doses (10.5, 18, 25.5 and 37.5 J/cm²). Each experimental condition was carried out in triplicate and repeated three times. From each sample, serial dilutions were obtained and aliquots of 25 µl of each dilution were plated on Sabouraud Dextrose Agar. All plates were incubated at 37°C for 48 hours. After incubation, colonies were counted (CFU/ml) and the data were statistically analyzed by the Student's t test ($p < 0.05$). The results demonstrated a concentration/dose-dependent pattern of inactivation, that resulted in complete elimination of all *Candida* evaluated. The minimal light dose for the complete inactivation of both *C. albicans* source was 18 J/cm², in conjunction with 50 mg/l of Photogem®. After 25.5 and 37.5 J/cm², a lower concentration of Photogem® was required to totally inactivate *C. albicans* ATCC (5 and 2.5 mg/l) in comparison with *C. albicans* fluconazole-resistant (10 and 5 mg/l). There were statistically significant differences in the log (CFU/ml) for the minimal light dose

to complete inactivation of both *C. glabrata* sources. For *C. glabrata* ATCC, no viable cells were detected after treatment with 10, 25.5 or 50 mg/l of Photogem[®] followed by 37.5 J/cm², while the association of 25 mg/l with 25.5 J/cm² was sufficient to totally inactivate the *C. glabrata* fluconazole-resistant. The photoactivation of Photogem[®] by blue LED light proved to be effective for the inactivation of fluconazole-resistant and ATCC strains of *C. albicans* and *C. glabrata*.

Keywords: *Candida albicans*; *Candida glabrata*; photochemotherapy; hematoporphyrins; drug fungal resistance.

1. Introdução

As espécies do gênero *Candida* são freqüentemente isoladas da cavidade bucal na maioria dos indivíduos saudáveis⁵⁷, vivendo normalmente em relação de comensalismo. No entanto, sob determinadas condições, esses microrganismos podem atuar como patógenos oportunistas, invadindo tecidos e desencadeando processos infecciosos¹⁴. A *Candida albicans* é considerada a espécie mais prevalente e patogênica, sendo responsável por cerca de 70% dos casos de infecções⁴⁴. Esse fungo possui a habilidade de alterar sua morfologia de leveduras (blastosporo - presente na mucosa bucal normal) para o tipo micelial (pseudohifas e hifas - forma invasiva do microrganismo), o qual provoca uma intensa reação imunológica e inflamação²⁹. Outras espécies do mesmo gênero também têm sido isoladas e são freqüentemente associadas ao desenvolvimento de infecções, tais como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondi* (em ordem decrescente de virulência)⁵³.

A infecção da cavidade bucal por *Candida* spp., denominada candidose bucal, é considerada a infecção fúngica mais freqüente entre humanos¹. Alguns fatores locais, como redução do fluxo salivar, trauma local, alterações de pH e uso contínuo de próteses removíveis, podem estar associados ao desenvolvimento dessa condição patológica⁵⁰. A utilização de próteses dentais removíveis tem sido associada à manifestação de uma forma de candidose que afeta normalmente o palato de aproximadamente 65% dos pacientes portadores de próteses²⁰, conhecida como estomatite protética. Atualmente, sabe-se que a colocação de prótese removível na cavidade bucal promove um desequilíbrio nos processos homeostáticos locais^{38,56}, o que leva a alterações quantitativa e qualitativa da microbiota bucal²⁵. O uso contínuo da prótese associado a uma higienização inadequada promovem condições favoráveis para a proliferação de diversos microrganismos, principalmente espécies do gênero *Candida*^{11,60}. Como consequência, um biofilme microbiano é formado na superfície interna da

prótese^{11,60,63}. A colonização e a subsequente formação de biofilme na superfície protética, que mantêm contato com a mucosa do palato, estão relacionadas ao desenvolvimento da estomatite protética⁴⁵.

Clinicamente, a estomatite protética caracteriza-se pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos na região palatina sob as próteses removíveis dos pacientes, e, em casos mais avançados, também podem ser observadas áreas eritematosas difusas, ou ainda, hiperplasia papilar do palato. Além da região palatina correspondente à área de suporte das próteses totais superiores, outras regiões podem ser acometidas pela estomatite protética, tais como áreas de suporte de próteses parciais removíveis superiores e inferiores^{34,65}. Os sintomas da estomatite causada por prótese podem incluir ardência, prurido, dor, desconforto generalizado na cavidade bucal, alteração no paladar e lesões associadas, como a queilite angular^{4,34}. Além disso, a hiperplasia papilar do palato pode ocasionar a desadaptação da prótese, tendo como consequência uma diminuição da capacidade mastigatória do indivíduo e injúrias à mucosa de suporte da prótese.

Algumas alterações sistêmicas também são consideradas fatores predisponentes ao desenvolvimento de infecções por espécies de *Candida*. Esses fungos, embora comensais em indivíduos saudáveis, podem transformam-se em patógenos parasitas quando o sistema imunológico está comprometido e os mecanismos de defesa diminuídos⁵². A candidose oral e a orofaríngea são doenças oportunistas de alta incidência em pacientes diabéticos, nos que fazem uso de medicamentos imunossupressores após transplante de órgãos, antibióticos de amplo espectro, terapias antineoplásicas e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)^{50,55}. A candidose oral é uma das infecções oportunistas mais comumente observadas em pacientes portadores da AIDS⁵², e, quando não corretamente tratada e prevenida, pode contribuir consideravelmente para a mortalidade desses pacientes⁶¹.

No tratamento da candidose oral podem ser utilizados terapia antifúngica tópica^{5,19}, medicação antifúngica sistêmica^{12,35} e procedimentos de higienização e desinfecção das próteses^{4,18,49}. A escolha de um tratamento ou a associação de mais de um deles deve ser definida em virtude do grau de infecção

decorrente da candidose, das condições de saúde geral e bucal, da idade e do gênero do paciente⁶⁵.

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.^{4,29}. No entanto, esses medicamentos mostram resultados efêmeros pois não eliminam completamente esses microrganismos^{10,34,47}. Essa deficiência ocorre devido à diminuição da concentração do agente tópico nos tecidos infectados associada aos efeitos diluentes da saliva e aos movimentos da língua⁴. Como conseqüência da reduzida ação do agente antifúngico tópico, a recolonização do microrganismo é freqüente após o tratamento, o que leva a uma recidiva da infecção⁴². A medicação sistêmica é uma outra opção de tratamento, a qual é usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes⁵⁰. Nesses casos, medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B podem ser utilizados. Esses agentes vêm sendo amplamente utilizados para o tratamento da candidose oral, especialmente em pacientes imunodeprimidos, porém tem sido relatado que a utilização de antifúngicos sistêmicos, particularmente a anfotericina B, pode promover efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos³⁹.

Um 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. Os resultados obtidos em um estudo de Chandra et al.²⁰ demonstraram que cepas de *C. albicans* presentes em um modelo de biofilme apresentaram resistência a antifúngicos tópicos (nistatina, clorexidina) e sistêmicos (anfotericina B, fluconazol) freqüentemente utilizados para o tratamento de estomatite protética. 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 oportunistas⁵⁰. 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 incomum¹².

Isso provavelmente ocorre em consequência da característica fungistática das drogas azóis, que não são capazes de eliminar totalmente o microrganismo. Além disso, espécies como a *C. glabrata* e a *C. krusei* são intrinsicamente resistentes aos medicamentos antifúngicos e vêm sendo frequentemente isoladas de infecções^{16,28,64}. 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 fúngicas⁶⁴. 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.⁵⁴, 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. Recentemente, Hunter et al.²⁸ verificaram que a utilização do fluconazol para o tratamento de pacientes com candidose causou o desenvolvimento de resistência da *C. albicans*. Além disso, a exposição ao antifúngico ocasionou uma seleção de espécies não-*albicans* resistentes ao tratamento, que persistiram nas infecções²⁸. Neste estudo, outras nove espécies fúngicas foram isoladas clinicamente, sendo a *C. glabrata* a mais frequente (14,6 %) ²⁸. De forma semelhante, Cartledge et al.¹⁶ também observaram maior prevalência de *C. glabrata* ao avaliar pacientes com candidose oral do tipo pseudomembranosa.

Diante das dificuldades impostas pelo surgimento da resistência microbiana, muitas pesquisas vêm sendo conduzidas buscando terapias alternativas para o tratamento de infecções como a candidose. Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de microrganismos patogênicos é a Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT)^{13,23,24,46,66,67}. Essa 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 neoplásico⁴¹. Recentemente, alguns estudos têm demonstrado o potencial da PDT na inativação microbiana, incluindo alguns tipos de vírus, bactérias e fungos⁴¹.

O processo fotodinâmico requer a utilização de um composto químico denominado fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio^{21,31,62}. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com um FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para a iluminação do tecido sensibilizado. A interação da luz de comprimento de onda adequado com o FS e o oxigênio resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação de células⁴¹. Tem sido sugerido que esse mecanismo envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, passando seus elétrons a um estado excitado. Na presença de um substrato, como o oxigênio, o FS retorna ao seu estado natural, transferindo a energia ao substrato, o que promove a formação de espécies reativas, como o oxigênio singlete²¹. Essa espécie eletrônica de oxigênio é altamente reativa para os constituintes celulares e pode promover a oxidação irreversível dos componentes por meio de lise da membrana e inativação de proteínas²⁷. De acordo com Colussi et al.²¹, para que um composto químico possa atuar como FS, ele deve possuir algumas propriedades - tais como capacidade de ser solúvel e estável em solução aquosa a pH fisiológico, permitindo sua circulação no meio celular, ter habilidade para o transporte passivo ou ativo dentro das células, possuir facilidade para absorver ou emitir fótons (alto rendimento quântico), não ser tóxico a níveis terapêuticos - entre outras características específicas para sua aplicabilidade no campo da oncologia²¹. Alguns compostos químicos corantes têm sido avaliados quanto a suas capacidades fotossensibilizadoras em microrganismos, como as fenotiazinas (azul de toluidina e azul de metileno), as cianinas (indocianina verde), os fitoterápicos (azuleno) e as ftalocianinas. Os compostos derivados da hematoporfirina (do inglês, *haematoporphyrin derivative* ou HpD) são FSs amplamente utilizados para o tratamento de câncer com PDT⁴¹, e entre eles destacam-se o Photofrin[®], o Photogem[®] e o Photosan[®]. Esses FSs consistem de uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros e são produzidos, de acordo com a tecnologia original de desfibrilação do sangue de animais e de humanos, a partir da hematoporfirina IX existente na circulação sanguínea. Alguns estudos in

vitro têm demonstrado que a utilização tópica desses compostos pode ser efetiva também na fotoinativação de bactérias e fungos^{6,43}.

Algumas combinações de FSs e fontes de luz vêm sendo testadas para a inativação de *Candida* spp.^{6,7,17,22,30,36,58,66}. O laser (*light amplification stimulated emission*) de baixa potência vem sendo preferencialmente empregado para a ativação dos FSs pois destaca-se das demais fontes de luz por apresentar feixe de luz monocromático, coerente e colimado. Wilson e Mia⁶⁷ avaliaram a efetividade da PDT na inativação de culturas de *Candida* spp. em placas de Petri. O laser de arseneto de gálio e alumínio (Ga-As, 660 nm) foi associado aos FSs azul de metileno e ftalocianina de dissulfato de alumínio, enquanto o laser de hélio e neônio (He-Ne, 632 nm) foi associado aos corantes azul de toluidina, violeta cristal, éster de dihematoporfirina e tionina. A associação do laser He-Ne com azul de toluidina foi o procedimento mais efetivo na inativação de *C. albicans* e de outras espécies de *Candida*⁶⁷. No entanto, o laser de He-Ne possui um custo muito elevado, e tem sido substituído por lasers de diodo semicondutores. Recentemente, foi observado que esse tipo de laser, no comprimento de onda vermelho, associado ao azul de metileno, apresentou efeito fungicida sobre células de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*⁵⁸.

Embora a maioria dos estudos in vitro de PDT utilize laseres com emissão de luz no espectro vermelho (em torno de 630 nm), estudos clínicos têm relatado o aparecimento de eritema, sangramento e edema após o tratamento de lesões superficiais, como neoplasmas cutâneos e acne². Esses efeitos colaterais são atribuídos à penetração da luz vermelha no tecido biológico, uma vez que o comprimento de onda e a penetrabilidade da luz no tecido são diretamente proporcionais². Assim, a aplicação de uma luz de comprimento de onda inferior, como, por exemplo, o azul (460 nm), poderia estar melhor indicada para o tratamento de lesões superficiais, como é o caso da candidose, pois a luz azul penetra superficialmente no tecido onde a infecção está instalada. Para isso, o agente FS empregado deve absorver luz em comprimentos de onda mais curtos, o que parece ser uma importante vantagem dos compostos derivados da hematoporfirina³³. Além disso, fontes de luz não-coerentes poderiam atingir

efeitos mais superficiais em relação aos lasers, em razão do maior espalhamento da luz no tecido biológico², o que reduz a quantidade de luz absorvida. A inviabilização de células de *Candida* spp. foi obtida em estudos que utilizaram o Photofrin[®] associado à iluminação com luz halógena (luz branca) e lâmpadas de mercúrio^{7,17,36}. Entretanto, essas lâmpadas emitem calor, fato não desejável na aplicação da PDT, tendo em vista que a emissão de energia térmica configura um desperdício energético e aquece o local irradiado, levando a inativação térmica dos microrganismos e efeitos colaterais no tecido biológico.

Neste contexto, torna-se evidente que a difusão da PDT como método para o controle de infecções está na dependência da realização de estudos que viabilizem a utilização segura e eficaz dessa técnica. O desenvolvimento de fontes de luz capazes de otimizar os resultados e possibilitar a execução de estudos in vitro, fundamentais para definição de parâmetros de aplicação da PDT, tem grande importância para a aplicabilidade desse método. O LED representa uma nova possibilidade de aplicação de energia luminosa, desenvolvido por meio de recentes evoluções tecnológicas. É uma categoria de fonte de luz fria que emite radiação numa faixa mais ampla do espectro, porém com um comprimento de onda predominante, apresenta uma emissão de luz espontânea, não coerente e com certo espalhamento. Além disso, possui um custo menor e tecnologia mais simples comparada com a dos aparelhos laser⁹, fato este que tornaria a PDT uma prática clinicamente mais acessível. Já foi demonstrado que a utilização tanto do laser de He-Ne quanto do LED, associados ao azul de toluidina obtiveram efetividades semelhantes na inativação de biofilmes de *Streptococcus mutans*⁶⁸. No entanto, não foram realizados estudos que tenham testado a efetividade da PDT associado ao LED na inativação de espécies de *Candida*.

Embora estudos tenham avaliado a susceptibilidade de *Candida* spp. à PDT, a efetividade dessa terapia associada ao LED de comprimento de onda azul não é conhecida. Além disso, é importante salientar que a utilização dessa terapia para o tratamento da candidose bucal poderia representar uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes portadores desta infecção, já que os tratamentos disponíveis atualmente nem sempre são eficazes. A aplicação da PDT

pode apresentar importantes vantagens em relação aos antifúngicos tendo em vista a possibilidade da obtenção de efeito fungicida sobre as células de fúngicas, sem o desenvolvimento de resistência por parte do microrganismo. Dessa forma, este estudo avaliou a efetividade da associação de um agente derivado da hematoporfirina e do LED na inativação de cepas padrão e resistentes a fluconazol de *C. albicans* e de *C. glabrata*.

2 Revisão da literatura

Com objetivos didáticos, a revisão da literatura abordará dois aspectos separadamente: o primeiro fará referência aos trabalhos relacionados à candidose oral e resistência antifúngica a drogas; o segundo enfocará os estudos relacionados com a PDT.

2.1 Candidose oral

O efeito da administração de fluconazol em pacientes com estomatite protética foi avaliado por Budtz-Jorgensen et al.¹⁰, em 1988. Pacientes portadores desta infecção foram submetidos à coleta de amostras do palato e da superfície da prótese, para a verificação da presença de fungos. Foram selecionados 38 pacientes, que apresentavam os sinais clínicos de estomatite protética e que possuíam, predominantemente, a *C. albicans* na cavidade bucal. Metade desses indivíduos recebeu a administração de 50 mg de fluconazol por dia, durante 14 dias, via oral. Os demais, receberam apenas cápsulas placebo. Foram realizadas avaliações clínicas e micológicas antes, imediatamente após, 2 e 4 semanas após o término do tratamento. Além disso, amostras de sangue e urina foram obtidas para a verificação de possíveis efeitos colaterais do tratamento. Os resultados demonstraram uma redução significativa no eritema após o término do tratamento com fluconazol, mas após 2 e 4 semanas, a inflamação mostrou uma remissão parcial. Em alguns casos, a infecção foi re-estabelecida após o período de 2 semanas. Foram observadas alterações na flora microbiana dos pacientes tratados com o antifúngico, tanto quantitativas, como qualitativas. Na maioria dos casos, a cepa identificada inicialmente foi eliminada e substituída por outros fungos patogênicos. Nesses pacientes, foram encontradas cepas diferentes da espécie originalmente identificada ou outras espécies patogênicas. As análises de urina e sangue, não revelaram efeitos tóxicos da administração do fluconazol. Os indivíduos tratados com o placebo, não mostraram nenhuma alteração na flora

bucal e nas condições clínicas. Foi concluído que a utilização do fluconazol foi efetiva para a remissão dos sinais da estomatite protética, no entanto, os índices de recidivas encontrados demonstram resultados temporários.

Hunter et al.²⁸, em 1998, realizaram um estudo para avaliar a presença de resistência a fluconazol em *C. albicans* isoladas de pacientes HIV-positivos. Para isso, foram coletadas amostras de saliva de 89 pacientes, sendo que desses, 48 haviam sido tratados previamente com fluconazol e 41 nunca haviam sido expostos a este medicamento. Alíquotas dessas amostras foram submetidas a testes para a identificação microbiológica das espécies de *Candida*, por meio do teste de Pagano Levin e produção de tubos germinativos. Para a avaliação da susceptibilidade ao fluconazol dos isolados clínicos de *C. albicans*, foi realizado o teste de difusão em disco (DDA). Os resultados demonstraram que a *C. albicans* foi isolada de 69% dos pacientes que já haviam recebido o fluconazol, e de 93% dos pacientes que não haviam recebido este tratamento. Além disso, nove outras espécies foram isoladas, como a *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, sendo que essas espécies foram isoladas com maior frequência nos pacientes expostos ao fluconazol. Dessas, a *C. glabrata* foi a mais encontrada. Cinco pacientes, previamente expostos ao fluconazol, possuíam *C. albicans* resistente a esse medicamento, sendo que a presença de resistência esteve relacionada a baixas contagens de linfócitos CD4. Os autores concluíram que longos períodos de tratamento com fluconazol podem causar modificações na flora fúngica da cavidade bucal dos pacientes, levando a uma seleção de espécies não-*albicans* que persistem nas infecções. Algumas dessas espécies podem apresentar resistência intrínseca a antifúngicos. Além disso, concluíram que a exposição ao fluconazol pode promover o desenvolvimento de resistência nas cepas de *C. albicans* expostas a esse medicamento.

Radford et al.⁵¹, em 1998, compararam a capacidade de aderência da *C. albicans* (com e sem transformações fenotípicas) às superfícies de corpos de prova confeccionados com resina acrílica termopolimerizável e dois materiais reembasadores. Metade de cada uma das hemifaces dos corpos de prova foi polimerizada em contato com uma lâmina de vidro e não recebeu acabamento

(superfície lisa - controle) e a outra metade foi submetida a acabamento (superfície rugosa). O acabamento da resina de base foi realizado com fresa de aço, e o dos materiais reembasadores com lixas de carbetto de silício. As colônias com e sem transformação fenotípica foram obtidas a partir de cepas padrão de *C. albicans* incubadas por 18 a 20 horas em caldo nutriente. Em seguida, uma suspensão celular (10^7 org/mL) foi incubada durante uma hora em placas de orifícios. Após a remoção das placas, os corpos de prova foram enxaguados, secos, montados em lâminas de vidro e corados. As leveduras e hifas aderidas foram contadas microscopicamente pela técnica de amostra estratificada. Os resultados para a aderência de leveduras demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na aderência dos dois tipos de *C. albicans* (com ou sem transformação fenotípica). Foi observada menor aderência desses microrganismos a resina acrílica do que aos materiais reembasadores e a aderência as superfícies lisas foi menor do que as superfícies rugosas. A aderência a resina acrílica de base foi menor do que aos materiais reembasadores. O número de leveduras aderidas aos materiais foi superior ao número de hifas, tendo sido a contagem dessas últimas realizada em maior aumento do microscópio. Para as hifas, foi observada maior aderência de *C. albicans* com transformação fenotípica, mas não houve diferença significativa de aderência entre os materiais. Os autores concluíram que a rugosidade de superfície promoveu a adesão e que a capacidade de transformação fenotípica dos microrganismos não influenciou na aderência das leveduras, mas sim, na aderência de hifas.

Em uma revisão de literatura, White et al.⁶⁴, em 1998, descreveram os fatores clínicos, moleculares e celulares que podem estar relacionados ao desenvolvimento de resistência antifúngica. No estudo, dois tipos de resistência foram definidos: a primária (intrínseca a algumas espécies, como a *C. glabrata* e *C. krusei*), e a secundária (desenvolvida após a exposição prolongada a algum tipo de medicamento). De acordo com os autores, os mecanismos de resistência demonstrados na literatura variam conforme a medicação avaliada. Os agentes azóis, por exemplo, atuam na inibição da biossíntese do ergosterol, promovendo alterações na função apropriada de enzimas e na integridade da membrana

citoplasmática. Dessa forma, microrganismos resistentes, normalmente apresentam mutações genéticas nas enzimas alvo do medicamento (envolvidas na formação do ergosterol) e mecanismos para diminuir a concentração celular da droga. De um modo geral, a natureza fungistática do medicamento, a dosimetria de aplicação (frequência e quantidade de efeito cumulativo), a farmacocinética (absorção, distribuição e metabolismo) e as interações medicamentosas são parâmetros relativos às drogas que podem influenciar o desenvolvimento de resistência antifúngica. Além disso, fatores intrínsecos aos indivíduos também podem interferir na resposta a medicação, como o estado imunológico, o local e severidade da infecção e a presença de fatores agravantes (próteses dentais, catéteres, válvulas cardíacas). Os autores frisaram a importância do desenvolvimento de estratégias que identifiquem de forma segura a presença de microrganismos resistentes nas infecções, para que terapias apropriadas possam ser aplicadas. Além disso, foi concluído que a busca por tratamentos que não promovam o desenvolvimento de resistência é de fundamental importância, tendo em vista que os medicamentos disponíveis atualmente parecem continuar promovendo novos mecanismos de resistência.

A presença de espécies não-*albicans* na candidose bucal em pacientes HIV-positivos, foi avaliada por Cartledge et al.¹⁶, em 1999. Para a realização da pesquisa, foram selecionados pacientes HIV-positivos com candidose oral pseudomembranosa. Amostras de saliva e coletas por meio de *swabs* foram submetidas a testes de identificação microbiológica e susceptibilidade a antifúngicos. Após isso, os pacientes receberam um tratamento com antifúngico durante 7 dias, sendo que um grupo foi tratado com ketaconazol, outro com itraconazol e outro com fluconazol. Passado este período, a resposta aos tratamentos foi classificada como sucesso (remissão dos sinais de candidose) ou insucesso (persistência da infecção), e esse resultado foi relacionado a susceptibilidade *in vitro* das espécies isoladas. Dentre os 921 isolados clínicos identificados, 95 (10%) foram de espécies não-*albicans*, sendo que a *C. glabrata* foi a mais frequente. Desses, 85 isolados não-*albicans* demonstraram resistência *in vitro* ao fluconazol. Além disso, 32% do total de isolados, foram identificados

com *C. albicans* resistente a fluconazol. De uma forma geral, as espécies não-*albicans* demonstraram baixos valores de susceptibilidade, in vitro, aos antifúngicos testados. Nas infecções causadas somente por uma dessas espécies, os índices de falhas foram elevados, e os autores concluíram que os resultados dos testes in vitro prognosticaram as respostas clínicas encontradas. Já nas infecções mistas, os índices de sucesso não estiveram sempre relacionados aos resultados de susceptibilidade in vitro, tendo em vista que as diferentes espécies apresentaram valores de susceptibilidade discordantes.

Banting, Hill⁵, em 2001, avaliaram in vivo a desinfecção de próteses totais por imersão em clorexidina ou irradiação em microondas como métodos adjuntos no tratamento de estomatite protética. Trinta e quatro pacientes portadores de próteses totais superiores com esfregaços positivos para pseudohifas de *C. albicans* foram selecionados para um dos seguintes tratamentos: irradiação da prótese em microondas ou imersão da prótese em solução clorexidina a 0,2% (controle). Todos os pacientes receberam medicação antifúngica tópica (Nistatina 300000 IU 3 vezes ao dia) por 14 dias. As próteses selecionadas para o tratamento com as microondas foram escovadas com sabão anti-séptico e água e então irradiadas por um minuto a 850 W em três dias diferentes (1º, 5º e 10º dia). Para o grupo controle, as próteses foram imersas na solução de clorexidina durante a noite por 14 dias, com renovação da solução a cada 2 dias. Essas próteses também foram escovadas em 3 dias diferentes (1º, 5º e 10º dias), estabelecendo parâmetro para comparação entre os grupos. Os resultados demonstraram que, após 14 dias, 53% das próteses irradiadas por microondas apresentaram pseudohifas de *C. albicans* e que essa porcentagem aumentou para 84% para as próteses imersas em clorexidina. Por outro lado, após esse mesmo período, os esfregaços citológicos referentes à mucosa palatina dos pacientes cujas próteses foram irradiadas apresentaram 1/4 do risco de infecção dos tecidos palatinos em relação aos pacientes que tiveram suas próteses imersas em clorexidina. Três meses após o tratamento, o grupo controle foi considerado 5 vezes mais susceptível a apresentar pseudohifas de *C. albicans* quando em comparação com o grupo que recebeu tratamento com as microondas. Os autores concluíram que a exposição das

próteses às microondas foi efetiva para uma adequada desinfecção nas próteses sem ocasionar efeitos deletérios aparentes nas propriedades das mesmas.

Em um trabalho de revisão de literatura, Calderone, Fonzi¹⁴, em 2001, descreveram os fatores de virulência da *C. albicans*. De acordo com os autores, a candidose é uma infecção comum da pele, cavidade bucal e esôfago, trato gastrointestinal, vagina e sistema vascular em humanos. Embora a maioria das infecções ocorra em pacientes imunocomprometidos ou debilitados, a *C. albicans* expressa diversos fatores de virulência que contribuem para a patogênese. Esses fatores incluem a presença de biomoléculas de reconhecimento do hospedeiro (adesinas) e a produção de fosfolipases e proteases aspartil secretadas. Os autores descreveram os eventos iniciais da patogenia da candidose, que se inicia pelo reconhecimento do hospedeiro. A ligação do microrganismo a proteínas ou competidores do microrganismo pode dificultar a sua identificação por parte do hospedeiro. Além disso, embora seja bem difundida a idéia de que a invasão tecidual seja facilitada pela transformação do microrganismo para a forma de hifas, de acordo com os autores, outros mecanismos de penetração tecidual podem ocorrer. Os autores descreveram a invasão tecidual das leveduras por um processo denominado “persoption”, e, também, por meio de fagocitose por parte das células humanas da região da faringe e do esôfago. Além disso, alterações fenotípicas são acompanhadas de alterações na expressão antigênica, morfologia de colônia e afinidade aos tecidos da *C. albicans* e outras espécies de *Candida*. As alterações podem proporcionar às células, flexibilidade, favorecendo a sua adaptação as condições do próprio hospedeiro e do tratamento imposto por algum tipo de terapia.

Chandra et al.¹⁹, em 2001, verificaram a formação de biofilmes de *C. albicans* e de *Saccharomyces cerevisiae* sobre corpos de prova de metilmetacrilato e de silicone. Para isso, foram utilizadas cepas padrão e isoladas da cavidade bucal de pacientes, as quais foram inoculadas nesses corpos de prova. Foram utilizadas técnicas para verificação do número de células pela redução de tetrazolium e pelo peso seco dos materiais. Além disso, foi avaliada a atividade metabólica, por meio de corantes fluorescentes e microscopia confocal a laser. Os

autores também avaliaram a susceptibilidade dos microrganismos a diferentes concentrações (0,5 a 256 mg/mL) de fluconazol, anfotericina B, nistatina e clorexidina. Os autores observaram que as leveduras aderidas são transformadas em comunidades celulares bem definidas, inseridas em uma matriz de polissacarídeos. Os biofilmes constituíram um nicho de proteção contra a terapia com antifúngicos, podendo criar uma fonte para infecções refratárias. Além disso, a observação de biofilmes por microscopia de fluorescência e confocal de varredura a laser demonstrou que os biofilmes de *C. albicans* são altamente heterogêneos, sendo compostos de elementos celulares e não celulares. Em ambos os modelos, a resistência antifúngica das células aumentou com o desenvolvimento do biofilme. O biofilme formado sobre o silicone apresentou camadas internas formadas por densos aglomerados de leveduras, das quais partiram prolongamentos miceliais (hifas) que atravessaram um revestimento externo de polissacarídeos. Com a remoção mecânica do biofilme, por meio de enxágüe ou raspagem, ainda permaneceram as células basais leveduriformes aderidas ao material de substrato. Ao contrário da *C. albicans*, *S. cerevisiae* não apresentou capacidade de formar biofilme maduro, embora também tenha aderido às superfícies protéticas. Os resultados obtidos pelos autores permitiram, segundo eles, a identificação de bases para investigações dos mecanismos moleculares da biologia de biofilmes de *C. albicans*, envolvidos na resistência antifúngica e forneceram meios para o desenvolvimento de novas terapias para infecções provocadas por biofilmes.

Em 2001, Chandra et al.²⁰ desenvolveram um modelo reproduzível de biofilme de *C. albicans* em prótese para determinar a susceptibilidade de isolados do microrganismo a quatro agentes antifúngicos (nistatina, anfotericina, fluconazol, clorexidina). Inicialmente foi obtida uma suspensão celular de dois isolados de *C. albicans*, sendo um de paciente com estomatite protética e um de paciente HIV-positivo com candidose orofaríngea. Para a formação do biofilme, uma alíquota da suspensão celular foi aplicada nas superfícies de um corpo-de-prova de resina acrílica. A susceptibilidade da *C. albicans* presente no biofilme foi comparada à de células planctônicas desse microrganismo. Houve 50% de

redução da atividade metabólica do biofilme quando os antifúngicos nistatina, anfotericina, clorexidina e fluconazol foram aplicados nas concentrações de 8 µg/mL, 16 µg/mL, 128 µg/mL e superior a 64 µg/mL, respectivamente. Entretanto, as células planctônicas de *C. albicans* foram susceptíveis aos agentes antifúngicos, com 50% de redução da atividade metabólica para as concentrações de 0,25 µg/mL, 1 µg/mL, 4 µg/mL e 0,5 µg/mL dos antifúngicos nistatina, anfotericina B, clorexidina e fluconazol, respectivamente. Os autores concluíram que, comparadas às células planctônicas, as células de *C. albicans* associadas ao modelo de biofilme em prótese apresentaram resistência aos antifúngicos mais freqüentemente utilizados para o tratamento da estomatite protética.

A hidrofobicidade e aderência ao acrílico de 33 isolados de *Candida glabrata* e 14 de *Candida albicans* foram avaliadas por Luo, Samaranayke⁴⁰, em 2002. Além disso, os autores tentaram confirmar a correlação entre hidrofobicidade e aderência para a *C. glabrata*. Corpos-de-prova de resina acrílica auto-polimerizável, com dimensões de 5 x 5 mm, foram confeccionados, submersos em 0,4 mL de uma suspensão de 10⁷org/mL das cepas avaliadas e incubados por 1 hora a 37°C, com leve agitação de 75 rpm. Após o período de incubação, os corpos-de-prova foram lavados em água destilada, secos, corados e avaliados automaticamente em um sistema de análise de imagens e em microscópio óptico. Para avaliar a hidrofobicidade dos microorganismos, uma alíquota de 5 mL da suspensão previamente obtida, para cada cepa avaliada, foi transferida para 2 tubos, representando os grupos controle e experimental. A hidrofobicidade foi avaliada através da diminuição da densidade óptica dos tubos experimentais, quando comparados aos tubos controle. Testes para avaliar a influência de diferentes temperaturas (37°C e 25°C) na hidrofobicidade e aderência de 6 isolados de *C. glabrata* também foram realizados. Os resultados do estudo demonstraram que a *C. glabrata* tem 247% maior afinidade ao acrílico quando comparada à *C. albicans*. Os autores justificaram esses resultados por meio de duas observações realizadas durante a avaliação das fotomicrografias: as cepas de *C. glabrata* são de proporções bem reduzidas e o fenômeno de co-adesão (adesão de cepas a outras cepas já aderidas) ocorreu em maior intensidade nesta

espécie. Foi observado também que os microorganismos da espécie *C. glabrata* apresentam hidrofobicidade significativamente superior aos da *C. albicans* e os autores encontraram uma correlação positiva entre hidrofobicidade e aderência, para ambas as espécies. Com relação às diferentes temperaturas avaliadas, 4 dos 6 isolados avaliados tiveram sua capacidade de aderência e hidrofobicidade afetadas pela diminuição da temperatura de incubação. Os autores concluíram que os resultados deste estudo oferecem informações que justificam a maior prevalência das duas espécies avaliadas em infecções oportunistas.

No estudo de Goldman et al.²⁶, em 2004, foram avaliados os mecanismos de resistência a fluconazol presentes em cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV-positivos. Os isolados clínicos utilizados foram obtidos de pacientes de nove hospitais, que apresentavam candidose oral ou orofaríngea, e que receberam fluconazol durante 6 a 12 meses. As 20 cepas isoladas foram identificadas e submetidas a testes de susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, ketoconazol e anfotericina B. Em seguida, foi realizada a identificação genética das possíveis mutações ocorridas nas células fúngicas das cepas resistentes, por meio dos testes de sequenciamento do gene *ERG11*, análises por PCR e isolamento do DNA e RNA. Os resultados demonstraram a ocorrência de vários mecanismos de resistência nos isolados clínicos avaliados. Tais alterações incluíram a presença de mutações e super-expressão do gene *ERG11*, responsável pela produção da enzima 14- α - esterol dimetilase, precursora do ergosterol presente na membrana citoplasmática das células fúngicas. Além disso, outras quatro mutações previamente descritas foram identificadas neste estudo (*Y132F*, *K143R*, *E266D* e *V437I*), e 14 novas mutações foram apresentadas. Algumas cepas mostraram a ocorrência de mais de uma mutação. Foi observado também o desenvolvimento de mecanismos de expulsão das drogas do interior celular. Segundo os autores foi demonstrado que os mecanismos de resistência antifúngica previamente descritos na Europa e América do Norte, estiveram presentes nas cepas isoladas. No entanto, algumas alterações também foram encontradas em cepas susceptíveis aos antifúngicos e portanto, existe a

necessidade de estudos complementares que esclareçam a relação entre as alterações genéticas e o desenvolvimento de resistência.

Algumas diferenças e similaridades entre a *C. glabrata* e a *C. albicans* foram descritas por Kaur et al.³², em 2005. De acordo com os autores, a *C. glabrata* é a segunda espécie de *Candida* mais prevalente nos seres humanos, sendo responsável por cerca de 15% dos casos de infecções. Assim como a *C. albicans*, este fungo vive normalmente em relação de comensalismo, podendo ser isolado de mucosas em indivíduos saudáveis. Ambas as espécies possuem um elevado número de adesinas, que parecem ser responsáveis pelas estratégias de adaptação desses fungos ao modo oportunista de sobrevivência. No entanto, as duas espécies são distintas filogeneticamente. Algumas características importantes relativas a virulência da *C. albicans*, como a morfodiferenciação em hifas e a secreção de proteinases, parecem não possuir nenhum paralelo nos fatores de virulência da *C. glabrata*. Além disso, a *C. glabrata* apresenta uma resistência intrínseca a antifúngicos do tipo azol. Este fato tem sido proposto como uma provável explicação da alta prevalência dessa espécie em populações que utilizam o fluconazol com frequência, para o tratamento da candidose.

Perezous et al.⁵⁰, em 2005, realizaram extensa revisão de literatura a respeito da colonização de diferentes espécies de *Candida* em pacientes portadores de próteses dentárias, dando ênfase à infecção pelo vírus HIV. De acordo com os autores, a ocorrência concomitante de candidose oral em pacientes infectados pelo vírus HIV, especialmente os portadores de próteses dentárias, sugere uma correlação entre a infecção por HIV e o declínio nos mecanismos de defesa oral. Os autores destacam também que a presença de biofilme na superfície das próteses dentárias oferece uma reserva protetora aos microorganismos presentes, dentre os quais, um grande número de diferentes espécies de *Candida*, favorecendo o aparecimento de infecções recorrentes. Ainda, os autores relatam o aumento da resistência dos microorganismos aos antifúngicos sistêmicos utilizados no tratamento da candidose oral, especialmente em pacientes imunossuprimidos que fazem tratamento profilático contra infecções fúngicas. Os autores concluem que mais atenção deve ser direcionada ao relacionamento entre os materiais das

bases de próteses e seus efeitos no crescimento e colonização dos fungos, pois é um fator de risco para pacientes imunocomprometidos e a presença de saúde oral é um componente essencial na batalha contra a AIDS.

Andes et al.³, em 2006, avaliaram o impacto do regime medicamentoso de fluconazol no desenvolvimento de resistência antifúngica, in vivo. Para isso, foi utilizado um modelo animal de candidose sistêmica, no qual ratos foram contaminados com cepas de *C. albicans*. Foram avaliados 18 condições de administração do fluconazol, por meio da variação de seis doses e três intervalos de aplicação do medicamento. Após a indução de infecção e tratamento dos animais, foram realizados testes para a determinação da presença de resistência antifúngica. As respostas aos diferentes regimes de aplicação foram avaliadas após 24 e 72 horas do término do tratamento. Os resultados demonstraram que o surgimento de resistência foi favorecido nos regimes medicamentosos com grandes intervalos de aplicação da droga. Uma maior frequência de administração do fluconazol suprimiu o desenvolvimento de cepas resistentes. Foi observado que grandes intervalos de exposição a droga podem permitir a ocorrência de concentrações sistêmicas inferiores ao valor mínimo necessário para a inibição do fungo. Este fato, somado a característica fungistática do fluconazol, poderia estar relacionado ao desenvolvimento de resistência antifúngica. Segundo os autores, a associação entre o regime de aplicação e o desenvolvimento de resistência não é válida para agentes fungicidas, e portanto o comportamento demonstrado no estudo foi devido, principalmente ao mecanismo de inibição provocado pelas drogas do tipo azol.

2.2 PDT

Bertoloni et al.⁶, em 1989, avaliaram a influência de diversos parâmetros na foto-inativação de *C. albicans* sensibilizadas por um derivado de hematoporfirina. O microrganismo foi cultivado aerobicamente a 37°C em meios de Sabourarud Broth e Brain Heart Infusion, os quais foram modificados ou não, a fim de se verificar a influência da composição do meio na fotoinativação celular.

pós a obtenção de suspensões celulares em solução salina, as amostras foram incubadas no escuro com porfirina nas concentrações de 0,1 a 1000 mg/L por 6 ou 30 minutos. Para irradiação, foram utilizadas quatro lâmpadas de tungstênio de 250 W, numa fluência de 6 mW/cm², e a suspensão celular foi mantida em diversas temperaturas, que variaram entre 2 e 42°C. Em seguida, as amostras foram analisadas em microscopia de luz e eletrônica. A ligação entre a porfirina e a célula foi estimada, e também foram avaliadas as atividades enzimáticas de ATPase e citocromo-*c*-oxidase, as quais indicam as propriedades funcionais da membrana citoplasmática e da mitocôndria celular, respectivamente. Foi observado que a redução da viabilidade celular foi dependente do tempo de iluminação, e que apenas concentrações acima de 1 mg/L de porfirina foram efetivas para foto-inativação celular. Uma redução significativa da atividade da enzima citocromo-*c*-oxidase foi verificada após 5 minutos de irradiação, enquanto que a atividade da ATPase apresentou redução após 1 minuto de irradiação e não foi afetada por tempos mais prolongados. Também foi verificado que, quando temperaturas maiores de irradiação foram utilizadas, a inativação celular foi maior e a fluorescência das células foi menor, indicando mobilidade da porfirina ligada à célula. A sobrevivência das amostras cultivadas em Sabouraud foi maior do que a sobrevivência das amostras cultivadas em Brain Heart Infusion. Adicionalmente, a modificação dos meios não alterou a capacidade das células em se ligar à porfirina. A adição de glicose e a ausência de sais e fosfato aumentaram a sobrevivência do microrganismo no meio de cultivo, enquanto que a variação de pH não alterou a viabilidade celular. Quando suspensões sensibilizadas pela porfirina foram lavadas três vezes, foram necessários maiores tempos de irradiação para diminuir a viabilidade do microrganismo, que apresentou maior permeabilidade celular. A microscopia eletrônica demonstrou que as amostras irradiadas por 10 minutos apresentaram células com alterações morfológicas, e que as células irradiadas por tempos maiores apresentaram rompimento da membrana citoplasmática e organelas. Também foi verificado que, quando tempos de 10 e 30 minutos foram utilizados para irradiação das amostras, a fluorescência do DNA diminuiu, indicando dano à membrana nuclear. Os autores concluíram

que a fotossensibilização de *C. albicans* pela porfirina causa um dano inicial na membrana citoplasmática, o qual permite a penetração das moléculas do fotossensibilizador para dentro do citoplasma, danificando componentes vitais para célula.

Os pesquisadores Dobson, Wilson²⁴, em 1992, estudaram a ação do laser He-Ne (7.3 mW/632.8 nm/1.3 mm) associado a vários FSs sobre biofilmes de *Streptococcus Sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Os biofilmes foram cultivados em placas de Petri contendo meios de cultura específicos, e várias substâncias corantes foram adicionadas a esses biofilmes, com o intuito de avaliar a capacidade fotossensibilizadora de cada uma delas, seguido da iluminação com a luz de laser. A análise dos resultados foi realizada por meio do aparecimento de zonas de inibição de crescimento. Para o microrganismo *S. Sanguis* foram utilizados os FSs violeta cristal, azul de metileno, azul de orto-toluidina e azul metálico todos nas concentrações de 0,01% e 0,1%, enquanto para o fotossensibilizante ftalocianina, a concentração utilizada foi de 0,005%. Todos os biofilmes foram irradiados durante 10 ou 60 segundos com a luz do laser de He-Ne. Outro tipo de experimento foi realizado para os quatro microrganismos utilizando a concentração de 0.005% dos seguintes fotossensibilizantes: azul de toluidina, hematoporfirina HCl, azul de metileno, ftalocianina e hematoporfirina éster, porém durante 10 ou 30 segundos de exposição à luz do laser de He-Ne. Pela análise dos resultados foi verificada a redução no número de microrganismos para as quatro espécies após a utilização de azul de orto-toluidina e azul de metileno, ambos na concentração de 0,005% submetidos à irradiação durante 30 segundos (16,5 J/cm²). Os demais FSs foram efetivos apenas para alguns microrganismos. Devido a estes resultados, os autores sugerem que uma fotoinativação pode ser efetiva para a eliminação de bactérias periodontopatogênicas da placa dental.

A susceptibilidade de bactérias cariogênicas à PDT foi verificada por Burns et al.¹³, em 1993. Para isso, foram realizados dois experimentos distintos, nos quais um aparelho de laser hélio-neônio (He-Ne) foi associado ao

FS azul de toluidina. Inicialmente, as bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus* foram individualmente inoculadas em caldo Tryptic Soy e incubadas por 16 horas a 37°C. Em seguida, o FS foi adicionado a estas suspensões celulares, obtendo-se as concentrações finais de 100, 50 e 25 mg/L. Após o período de incubação de 15 minutos, uma alíquota de 1 mL da cada suspensão celular foi transferida para placas de Petri contendo o meio de cultura Tryptic Soy Agar, e diferentes áreas de cada placa foram expostas a luz do laser durante os tempos de 15 a 300 segundos. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C para a análise de zonas de inibição de crescimento microbiológico. O segundo teste foi realizado por meio da transferência de 100 µL de cada suspensão celular de microrganismo para orifícios de uma placa de microtitulação, juntamente com o mesmo volume do FS em varias concentrações, e em seguida a placa foi exposta ao laser. O controle constituiu-se de amostras adicionais que não foram expostas ao laser, amostras que receberam apenas meio de cultura e foram expostas a luz, e amostras que não receberam nem FS nem luz. Os resultados obtidos nos dois experimentos demonstraram que a inativação dos microrganismos ocorreu de forma dose-concentração dependente. No primeiro, foram observadas zonas de inibição nas placas de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *A. viscosus* após 15 segundos de exposição ao laser e o *L. casei* após 45 segundos, quando o azul de toluidina foi utilizado a 100 mg/L. A utilização de concentrações menores do FS necessitou de maiores tempos de iluminação para que fosse conseguida a inativação das quatro bactérias testadas. Da mesma forma, os resultados do segundo experimento demonstraram significativa redução nos valores de ufc/mL de todos os microrganismos testados após a exposição por 60 segundos ao laser (33,6 J/cm²), quando o FS foi utilizado na concentração de 50mg/L. Entretanto, esta concentração do agente mostrou-se tóxica às células microbianas do *S. mutans* e *S. sobrinus*, na ausência de luz. A exposição ao laser sem a presença do FS não afetou significativamente a viabilidade de das bactérias testadas. Com os resultados obtidos, os autores concluíram que a PDT pode ser empregada na odontologia, para a descontaminação de dentina cariada previamente a restauração.

Wilson, Mia⁶⁷, em 1993, avaliaram a inativação de *Candida* spp. após aplicação da PDT. Foram utilizados os FSs ftalocianina dissulfonato de alumínio (FDA) e azul de metileno (MB) associados ao laser de arseneto de gálio e alumínio (Ga-As, 660 nm), cuja potência é de 11mW. Também, foram testados os FSs violeta cristal, azul de toluidina (TB), dihematoporfirina-ester (HpDE) e tionina em associação ao laser de hélio e neônio (He-Ne, 632,8 nm), de potência de 7,3 mW. Inicialmente o microrganismo avaliado foi uma cepa padrão de *C. albicans*. Alíquotas de 50 µL da suspensão diluída 1:100 foram transferidas para uma placa de 96 orifícios. Uma alíquota de mesmo volume de um dos FSs foi então adicionada a cada orifício, obtendo-se concentrações finais de 100, 500, ou 1000 mg/L. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, os orifícios em duplicatas foram expostos à luz de laser durante 120 segundos. Amostras adicionais somente receberam o FS ou foram expostas à luz. Para todas as amostras, 50 µL das diluições seriadas foram plaqueadas em duplicatas em Agar Sabouraud Dextrose. Após 3 dias a 37°C, as colônias foram contadas. Após esta etapa inicial, o FSs mais efetivo foi então selecionado na concentração de 100 mg/L para avaliar a inativação de suspensões mais densas (1:10) de cepas de *C. albicans*, *C. steallatoidea*, *C. tropicalis* e *C. kefyr*. Os dados foram analisados pelo teste-t de Student. Foi verificada que a exposição ao He-Ne reduziu os valores de ufc/mL das amostras sensibilizadas por TB, tionina e violeta cristal a 100 e 500 mg/L, sendo que a maior redução foi obtida com o TB a 100 mg/L. A irradiação com o laser Ga-As promoveu redução significativa dos valores de ufc/mL das amostras sensibilizadas por MB e FDA a 100 e 1000 mg/L. A PDT não foi efetiva na inativação de *C. albicans* quando o HpDE foi utilizado. Os agentes TB, MB e FDA se mostraram tóxicos às células de *C. albicans*, na ausência de luz. Além disso, o TB a 100 mg/L associado ao laser He-Ne também foi efetivo na inativação das demais espécies de *Candida*, no entanto essas se mostraram menos susceptíveis à terapia em relação a *C. albicans*. Os autores concluíram que a PDT foi efetiva na inativação de *Candida* spp. quando uma fonte de luz de laser de baixa potência é associada a vários FSs.

Os princípios básicos de ação da PDT contra o câncer, e alguns fotossensibilizadores, foram revisados por Colussi et al.²¹, em 1996. Segundo os autores, a PDT é um processo fototerápico que ocorre com o auxílio de um agente químico estranho ao organismo. A primeira investigação *in vitro* do efeito fotodinâmico foi realizada em 1900, quando foi observada a ação tóxica da luz em *Paramecium* sensibilizado por acridina laranja na presença de oxigênio. A descoberta das propriedades de um derivado da hematoporfirina, em 1970, despertou um novo interesse clínico para a PDT, que atualmente vem sendo aplicada no tratamento de alguns tipos de neoplasias. Para que a inativação celular ocorra, é necessária a aplicação de um fotossensibilizador e luz. Essa associação, na presença de oxigênio, promove a formação de espécies altamente reativas, como o oxigênio singlete, que pode interagir com moléculas biológicas, levando a morte celular. Um composto químico, para ser aplicado em PDT como fotossensibilizador, deve apresentar propriedades específicas, tais como solubilidade e estabilidade em solução aquosa, habilidade para transporte ativo ou passivo, alto rendimento quântico e biocompatibilidade. Na terapia contra o câncer, os derivados da hematoporfirina são frequentemente utilizados, pois agem simultaneamente como localizadores ópticos e fotossensibilizadores destrutivos com seletividade as células tumorais. Esse tipo de FS já foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para utilização clínica em pacientes. Os lasers são os sistemas ópticos mais indicados para a fotossensibilização, devido a suas propriedades de monocromaticidade, coerência e alta intensidade. Além disso, a luz de laser pode ser aplicada em regiões de difícil acesso, por meio de fibras ópticas. No entanto, o tratamento de lesões superficiais pode ser realizado com sucesso por meio de irradiação com fontes de luz mais simples. Foi concluído que o desenvolvimento de sistemas ópticos com tecnologia simplificada poderão aumentar a aceitação e viabilidade da utilização da PDT entre os clínicos em geral.

Com base em dados científicos publicados na literatura, Wainwright⁶², em 1998, apresentou os fotossensibilizadores disponíveis para a realização da PDT antimicrobiana. De acordo com o autor, a utilização das

porfirinas, que são um tipo de FSs macrocíclicos, é decorrente do seu emprego no tratamento fotodinâmico de câncer. Os derivados de hematoporfirina, são uma combinação de fotossensibilizadores oligoméricos derivados do sangue, e foram os primeiros agentes a receberem aprovação do FDA (Food and Drug Administration) para aplicação clínica da PDT. As porfirinas aniônicas são efetivas para a foto-inativação de bactérias Gram-positivas. Entretanto, as bactérias Gram-negativas, por apresentarem uma parede celular mais complexa, somente são sensibilizadas quando a porfirina aniônica é utilizada em associação a um derivado nonapeptídeo de colistina, que promove abertura de canais na membrana bacteriana. As porfirinas também têm se mostradas efetivas para inativação de vírus *in vitro*, causando aparentemente um dano ao envelope viral. Segundo o autor, as pesquisas realizadas até o momento ainda não indicam a PDT como uma forma de tratamento em substituição as drogas antimicrobianas, mas sim como uma forma de se aprimorar o tratamento de infecções locais devido ao menor custo e à maior agilidade que pode ser obtida.

Carré et al.¹⁵, em 1999, apresentaram um estudo da atividade fotodinâmica de 5 porfirinas sintéticas modificadas por meio de associações de açúcares e meso-carbonos. Todas as soluções foram preparadas a partir de um derivado de hematoporfirina, o qual também teve sua capacidade fotossensibilizadora avaliada. Após a obtenção dos FSs, foram realizados testes para a determinação da capacidade formadora de oxigênio singlete de cada um deles. Suspensões celulares do fungo *Saccharomyces cerevisie* foram colocadas no interior de tubos de ensaio, e foram incubadas com as soluções de porfirina na concentração de 10^{-5} M. A iluminação das amostras foi realizada com uma lâmpada de tungstênio (500 W/m^2). Suspensões controle foram tratadas com os FSs e mantidas no escuro. Adicionalmente, foram realizados testes para a verificação da presença de clonogenicidade e permeabilidade de membrana. Foi observado que as porfirinas mais efetivas na inativação do fungo foram a monoglicosilporfirina e a cis-diglicosilporfirina. As análises de presença de clonogenicidade e fragmentação de DNA evidenciaram que a atividade fotodinâmica desses compostos resultou em dano intracelular nas células fúngicas.

Os autores concluíram que a habilidade dos FSs em atingir o interior da célula esteve diretamente relacionado ao potencial antifúngico das porfirinas avaliadas.

O objetivo do estudo de Jackson et al.³⁰, em 1999, foi avaliar se suspensões de *C. albicans*, em forma de leveduras e hifas, poderiam ser fotoinativadas. A PDT foi realizada por meio da utilização do azul de toluidina em associação com um laser de hélio-neônio (632,8 nm). Três variáveis foram avaliadas: a concentração do FS (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L), a dose de luz (4,2; 10,5; 21 e 42 J) e o tempo de pré-irradiação. Além disso, duas cepas de *C. albicans* com resistência a fluconazol foram submetidas à incubação durante 5 minutos com 25 mg/L de azul de toluidina, e em seguida foram iluminadas com 21 J de luz. A sobrevivência do fungo foi determinada pelo método da contagem de ufc/mL. Os resultados demonstraram que as duas formas de *C. albicans* foram efetivamente inativadas, no entanto, as hifas necessitaram de 12,5 mg/L de FS para que a redução da viabilidade ocorresse, enquanto que, para as leveduras, foi necessária a utilização de 25 mg/L. Segundo os autores, a maior susceptibilidade da forma de hifas foi em consequência das alterações celulares ocorridas durante a conversão da forma de leveduras para as hifas. A quantidade de redução obtida, para as duas formas, foi dependente da dose de luz aplicada, sendo que a aplicação de 42 J promoveu as maiores taxas de inativação. A aplicação de diferentes tempos de pré-irradiação não afetou a efetividade da PDT para a forma de hifa, mas para a forma de levedura, o período ideal de incubação foi de 5 minutos. Como a conversão da forma de levedura para a forma de hifa é responsável pelo desenvolvimento de infecções por *C. albicans*, os autores sugeriram que a eliminação das hifas por meio da PDT pode ser uma possível modalidade de tratamento para a candidose. Além disso, as duas cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol avaliadas foram inativadas pela PDT, no entanto, a redução obtida foi menor em relação aos resultados dos experimentos anteriores.

Machado⁴¹, em 1999, apresentou uma revisão da literatura a respeito dos princípios e potenciais aplicações da PDT. De acordo com o autor, essa modalidade terapêutica tem sido aplicada com sucesso no tratamento de tumores, por meio da inativação celular do tecido neoplásico. Alguns estudos têm

avaliado a possibilidade da sua aplicação em outras condições clínicas, como a inativação de microrganismos patogênicos. A inviabilização celular promovida pela PDT é resultado de uma reação que decorre primariamente da excitação eletrônica do FS pela luz, seguida da formação de espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete). A primeira geração de agentes FS, baseada em misturas de derivados porfirínicos, tem sido efetiva no tratamento de diversos tipos de tumores. Uma outra classe de FSs são os endógenos, baseados na administração por via oral ou mesmo uso tópico do ácido δ -aminolevulínico. Esse ácido é um precursor metabólico da protoporfirina IX, um composto fotodinamicamente ativo. Em vários países, o emprego da PDT como terapia anti-câncer já foi autorizado, como os Estados Unidos, França, Holanda, Canadá e Japão. No entanto, a PDT tem mostrado o seu grande potencial no que concerne a outras moléstias, como a psoríase, arteriosclerose, degeneração macular da retina e remoção de verrugas na laringe. Além disso, também vem sendo obtida a destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos convencionais e descontaminação de sangue. O autor concluiu que as pesquisas na área de PDT estão promovendo um acentuado desenvolvimento dessa nova modalidade terapêutica em outras áreas médicas, tornando-a uma prática segura e viável.

O efeito causado pelo oxigênio singlete nos esteróis presentes na membrana citoplasmática de um fungo foi objeto de estudo de Bocking et al.⁸, em 2000. Inicialmente, suspensões celulares de *Saccharomyces cerevisiae* foram incubadas durante 20 minutos com azul de toluidina na concentração de 3,25 μ M. Em seguida, as suspensões foram iluminadas com uma lâmpada incandescente por períodos variando entre 12 e 60 minutos, plaqueadas em meio de cultura e incubadas durante 3 dias. Após os procedimentos relativos à PDT, os lipídeos presentes nas células fúngicas foram extraídos e os esteróis e seus produtos oxidados foram isolados por meio de análises cromatográficas. Também foram realizadas análises que identificaram os derivados oxidativos do ergosterol formados a partir da aplicação da PDT. Os resultados demonstraram que a aplicação da PDT sobre as células de *S. cerevisiae* ocasionou uma rápida oxidação do ergosterol e um acúmulo de seus derivados na membrana plasmática. O

produto oxidativo predominantemente formado foi denominado de 8-DED. Também foi observado que durante a aplicação da PDT, a célula fúngica mobiliza seletivamente o ergosterol intracelular para repor o nível desse lipídeo na membrana citoplasmática, onde possui funções vitais para a célula. As alterações ocorridas na membrana citoplasmática após a depleção do ergosterol levaram ao aumento da permeabilidade da membrana, que possibilitou a entrada do fotossensibilizador para o interior celular, a ocorrência de danos na função de organelas como a mitocôndria e a inativação celular.

A fotoinativação de microrganismos cutâneos foi objeto de estudo de Zeina et al.⁶⁹, em 2001. Suspensões celulares de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *C. albicans*, foram pipetadas em placas de Petri para a realização dos experimentos. A fotossensibilização das amostras foi realizada com 1 mL do corante azul de metileno, a 100 mg/L. Um projetor de slides foi utilizado como fonte de luz policromática, e a iluminação das amostras foi realizada sob intensidades de luz que variaram de 1,6 a 42 mW/cm², dependendo da distância entre o aparelho de luz e a amostra iluminada. A aplicação da luz foi realizada durante períodos de 10 a 60 minutos, sendo que a cada 10 minutos transcorridos, uma alíquota de 1 mL foi removida da placa de Petri, diluída e plaqueada em meio de cultura específico. A análise de regressão foi utilizada para o cálculo da quantidade de redução de todas as espécies testadas. Além disso, foram obtidos “valores-D”, correspondentes ao tempo mínimo de exposição necessário para promover uma redução na contagem de colônias viáveis. Foi demonstrado que os valores-D obtidos para cada microrganismo foram distintos, sendo que a *C. albicans* mostrou o maior valor em comparação com as bactérias (a iluminação por 660 segundos reduziu apenas 0,09 log ufc/mL). Tal fato foi atribuído ao maior tamanho/volume da célula da *C. albicans*, que é cerca de 25-50 vezes maior do que as células das bactérias testadas. Além disso, a presença da membrana nuclear nos seres eucariontes, como os fungos, pode representar uma barreira adicional a penetração do FS, tornando a *C. albicans* mais resistente a PDT em relação às bactérias.

A inativação de *C. albicans* in vivo foi avaliada no estudo conduzido por Teichert et al.⁵⁹, em 2002. Os autores verificaram a susceptibilidade de *C. albicans* presente em línguas de camundongos, por meio da utilização do azul de metileno como FS. Setenta e cinco camundongos com severa imunodeficiência receberam inoculação durante quatro semanas de uma cepa clínica de *C. albicans* azol-resistente. Previamente a aplicação da PDT, os animais foram anestesiados e foi realizada uma coleta, por meio de *swab*, para a determinação do número de ufc/mL presentes na língua dos animais. Em seguida, os animais foram divididos em grupos de acordo com a concentração de FS aplicado topicamente (250, 275, 300, 350, 400, 450 ou 500 mg/L). Após 10 minutos de incubação, a língua foi exposta à luz de um aparelho de laser diodo (664 nm), durante 684,5 segundos, o que correspondeu a uma dose de 275 J/cm². Ao final da iluminação, foi realizada uma nova coleta da língua e os animais foram sacrificados. Os grupos controle corresponderam a animais não inoculados que foram expostos ao laser e animais inoculados com *C. albicans* que não receberam nenhum tratamento, além de animais inoculados que receberam somente o FS ou somente luz. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os quatro grupos controle. Nos grupos experimentais, foi observada, independente da concentração de FS utilizada, uma diminuição no número de colônias viáveis por mL, após a exposição a luz do laser. Apesar disso, somente as concentrações de 450 e 500 mg/L eliminaram totalmente o microrganismo da cavidade bucal dos animais após a ativação por luz.

Bliss et al.⁷, em 2004, avaliaram a susceptibilidade de cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* a PDT mediada pelo Photofrin[®]. Neste estudo, suspensões celulares das três espécies avaliadas foram transferidas para cavidades de uma placa de 96 orifícios, incubadas por 30 minutos com o FS, em concentrações variando de 0,01 a 10 mg/L, e iluminadas com uma lâmpada de arco (mercúrio) durante 10 minutos a 15 mW/cm² (9 J/cm²). A sobrevivência dos microrganismos foi verificada por meio do teste de viabilidade celular (XTT). Adicionalmente, foram realizadas análises em microscopia de fluorescência e confocal, para a verificação da captação do FS pelas células fúngicas. O controle

foi constituído de suspensões de *Candida* spp. associadas tanto a solução salina como ao Photofrin[®] (suspensões não iluminadas). Os experimentos foram realizados em triplicatas e as comparações da efetividade da PDT em relação a diferentes espécies avaliadas foram feitas com Análise de Variância. Os autores demonstraram que, a *C. albicans* foi a espécie mais susceptível a PDT, seguida da *C. krusei* e *C. glabrata*. Após a irradiação, foram obtidas altas porcentagens de redução da viabilidade celular, mais de 50%, com a utilização de apenas 1 mg/L do Photofrin[®] para a *C. albicans* e *C. krusei*, sendo que o FS a 10 mg/L reduziu em cerca de 80 % a viabilidade dessas duas espécies. Para a *C. glabrata*, no entanto, a utilização de 10 mg/L do Photofrin[®] promoveu baixas porcentagens de redução, cerca de 30%. As imagens obtidas nas análises microscópicas demonstraram fluorescência quando o FS foi efetivamente captado para o interior da célula fúngica. A fluorescência foi detectada na presença de 10 mg/L de Photofrin[®] em todas as espécies, porém, para a *C. glabrata*, a quantidade de fluorescência foi mínima. Os autores concluíram que a captação do FS para o interior da célula está diretamente relacionada com a efetividade da PDT, e que a *C. glabrata* apresenta uma menor susceptibilidade à inativação fotodinâmica, em comparação com as outras espécies avaliadas.

Chabrier-Roselló et al.¹⁷, em 2005, avaliaram parâmetros da ação fotodinâmica mediada pelo Photofrin[®] em *C. albicans*. O cultivo de *C. albicans* foi realizado em tubo germinativo e em biofilmes de 24 horas. As amostras foram incubadas com Photofrin[®] 10 mg/L por 1 e 5 minutos e, em seguida, irradiadas com uma lâmpada de mercúrio de 400 a 700 nm, numa fluência de 15 mW/cm² (0,9 J/cm² por minuto de irradiação). Amostras deixadas no escuro (não irradiadas) foram utilizadas como controle. A atividade metabólica do microrganismo foi avaliada pelo teste XTT. Tubos germinativos de *C. albicans* foram observados em microscopia de fluorescência a fim de se avaliar a captação do Photofrin[®] pela célula. Para avaliar a resposta adaptativa do microrganismo a injúria oxidativa, tubos germinativos foram submetidos repetidamente a tratamentos com H₂O₂ (primeiramente numa concentração subletal de 1 mM e posteriormente em concentrações tóxicas variadas entre 50 e 100 mM), PDT

(Photofrin numa concentração subtóxica de 0,5 mg/L associada à irradiação de 9 J/cm², seguida por novas irradiações com concentrações do fotossensibilizador entre 1 e 10 mg/L) ou associação de ambos os tratamentos. Adicionalmente, amostras de biofilmes submetidas à PDT (10 mg/L de Photofrin, seguida por 30 minutos de incubação e irradiação de 18 J/cm²) foram comparadas com amostras tratadas com anfotericina B 10 mg/L. Todos os procedimentos foram realizados em duplicatas e repetidos três vezes. A análise estatística foi realizada com o teste t de Student. Os resultados obtidos com as amostras de tubo germinativo demonstraram que a PDT utilizando ambos os tempos de incubação de 1 e 5 minutos com o FS promoveu a completa eliminação da atividade metabólica do microrganismo. A microscopia de fluorescência revelou captura uniforme de Photofrin[®] pelos organismos após 5 minutos. Foi verificada resistência na resposta adaptativa do microrganismo tratado repetidamente com H₂O₂. No entanto, não houve resistência quando amostras foram submetidas repetidamente à PDT ou quando essa foi associada ao tratamento com H₂O₂. Com relação às amostras em biofilme, a irradiação das amostras sensibilizadas pelo Photofrin[®] resultou em redução significativa da atividade metabólica de *C. albicans*. Além disso, a diminuição da atividade metabólica do microrganismo submetido à fototerapia foi significativa em relação às amostras tratadas com anfotericina B. Os autores concluíram que a PDT é uma alternativa segura como modalidade terapêutica para a inativação microbiana, pois o desenvolvimento de resistência é aos efeitos fotodinâmicos é improvável.

Deminova, Hamblin²², em 2005, compararam a efetividade da PDT na inativação de suspensões das bactérias *Escherichia coli* (gram-negativo) e *S. aureus* (gram-positivo), e do fungo *C. albicans*, em concentrações celulares de 10⁹-10⁷, 10⁹-10⁷ e 10⁸-10⁶ respectivamente. A foto-inativação foi testada com a utilização dos FSs rose bengal, azul de toluidina e conjugado de poli-lisina, em várias concentrações, associados a uma fonte de luz não coerente, composta de pacotes de fibras intercambiáveis. Inicialmente, as suspensões celulares dos três microrganismos foram obtidas por meio do crescimento *overnight* a 37°C, em meios de cultura específicos, seguido da centrifugação e ressuspensão das células

em solução tamponada. As suspensões celulares, foram incubadas em ambiente escuro com os FSs em diferentes concentrações durante 20 minutos, e em seguida, alíquotas de 200 μ L foram transferidas para uma placa de 96 orifícios, e a iluminação realizada com doses de luz que variaram de 0 a 200 J/cm². As amostras foram iluminadas com e sem a remoção do excesso do agente. Foram obtidas diluições seriadas de cada amostra, seguidas do plaqueamento, incubação overnight a 37°C, e obtenção do número de ufc/mL. Além disso, após a incubação, alíquotas adicionais foram utilizadas com o objetivo de verificar se os FSs testados permanecem somente ligados a membrana celular dos microrganismos ou se a captação para o interior da célula ocorreu. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste t Student. Os resultados demonstraram que a concentração celular das suspensões de microrganismos afetaram a efetividade de todos os FSs testados, ou seja, quanto maior a concentração celular presente na suspensão, uma maior concentração de FS foi requerida. O Conjugado de poli-lisina foi o FS mais efetivo para promover a fotossensibilização das bactérias e do fungo. A susceptibilidade dos três microrganismos variou em decorrência do microrganismo avaliado, sendo que a *C. albicans* mostrou-se mais resistente a PDT em comparação com as bactérias. 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 que sua inativação ocorra. Além disso, a *C. albicans* é um ser eucarionte e a presença da membrana nuclear poderia atuar como uma barreira adicional para a penetração do FS.

Lambrechts et al.³⁶, em 2005, realizaram um estudo para a avaliação dos mecanismos de inativação celular da PDT mediada por uma porfirina catiônica. Foram obtidas suspensões celulares de *C. albicans* nas concentrações de 10⁶ e 10⁷ células/mL. Em seguida, essas suspensões foram incubadas com a porfirina catiônica TriP [4], na concentração de 25 μ M, durante 1, 15 ou 30 minutos. Alíquotas de 1 mL das suspensões foram transferidas para um placa de orifícios e iluminadas com uma lâmpada halógena de intensidade de 30 mW/cm². 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 causado pela 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 em 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/cm² 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 PDT. 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.

O efeito da PDT em células humanas foi objeto de estudo de Lambrechts et al.³⁷, em 2005. Os autores avaliaram a citotoxicidade do tratamento fotodinâmico em fibroblastos humanos, por meio da utilização de parâmetros pré-definidos em estudos anteriores, os quais demonstraram eficiência para a completa inativação de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. As culturas de fibroblastos dérmicos foram obtidas a partir de tecido humano descartado em cirurgias e tratadas com uma porfirina catiônica em 11 diferentes concentrações, que variaram entre 0,05 e 50 µM. Em seguida, as células foram expostas a uma fonte de luz halógena (27J/cm²), lavadas duas vezes e incubadas a 37°C com o meio de cultura específico. A sobrevivência das células foi avaliada por meio do teste de viabilidade colorimétrico MTT, após 0, 6 e 18 horas da exposição a PDT. Esses resultados foram comparados com os valores de MTT obtidos com as mesmas

células humanas, previamente a terapia. Foi demonstrado que, a utilização da mesma concentração de porfirina catiônica que causou inativação de *S. aureus* em estudo anterior, foi suficiente para promover a inativação de 79% dos fibroblastos. No entanto, a inclusão de soro fetal bovino no meio de cultura resultou em um efeito protetor dos fibroblastos à fotoinativação. As concentrações do fotossensibilizador necessárias para a inativação de *C. albicans* e *P. aeruginosa* também resultaram na inativação de fibroblastos. Dessa forma, os autores concluíram que os fibroblastos foram menos susceptíveis a PDT em relação ao *S. aureus*, o que parece sugerir a seletividade desta terapia em fotoinativar a bactéria. Também foi concluído que a utilização da porfirina catiônica como fotossensibilizador para a inativação de *C. albicans* e *C. glabrata* não é indicada devido ao dano substancial ocorrido nos fibroblastos.

O objetivo do estudo de Paulino et al.⁴⁸, em 2005, foi avaliar o efeito da PDT sobre cepas de *S. mutans* e fibroblastos, utilizando diferentes concentrações do FS rose bengal (0-50 μL), associando um fotopolimerizador (HHP) com diferentes tempos de exposição de luz (0-40 s). Segundo os autores, o HHP apresentava as seguintes características: 350-500 mJ/cm^2 e 400-500 nm. Após a realização dos procedimentos relativos ao cultivo para obtenção do crescimento tanto do *S. mutans* como dos fibroblastos, foram, então, verificados os efeitos citotóxicos da PDT sobre estas células na presença e ausência de luz. Os resultados microbiológicos foram obtidos pela contagem das colônias (ufc/mL). A viabilidade celular dos fibroblastos foi avaliada em câmara de Neubauer pelo teste de exclusão *Trypan Blue*. Pelos resultados foi observado que a aplicação isolada da luz não promoveu efeitos tóxicos, mas o FS demonstrou toxicidade para as células testadas em concentrações acima de 2,5 μM . Sob a exposição de luz e concentrações do fotossensibilizante acima de 0,5 μM houve completa eliminação de *S. mutans*, e essa mesma condição experimental não ocasionou qualquer efeito citotóxico sobre os fibroblastos. Dessa forma, os autores afirmaram que a fotoinativação do FS Rose bengal pelo uso de HHP inativou a bactéria selecionada para este estudo sem afetar a viabilidade de fibroblastos.

O estudo de Zanin et al.⁶⁸, em 2005, teve por objetivo avaliar o efeito da associação do azul de orto-toluidina – TBO (100 mg/L) a uma luz LED vermelha (620-660 nm) ou a um laser de He-Ne (632,8 nm) sobre biofilmes de *S. mutans* crescidos em um fermentador de espessura e fluxo contínuos (CDFF). A utilização do CDFF possibilitou a simulação da formação da película adquirida e o crescimento dos biofilmes, a partir de culturas simples de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita (HA), em local constantemente banhado por saliva artificial. Os biofilmes foram crescidos sob suplementação de 2% de sacarose. Na aplicação da PDT, os discos de HA contendo os biofilmes foram removidos do CDFF após 3, 7 e 10 dias, e 25 µL de TBO foi adicionado em cada biofilme e deixado no escuro durante 5 min. Após este período, os biofilmes foram expostos por 5, 15 e 30 minutos ao laser He-Ne ou à luz do LED, sendo a mesma potência de 32 mW utilizada por ambos aparelhos, e a dose de energia para os diferentes tempos de irradiação correspondeu a 49, 147 e 294 J/cm², respectivamente. Os resultados deste estudo demonstraram redução significativa nas contagens das bactérias presentes em biofilmes de *S. mutans* após a realização da PDT. Não foram observadas diferenças significativas no efeito antimicrobiano promovido quando o laser de He-Ne ou a luz LED foram utilizados. Em ambos os casos, o FS utilizado foi o TBO na concentração de 100 mg/L, e, tanto a sensibilização dos biofilmes na ausência da luz, como a irradiação dos biofilmes na ausência do corante, não demonstraram efeito antimicrobiano sobre os biofilmes testados. Além disso, a microscopia confocal demonstrou que a inativação das bactérias promovida pela PDT ocorreu predominantemente nas camadas externas dos biofilmes e que os biofilmes mais velhos foram menos susceptíveis à essa terapia. Outro ponto importante a se ressaltar é que a luz LED vermelha apresentou efeito antimicrobiano semelhante ao obtido pelo laser de He-Ne. Assim, considerando o surgimento crescente de bactérias resistentes aos antibióticos, a PDT surge como uma terapia antimicrobiana alternativa para o tratamento e/ou prevenção de doenças como cárie dental.

Alexiades-Armenakas², em 2006, avaliaram, por meio de uma revisão de literatura, a aplicabilidade da PDT no tratamento de lesões

dermatológicas superficiais. Segundo o autor, os primeiros FSs utilizados foram os derivados da hematoporfirina. Em associação, fontes de luz como lâmpadas halógenas, luzes não coerentes e lâmpadas de amplo espectro de emissão luminosa, foram empregadas. A escolha do comprimento de onda emitido pela fonte de luz, deve levar em consideração o espectro de absorção do FS utilizado. No caso das porfirinas, a luz azul é a melhor absorvida, pois apresenta um pico de absorção por volta dos 400nm. No entanto, fontes de luz com emissão vermelha também são utilizadas, embora não possuam alto poder de absorção pelas porfirinas, são profundamente absorvidas pelo tecido. Devido ao alto poder de penetração tecidual, a utilização de luzes vermelhas provocam o surgimento de efeitos colaterais nos tecidos próximos a lesão tratada. Dessa forma, estudos recentes têm sido conduzidos com o objetivo de tornar a PDT uma modalidade terapêutica segura para o tratamento de infecções superficiais, minimizando o surgimento de desconfortos, eritema e sangramentos após sua aplicação. A utilização da luz azul possui uma penetração inferior no tecido biológico, e portanto, a chance de ocasionar danos aos tecidos subjacentes é menor. Além disso, os lasers pulsados de corantes têm sido avaliados para o tratamento de enfermidades como a queratose actínica, queilite actínica, hiperplasia sebácea, líquen esclerótico e mais recentemente para o tratamento de acne. O autor concluiu que o desenvolvimento de novas fontes de luz e FSs tem promovido a aplicação da PDT em dermatologia, com menores riscos de efeitos colaterais e com alta eficiência no tratamento de alguns tipos de lesões.

O objetivo do estudo de Souza et al.⁵⁸, em 2006, foi avaliar a viabilidade de diferentes espécies de *Candida* após a fotossensibilização com azul de metileno (100mg/L), e iluminação com um laser diodo (685 nm; 28 J/cm²). Suspensões celulares de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, contendo 10⁶ células por mL, foram submetidas as seguintes condições experimentais: aplicação de FS seguida de iluminação com laser, somente aplicação de FS, somente iluminação com laser, e aplicação de nenhum tratamento (controle). Para avaliação da viabilidade celular após a PDT, os autores utilizaram o método da contagem das ufc/mL. Para isso, após a execução dos

experimentos, diluições seriadas de cada amostra (10^{-2} e 10^{-3}), foram plaqueadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, e as placas foram incubadas por 48 horas. Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e teste de Tukey. Foi demonstrado que a iluminação com laser, na presença de Azul de metileno, reduziu o número de ufc/mL em 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis*, 91,6% para a *C. krusei* e 82,3% para a *C. tropicalis*. Também foi observado que a utilização do FS ou da luz, isoladamente, não causaram reduções significativas no número de ufc/mL das amostras, exceto para a *C. tropicalis*. Os autores concluíram que a fotoativação do azul de metileno pela luz vermelha do laser promoveu um efeito fungicida sobre as células de todas as espécies avaliadas.

Jori et al.³¹ publicaram em 2006, uma revisão de literatura baseada nos princípios de ação e aplicações da PDT na inativação microbiológica. Segundo os autores, apesar da PDT ser atualmente empregada no tratamento de neoplasias, o primeiro relato da utilização desta terapia foi na área microbiológica, em 1900. No entanto, o potencial da PDT no tratamento de infecções ficou por muitos anos, inexplorado. Atualmente, com a emergência de doenças infecciosas resistentes aos tratamentos convencionais, muitos estudos têm buscado o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a inativação de microrganismos patogênicos. A PDT 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 PDT 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 singlete para que a inativação celular ocorra, em comparação com bactérias. Particularmente no caso da candidose, a aplicação tópica de FS associada a luz para a inativação microbiológica parece oferecer um importante avanço para o tratamento de pacientes imunodebilitados, como os HIV positivos. A utilização de porfirinas tem se mostrado efetiva para a

fotossensibilização da *C. albicans*, e promove a inativação do fungo após a iluminação com luz visível. A PDT também representa uma modalidade terapêutica potencialmente aplicável para o tratamento de doenças periodontais e cáries. No entanto, são encontrados poucos estudos in vivo que utilizam esse método terapêutico para o tratamento de infecções e assim, a aplicação clínica da PDT antimicrobiana ainda está em desenvolvimento.

3 Proposição

Com base nas informações apresentadas nos capítulos anteriores, este estudo teve como objetivo avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica na inativação de *C. albicans* e *C. glabrata*, ATCC e resistente a fluconazol, em função de:

- ◆ cinco concentrações do agente fotossensibilizador Photogem[®];
- ◆ quatro doses de luz de LED no comprimento de onda azul.

4 Material e método

4.1 Material

Para a realização da fase experimental desta pesquisa foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentos e aparelhos:

4.1.1 Materiais de consumo

- 1- Cultura de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA
Número (ATCC number): 2327
- 2- Cultura de *Candida glabrata* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA
Número (ATCC number): 2001
- 3- Três culturas de isolados clínicos de *Candida albicans*, com resistência a fluconazol, provenientes do Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brasil
Identificações: 10 R, 15 R e 23 R
- 4- Três culturas de isolados clínicos de *Candida glabrata*, com resistência a fluconazol, provenientes do Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brasil
Identificações: 50 R, 63 R e 87 R
- 5- Água destilada
- 6- Meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), produzido pela Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Lote nº 100,431
- 7- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar, produzido pela Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland 21220, EUA
Lote nº 100,717C

- 8- Cloranfenicol levógiro Quemacetina[®], produzido por Laboratórios Pfizer Ltda, Jandira, São Paulo, Brasil
Lote n° BC 0112
- 9- Sódio cloreto (P. A. A. C. S.), produzido por CAQ - Casa da Química Indústria e Comércio Limitada
- 10- Pontas descartáveis para micropipeta
- 11- Micotubos tipo Eppendorfs Graduado, produzido por Homo Polymer-Boie Proof.
- 12- Sal sódico derivado de hematoporfirina Photogem[®], produzido no Instituto de Química Fina de Moscou, Moscou, Rússia
- 13- Placa de orifícios Costar[®] com 96 cavidades de fundo redondo estéril, produzida por Corning Incorporated, New York, EUA

4.1.2 Instrumentos

- 1- Placas de Petri 100 X 15 mm, fabricada por Petriq
- 2- Tubos de ensaio 100 X 10 mm, fabricados por Pyrex
- 3- Pipetador para acoplamento de pipetas de vidro, fabricado pela Pipump.
- 4- Béquer graduado, fabricado pela Vidrolabor
- 5- Erlenmeyer graduado, fabricado pela Vidrolabor
- 6- Micropipeta de 0,5-10 µL, fabricada pela Boeco, Alemanha
- 7- Micropipeta de 20-200 µL, fabricada pela Boeco, Alemanha
- 8- Micropipeta de 100-1000 µL, fabricada pela Boeco, Alemanha
- 9- Bico de Bunsen, fabricado por J.Prolab
- 10- Alça metálica para inoculação de microrganismos
- 11- Alça de Drigalsky, fabricada pela Vidrolabor

4.1.3 Equipamentos

- 1- Balança de precisão, fabricada por Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, São Paulo, Brasil
Modelo: BG 400
Nº 016450
- 2- Centrífuga Revan, fabricada por Revan do Brasil
Modelo: Ciclo CI
- 3- Contador de colônias CP 600 Plus, fabricado pela Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo: CP-600
Nr-série: 919
- 4- Autoclave vertical, fabricada pela Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo : AV 60
Nº 6614
- 5- Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil
Modelo: MA 033
Série: 9819
- 6- Agitador de tubos, fabricado por Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil
Modelo: AP 56
Série: 9803
- 7- Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil
Modelo – MA 0324
Série – 9819011

- 8- Câmara de fluxo laminar vertical, fabricada pela Pachane Indústria e Comércio Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil
Modelo – PA 115
Número – 12898
- 9- Mesa difusora de iluminação com LEDs azuis (455 nm) desenvolvido no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos (IFSC), titulado “*Bio Table*”.

4.2 Método

4.2.1 Preparo dos materiais microbiológicos

O meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) foi preparado para a reativação das espécies de *Candida* utilizadas neste estudo. Esse meio de cultura constitui-se de um caldo nutriente que propicia o crescimento de vários tipos de microrganismos. A manipulação e a esterilização desse meio de cultura foram realizadas segundo as recomendações do fabricante. Para o preparo do meio, foi utilizada uma proporção de 30 g de pó do meio de cultura para 1 L de água destilada. O pó proporcionado foi colocado em um béquer, e a água foi adicionada. A seguir, o béquer foi aquecido em banho-maria para a dissolução completa do meio de cultura na água destilada. Após a dissolução, a solução resultante foi distribuída em tubos de ensaio. Uma alíquota de 5 mL do meio de cultura preparado foi pipetada e dispensada em cada um dos tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram devidamente identificados e datados. A seguir, esses tubos contendo o meio de cultura foram tampados com algodão e levados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após esse procedimento, os tubos de ensaio tampados foram deixados ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, foram armazenados em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

A solução salina utilizada nas diluições seriadas realizadas neste estudo foi preparada pela diluição completa de 8,5 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada. A dissolução do sal na água destilada foi realizada em um béquer, pela manipulação de uma haste de vidro. Após a dissolução, a solução salina resultante, na concentração de 0,15 mol, foi distribuída em tubos de ensaio. Para a distribuição, 900 µL da solução salina foram pipetados e transferidos para cada um dos tubos de ensaio. A seguir, esses tubos foram tampados com algodão e levados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos de ensaio foram deixados ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, os tubos de ensaio contendo solução salina

foram armazenados em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

O meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) contendo 5 µg/mL de cloranfenicol foi utilizado nas sementeiras das placas de Petri. Esse meio de cultura apresenta-se sólido após o preparo, sendo seletivo para a cultura de fungos. Para o preparo do meio de cultura, foi utilizada a proporção recomendada pelo fabricante: 65 g de pó misturada a 0,005 g de cloranfenicol para 1 L de água destilada. Para o preparo, o meio de cultura proporcionado foi individualmente colocado em um béquer e misturado com a água destilada. A seguir, o béquer foi levado ao banho-maria até que ocorresse a dissolução completa do meio de cultura. Uma alíquota de 20 mililitros da solução resultante foi pipetada e dispensada em tubos de ensaio, ainda na fase líquida (temperatura superior à temperatura de solidificação). A seguir, os tubos de ensaio foram devidamente identificados, datados, tampados com algodão e levados em autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os meios de cultura, ainda na fase líquida, foram vertidos em placas de Petri estéreis. Para a realização desse procedimento, os tubos de ensaio contendo os meios de cultura foram levados à câmara de fluxo laminar.

Para receber os tubos de ensaio, a câmara de fluxo laminar vertical foi preparada para permitir um ambiente asséptico para a manipulação dos tubos de ensaio e das placas de Petri. Para isso, a porta de vidro da câmara de fluxo laminar foi fechada e a luz ultravioleta foi acionada por 10 minutos. Após esse período, a luz ultravioleta foi desligada e o ventilador da câmara de fluxo laminar foi acionado para aclimatização do ambiente. A porta de vidro da câmara de fluxo laminar foi ligeiramente aberta para que os tubos de ensaio e as placas de Petri estéreis fossem colocados no ambiente asséptico criado. É importante ressaltar que a esterilização das placas de Petri foi realizada previamente aos procedimentos executados na câmara de fluxo laminar. Para a esterilização das placas de Petri, um papel filtro cortado em círculo foi interposto entre as partes superior e inferior de cada uma delas. A parte superior e a inferior das placas de

Petri foram encaixadas e todo o conjunto foi embalado em papel comum. As placas embaladas foram esterilizadas em estufa a 175°C por 2 horas.

Após a esterilização, as placas de Petri embaladas foram deixadas ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Após esse procedimento, as placas de Petri foram levadas à câmara de fluxo laminar e retiradas das embalagens de papel comum. Após a colocação das placas de Petri e dos tubos de ensaio na câmara de fluxo laminar, foram repetidos os procedimentos previamente descritos para que a manipulação do meio de cultura fosse realizada de forma asséptica. Após a aclimatização, o ventilador permaneceu ligado durante todo o procedimento de colocação do meio de cultura nas placas. Os tubos de ensaio foram individualmente vertidos nas placas de Petri. Cada tubo de ensaio contendo 20 mL do meio foi aberto e o conteúdo do mesmo foi vertido na parte inferior da placa de Petri. As placas de Petri foram individualmente fechadas e mantidas na câmara de fluxo laminar até que fosse observada a solidificação do meio de cultura. Após a solidificação dos meios de cultura, o ventilador foi desligado, e a câmara de fluxo laminar foi aberta. Todas as placas de Petri foram devidamente identificadas, datadas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Estes procedimentos foram realizados com o objetivo de verificar a esterilização das placas de Petri e dos meios de cultura. Após a incubação, foram descartadas deste estudo todas as placas que apresentaram quaisquer indícios de crescimento microbiano. A seguir, a parte inferior de cada placa de Petri foi externamente dividida em quadrantes. Esses quadrantes foram traçados com caneta para retroprojetor para facilitar posteriormente os procedimentos de semeadura dos microrganismos (diluição seriada por quadrante). Finalmente, as placas de Petri foram armazenadas em geladeira a 5°C para serem utilizadas nos procedimentos de semeadura dos microrganismos.

4.2.2 Aplicação da Terapia Fotodinâmica

Preparo do agente fotossensibilizador e da fonte de luz

A fotossensibilização das amostras de *C. albicans* e *C. glabrata* foi realizada com a utilização do agente fotossensibilizador Photogem[®] (Figura 1). Esse medicamento é produzido a partir da hematoporfirina, uma substância presente no sangue de animais e de humanos. O Photogem[®] é fabricado na Rússia – Moscou, aprovado pelo *Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation* sob autorização 42-3199-98. Além disso, a utilização desse agente é aprovada para uso em humanos pelo Comitê Estatal de Farmacologia da Federação Russa e também pela ANVISA (data 08/04/2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4). Apresenta-se na forma de um pó violeta escuro, comercializado em frascos esterilizados contendo 200 mg do pó, sendo que sua distribuição é realizada somente sob prescrição para instituições especializadas. Pode ser armazenado por até 2 anos em um local protegido da luz e em temperatura inferior a 5°C. Em solução, o Photogem[®] apresenta uma banda característica de absorção com um pico máximo em 369 nm, e outras quatro bandas menores (Figura 2).



FIGURA 1 – Embalagem comercial do fotossensibilizador Photogem[®].

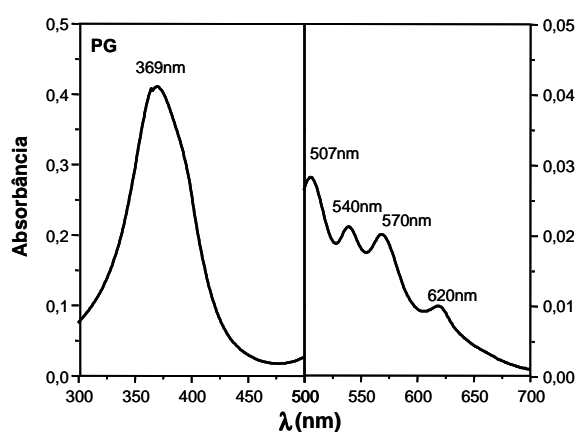


FIGURA 2 – Espectro de absorção óptica do Photogem[®].

Para a realização deste experimento, alíquotas de 5 mg do FS foram fornecidas pelo Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos – USP (IFSC), e armazenadas em microtubos de plástico envolvidos em papel alumínio para proteção da luz à temperatura de 4°C. Previamente a sua utilização, foi realizado o preparo da solução deste medicamento, por meio da dissolução do pó em solução salina estéril.

Inicialmente, uma alíquota de 1 mL de solução salina estéril foi pipetada no interior de um microtubo contendo 5 mg de pó de Photogem[®]. O microtubo foi colocado em agitador de tubos e agitado vigorosamente por 1 minuto para a completa dissolução do pó. Em seguida, a solução resultante foi removida do microtubo e transferida para um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução salina estéril, e o tubo foi agitado por um minuto para homogeneizar a solução fotossensibilizadora. Dessa forma, cada alíquota de 5 mg de pó foi dissolvida em 5 mL de solução salina estéril, obtendo-se uma solução estoque de fotossensibilizador na concentração de 1000 mg/L. Essa solução foi armazenada em tubos de ensaio envolvidos em papel alumínio, identificados e datados, à temperatura de 4°C (Figura 3). É importante ressaltar que o Photogem[®] é uma substância fotossensível, isto é, pode sofrer degradação de seus componentes quando exposto a luz. Assim, a manipulação deste medicamento durante o preparo da solução estoque e posteriormente na fotossensibilização dos microrganismos, foi realizada em ambiente escuro.

A capacidade fotossensibilizadora do Photogem[®] foi avaliada por meio da utilização de cinco concentrações desse agente: 2,5, 5, 10, 25 e 50 mg/L. Para isso, alíquotas da solução estoque de Photogem[®] (1000 mg/L) foram diluídas em solução salina estéril, até a obtenção de cinco diluições do FS: 5, 10, 20, 50 e 100 mg/L. Essas diluições correspondem ao dobro das concentrações avaliadas neste estudo, já que, quando estas soluções foram adicionadas às suspensões de *Candida* spp., a concentração do Photogem[®] foi reduzida pela metade, atingindo-se as concentrações finais de 2,5, 5, 10, 25 e 50 mg/L. O preparo das cinco diluições da solução estoque de Photogem[®] foi sempre realizado instantes antes

do seu uso, seguindo uma proporção fixa de solução salina/solução estoque. Para isso, foram realizados cálculos de regra de três simples que possibilitaram a obtenção das seguintes proporções: solução estoque a 0,5 % para a concentração de 5,0 mg/L, solução estoque a 1,0 % para a concentração de 10 mg/L, solução estoque a 2,0 % para a concentração de 20 mg/L, solução estoque a 5,0 % para a concentração de 50 mg/L e solução estoque a 10,0 % para a concentração de 100 mg/L (Apêndice 1). As soluções foram preparadas em microtubos envolvidos em papel alumínio (Figura 3) e agitadas vigorosamente por 1 minuto para sua completa homogeneização.



FIGURA 3 – Tubo de ensaio contendo a solução estoque de Photogem[®] (1000 mg/L), juntamente com as cinco diluições preparadas nos microtubos.

A fonte de luz empregada na iluminação das amostras deste estudo foi um aparelho constituído de LEDs azuis, idealizado e desenvolvido no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP), campus de São Carlos, intitulado de *Bio Table* (Figura 4). Foram utilizadas lâmpadas do tipo LED (LXHL-PR09, Luxeon[®] III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, Califórnia, USA) distribuídas uniformemente no interior do sistema óptico. Sobre as lâmpadas, foi acoplada uma placa de vidro difusora, para permitir a emissão de luz uniforme em toda a superfície de iluminação do aparelho. A *Bio Table* possui potência de saída constante de 12,5 mW/cm², e a luz emitida se encontra numa estreita faixa do

espectro fotomagnético, predominantemente em 455 nm, na qual o FS empregado apresenta alta capacidade de absorção de luz. O conhecimento da potência de saída do aparelho utilizado é um fator importante a ser considerado, pois este valor, juntamente com o tempo de iluminação, determina a quantidade de energia aplicada na amostra irradiada. Essa quantidade de energia é denominada fluência ou dose de luz, e é expressa pela energia por área (J/cm^2). A fórmula empregada para o cálculo da dose é a seguinte:

$$\text{Dose}(\text{J}/\text{cm}^2) = \text{Potência}(\text{W}/\text{cm}^2) \times \text{Tempo}(\text{s}).$$



FIGURA 4 – *Bio Table* - Aparelho constituído de LEDs utilizado para iluminação das amostras.

Para a avaliação da efetividade da PDT na inativação de *C. albicans* e *C. glabrata*, foram testadas quatro doses de luz: $37,5 \text{ J}/\text{cm}^2$, $25,5 \text{ J}/\text{cm}^2$, $18,0 \text{ J}/\text{cm}^2$ e $10,5 \text{ J}/\text{cm}^2$. Como a fonte de luz utilizada possuiu potência constante, a variação da dose de luz foi realizada pela variação do tempo de exposição das amostras microbiológicas à luz azul da *Bio Table*. Assim os tempos de iluminação utilizados foram 50, 34, 24 e 14 minutos, respectivamente. Os cálculos realizados para a obtenção dos tempos de iluminação estão descritos no Apêndice 2.

Microrganismos utilizados e condições experimentais avaliadas

Os microrganismos selecionados para execução deste estudo foram oito diferentes cepas de *Candida*, dentre elas, uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 2327) e uma de *C. glabrata* (ATCC 2001). As seis restantes foram cepas de origem clínica, isoladas de pacientes com resistência a fluconazol, sendo três da espécie *C. albicans* (10 R, 15 R e 23 R) e três de *C. glabrata* (50 R, 63 R e 87 R). As culturas dos oito microrganismos testados neste estudo foram armazenadas em meio de cultura TSB acrescido de glicerol no interior de microtubos a - 70°C, até o momento de sua utilização. É importante salientar que a utilização de cepas de origem clínica foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Apêndice 3).

Para a realização dos experimentos, os microrganismos foram individualmente inoculados em meio de cultura e incubados em estufa bacteriológica para sua reativação. Cada cultura de *Candida* foi inicialmente descongelada e, a seguir, uma alíquota de 10 µL foi retirada do microtubo e inoculada em 5 mL de TSB contido em um tubo de ensaio, o qual foi incubado a 37°C durante 16 horas (período denominado *overnight*). Após a incubação, o tubo de ensaio foi colocado em agitador de tubos e agitado vigorosamente por 30 segundos, para se verificar o crescimento microbiológico por meio da turvação do meio de cultura (Figura 5). Em seguida, o tubo foi centrifugado a 2000 rpm, durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células (sedimentado) foram ressuspensas em 5 ml de água destilada estéril. O tubo foi agitado novamente por 30 segundos e os mesmos passos de centrifugação foram repetidos. As células foram, então, ressuspensas em solução salina estéril até que a concentração celular no interior do tubo de ensaio fosse equivalente a 10⁶ células/mL (escala McFarland). Para isso, alíquotas de 100 µL de solução salina foram transferidas gradativamente para o interior do tubo de ensaio que continha as células de *Candida* sedimentadas, até que o grau de turvação no interior do tubo fosse visualmente semelhante com o padrão da escala. Dessa forma, foram obtidas suspensões celulares de todos os microrganismos avaliados, em solução salina, padronizadas em uma mesma concentração celular (10⁶ células/mL).



FIGURA 5 - Tubos de ensaio com turvação após o período de incubação.

A susceptibilidade das oito cepas de *Candida* a PDT, foi avaliada por meio da exposição das suspensões celulares a cinco concentrações do agente Photogem[®] (2,5, 5, 10, 25 e 50 mg/L) e quatro doses de luz (37,5, 25,5, 18,0 e 10,5 J/cm²) no comprimento de onda azul (predominantemente em 455 nm). Assim, para cada microrganismo, foram testadas 20 condições experimentais, obtidas a partir do cruzamento das quatro doses de luz com as cinco concentrações de Photogem[®] avaliadas, denominadas de P+L+. Adicionalmente, o efeito da aplicação isolada de cada concentração do Photogem[®] (P+L-) e de cada dose de luz (P-L+) também foi avaliado, sobre as suspensões celulares, o que totalizou 29 condições experimentais. As amostras referentes ao grupo controle não foram fotossensibilizadas com Photogem[®] e não receberam iluminação com o LED (P-L-). Dessa forma, foram obtidas 30 condições experimentais que avaliaram a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans* e *C. glabrata*. Essas condições estão descritas na Tabela A1 do Apêndice 4.

A seguir, estão descritas as etapas realizadas para a avaliação da efetividade da PDT na inativação das cepas de *Candida*. As condições experimentais avaliadas estão descritas em forma de tópicos e foram divididas em quatro grupos com a finalidade de simplificar a descrição das etapas. Todas as etapas foram realizadas para as oito cepas de *Candida* avaliadas.

◆ *P+L+*

As amostras incluídas nesta condição experimental foram fotossensibilizadas com o Photogem[®] em cinco concentrações, e, em seguida, foram expostas à iluminação nas quatro doses de luz propostas.

Para cada cepa de *Candida* avaliada, alíquotas de 100 µL da suspensão de celular, em solução salina, foram transferidas individualmente para 15 orifícios de uma placa de 96 cavidades. Em seguida, cada uma dessas 15 amostras foi fotossensibilizada com o mesmo volume de Photogem[®] (100 µL), em uma das concentrações avaliadas (n = 3) (Figura 6). A placa de orifícios contendo as suspensões resultantes foi deixada em repouso no escuro durante 30 minutos, para promover a fotossensibilização das amostras (tempo de pré-irradiação). Após esse período, a placa foi colocada sobre o vidro difusor da *Bio Table*. O aparelho foi então, acionado e todos os orifícios da placa foram iluminados uniforme e simultaneamente. (Figura 7).

O procedimento descrito anteriormente foi realizado para a avaliação das quatro doses de luz propostas neste estudo (37,5, 25,5, 18,0 e 10,5 J/cm²). Dessa forma, quatro placas de orifícios com 15 amostras cada uma, foram utilizadas, e cada uma delas foi exposta ao comprimento de onda azul, nas doses de luz obtidas durante 50, 34, 24 ou 14 minutos de iluminação.



FIGURA 6 – Placa de orifícios com 15 amostras de suspensão celular associadas ao Photogem[®] em cinco diferentes concentrações.



FIGURA 7 – Placa de orifícios posicionada sobre a superfície de iluminação da *Bio Table* acionada.

◆ *P+L*

Para que fosse avaliada a existência de efeitos tóxicos após a aplicação do Photogem[®] sobre as suspensões celulares, foram incluídas neste estudo amostras sensibilizadas com o medicamento que não foram iluminadas com o LED. Para cada cepa de *Candida* avaliada, alíquotas de 100 μ L da suspensão de celular foram pipetadas individualmente em 15 orifícios de uma placa de 96 cavidades. Em seguida, o mesmo volume de Photogem[®] foi transferido para cada um desses orifícios. Para cada concentração de

fotossensibilizante avaliada, foram utilizados três orifícios. A placa foi deixada em repouso durante 30 minutos no escuro, e em seguida, foi deixada sobre a bancada durante 50, 34, 24 ou 14 minutos (tempo equivalente às doses de luz aplicadas nas amostras P+L+).

◆ *P⁻L⁺*

Da mesma forma que na condição anterior, foi avaliado se a aplicação de luz, na ausência do fotossensibilizante, poderia apresentar efeitos tóxicos para os microrganismos avaliados. Assim, três alíquotas de 100 µL da suspensão de celular de cada microrganismo avaliado foram pipetadas individualmente em três orifícios de uma placa de 96 cavidades. A seguir, o mesmo volume de solução salina estéril foi transferido para cada um dos orifícios. A placa foi deixada em repouso no escuro durante 30 minutos, e em seguida, foi colocada sobre a *Bio Table* para ser iluminada em uma das doses avaliadas. Esse procedimento foi realizado para as quatro doses de luz propostas (37,5, 25,5, 18,0 e 10,5 J/cm²).

◆ *P⁻L⁻*

Nesta condição experimental, foram incluídas amostras de cada microrganismo avaliado, que não foram submetidas aos procedimentos de PDT. Os resultados obtidos com as culturas dessas amostras foram utilizados como parâmetro para comparação com aqueles obtidos com as culturas das amostras submetidas à fotossensibilização e iluminação com o LED. Alíquotas de 100 µL das suspensões celulares de cada microrganismo avaliado foram pipetadas individualmente em três orifícios de uma placa de 96 cavidades. A seguir, o mesmo volume de solução salina estéril foi transferido para cada um dos orifícios. A placa foi deixada em repouso durante 30 minutos no escuro, e em seguida, foi deixada sobre a bancada por mais 50 minutos (tempo equivalente à máxima dose de luz aplicada nas amostras P+L+).

Para todas as condições avaliadas, foram realizadas diluições seriadas a partir das amostras contidas nos orifícios das placas. Para isso, uma alíquota de 100 µL foi removida de cada amostra e transferida para um tubo de ensaio contendo 900 µL de solução salina estéril. Este tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos e uma nova alíquota de 100 µL foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 900 µL de solução salina. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra e, desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram obtidas⁵⁸ (Figura 8).

As três diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram utilizadas para a realização da semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura SDA com 5 µg/mL de cloranfenicol. Para este procedimento, os tubos de ensaio contendo as diluições seriadas foram individualmente agitados em agitador de tubos de ensaio. A seguir, alíquotas de 25 µL de cada diluição seriada foram pipetadas em triplicata. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes de três placas de Petri contendo o meio de cultura. Adicionalmente, alíquotas de 25 µL foram removidas das cavidades das placas de orifícios e transferidas diretamente para um quadrante da placa de Petri, sem a realização de diluição (Figura 9). Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. Os procedimentos de semeadura foram realizados em triplicatas.

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri referentes às amostras das condições experimentais avaliadas foram submetidas à contagem de colônias. Para este procedimento, cada placa de Petri foi posicionada em um contador de colônias digital. A quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados.



FIGURA 8 – Diluições seriadas referentes a uma das cavidades das placas de orifícios.

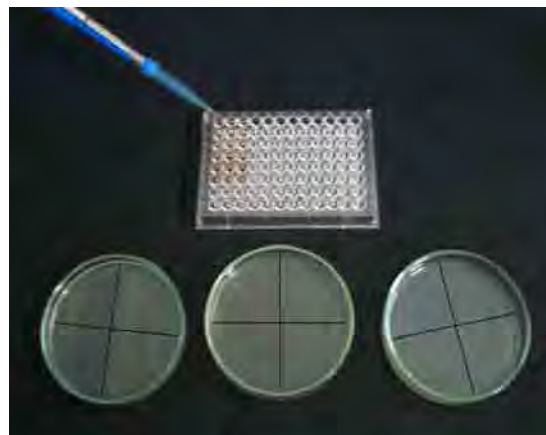


FIGURA 9 – Aliquotas de 25 µL foram transferidas diretamente do orifício para placas de Petri contendo meio de cultura.

4.2.3 Planejamento Experimental

Para cada condição avaliada neste estudo, foram realizadas três repetições. Esta decisão baseou-se em metodologias recentemente publicadas que avaliaram a efetividade da PDT antimicrobiana, nas quais a utilização de três amostras por grupo mostra-se adequada^{7,22}. O plaqueamento das amostras foi realizado em triplicata para uma melhor caracterização do valor obtido.

Após a incubação das placas de Petri a 37° C por 48 horas, foi realizado o cálculo do número de microrganismos viáveis, em valores de ufc/mL, obtido nas amostras experimentais e controle. Para o cálculo desses valores, as colônias viáveis presentes nas placas de Petri de cada triplicata foram contadas com o contador de colônias digital. É importante ressaltar que, para cada triplicata, a contagem do número de colônias foi realizada em cada uma das diluições semeadas (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) e também no quadrante onde a alíquota plaqueada foi retirada diretamente da suspensão celular (diluição zero). Para os grupos controle (P-L-, P+ L- e P-L+) foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido o número de colônias referente a uma única diluição que representasse um valor entre a variação considerada. Para os grupos

experimentais (P+L+), essa regra não pode ser aplicada, pois muitas vezes o crescimento nas placas não atingiu o valor mínimo de 30 colônias, tendo em vista as taxas de redução obtidas após a aplicação da PDT. Então, quando valores inferiores a 30 foram observados, o número de colônias considerado foi referente à diluição que apresentou algum crescimento. Após a contagem, foi obtida a média entre as triplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foi calculado. Também foi calculada a média entre os valores obtidos com as três cepas resistentes a fluconazol, de cada espécie. Para o cálculo de ufc/mL, utilizou-se a fórmula a seguir: Para esse cálculo, utilizou-se a fórmula a seguir:

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas sementeiras das placas. No presente estudo, $q = 0,025$ já que foram pipetados 25 μL para cada diluição. Os valores de ufc/mL obtidos foram deixados em notação científica.

Os valores de ufc/mL são extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. As contagens de microrganismos, em ufc/mL, foram transformadas em logaritmo para a análise pretendida neste trabalho. O teste t de Student foi utilizado na comparação de uma média com um valor padrão e na comparação de duas médias, ao nível de 5% de significância²².

5 Resultado

O número de colônias obtido em cada triplicata de todas as amostras avaliadas neste estudo está representado no Apêndice 5, no qual as Tabelas A2 a A21 são referentes à *C. albicans*, e as Tabelas de A22 a A41 são relativas à *C. glabrata*.

5.1 Avaliação da efetividade da PDT na inativação de *C. albicans*, ATCC e resistente a fluconazol

Na Tabela 1 estão descritos os valores de logaritmo de ufc/mL relativos à cepa padrão de *C. albicans* (ATCC), e na Tabela 2 estão as médias e desvios padrão dos log(ufc/mL) referentes às três cepas dessa mesma espécie, com resistência a fluconazol. Esses resultados estão representados graficamente nas Figuras 10 e 11, para a ATCC e a resistente, respectivamente.

De acordo com as Tabelas 1 e 2, foi possível a obtenção de valores nulos de crescimento microbiológico após a aplicação da PDT, o que demonstrou a inativação total das células de *C. albicans* presentes nas suspensões celulares expostas à terapia (Figura 12). Esses resultados foram observados com a aplicação de doses a partir de 18 J/cm², para as duas origens de *C. albicans* avaliadas. Os valores destas tabelas também demonstram que, nas doses de 25,5 e 37,5 J/cm², a *C. albicans* ATCC necessitou de apenas 5 e 2,5 mg/L de Photogem[®] para que sua inativação total fosse alcançada, respectivamente. Sob as mesmas doses de luz (25,5 e 37,5 J/cm²), a *C. albicans* resistente a fluconazol foi completamente inativada com 10 e 5 mg/L do FS, respectivamente. Além disso, pode-se observar a ocorrência de reduzidos valores de ufc/mL em outras condições experimentais, que embora não tenham sido capazes de inviabilizar as suspensões celulares, promoveram uma inativação parcial dos microrganismos em relação ao controle (Figura 13).

Tabela 1 - Logaritmo de ufc/mL de *C. albicans*

Photogem [®] (mg/L)	Dose de luz (J/cm ²)				
	0,0	10,5	18,0	25,5	37,5
0	6,65	6,47	6,69	6,54	6,50
2,5	6,74	6,42	6,53	5,22	0,00 *
5	6,73	6,42	5,63	0,00 *	0,00
10	6,79	6,40	4,58 *	0,00	0,00
25	6,77	6,29	0,64 *	0,00	0,00
50	6,72	5,51	0,00	0,00	0,00

* Média de resistente a fluconazol é significativamente diferente do ATCC, ao nível de 5%

Tabela 2 - Médias e desvios padrão (DP) de logaritmo de ufc/mL de *C. albicans* resistente ao fluconazol

Photogem [®] (mg/L)	Estatística	Dose de luz (J/cm ²)				
		0,0	10,5	18,0	25,5	37,5
0	Média	6,65	6,60	6,61	6,34 *	6,27
	DP	0,03	0,02	0,04	0,01	0,06
2,5	Média	6,66	6,59	6,25 *+	5,47 *+	4,98 *+
	DP	0,01	0,02	0,09	0,08	0,09
5	Média	6,66	6,56	6,02 *+	3,81 *+	0,00 *+
	DP	0,02	0,01	0,10	0,03	0,00
10	Média	6,64	6,43 *	5,74 *+	0,00 *+	0,00
	DP	0,01	0,04	0,03	0,00	0,00
25	Média	6,65	6,07 *+	2,73 *+	0,00 *	0,00
	DP	0,02	0,08	0,12	0,00	0,00
50	Média	6,62	5,24 *+	0,00 *+	0,00	0,00
	DP	0,01	0,18	0,00	0,00	0,00

* na linha e + na coluna: significativamente menor do que o anterior, ao nível de 5%

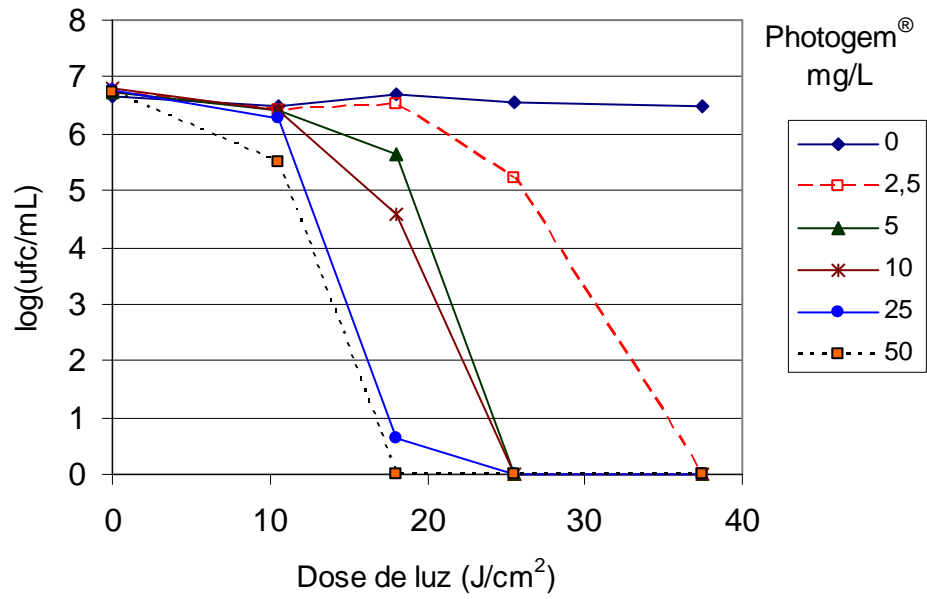


FIGURA 10 - Representação gráfica do logaritmo de ufc/mL de *C. albicans* ATCC.

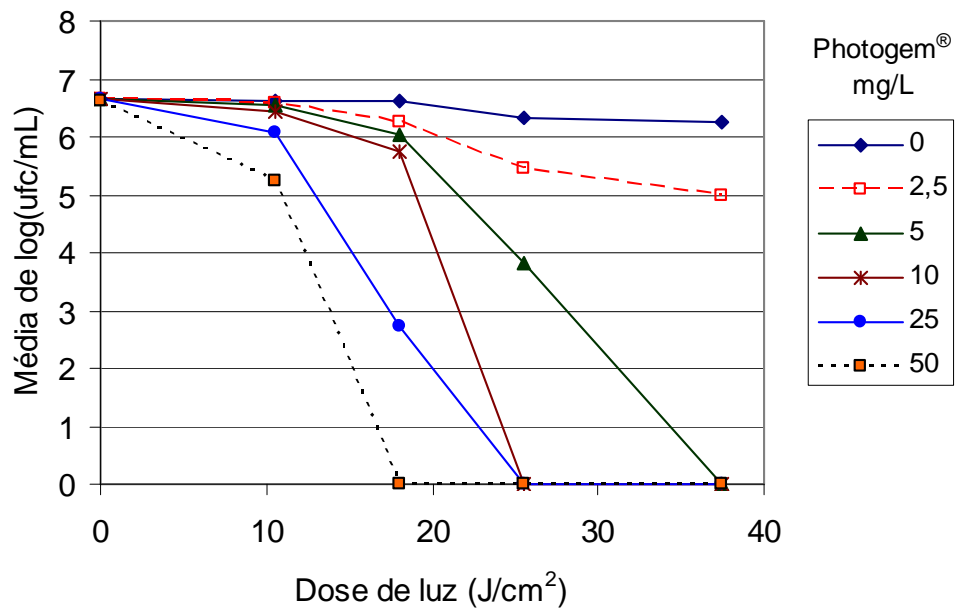


FIGURA 11 - Representação gráfica das médias de logaritmo de ufc/mL de *C. albicans* resistente a fluconazol.



FIGURA 12 – Placa de Petri representativa da ocorrência de inativação total de *Candida* spp..

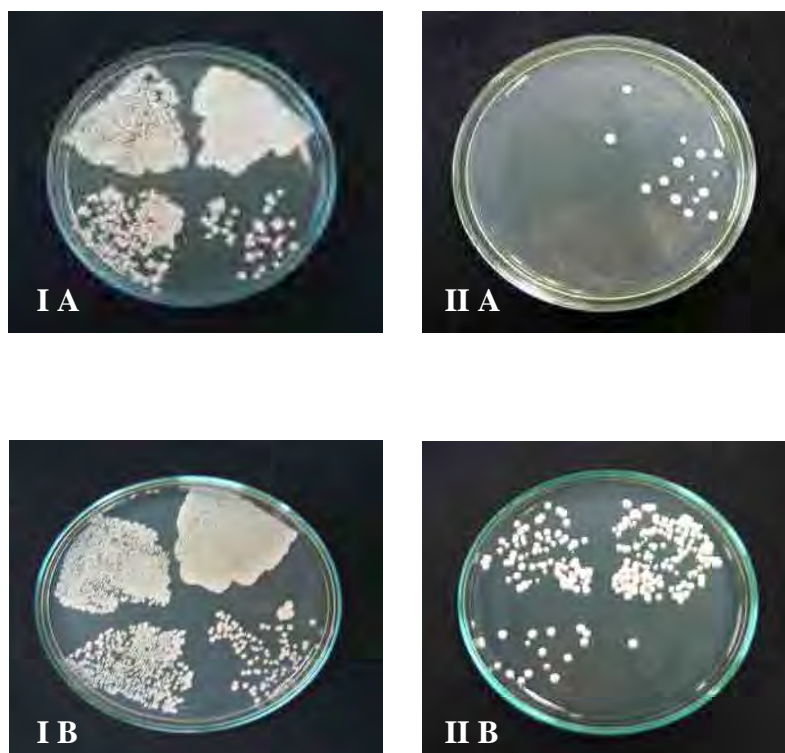


FIGURA 13 – Representações de crescimento de colônias viáveis após 48 horas a 37°C, para as amostras controle (I) e para as amostras das condições experimentais que obtiveram inativação parcial de *C. albicans* (II). Em A, *C. albicans* ATCC; em B, *C. albicans* resistente a fluconazol.

O teste t de Student foi utilizado para a comparação das médias das cepas resistentes a fluconazol em relação ao valor padrão (*C.albicans* ATCC), ao nível de 5% de significância. Esta análise apontou algumas diferenças estatisticamente significantes, apresentadas na Tabela 1. De um modo geral, essas diferenças ocorreram quando valores inferiores de ufc/mL foram obtidos para a *C. albicans* ATCC, em relação a mesma espécie resistente a fluconazol (Tabela 2). A utilização da dose de 18 J/cm² em conjunção com o Photogem[®] nas concentrações de 10 e 25 mg/L, promoveu a obtenção de menores valores de log(ufc/mL) para a *C. albicans* ATCC. Além disso, sob as doses de luz de 25,5 e 37,5 J/cm², a inativação total da *C. albicans* ATCC ocorreu com concentrações inferiores do FS. Essas diferenças estatisticamente significantes demonstram que a *C. albicans* ATCC é inativada em concentrações menores do Photogem[®] em relação à resistente a fluconazol, e portanto, esta última foi menos susceptível a PDT.

Para a avaliação estatística das contagens de *C. albicans* resistente a fluconazol conforme se varia a concentração do Photogem[®], em mg/L, e a dose de luz, em J/cm², definiu-se um desvio padrão comum a todos os valores, igual a 0,07 em unidades de log(ufc/mL), desconsiderando-se os grupos com valores iguais a zero. Em seguida, com base no teste t de Student para a comparação de duas médias, foi definida uma diferença mínima, igual 1,41, acima da qual duas médias são significativamente diferentes ao nível de 5%. O resultado do teste t de Student é apresentado na Tabela 2, mas somente da comparação entre uma média e a anterior, tanto na direção das concentrações de Photogem[®] (colunas) como na direção das doses de luz (linhas). Esta análise demonstrou uma progressiva redução no valor de log(ufc/mL) à medida que se aumenta a concentração do Photogem[®] em cada dose de luz aplicada. Da mesma forma, o aumento na dose de luz aplicada numa única concentração de FS, promove resultados mais satisfatórios de inativação celular. A comparação dos valores da Tabela 2 com os obtidos para a cepa padrão (Tabela 1), demonstra que a característica concentração/dose dependente é observada para as duas origens do microrganismo, embora algumas diferenças estatisticamente significantes sejam

encontradas. Essa semelhança no comportamento de inativação pode ser visualizada também nas Figuras 10 e 11.

De acordo com a Tabela 2, a utilização do Photogem[®] na ausência de iluminação pelo LED (0 J/cm²), não foi capaz de promover redução nos valores de log(ufc/mL), nas cinco concentrações avaliadas do FS. A aplicação isolada da luz do LED, sem a prévia fotossensibilização das amostras (0 mg/L), resultou em valores reduzidos no número de colônias viáveis a partir da dose 25,5 J/cm². Apesar disso, esse resultado deve ser visto com cautela, já que os valores obtidos para as quatro doses de luz, na ausência do Photogem[®] são semelhantes. Tal fato pode ser explicado com base no baixo desvio-padrão comum (0,07) utilizado para a realização do teste estatístico, que apontou diferenças entre números próximos.

5.2 Avaliação da efetividade da PDT na inativação de C. glabrata ATCC e resistente a fluconazol

Na Tabela 3 são apresentados os valores de logaritmo de ufc/mL referentes a *C. glabrata* ATCC, e na Tabela 4 estão as médias e desvios padrão dos log(ufc/mL) referentes a *C. glabrata* resistente a fluconazol. Esses resultados estão representados graficamente nas Figuras 14 e 15, respectivamente, para a ATCC e a resistente a fluconazol. De acordo com as Tabelas 3 e 4, foi obtida inativação total de suspensões celulares de *C. glabrata* ATCC e resistente a fluconazol, em determinadas condições experimentais (Figura 12). Para a *C. glabrata* ATCC, esses resultados foram observados com o Photogem[®] em concentrações a partir de 10 mg/L associado a 37,5 J/cm². A *C. glabrata* resistente a fluconazol necessitou de 25 ou 50 mg/L do FS, associada ao LED nas doses a partir de 25,5 J/cm². Em outras condições experimentais, foi demonstrada a obtenção de valores reduzidos de log(ufc/mL) em relação aos valores controle, caracterizando uma inativação parcial das células fúngicas presentes nas suspensões expostas a PDT (Figura 16).

Tabela 3 - Logaritmo de ufc/mL de *C. glabrata*

Photogem [®] (mg/L)	Dose de luz (J/cm ²)				
	0,0	10,5	18,0	25,5	37,5
0	6,72	6,70	6,61	6,73	6,28
2,5	6,73	6,70	6,66	6,65	5,68 *
5	6,78	6,72	6,61	6,54 *	4,46 *
10	6,79	6,69	6,61	5,62 *	0,00 *
25	6,79	6,71	5,83 *	3,37 *	0,00
50	6,81	6,23 *	4,35 *	1,92 *	0,00

* Média de resistente a fluconazol é significativamente diferente do ATCC, ao nível de 5%

Tabela 4 - Médias e desvios padrão (DP) de logaritmo de ufc/mL de *C. glabrata* resistente ao fluconazol ATCC

Photogem [®] (mg/L)	Estatística	Dose de luz (J/cm ²)				
		0,0	10,5	18,0	25,5	37,5
0	Média	6,74	6,74	6,76	6,65 *	6,55 *
	DP	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03
2,5	Média	6,75	6,72	6,69 +	6,43 *+	6,26 *+
	DP	0,02	0,02	0,02	0,06	0,04
5	Média	6,74	6,69	6,65	6,26 *+	5,96 *+
	DP	0,01	0,01	0,04	0,02	0,05
10	Média	6,76	6,68 *	6,61 *	5,25 *+	4,14 *+
	DP	0,02	0,01	0,03	0,04	0,01
25	Média	6,75	6,68 *	6,40 *+	0,00 *+	0,00 +
	DP	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00
50	Média	6,73	6,69	6,10 *+	0,00 *	0,00
	DP	0,02	0,01	0,03	0,00	0,00

* na linha e + na coluna: significativamente menor do que o anterior, ao nível de 5%.

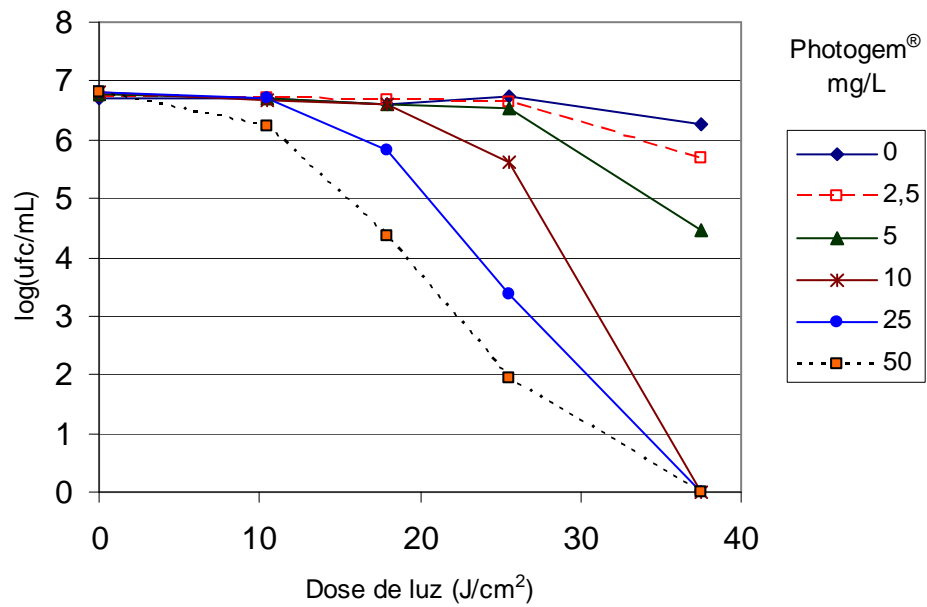


FIGURA 14 - Representação gráfica de logaritmo de ufc/mL de *C. glabrata* ATCC.

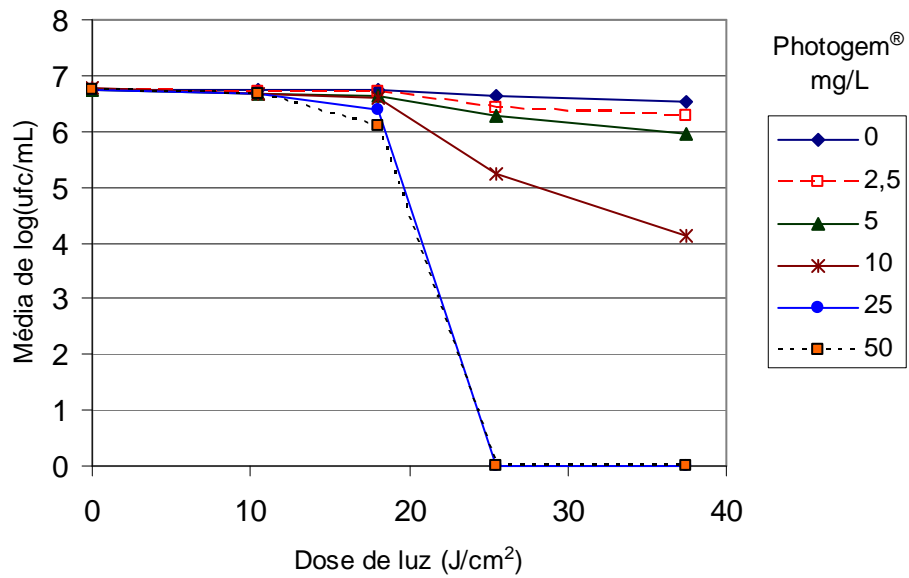


FIGURA 15 - Representação gráfica de médias de logaritmo de ufc/mL de *C. glabrata* resistente a fluconazol.

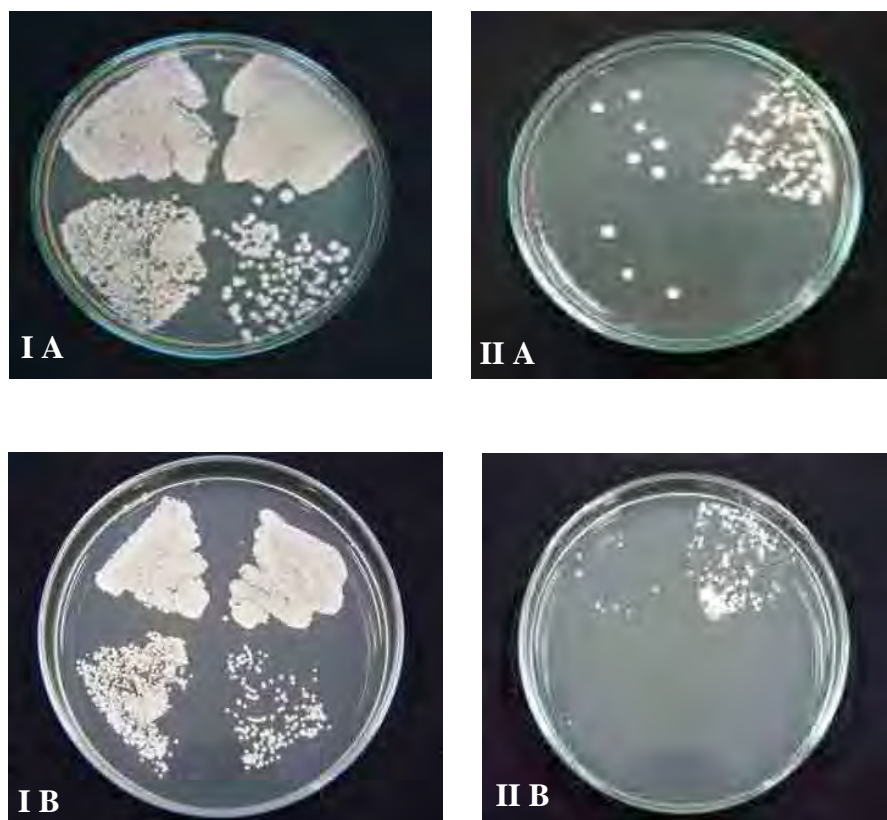


FIGURA 16 – Representação de crescimento de colônias viáveis de após 48 horas a 37°C, para as amostras controle (I) e para as amostras das condições experimentais que obtiveram inativação parcial de *C. glabrata* (II). Em A, *C. glabrata* ATCC; em B, *C. glabrata* resistente a fluconazol.

A comparação das médias das cepas resistentes a fluconazol em relação ao valor padrão (*C. glabrata* ATCC) foi realizada pelo teste t de Student, ao nível de 5% de significância. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 3, com o asterisco indicando as comparações significantes. Foram apontadas diferenças significantes para os valores de log (ufc/mL) obtidos com as associações de 50 mg/L de FS e 10,5 J/cm² de luz, e 25 e 50 mg/L com 18 J/cm². Nesses casos, a *C. glabrata* ATCC apresentou menores contagens de ufc/mL. Sob a dose de 25,5 J/cm², as diferenças encontradas apontaram menores valores de log (ufc/mL) para a *C. glabrata* resistente a fluconazol, que foi completamente inativada com concentrações a partir de 25 mg/L. A inativação total da *C. glabrata* ATCC ocorreu com a dose de luz de 37,5 J/cm², associada a 10 mg/L de FS. Nesta dose de luz, foram encontrados valores menores de contagem celular

para a *C. glabrata* ATCC, nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mg/L, em relação a *C. glabrata* resistente a fluconazol.

Para a avaliação estatística das contagens *C. glabrata* resistente a fluconazol conforme se varia a concentração do Photogem[®], em mg/L, e a dose de luz, em J/cm², obteve-se um desvio padrão comum igual a 0,03 em unidades de log(ufc/mL). A diferença mínima acima da qual duas médias são significativamente diferentes ao nível de 5% é igual a 1,15. O resultado da comparação entre uma média e a anterior, tanto na direção das concentrações de Photogem[®] (colunas) como na direção das doses de luz (linhas) está na Tabela 4. De acordo com esta análise, o aumento, tanto nas doses de luz, quanto nas concentrações de FS, promoveu a obtenção de valores menores de log(cfu/mL), que resultou na completa inativação do microrganismo, com o Photogem[®] a partir de 25 mg/L e 25,5 J/cm² de iluminação. No entanto, o aumento na dose de luz para 37,5 J/cm² não demonstrou maior efetividade para a inativação total de *C. glabrata* resistente a fluconazol.

Na ausência do Photogem[®] (0 mg/L), a utilização de doses de luz a partir de 25 J/cm² promoveu uma redução estatisticamente significativa na contagem celular da *C. glabrata* resistente a fluconazol, entretanto, os valores obtidos são muito semelhantes (Tabela 4). É importante ressaltar que algumas diferenças estatisticamente significantes encontradas possuem valores muito similares, em razão aos baixos valores de desvios padrão obtidos. Assim, algumas diferenças encontradas podem não representar nenhuma relevância clínica.

5.3 Susceptibilidade a PDT da *C. albicans* em relação a *C. glabrata*

De acordo com os resultados apresentados, as duas espécies de *Candida* avaliadas foram efetivamente inativadas após a aplicação da PDT. No entanto, a observação das Figuras 10, 11, 14 e 15 demonstra claramente que a *C. glabrata* apresentou maior resistência à fotoinativação em relação a *C. albicans*, tanto para a ATCC como para a resistente a fluconazol.

A *C. albicans* ATCC foi totalmente eliminada sob a dose de 18 J/cm² e concentração de 50 mg/L, enquanto que a aplicação da maior dose de luz avaliada (37,5 J/cm²) promoveu a inviabilização das suspensões celulares em todas as concentrações do Photogem[®] (2,5, 5, 10, 25 e 50 mg/L). Para a *C. glabrata* ATCC, a inativação total ocorreu somente na dose de 37,5 J/cm², e as concentrações requeridas foram a partir de 10 mg/L.

Para a *C. albicans* resistente a fluconazol, a inativação total foi atingida após a fotossensibilização das suspensões com 50 mg/L e iluminação com 18 J/cm², enquanto que a utilização de maiores doses de luz necessitou de menores concentrações do FS, para que a inativação ocorresse. A *C. glabrata* resistente a fluconazol foi completamente inativada sob a dose de 25,5 e 37,5 J/cm², com as concentrações de Photogem[®] a partir de 25 mg/L.

6 Discussão

O desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento da candidose bucal tem sido alvo de inúmeras pesquisas^{4,59} tendo em vista o surgimento de microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais com medicamentos tópicos e sistêmicos^{20,26,28}. De forma semelhante ao que ocorre ante aos antibióticos, a utilização de antifúngicos para o tratamento da candidose pode ocasionar resistência das espécies de *Candida*, impedindo a regressão das infecções^{26,64}. Além disso, a presença de diversas espécies de *Candida* em uma mesma infecção contribui para o insucesso do tratamento com antifúngicos, já que a susceptibilidade aos medicamentos pode variar de acordo com a espécie^{16,64}. Algumas espécies, como a *C. glabrata* e a *C. krusei*, são intrinsecamente mais resistentes às drogas do tipo azol em comparação com a *C. albicans*⁶⁴, fato que deve ser levado em consideração na escolha do tratamento adequado para as infecções causadas por esses microrganismos.

A utilização de substâncias fotossensibilizadoras em associação com uma fonte de luz tem sido sugerida como método alternativo para o tratamento de infecções localizadas como a candidose^{31,59}. A fotoinativação de microrganismos patogênicos por meio da PDT representa uma nova abordagem desse método terapêutico atualmente empregado para o tratamento de tumores^{27,41}. Investigações in vitro têm demonstrado a susceptibilidade de patógenos, como bactérias^{13,24,48,68} e fungos^{16,30,69} a essa terapia. Além disso, alguns estudos têm avaliado seu potencial no tratamento de enfermidades dermatológicas superficiais, como a queratose actínica, acne e líquen². A aplicação da PDT como modalidade terapêutica para o tratamento de infecções ainda está em desenvolvimento. Embora sejam encontrados estudos que comprovem a utilização de luz associada à FSs como um procedimento efetivo para inativação microbiológica, algumas variáveis podem influenciar essa terapia, como o tipo e a concentração do FS, a espécie do microrganismo, o período de pré-irradiação e a fonte de luz e a dose empregada³¹. O conhecimento da contribuição desses fatores para o sucesso da PDT antimicrobiana tem sido alvo

de estudos que buscam tornar essa prática uma alternativa viável para a eliminação de infecções.

Este estudo avaliou a susceptibilidade de *C. albicans* e *C. glabrata* à PDT por meio da associação de cinco concentrações do Photogem® e quatro doses de luz do tipo LED e constatou que as duas espécies de *Candida* selecionadas foram totalmente inativadas em determinadas condições experimentais. Entre as várias combinações possíveis de FS e luz, a associação de 25 mg/L e 50 mg/L do Photogem® com iluminação a 37,5 J/cm² do LED promoveu a total inviabilização de todas as suspensões celulares de *Candida* avaliadas. Além disso, a utilização dessa mesma dose de luz (37,5 J/cm²) com concentrações menores do FS foi efetiva na eliminação da *C. albicans* ATCC (2,5 mg/L; 5 mg/L e 10 mg/L), da *C. albicans* resistente a fluconazol (5,0 mg/L e 10,0 mg/L) e da *C. glabrata* ATCC (10 mg/L). Esses resultados foram constatados pela ausência de crescimento microbiológico nas placas de Petri após 48 horas a 37°C. O mesmo comportamento foi observado após a aplicação de 25,5 J/cm² associada ao Photogem® em concentrações a partir de 5 mg/L para *C. albicans* ATCC, de 10 mg/L para *C. albicans* resistente a fluconazol e de 25 mg/L para a *C. glabrata* resistente a fluconazol. A aplicação da dose de 18 J/cm² foi efetiva para a inativação total da *C. albicans* ATCC e resistente a fluconazol (50 mg/L).

Apesar dos relatos encontrados na literatura acerca da susceptibilidade de espécies de *Candida* a PDT, poucos estudos observaram a inativação total de *C. albicans*^{36,59}, enquanto que a eliminação de *C. glabrata* é um resultado completamente novo. Já foi demonstrado que a utilização de uma porfirina catiônica (25 µM) associada a 12,6 J/cm² de luz halógena resultou na ausência de colônias viáveis de *C. albicans* após 48 horas³⁶. Embora os FSs com cargas positivas (catiônico) possam apresentar maior atividade fotodinâmica⁶², os mesmos autores também demonstraram toxicidade da porfirina catiônica às células fúngicas previamente à exposição luminosa³⁶, e dano considerável em fibroblastos quando esse FS foi avaliado³⁷. Tais fatos poderiam contra-indicar as porfirinas catiônicas para utilização clínica da PDT antimicrobiana. O corante azul de metileno também foi efetivo em fotossensibilizar a *C. albicans*, promovendo a

completa eliminação desse microrganismo da cavidade bucal de ratos imunossuprimidos, após iluminação com 275 J/cm^2 de laser diodo⁵⁹. Para isso os autores utilizaram concentrações superiores de FS (450 mg/L a 500 mg/L), em comparação com o presente estudo, para a inativação total de *C. albicans*. No entanto, os FS utilizados nos dois estudos são quimicamente distintos, e, portanto, podem apresentar características fotossensibilizadoras diferentes⁶². Além disso, a fonte de luz utilizada por Teichert et al.⁵⁹ possuía emissão de luz no comprimento de onda vermelho, e o estudo foi realizado em língua de animais infectados por *Candida*, o que poderia explicar a necessidade da utilização de concentrações de FS e doses de luz maiores em relação ao presente estudo.

A eliminação total de espécies de *Candida* por meio da PDT, pode apresentar importantes vantagens em relação aos tratamentos convencionais com antifúngicos para as infecções bucais causadas por esses microrganismos. Vem sendo demonstrado que os medicamentos antifúngicos muitas vezes não eliminam completamente as espécies de *Candida*^{4,12,20} e que, por isso, não atingem resultados satisfatórios no tratamento da candidose bucal. Chandra et al.²⁰ demonstraram que a utilização de agentes tópicos e sistêmicos é capaz de provocar apenas uma redução, cerca de 50%, na atividade metabólica de biofilmes de *C. albicans*, existindo a possibilidade da persistência dos microrganismos na infecção após o término do tratamento²⁰. Particularmente, no caso da aplicação tópica de antifúngicos, como a nistatina e o miconazol, os efeitos diluentes da saliva podem prejudicar a efetividade desses agentes na erradicação do agente etiológico, promovendo uma redução da concentração do medicamento para níveis subterapêuticos⁴. Além disso, os medicamentos do tipo azol, como o fluconazol e itraconazol, possuem ação fungistática sobre as células fúngicas, e, portanto, não eliminam necessariamente o microrganismo^{50,64}. A presença de infecções recorrentes por causa da sobrevivência do microrganismo no sítio da infecção é comum⁴, especialmente em indivíduos com o sistema imunológico comprometido, nos quais a eradicação do microrganismo adquire fundamental importância para que não haja recidivas. De acordo com os resultados do presente estudo, a PDT parece ser um método promissor para obtenção da eliminação total

de *C. albicans* e *C. glabrata*, o que contribuiria para suprir as limitações dos medicamentos convencionais e proporcionar melhores resultados do tratamento.

Para a realização dos experimentos deste estudo, foram utilizadas suspensões celulares de *Candida* spp.. A utilização de culturas planctônicas pode não simular fielmente as condições encontradas in vivo, já que, clinicamente, os microrganismos encontram-se agrupados em comunidades complexas, denominadas biofilmes microbianos^{19,68}. Segundo Chandra et al.¹⁹, a sensibilidade de microrganismos a diferentes tipos de tratamentos, diminui consideravelmente quando são avaliados biofilmes. Porém, foi demonstrado, por Chabrier-Roselló et al.¹⁷, uma redução significativa na atividade metabólica de biofilmes de *C. albicans* após a fotossensibilização com 10 mg/L de Photofrin[®] e iluminação a 18 J/cm². Também já foi demonstrada a eliminação de *C. albicans* presente em línguas de ratos com a utilização do azul de metileno e laser⁵⁹. Dessa forma, a utilização efetiva da PDT, in vivo, parece ser um campo de estudo promissor. No presente estudo, as suspensões celulares utilizadas foram obtidas a partir de culturas em meio líquido, o que favoreceu o desenvolvimento dos microrganismos na forma de leveduras, também denominados blastósporo ou blastoconidia. As células leveduriformes têm sido consideradas as maiores constituintes de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos in vitro em corpos-de-prova de resina acrílica e também são capazes de invadir os tecidos bucais em invaginações mucosas^{14,19,51}. No entanto, a forma de hifas da *C. albicans* é considerada a principal responsável pelo desenvolvimento de infecções causadas por essa espécie. Já foi demonstrada a maior susceptibilidade de hifas de *C. albicans* em comparação com a forma de levedura³⁰. Segundo os autores, a parede celular passa por algumas modificações antes, durante e após a alteração morfológica para a forma de hifas, que resultam na maior sensibilidade do microrganismo a fotoinativação. Os resultados obtidos por Bliss et al.⁷ confirmam essa teoria, pois observaram, por meio de microscopia confocal, a ocorrência de influxo de Photofrin[®] para o interior das hifas previamente à exposição luminosa. Assim, embora o presente estudo não tenha utilizado culturas de *C. albicans* na forma de hifas, pode-se supor que a PDT mediada pelo Photogem[®] é potencialmente efetiva

na inativação dessa forma celular da *C. albicans*, tendo em vista que a forma de leveduras foi susceptível após a iluminação com a luz LED. Os resultados encontrados no presente estudo poderão servir como parâmetro para futuras investigações, nas quais a associação do Photogem[®] à luz do tipo LED poderá ser avaliada em situações que simulem as condições encontradas clinicamente.

O efeito antimicrobiano da PDT tem sido descrito como resultado da interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto químico não tóxico (FS) e oxigênio, o que promove a formação de espécies reativas capazes de induzir a inativação celular. O mecanismo da fotossensibilização tem início quando as moléculas do FS são irradiadas com luz visível e os fótons são absorvidos pelo FS. Com isso, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singlete (elétrons de spins emparelhados). Esse elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou passar para o estado triplete (spins paralelos). O FS no estado triplete possui um tempo de vida relativamente longo, o que permite um aumento do número de colisões, ainda em estado excitado, com outras moléculas (por exemplo, com o oxigênio). Essa interação com moléculas vizinhas pode ocorrer por meio de dois principais mecanismos. Os produtos da reação tipo I são radicais livres que podem gerar vários produtos oxidados. Entretanto, são as reações do mecanismo tipo II as principais envolvidas no processo da inativação celular. O FS no estado triplete transfere energia ao oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), produzindo o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), e o FS retorna ao seu estado fundamental. A espécie $^1\text{O}_2$ é altamente reativa no sistema biológico e pode interagir com proteínas e lipídeos promovendo a inativação celular.^{21,41} Portanto, a aplicação de luz sem a presença de um FS, não é capaz de promover a formação do oxigênio singlete, sendo fundamental a presença de uma substância para intermediar o processo de formação dos radicais. Os resultados observados pela análise das Tabelas 2 e 4 confirmam essa teoria, tendo em vista os valores de log (cfu/mL) obtidos nas condições experimentais P-L+. Embora tenham sido apontadas algumas diferenças entre os valores, quando as suspensões celulares foram expostas somente às quatro doses de luz, sem a fotossensibilização prévia, os valores demonstrados foram muito semelhantes aos do controle.

Particularmente para a *C. albicans*, os processos fotoquímicos mediados por derivados da hematoporfirina parecem promover, inicialmente, uma alteração na membrana citoplasmática do microrganismo⁶. Esse efeito ocorre, possivelmente, por meio de alterações oxidativas em lipídeos e proteínas presentes na membrana⁸. O ergosterol é o principal lipídeo presente na membrana citoplasmática das células fúngicas, responsável pela modulação de propriedades vitais às células, como fluidez e permeabilidade da membrana⁶⁴. A fotoxidação do ergosterol leva a formação de oxisteróis, que não são capazes de manter as funções vitais da membrana citoplasmática, aumentando sua permeabilidade⁸. Dessa forma, o FS pode penetrar para o interior da célula, e ocasionar danos irreversíveis a organelas intracelulares, o que leva à inativação celular⁶. Segundo Jori³¹, o aumento da permeabilidade da 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 et al.³⁶. Segundo esses autores, como a permeabilidade da membrana citoplasmática é maior para moléculas com carga positiva, a utilização de FSs catiônicos promoveu a fotoinativação de *C. albicans* sob uma baixa dose de luz³⁶. O presente estudo utilizou o Photogem[®] como FS. As suspensões celulares foram incubadas com esse FS, durante 30 minutos, previamente à iluminação. Esse período é denominado de tempo de pré-irradiação ou tempo de incubação³⁰ e é fundamental para a realização de PDT em tecidos neoplásicos⁴¹, pois os FSs são aplicados sistemicamente e precisam atingir o tecido tumoral antes da aplicação da luz. Na PDT antimicrobiana, esse período também é recomendado para que o FS possa se ligar à célula microbiana, fotossensibilizando-a. Entretanto, não existe um consenso na literatura sobre os tempos de incubação mínimos necessários para a fotossensibilização de microrganismos devido a grande variedade de FS aplicados nos estudos. A utilização de curtos períodos de incubação, tais como 1 ou 5 minutos, tem sido suficiente para a fotossensibilização de *C. albicans*, mas a inativação demonstrada nesses estudos ocorre apenas parcialmente, ou seja, verifica-se apenas uma redução da viabilidade celular do microrganismo^{30,36}.

As duas espécies de *Candida* resistentes a fluconazol utilizadas neste estudo também foram totalmente inativadas com a PDT. Atualmente, a resistência antifúngica é considerada a principal causa de falhas na terapia com antifúngicos⁶⁴. Estudos demonstram que a exposição das células de *Candida* spp. ao fluconazol durante longos períodos pode levar ao desenvolvimento de alterações nessas células, diminuindo a susceptibilidade aos antifúngicos ou, ainda, promovendo mecanismos de expulsão do medicamento para fora das células²⁶. Também vem sendo relatado que a utilização de concentrações não-efetivas de antifúngicos tópicos e sistêmicos pode contribuir para o desenvolvimento de resistência às drogas³. Os resultados do presente estudo demonstraram que as diferenças encontradas na susceptibilidade à PDT entre a *Candida* ATCC e a resistente a fluconazol foram estatisticamente significantes. Foram necessárias maiores concentrações de Photogem[®] para a obtenção da inativação total da *Candida* fluconazol-resistente, em comparação com a cepa padrão, para as duas espécies avaliadas. Um comportamento semelhante foi observado no estudo de Jackson et al.³⁰, que verificaram menores taxas de mortalidade de cepas azol-resistente de *C. albicans*, em comparação com uma cepa de laboratório, após aplicação de PDT mediada pelo azul de toluidina. Segundo os autores, como a atuação dos FSS utilizados em PDT ocorre primariamente na membrana celular dos microrganismos³¹, as alterações genéticas presentes nas células fúngicas azol-resistentes possivelmente dificultariam a fotoinativação dessas células. Os medicamentos antifúngicos do tipo azol atuam, principalmente, na inibição da biossíntese do ergosterol, agindo diretamente na enzima lanosterol dimetilase que atua via de produção desse lipídeo⁶⁴. O desenvolvimento de resistência antifúngica a esse tipo de medicamento é, normalmente, relacionado a modificações genéticas na enzima atingida e também a super-expressão da enzima no interior celular⁶⁴. O aumento na produção da enzima poderia, portanto ocasionar uma maior produção do ergosterol constituinte da membrana, promovendo modificações nessa organela. Como a fotoinativação depende da oxidação do ergosterol e conseqüente aumento de permeabilidade da membrana, é possível que o efeito fotodinâmico em células fluconazol resistentes

seja dificultado. Dessa forma, a utilização de maiores concentrações de FS pode ser justificada, tendo em vista que permitiria a formação de maiores quantidades de oxigênio singlete, necessário para a fotoxidação do ergosterol. Todavia, não são encontrados estudos na literatura que confirmem essa possibilidade. Apesar disso, deve-se ressaltar que as duas espécies de *Candida* resistentes a fluconazol utilizadas neste estudo foram totalmente inativadas com a PDT, assim como as cepas padrão. Esse resultado possui grande relevância para o tratamento de infecções recorrentes, como a candidose, uma vez que a PDT poderia ser utilizada também para o tratamento de infecções resistentes aos medicamentos convencionais, e a eliminação total do microrganismo diminuiria a possibilidade de recidivas da doença. Entretanto, essa hipótese precisa ser validada por meio de estudos clínicos.

Um outro resultado obtido neste estudo foi a ocorrência de valores reduzidos de ufc/mL em relação às suspensões controle (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Os dados obtidos dentro das condições experimentais propostas demonstraram que a inativação dos microrganismos avaliados ocorreu de uma maneira concentração/dose dependente, pois a taxa de redução obtida após a aplicação da PDT aumentou proporcionalmente com a aplicação de doses de luz e concentrações do Photogem[®] mais elevadas. De forma semelhante, outros estudos também observaram que a concentração do FS^{6,7,17} e a dose de luz^{6,36} são fatores que interferem na efetividade da fotossensibilização de *C. albicans* por compostos derivados da hematoporfirina. Bertoloni et al.⁶ observaram que o percentual de sobrevivência desse fungo foi reduzido à medida que foram aumentados o tempo de iluminação das amostras (a dose de luz) e a concentração do FS. Os autores demonstraram que a utilização de 10 mg/L da hematoporfirina provocou uma redução na viabilidade celular da *C. albicans* após 4 minutos de iluminação, enquanto concentrações inferiores necessitaram de um tempo maior de exposição luminosa⁶. No entanto, as doses de luz obtidas com os períodos de iluminação avaliados não foram fornecidas pelos autores. Bliss et al.⁷ também obtiveram resultados similares ao avaliarem a atividade metabólica da *C. albicans* após a PDT mediada pelo Photofrin[®], quando uma curva concentração-dependente foi

observada até a obtenção do menor valor de fluorescência pelo teste XTT (3 mg/L). Entretanto, esse teste é capaz de mensurar apenas atividade enzimática da célula e não necessariamente a morte celular¹⁷. Devido a essa limitação, o presente estudo utilizou o método da contagem das ufc/mL para a avaliação da inativação dos microrganismos. Dessa forma, a inviabilização celular dos fungos foi efetivamente constatada pela ausência ou redução do crescimento microbiológico nas placas de Petri após a aplicação da PDT, e foi verificado que baixas concentrações do Photogem[®] exigem altas doses de luz para a obtenção da inativação da *Candida*, e que altas concentrações são efetivas em doses de luz inferiores. Entretanto, a utilização de baixas concentrações de FS pode não ser adequada, pois o dano celular provocado pode ocorrer em níveis que permitam a reparação celular, e, assim, a inativação não ocorreria efetivamente⁶. Apesar disso, o uso de concentrações subletais de FS parece não ser capaz de induzir resistência nas células fúngicas¹⁷, devido ao mecanismo de ação da PDT.

As propriedades fotossensibilizadoras de substâncias corantes, como o azul de metileno e o azul de toluidina, também têm sido avaliadas. Wilson, Mia⁶⁷ demonstraram que o azul de toluidina foi efetivo para promover a inativação de *Candida* spp. após a aplicação da luz de um laser de hélio-neônio. Souza et al.⁵⁸ observaram que a iluminação de suspensões celulares com laser (28 J/cm²), na presença de 100 mg/L de azul de metileno, promoveu 80% de redução no número de ufc/mL de espécies de *Candida*. A mesma concentração de azul de metileno (100 mg/L) também foi efetiva em reduzir o número de colônias viáveis de *C. albicans*, quando uma luz policromática era aplicada (15 J/cm²)⁶⁹. Além disso, outros microrganismos também tem sido efetivamente inativados com a utilização desses compostos, como *S. aureus*^{22,69}, *S. mutans*^{13,68}, *S. sobrinus*¹³, *L. casei*¹³, *A. viscosus*¹³ e *P. gingivalis*²⁴. No entanto, devido às características corantes, a utilização intrabucal dessas substâncias poderia ocasionar alteração na cor de superfícies dentais, protéticas e de restaurações resinosas. Dessa forma, para o tratamento de infecções bucais como a candidose, seria apropriada a utilização de substâncias que não ocasionassem manchamento às superfícies dentais e reabilitadoras. O Photogem[®] não possui propriedades corantes e,

portanto, poderia ser utilizado com maior segurança em pacientes portadores de restaurações estéticas e em usuários de próteses dentárias.

Os resultados deste estudo demonstraram que a *C. glabrata* necessitou de maiores concentrações de FS e doses de luz para sua inativação, em comparação com a *C. albicans*. Essa diferença é claramente observada nas Figuras 10, 11, 14 e 15. Outros estudos já observaram que essas duas espécies de *Candida* podem apresentar comportamentos distintos ante antifúngicos e PDT^{7,64}. Bliss et al.⁷ observaram resistência da *C. glabrata* em ser inativada com 10 mg/L de Photofrin e 9 J/cm² de luz, enquanto a *C. albicans* teve sua atividade metabólica reduzida em mais de 80% sob as mesmas condições experimentais. Uma análise das células de *C. glabrata* em microscopia de fluorescência demonstrou que não ocorreu a captação do FS para o interior das células, sugerindo que esse fator está relacionado com a reduzida susceptibilidade dessa espécie aos efeitos fotodinâmicos⁷. Filogeneticamente, a *C. albicans* e a *C. glabrata* são distintas, e algumas características intrínsecas das espécies estão relacionadas a comportamentos diferentes em relação aos fatores de virulência³² e capacidade de adesão a superfícies acrílicas⁴⁰. Da mesma forma, pode-se supor que algumas dessas peculiaridades inerentes a *C. glabrata* possam atuar como resistência à inativação celular por meio de processos fotoquímicos, como é o caso da PDT. Tem sido sugerido que a *C. glabrata* possui uma maior hidrofobicidade superficial em relação a *C. albicans*⁴⁰. Tal característica é responsável por uma maior tendência das células de *C. glabrata* a se apresentarem co-aderidas umas as outras, quando na forma de blastoconídeos. Para que o efeito fotodinâmico ocorra, é necessário que o oxigênio singlete seja formado em proximidade ao seu alvo, devido ao seu tempo de vida curto e baixa capacidade de difusão em água⁸. Dessa forma, o fenômeno de co-adesão entre as células de *C. glabrata* poderia estar associado a uma maior dificuldade do oxigênio singlete em atingir a superfície das células fúngicas, diminuindo a efetividade da terapia. No entanto, nenhuma informação específica é apontada na literatura.

É importante lembrar que este foi um estudo realizado in vitro, no qual não foram simuladas todas as condições encontradas clinicamente. Dessa

forma, embora os resultados tenham demonstrado que a PDT possa representar uma alternativa promissora para o tratamento da candidose, inclusive em infecções resistentes, a interpretação dos dados deve ser feita com cautela. Alguns aspectos dessa modalidade terapêutica ainda precisam ser esclarecidos em futuras investigações, como a susceptibilidade de biofilmes de *Candida* a PDT, a influência da saliva na efetividade da terapia e a possibilidade de sua aplicação sem a ocorrência de efeitos colaterais aos tecidos subjacentes.

7 Conclusão

Com base nas condições experimentais do presente estudo, foi possível concluir que:

1. A utilização da PDT com LED associada ao Photogem[®] foi efetiva na inativação das duas espécies de *Candida* avaliadas, ATCC e resistente a fluconazol.
2. A redução da viabilidade dos microrganismos foi dependente da concentração de Photogem[®] e dose de luz aplicada.
3. A combinação de 25 mg/L e 50 mg/L do Photogem[®] com iluminação a 37,5 J/cm² do LED promoveu a total inviabilização de todas as suspensões celulares de *Candida* avaliadas.
4. A mínima dose de luz necessária para a inativação de *C. albicans* ATCC e fluconazol resistente foi de 18 J/cm², em associação com 50 mg/L do Photogem[®].
5. A *C. glabrata* ATCC foi totalmente inativada apenas com a dose de luz de 37,5 J/cm², associada ao Photogem[®] em concentrações a partir de 10 mg/L.
6. A *C. glabrata* resistente a fluconazol foi inativada com a associação de 25,5 J/cm² de luz e 25 mg/L de Photogem[®].

8 Referências *

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78 (922): 455-9.
2. Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin Dermatol*. 2006; 24: 16-25.
3. Andes D, Forrest A, Lepack A, Nett J, Marchillo K, Lincoln L. Impact of antimicrobial dosing regimen on evolution of drug resistance in vivo: fluconazole and *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2374-83.
4. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001; 21: 4-8.
5. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995; 61: 199-200, 203-5.
6. Bertoloni G, Reddi E, Gatta M, Burlini C, Jori G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. 1989;135: 957-66.
7. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 2000-6.
8. Bocking T, Barrow KD, Netting AG, Chilcott TC, Coster HGL, Hofer M. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 2000; 267:1607-18.
9. Brancalion L, Moseley H. Laser e non-laser light sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med Sci*. 2002; 17: 173-86.
10. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974; 82: 151-90.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

11. Budtz-Jorgensen E, Theilade E. Regional variations in viable bacterial and yeast counts of 1-week-old denture plaque in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 288-95.
12. Budtz-Jorgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 1859-63.
13. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Dent.* 1994; 22: 273-8.
14. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 327-35.
15. Carré V, Gaud O, Sylvain I, Bourdon O, Spiro M, Blais J, et al. Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1999; 48: 57-62.
16. Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Non-*albicans* oral candidosis in HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43: 419-22.
17. Chabrier-Rosello Y, Foster TH, Perez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4288-95.
18. Chan EC, Iugovaz I, Siboo R, Bilyk M, Barolet R, Amsel R, et al. Comparison of two popular methods for removal and killing of bacteria from dentures. *J Can Dent Assoc.* 1991; 57: 937-9.
19. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183(18): 5385-94.
20. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80: 903-8.

21. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. Rev Assoc Med Bras. 1996;42:229-36.
22. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2329-35.
23. DeSimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Phys Ther. 1999;79: 839-46.
24. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. Arch Oral Biol. 1992; 37: 883-7.
25. Ghamrawy EE. Quantitative changes in dental plaque formation related to removable partial dentures. J Oral Rehabil. 1976; 3: 115-20.
26. Goldman GH, da Silva Ferreira ME, dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;50: 25-32.
27. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol. 1992; 55:145-57.
28. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998; 85: 558-64.
29. Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. J Am Dent Assoc. 1992; 123: 46-51.
30. 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 Med Sci. 1999; 14: 150-7.

31. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38: 468-81.
32. Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8: 378-84.
33. Kolarova H, Ditrichova D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Lasers Surg Med.* 1999; 24:231-5.
34. Konsberg R, Axell T. Treatment of *Candida*-infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 306-11.
35. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72: 283-8.
36. Lambrechts SAG, Aalders MCG, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2026-34.
37. Lambrechts SAG, Schwartz KR, Aalders MCG, Dankert JB. Photodynamic inactivation of fibroblasts by a cationic porphyrin. *Lasers Med Sci.* 2005; 20: 62-7.
38. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242: 345-51.
39. Lombardi T, Budtz-Jorgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 1993; 2: 17-22.
40. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS.* 2002; 110: 601-10.
41. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova.* 2000; 32: 237-43.
42. Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. *Med Microbiol.* 1995; 42: 372-9.

43. Menezes PFC. Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem[®] fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser [Tese de Doutorado]. São Carlos: Instituto de Química da USP; 2006.
44. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. J Dent. 1998; 26: 299-304.
45. Nikawa H, Jin C, Makihira S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. J Oral Rehabil. 2003; 30: 243-50.
46. Okamoto H, Iwase T, Morioka T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. Lasers Surg Med. 1992; 12: 450-8.
47. Olsen I. Denture stomatitis. Effects of chlorhexidine and amphotericin B on the mycotic flora. Acta Odontol Scand. 1975; 33: 41-6.
48. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei Jr G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 2005; 50: 353-9.
49. Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. J Oral Rehabil. 2003; 30: 532-6.
50. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. J Prosthet Dent. 2005; 93: 288-93.
51. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of phenotypically switched *Candida albicans* to denture base materials. Int J Prosthodont. 1998; 11: 75-81.
52. Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992; 73: 171-80.
53. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 398-429.

54. 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. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 668-79.
55. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5: 125-57.
56. Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34: 340-6.
57. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.* 2002; 81: 101-10.
58. Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B.* 2006; 83: 34-8.
59. Teichert MC, Jones MD, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93: 155-60.
60. Theilade E, Budtz-Jorgensen E. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with denture-induced stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1988; 3: 8-13.
61. Thuler LC, Hatherly AL, Goes PN, Almeida e Silva Jr. Mortality descriptors in HIV inpatients. *Rev Saúde Pública.* 1998; 32: 572-8.
62. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 13-28.
63. Walter B, Frank RM. Ultrastructural relationship of denture surfaces, plaque and oral mucosa in denture stomatitis. *J Biol Buccale.* 1985; 13: 145-66.
64. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 382-402.
65. Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J.* 1998; 185: 380-4.

66. Wilson M, Mia N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans* in vitro. *Lasers Med Sci.* 1994; 9: 105-9.
67. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22: 354-7.
68. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Brugnera Jr A, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 324-30.
69. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001; 144: 274-8.

Apêndices



Apêndice 1

Cálculos realizados para a obtenção das proporções utilizadas no preparo das cinco concentrações do Photogem[®], a partir da solução estoque.

- ◆ Proporção utilizada para se obter a concentração de 5 mg/L:

Solução estoque 1000 mg/L ----- 100%

Solução diluída 5 mg/L ----- X

$$X = 500/1000$$

$$X = 0,5 \%$$

- ◆ Proporção utilizada para se obter a concentração de 10 mg/L:

Solução estoque 1000 mg/L ----- 100%

Solução diluída 10 mg/L ----- X

$$X = 1000/1000$$

$$X = 1,0 \%$$

- ◆ Proporção utilizada para se obter a concentração de 20 mg/L:

Solução estoque 1000 mg/L ----- 100%

Solução diluída 20 mg/L ----- X

$$X = 2000/1000$$

$$X = 2,0 \%$$

- ◆ Proporção utilizada para se atingir a concentração de 50 mg/L:

Solução estoque 1000 mg/L ----- 100%

Solução diluída 50 mg/L ----- X

$$X = 5000/1000$$

$$X = 5,0 \%$$

- ◆ Proporção utilizada para se atingir a concentração de 100 mg/L:

Solução estoque 1000 mg/L ----- 100%

Solução diluída 100 mg/L ----- X

$$X = 10000/1000$$

$$X = 10,0 \%$$

Apêndice 2

Cálculos realizados para a obtenção dos tempos de iluminação das amostras de Candida spp.

A dose de luz (J/cm^2) é calculada por meio de uma fórmula, na qual o seu valor é diretamente proporcional à intensidade de luz do aparelho (W/cm^2) e ao tempo de iluminação (segundos):

$$\text{Dose } (\text{J}/\text{cm}^2) = \text{I } (\text{W}/\text{cm}^2) \times \text{T } (\text{s})$$

É importante ressaltar que a intensidade de luz é obtida por meio da multiplicação da potência de saída do aparelho (W) pela área de iluminação (cm^2). Este valor é fixo e foi fornecido pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC) juntamente com as instruções para utilização da “Bio Table”. Como na maioria das fontes de luz, o valor da intensidade foi fornecido na unidade mW, ou seja, Watts divididos por mil. Portanto, para inserir esse valor na fórmula, foi preciso fazer a transformação de unidades. Dessa forma, o valor da intensidade de 12,5 mW/cm^2 foi convertido para 0,0125 W/cm^2 .

- ◆ Cálculo do tempo de iluminação para a dose de 10,5 J/cm^2 :

$$\text{Dose } (\text{J}/\text{cm}^2) = \text{I } (\text{W}/\text{cm}^2) \times \text{T } (\text{s})$$

$$10,5 \text{ J}/\text{cm}^2 = 0,0125 \text{ W}/\text{cm}^2 \times \text{T}$$

$$\text{T} = 10,5 \text{ J}/\text{cm}^2 / 0,0125 \text{ W}/\text{cm}^2$$

$$\text{T} = 840 \text{ s ou } 14 \text{ minutos}$$

- ◆ Cálculo do tempo de iluminação para a dose de 18 J/cm²:

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times T \text{ (s)}$$

$$18 \text{ J/cm}^2 = 0,0125 \text{ W/cm}^2 \times T$$

$$T = 18 \text{ J/cm}^2 / 0,0125 \text{ W/cm}^2$$

$$T = 1440 \text{ s ou } 24 \text{ minutos}$$

- ◆ Cálculo do tempo de iluminação para a dose de 25,5 J/cm²:

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times T \text{ (s)}$$

$$25,5 \text{ J/cm}^2 = 0,0125 \text{ W/cm}^2 \times T$$

$$T = 25,5 \text{ J/cm}^2 / 0,0125 \text{ W/cm}^2$$

$$T = 2040 \text{ s ou } 34 \text{ minutos}$$

- ◆ Cálculo do tempo de iluminação para a dose de 37,5 J/cm²:

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times T \text{ (s)}$$

$$37,5 \text{ J/cm}^2 = 0,0125 \text{ W/cm}^2 \times T$$

$$T = 37,5 \text{ J/cm}^2 / 0,0125 \text{ W/cm}^2$$

$$T = 3000 \text{ s ou } 50 \text{ minutos}$$

Apêndice 3

O projeto e protocolo de pesquisa referente a este estudo, foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CEP). Estavam incluídos no projeto enviado inicialmente, dois estudos distintos, que continham a proposta de utilização de cepas de origem clínica para avaliação da efetividade da PDT. No entanto, apenas a pesquisa relativa a esta dissertação foi concluída. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo foram enviados como relatório parcial para a apreciação do CEP, que o considerou aprovado.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Rua Humaitá, 1680 - 14801-903 Araraquara-SP - FONE: 0xx16 33016434 - FAX: 0xx16 33016433

Araraquara, 15 de dezembro de 2006.

Ofício CEP-FO/CAR. nº 227/2006

Prezada Senhora:

O CEP reunido em 13 de dezembro de 2006, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa intitulado **"EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA INATIVAÇÃO DE CANDIDA SPP"**, de sua responsabilidade e, considerou-o APROVADO.

Atenciosamente

Profª Dra Mirian Aparecida Onofre
Coordenador do CEP-FO/CAR.

Ilma. Sra.
Profª Drª ANA CLAUDIA PAVARINA
DD. Pesquisadora Responsável

Apêndice A

Tabela A1 – Condições experimentais avaliadas para cada microrganismo exposto a PDT. Os parâmetros dose de luz e concentração de Photogem[®] foram variados

Condições experimentais	Parâmetros da Terapia Fotodinâmica	
	Dose de luz (J/cm ²)	Concentração do Photogem [®] (mg/L)
1 P-L- – Controle	----	----
Positivo	----	----
2 P-L+	37,5	----
3 P-L+	25,5	----
4 P-L+	18,0	----
5 P-L+	10,5	----
6 P+L-	----	50
7 P+L-	----	25
8 P+L-	----	10
9 P+L-	----	5
10 P+L-	----	2,5
11 P+L+	37,5	50
12 P+L+	37,5	25
13 P+L+	37,5	10
14 P+L+	37,5	5
15 P+L+	37,5	2,5
16 P+L+	25,5	50
17 P+L+	25,5	25
18 P+L+	25,5	10
19 P+L+	25,5	5
20 P+L+	25,5	2,5
21 P+L+	18,0	50
22 P+L+	18,0	25
23 P+L+	18,0	10
24 P+L+	18,0	5
25 P+L+	18,0	2,5
26 P+L+	10,5	50
27 P+L+	10,5	25
28 P+L+	10,5	10
29 P+L+	10,5	5
30 P+L+	10,5	2,5

Apêndice 5

Resultados de contagem celular obtidos nas condições experimentais avaliadas.

Tabela A2 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* ATCC a 37,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
2,5 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
0 mg/L	1	93	90	71	84,666667	3,39E+06
	2	92	80	90	87,333333	3,49E+06
	3	75	56	70	67	2,68E+06

Tabela A3 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* ATCC a 25,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	1	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
2,5 mg/L	1	16	14	18	16	6,40E+04
	2	62	66	74	67,333333	2,69E+05
	3	67	65	71	67,666667	2,71E+05
0 mg/L	1	62	111	77	83,333333	3,33E+06
	2	83	104	121	102,666667	4,11E+06
	3	74	72	85	77	3,08E+06

Tabela A4 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* ATCC a 18 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	1	5	0	2	8,00E+01
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	111	119	118	116	4,64E+04
	2	51	100	97	82,666667	3,31E+04
	3	117	85	74	92	3,68E+04
5 mg/L	1	106	118	115	113	4,52E+05
	2	119	111	106	112	4,48E+05
	3	109	111	72	97,333333	3,89E+05
2,5 mg/L	1	87	74	93	84,666667	3,39E+06
	2	80	88	89	85,666667	3,43E+06
	3	91	70	88	83	3,32E+06
0 mg/L	1	119	124	118	120,333333	4,81E+06
	2	116	125	117	119,333333	4,77E+06
	3	123	126	128	125,666667	5,03E+06

Tabela A5 Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* ATCC a 10,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	43	38	50	43,666667	1,75E+05
	2	119	105	103	109	4,36E+05
	3	121	105	100	108,666667	4,35E+05
25 mg/L	1	51	43	41	45	1,80E+06
	2	61	41	48	50	2,00E+06
	3	51	47	52	50	2,00E+06
10 mg/L	1	60	73	63	65,333333	2,61E+06
	2	55	49	62	55,333333	2,21E+06
	3	86	59	66	70,333333	2,81E+06
5 mg/L	1	63	59	42	54,666667	2,19E+06
	2	76	91	84	83,666667	3,35E+06
	3	56	69	64	63	2,52E+06
2,5 mg/L	1	56	77	60	64,333333	2,57E+06
	2	65	51	73	63	2,52E+06
	3	80	57	69	68,666667	2,75E+06
0 mg/L	1	90	101	75	88,666667	3,55E+06
	2	86	77	111	91,333333	3,65E+06
	3	54	41	55	50	2,00E+06

Tabela A6 – Valores originais obtidos com suspensões celulares do microrganismo *C. albicans* ATCC, sem exposição ao LED, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	137	151	134	140,66667	5,63E+06
	2	120	115	106	113,66667	4,55E+06
	3	148	131	137	138,66667	5,55E+06
25 mg/L	1	161	145	150	152	6,08E+06
	2	144	132	187	154,33333	6,17E+06
	3	151	147	112	136,66667	5,47E+06
10 mg/L	1	140	153	148	147	5,88E+06
	2	155	149	162	155,33333	6,21E+06
	3	170	149	176	165	6,60E+06
5 mg/L	1	155	146	150	150,33333	6,01E+06
	2	96	113	101	103,33333	4,13E+06
	3	149	154	155	152,66667	6,11E+06
2,5 mg/L	1	134	125	125	128	5,12E+06
	2	158	169	142	156,33333	6,25E+06
	3	123	119	139	127	5,08E+06
0 mg/L	1	92	101	78	90,33333	3,61E+06
	2	102	97	91	96,66667	3,87E+06
	3	157	161	167	161,66667	6,47E+06
	4	105	118	107	110	4,40E+06
	5	107	121	124	117,33333	4,69E+06

Tabela A7 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 10R a 37,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis				Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3			
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00	
	2	0	0	0	0	0,00E+00	
	3	0	0	0	0	0,00E+00	
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00	
	2	0	0	0	0	0,00E+00	
	3	0	0	0	0	0,00E+00	
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00	
	2	0	0	0	0	0,00E+00	
	3	0	0	0	0	0,00E+00	
5 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00	
	2	0	0	0	0	0,00E+00	
	3	0	0	0	0	0,00E+00	
2,5 mg/L	1	49	64	71	61,33333	2,45E+05	
	2	68	68	59	65	2,60E+05	
	3	91	74	106	90,33333	3,61E+05	
0 mg/L	1	76	58	95	76,33333	3,05E+06	
	2	84	55	36	58,33333	2,33E+06	
	3	87	69	71	75,66667	3,03E+06	

Tabela A8 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 10R a 25,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis				Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3			
50 mg/L		0	0	0	0	0,00E+00	
		0	0	0	0	0,00E+00	
		0	0	0	0	0,00E+00	
25 mg/L		0	0	0	0	0,00E+00	
		0	0	0	0	0,00E+00	
		0	0	0	0	0,00E+00	
10 mg/L		0	0	0	0	0,00E+00	
		0	0	0	0	0,00E+00	
		0	0	0	0	0,00E+00	
5 mg/L		0	0	0	0	0,00E+00	
		0	0	0	0	0,00E+00	
		0	0	0	0	0,00E+00	
2,5 mg/L		131	156	141	142,6667	5,71E+05	
		170	169	165	168	6,72E+05	
		127	120	99	115,3333	4,61E+05	
0 mg/L		46	59	55	53,33333	2,13E+06	
		66	67	48	60,33333	2,41E+06	
		39	31	51	40,33333	1,61E+06	

Tabela A9 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 10R a 18 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis				Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3			
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00	
	2	0	0	0	0	0,00E+00	
	3	0	0	0	0	0,00E+00	
25 mg/L	1	53	65	49	55,66667	2,23E+03	
	2	36	34	37	35,66667	1,43E+03	
	3	31	39	30	33,33333	1,33E+03	
10 mg/L	1	50	35	49	44,66667	1,79E+06	
	2	42	38	45	41,66667	1,67E+06	
	3	39	41	36	38,66667	1,55E+06	
5 mg/L	1	51	58	60	56,33333	2,25E+06	
	2	80	68	102	83,33333	3,33E+06	
	3	92	87	89	89,33333	3,57E+06	
2,5 mg/L	1	64	97	109	90	3,60E+06	
	2	82	109	97	96	3,84E+06	
	3	65	63	90	72,66667	2,91E+06	
0 mg/L	1	78	84	55	72,33333	2,89E+06	
	2	127	118	101	115,3333	4,61E+06	
	3	107	81	95	94,33333	3,77E+06	

Tabela A10 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 10R a 10,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis				Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3			
50 mg/L	1	43	45	36	41,33333	1,65E+05	
	2	142	139	136	139	5,56E+05	
	3	131	85	127	114,3333	4,57E+05	
25 mg/L	1	91	104	95	96,66667	3,87E+06	
	2	60	64	48	57,33333	2,29E+06	
	3	59	87	83	76,33333	3,05E+06	
10 mg/L	1	97	93	100	96,66667	3,87E+06	
	2	128	89	138	118,3333	4,73E+06	
	3	91	73	86	83,33333	3,33E+06	
5 mg/L	1	108	103	99	103,3333	4,13E+06	
	2	104	94	75	91	3,64E+06	
	3	91	75	121	95,66667	3,83E+06	
2,5 mg/L	1	89	83	108	93,33333	3,73E+06	
	2	101	110	122	111	4,44E+06	
	3	78	95	113	95,33333	3,81E+06	
0 mg/L	1	106	95	98	99,66667	3,99E+06	
	2	81	79	65	75	3,00E+06	
	3	114	95	87	98,66667	3,95E+06	

Tabela A11 – Valores originais obtidos com suspensões celulares do microrganismo *C. albicans* 10R, sem exposição ao LED, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	117	115	104	112	4,48E+06
	2	102	95	89	95,33333	3,81E+06
	3	118	110	117	115	4,60E+06
25 mg/L	1	116	104	115	111,6667	4,47E+06
	2	118	132	111	120,3333	4,81E+06
	3	111	97	100	102,6667	4,11E+06
10 mg/L	1	104	115	108	109	4,36E+06
	2	113	104	106	107,6667	4,31E+06
	3	117	114	126	119	4,76E+06
5 mg/L	1	102	94	106	100,6667	4,03E+06
	2	96	113	101	103,3333	4,13E+06
	3	114	114	109	112,3333	4,49E+06
2,5 mg/L	1	101	113	118	110,6667	4,43E+06
	2	132	125	125	127,3333	5,09E+06
	3	123	119	129	123,6667	4,95E+06
0 mg/L	1	124	124	93	113,6667	4,55E+06
	2	100	126	103	109,6667	4,39E+06
	3	120	101	115	112	4,48E+06
	4	116	112	88	105,3333	4,21E+06
	5	120	113	125	119,3333	4,77E+06

Tabela A12 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 15R a 37,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
2,5 mg/L	1	35	8	17	20	8,00E+02
	2	27	31	21	26,33333	1,05E+03
	3	12	14	13	13	5,20E+02
0 mg/L	1	63	69	83	71,66667	2,87E+06
	2	74	58	54	62	2,48E+06
	3	37	28	41	35,33333	1,41E+06

Tabela A13 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 15R a 25,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	35	40	47	40,66667	1,63E+04
	2	35	34	35	34,66667	1,39E+04
	3	51	32	46	43	1,72E+04
2,5 mg/L	1	106	101	103	103,3333	4,13E+05
	2	73	46	64	61	2,44E+05
	3	49	65	66	60	2,40E+05
0 mg/L	1	71	63	69	67,66667	2,71E+06
	2	52	47	55	51,33333	2,05E+06
	3	79	79	67	75	3,00E+06

Tabela A14 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 15R a 18 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis				ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média	
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	38	35	30	34,33333	1,37E+05
	2	34	30	33	32,33333	1,29E+05
	3	31	38	36	35	1,40E+05
2,5 mg/L	1	56	50	57	54,33333	2,17E+06
	2	36	47	47	43,33333	1,73E+06
	3	31	27	25	27,66667	1,11E+06
0 mg/L	1	109	125	121	118,3333	4,73E+06
	2	137	129	117	127,6667	5,11E+06
	3	115	127	129	123,6667	4,95E+06

Tabela A15 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 15R a 10,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis				ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média	
50 mg/L	1	34	38	38	36,66667	1,47E+04
	2	42	35	40	39	1,56E+04
	3	31	20	32	27,66667	1,11E+04
25 mg/L	1	61	47	55	54,33333	2,17E+05
	2	64	74	74	70,66667	2,83E+05
	3	47	46	40	44,33333	1,77E+05
10 mg/L	1	47	46	52	48,33333	1,93E+06
	2	59	57	56	57,33333	2,29E+06
	3	47	32	42	40,33333	1,61E+06
5 mg/L	1	97	97	103	99	3,96E+06
	2	111	125	118	118	4,72E+06
	3	109	113	121	114,3333	4,57E+06
2,5 mg/L	1	104	113	119	112	4,48E+06
	2	89	101	95	95	3,80E+06
	3	121	118	123	120,6667	4,83E+06
0 mg/L	1	115	107	99	107	4,28E+06
	2	104	104	111	106,3333	4,25E+06
	3	103	97	110	103,3333	4,13E+06

Tabela A16 – Valores originais obtidos com suspensões celulares do microrganismo *C. albicans* 15R, sem exposição ao LED, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	107	119	102	109,3333	4,37E+06
	2	127	110	107	114,6667	4,59E+06
	3	110	118	114	114	4,56E+06
25 mg/L	1	119	121	121	120,3333	4,81E+06
	2	125	120	118	121	4,84E+06
	3	117	125	111	117,6667	4,71E+06
10 mg/L	1	104	97	97	99,33333	3,97E+06
	2	106	111	102	106,3333	4,25E+06
	3	91	106	102	99,66667	3,99E+06
5 mg/L	1	123	115	119	119	4,76E+06
	2	118	107	115	113,3333	4,53E+06
	3	120	116	118	118	4,72E+06
2,5 mg/L	1	113	118	102	111	4,44E+06
	2	119	125	113	119	4,76E+06
	3	107	110	94	103,6667	4,15E+06
0 mg/L	1	99	80	113	97,33333	3,89E+06
	2	112	119	105	112	4,48E+06
	3	130	127	121	126	5,04E+06
	4	119	102	121	114	4,56E+06
	5	124	117	119	120	4,80E+06

Tabela A17 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 23R a 37,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
2,5 mg/L	1	59	105	100	88	3,52E+03
	2	75	60	103	79,333333	3,17E+03
	3	30	34	62	42	1,68E+03
0 mg/L	1	134	140	136	136,66667	5,47E+05
	2	145	133	147	141,66667	5,67E+05
	3	163	157	146	155,33333	6,21E+05

Tabela A18 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 23R a 25,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	106	96	94	98,666667	3,95E+03
	2	100	94	102	98,666667	3,95E+03
	3	59	60	71	63,333333	2,53E+03
2,5 mg/L	1	63	64	76	67,666667	2,71E+04
	2	74	73	74	73,666667	2,95E+04
	3	45	58	50	51	2,04E+04
0 mg/L	1	48	39	41	42,666667	1,71E+06
	2	57	46	49	50,666667	2,03E+06
	3	61	58	43	54	2,16E+06

Tabela A19 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 23R a 18 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	36	50	30	38,666667	1,55E+04
	2	33	31	31	31,666667	1,27E+04
	3	32	35	32	33	1,32E+04
2,5 mg/L	1	68	75	76	73	2,92E+05
	2	84	90	99	91	3,64E+05
	3	55	51	63	56,333333	2,25E+05
0 mg/L	1	79	85	89	84,333333	3,37E+06
	2	91	99	84	91,333333	3,65E+06
	3	102	98	89	96,333333	3,85E+06

Tabela A20 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* 23R a 10,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	34	30	43	35,666667	1,43E+05
	2	31	37	31	33	1,32E+05
	3	45	37	33	38,333333	1,53E+05
25 mg/L	1	40	48	52	46,666667	1,87E+05
	2	113	100	97	103,333333	4,13E+05
	3	34	37	41	37,333333	1,49E+05
10 mg/L	1	81	73	73	75,666667	3,03E+06
	2	31	33	37	33,666667	1,35E+06
	3	50	56	76	60,666667	2,43E+06
5 mg/L	1	64	77	69	70	2,80E+06
	2	52	63	55	56,666667	2,27E+06
	3	68	62	57	62,333333	2,49E+06
2,5 mg/L	1	79	86	77	80,666667	3,23E+06
	2	75	73	81	76,333333	3,05E+06
	3	93	87	95	91,666667	3,67E+06
0 mg/L	1	99	106	101	102	4,08E+06
	2	100	103	95	99,333333	3,97E+06
	3	112	109	105	108,666667	4,35E+06

Tabela A21 – Valores originais obtidos com suspensões celulares do microrganismo *C. albicans* 23R, sem exposição ao LED, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	92	87	87	88,666667	3,55E+06
	2	107	95	102	101,333333	4,05E+06
	3	91	105	83	93	3,72E+06
25 mg/L	1	89	93	100	94	3,76E+06
	2	103	109	112	108	4,32E+06
	3	98	110	98	102	4,08E+06
10 mg/L	1	117	106	111	111,333333	4,45E+06
	2	121	119	119	119,666667	4,79E+06
	3	115	120	117	117,333333	4,69E+06
5 mg/L	1	126	109	110	115	4,60E+06
	2	115	110	112	112,333333	4,49E+06
	3	132	125	119	125,333333	5,01E+06
2,5 mg/L	1	120	123	117	120	4,80E+06
	2	104	116	99	106,333333	4,25E+06
	3	119	106	112	112,333333	4,49E+06
0 mg/L	1	94	86	95	91,666667	3,67E+06
	2	115	101	124	113,333333	4,53E+06
	3	86	120	104	103,333333	4,13E+06
	4	121	114	103	112,666667	4,51E+06
	5	126	109	115	116,666667	4,67E+06

Tabela A22 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* ATCC a 37,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
5 mg/L	1	110	89	70	89,66667	3,59E+04
	2	122	120	110	117,33333	4,69E+04
	3	37	37	30	34,66667	1,39E+04
2,5 mg/L	1	134	180	140	151,33333	6,05E+05
	2	74	73	85	77,33333	3,09E+05
	3	108	158	167	144,33333	5,77E+05
0 mg/L	1	70	52	52	58	2,32E+06
	2	30	44	56	43,33333	1,73E+06
	3	33	44	52	43	1,72E+06

Tabela A23 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* ATCC a 25,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	3	2	1	2	8,00E+01
	2	1	2	2	1,666667	6,67E+01
	3	3	3	2	2,666667	1,07E+02
25 mg/L	1	92	93	93	92,66667	3,71E+03
	2	54	75	60	63	2,52E+03
	3	31	36	36	34,33333	1,37E+03
10 mg/L	1	111	113	81	101,6667	4,07E+05
	2	132	126	97	118,3333	4,73E+05
	3	95	84	94	91	3,64E+05
5 mg/L	1	57	64	64	61,66667	2,47E+06
	2	119	131	106	118,6667	4,75E+06
	3	101	83	83	89	3,56E+06
2,5 mg/L	1	138	101	119	119,3333	4,77E+06
	2	99	154	130	127,6667	5,11E+06
	3	103	99	78	93,33333	3,73E+06
0 mg/L	1	145	179	127	150,3333	6,01E+06
	2	127	131	136	131,3333	5,25E+06
	3	115	152	103	123,3333	4,93E+06

Tabela A24 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* ATCC a 18 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	51	74	66	63,66667	2,55E+04
	2	89	87	76	84	3,36E+04
	3	32	38	30	33,33333	1,33E+04
25 mg/L	1	185	178	194	185,66667	7,43E+05
	2	169	140	200	169,66667	6,79E+05
	3	136	149	164	149,66667	5,99E+05
10 mg/L	1	109	96	110	105	4,20E+06
	2	83	77	108	89,33333	3,57E+06
	3	129	114	101	114,66667	4,59E+06
5 mg/L	1	118	94	123	111,66667	4,47E+06
	2	80	83	98	87	3,48E+06
	3	107	105	114	108,66667	4,35E+06
2,5 mg/L	1	110	112	115	112,33333	4,49E+06
	2	117	126	125	122,66667	4,91E+06
	3	110	105	110	108,33333	4,33E+06
0 mg/L	1	85	97	98	93,33333	3,73E+06
	2	98	125	130	117,66667	4,71E+06
	3	96	94	91	93,66667	3,75E+06

Tabela A25 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* ATCC a 10,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	27	25	30	27,33333	1,09E+06
	2	31	72	39	47,33333	1,89E+06
	3	55	69	58	60,66667	2,43E+06
25 mg/L	1	151	134	122	135,66667	5,43E+06
	2	132	163	145	146,66667	5,87E+06
	3	95	117	116	109,33333	4,37E+06
10 mg/L	1	83	104	122	103	4,12E+06
	2	126	139	117	127,33333	5,09E+06
	3	143	136	139	139,33333	5,57E+06
5 mg/L	1	139	131	147	139	5,56E+06
	2	131	136	138	135	5,40E+06
	3	127	109	131	122,33333	4,89E+06
2,5 mg/L	1	130	104	121	118,33333	4,73E+06
	2	134	131	143	136	5,44E+06
	3	107	132	138	125,66667	5,03E+06
0 mg/L	1	131	103	124	119,33333	4,77E+06
	2	138	137	144	139,66667	5,59E+06
	3	109	136	105	116,66667	4,67E+06

Tabela A26 – Valores originais obtidos com suspensões celulares do microrganismo *C. glabrata* ATCC, sem exposição ao LED, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	157	181	174	170,6667	6,83E+06
	2	170	140	156	155,3333	6,21E+06
	3	168	154	163	161,6667	6,47E+06
25 mg/L	1	161	145	150	152	6,08E+06
	2	144	132	187	154,3333	6,17E+06
	3	169	154	157	160	6,40E+06
10 mg/L	1	140	153	148	147	5,88E+06
	2	161	149	156	155,3333	6,21E+06
	3	178	153	166	165,6667	6,63E+06
5 mg/L	1	155	146	150	150,3333	6,01E+06
	2	132	151	146	143	5,72E+06
	3	154	157	157	156	6,24E+06
2,5 mg/L	1	134	125	125	128	5,12E+06
	2	139	146	142	142,3333	5,69E+06
	3	132	129	147	136	5,44E+06
0 mg/L	1	138	145	131	138	5,52E+06
	2	127	135	118	126,6667	5,07E+06
	3	127	98	107	110,6667	4,43E+06
	4	134	127	86	115,6667	4,63E+06
	5	157	181	177	171,6667	6,87E+06

Tabela A27 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 50R a 37,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	31	30	34	31,66667	1,27E+04
	2	35	37	37	36,33333	1,45E+04
	3	41	30	33	34,66667	1,39E+04
5 mg/L	1	38	33	42	37,66667	1,51E+06
	2	45	37	32	38	1,52E+06
	3	42	31	35	36	1,44E+06
2,5 mg/L	1	63	51	53	55,66667	2,23E+06
	2	53	48	51	50,66667	2,03E+06
	3	52	45	60	52,33333	2,09E+06
0 mg/L	1	58	63	63	61,33333	2,45E+06
	2	74	85	71	76,66667	3,07E+06
	3	65	61	73	66,33333	2,65E+06

Tabela A28 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 50R a 25,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	72	73	78	74,33333	2,97E+05
	2	106	101	94	100,3333	4,01E+05
	3	98	100	75	91	3,64E+05
5 mg/L	1	183	198	187	189,3333	7,57E+05
	2	205	191	198	198	7,92E+05
	3	188	216	222	208,6667	8,35E+05
2,5 mg/L	1	78	85	56	73	2,92E+06
	2	77	74	76	75,66667	3,03E+06
	3	55	57	62	58	2,32E+06
0 mg/L	1	95	110	97	100,6667	4,03E+06
	2	84	114	133	110,3333	4,41E+06
	3	91	106	127	108	4,32E+06

Tabela A29 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 50R a 18 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis				ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média	
50 mg/L	1	38	34	31	34,33333	1,37E+06
	2	31	35	38	34,66667	1,39E+06
	3	34	34	37	35	1,40E+06
25 mg/L	1	83	74	80	79	3,16E+06
	2	87	94	92	91	3,64E+06
	3	59	85	93	79	3,16E+06
10 mg/L	1	118	107	86	103,6667	4,15E+06
	2	87	74	109	90	3,60E+06
	3	124	106	120	116,6667	4,67E+06
5 mg/L	1	107	83	145	111,6667	4,47E+06
	2	137	152	144	144,3333	5,77E+06
	3	77	104	95	92	3,68E+06
2,5 mg/L	1	110	139	119	122,6667	4,91E+06
	2	128	110	124	120,6667	4,83E+06
	3	105	133	119	119	4,76E+06
0 mg/L	1	132	138	140	136,6667	5,47E+06
	2	173	145	116	144,6667	5,79E+06
	3	155	177	126	152,6667	6,11E+06

Tabela A30 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 50R a 10,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis				ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Média	
50 mg/L	1	142	129	137	136	5,44E+06
	2	140	116	138	131,3333	5,25E+06
	3	120	120	162	134	5,36E+06
25 mg/L	1	127	139	141	135,6667	5,43E+06
	2	156	140	137	144,3333	5,77E+06
	3	127	156	131	138	5,52E+06
10 mg/L	1	133	141	157	143,6667	5,75E+06
	2	174	145	121	146,6667	5,87E+06
	3	110	115	174	133	5,32E+06
5 mg/L	1	148	143	134	141,6667	5,67E+06
	2	175	146	151	157,3333	6,29E+06
	3	149	132	141	140,6667	5,63E+06
2,5 mg/L	1	176	183	175	178	7,12E+06
	2	161	154	178	164,3333	6,57E+06
	3	166	161	172	166,3333	6,65E+06
0 mg/L	1	147	155	151	151	6,04E+06
	2	168	174	174	172	6,88E+06
	3	153	142	161	152	6,08E+06

Tabela A31 – Valores originais obtidos com suspensões celulares do microrganismo *C. glabrata* 50R, sem exposição ao LED, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	148	135	139	140,6667	5,63E+06
	2	142	156	144	147,3333	5,89E+06
	3	137	140	135	137,3333	5,49E+06
25 mg/L	1	132	149	151	144	5,76E+06
	2	148	148	142	146	5,84E+06
	3	159	161	149	156,3333	6,25E+06
10 mg/L	1	139	156	127	140,6667	5,63E+06
	2	156	151	149	152	6,08E+06
	3	155	163	169	162,3333	6,49E+06
5 mg/L	1	158	164	145	155,6667	6,23E+06
	2	151	163	161	158,3333	6,33E+06
	3	149	154	142	148,3333	5,93E+06
2,5 mg/L	1	158	146	151	151,6667	6,07E+06
	2	162	168	145	158,3333	6,33E+06
	3	138	134	152	141,3333	5,65E+06
0 mg/L	1	130	125	119	124,6667	4,99E+06
	2	128	134	115	125,6667	5,03E+06
	3	166	141	174	160,3333	6,41E+06
	4	180	147	128	151,6667	6,07E+06
	5	159	143	154	152	6,08E+06

Tabela A32 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 63R a 37,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	67	62	70	66,333333	2,65E+04
	2	55	53	61	56,333333	2,25E+04
	3	63	59	60	60,666667	2,43E+04
5 mg/L	1	172	165	171	169,333333	6,77E+05
	2	216	163	137	172	6,88E+05
	3	120	108	82	103,333333	4,13E+05
2,5 mg/L	1	71	75	76	74	2,96E+06
	2	62	63	60	61,666667	2,47E+06
	3	36	62	50	49,333333	1,97E+06
0 mg/L	1	101	75	93	89,666667	3,59E+06
	2	120	117	105	114	4,56E+06
	3	100	111	95	102	4,08E+06

Tabela A33 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 63R a 25,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	38	32	37	35,666667	1,43E+05
	2	36	32	35	34,333333	1,37E+05
	3	42	48	32	40,666667	1,63E+05
5 mg/L	1	111	98	105	104,666667	4,19E+06
	2	112	105	113	110	4,40E+06
	3	118	108	120	115,333333	4,61E+06
2,5 mg/L	1	130	130	124	128	5,12E+06
	2	134	139	148	140,333333	5,61E+06
	3	108	112	103	107,666667	4,31E+06
0 mg/L	1	131	125	135	130,333333	5,21E+06
	2	132	136	125	131	5,24E+06
	3	122	125	125	124	4,96E+06

Tabela A34 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 63R a 18 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	99	117	97	104,33333	4,17E+04
	2	107	100	106	104,33333	4,17E+04
	3	103	125	101	109,66667	4,39E+04
10 mg/L	1	72	57	82	70,33333	2,81E+06
	2	62	52	57	57	2,28E+06
	3	59	53	48	53,33333	2,13E+06
5 mg/L	1	79	97	109	95	3,80E+06
	2	96	86	74	85,33333	3,41E+06
	3	90	81	89	86,66667	3,47E+06
2,5 mg/L	1	111	128	89	109,33333	4,37E+06
	2	126	101	144	123,66667	4,95E+06
	3	90	94	96	93,33333	3,73E+06
0 mg/L	1	147	151	139	145,66667	5,83E+06
	2	131	126	131	129,33333	5,17E+06
	3	147	131	143	140,33333	5,61E+06

Tabela A35 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 63R a 10,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	127	112	117	118,66667	4,75E+06
	2	140	139	132	137	5,48E+06
	3	127	119	121	122,33333	4,89E+06
25 mg/L	1	89	125	111	108,33333	4,33E+06
	2	106	97	116	106,33333	4,25E+06
	3	140	117	120	125,66667	5,03E+06
10 mg/L	1	119	112	107	112,66667	4,51E+06
	2	102	118	112	110,66667	4,43E+06
	3	111	109	117	112,33333	4,49E+06
5 mg/L	1	107	124	121	117,33333	4,69E+06
	2	105	108	124	112,33333	4,49E+06
	3	107	114	127	116	4,64E+06
2,5 mg/L	1	122	124	120	122	4,88E+06
	2	106	125	121	117,33333	4,69E+06
	3	118	122	113	117,66667	4,71E+06
0 mg/L	1	113	114	124	117	4,68E+06
	2	135	127	122	128	5,12E+06
	3	113	127	121	120,33333	4,81E+06

Tabela A36 – Valores originais obtidos com suspensões celulares do microrganismo *C. glabrata* 63R, sem exposição LED, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	115	126	120	120,33333	4,81E+06
	2	126	119	135	126,66667	5,07E+06
	3	111	124	122	119	4,76E+06
25 mg/L	1	126	131	129	128,66667	5,15E+06
	2	138	125	128	130,33333	5,21E+06
	3	129	133	138	133,33333	5,33E+06
10 mg/L	1	149	136	141	142	5,68E+06
	2	134	142	129	135	5,40E+06
	3	145	151	153	149,66667	5,99E+06
5 mg/L	1	109	113	125	115,66667	4,63E+06
	2	119	115	122	118,66667	4,75E+06
	3	128	126	118	124	4,96E+06
2,5 mg/L	1	146	139	148	144,33333	5,77E+06
	2	156	142	145	147,66667	5,91E+06
	3	147	135	139	140,33333	5,61E+06
0 mg/L	1	126	103	120	116,33333	4,65E+06
	2	111	120	132	121	4,84E+06
	3	151	133	139	141	5,64E+06
	4	147	150	135	144	5,76E+06
	5	152	146	123	140,33333	5,61E+06

Tabela A37 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 87R a 37,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	71	85	90	82	3,28E+03
	2	66	69	73	69,333333	2,77E+03
	3	82	67	60	69,666667	2,79E+03
5 mg/L	1	156	172	143	157	6,28E+05
	2	215	211	178	201,333333	8,05E+05
	3	104	143	147	131,333333	5,25E+05
2,5 mg/L	1	177	168	215	186,666667	7,47E+05
	2	274	299	272	281,666667	1,13E+06
	3	252	240	234	242	9,68E+05
0 mg/L	1	71	153	86	103,333333	4,13E+06
	2	97	83	94	91,333333	3,65E+06
	3	79	83	99	87	3,48E+06

Tabela A38 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 87R a 25,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
25 mg/L	1	0	0	0	0	0,00E+00
	2	0	0	0	0	0,00E+00
	3	0	0	0	0	0,00E+00
10 mg/L	1	85	110	79	91,333333	3,65E+04
	2	80	82	90	84	3,36E+04
	3	77	60	80	72,333333	2,89E+04
5 mg/L	1	85	90	80	85	3,40E+05
	2	82	93	92	89	3,56E+05
	3	77	66	71	71,333333	2,85E+05
2,5 mg/L	1	102	99	107	102,666667	4,11E+05
	2	120	119	101	113,333333	4,53E+05
	3	97	98	90	95	3,80E+05
0 mg/L	1	103	97	95	98,333333	3,93E+06
	2	121	109	109	113	4,52E+06
	3	90	95	113	99,333333	3,97E+06

Tabela A39 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 87R a 18 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	55	51	64	56,666667	2,27E+06
	2	63	68	73	68	2,72E+06
	3	66	45	57	56	2,24E+06
25 mg/L	1	113	100	99	104	4,16E+06
	2	118	94	92	101,333333	4,05E+06
	3	118	108	97	107,666667	4,31E+06
10 mg/L	1	146	154	147	149	5,96E+06
	2	128	151	143	140,666667	5,63E+06
	3	146	121	144	137	5,48E+06
5 mg/L	1	140	137	142	139,666667	5,59E+06
	2	137	131	137	135	5,40E+06
	3	124	139	112	125	5,00E+06
2,5 mg/L	1	152	131	157	146,666667	5,87E+06
	2	137	134	157	142,666667	5,71E+06
	3	135	136	136	135,666667	5,43E+06
0 mg/L	1	131	142	134	135,666667	5,43E+06
	2	148	148	143	146,333333	5,85E+06
	3	161	157	153	157	6,28E+06

Tabela A40 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* 87R a 10,5 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	107	120	101	109,333333	4,37E+06
	2	93	106	116	105	4,20E+06
	3	108	112	109	109,666667	4,39E+06
25 mg/L	1	91	145	79	105	4,20E+06
	2	96	111	123	110	4,40E+06
	3	123	110	79	104	4,16E+06
10 mg/L	1	124	97	108	109,666667	4,39E+06
	2	109	98	115	107,333333	4,29E+06
	3	106	107	120	111	4,44E+06
5 mg/L	1	101	112	115	109,333333	4,37E+06
	2	99	96	120	105	4,20E+06
	3	112	95	91	99,333333	3,97E+06
2,5 mg/L	1	100	135	112	115,666667	4,63E+06
	2	115	91	98	101,333333	4,05E+06
	3	99	109	120	109,333333	4,37E+06
0 mg/L	1	138	129	142	136,333333	5,45E+06
	2	135	129	127	130,333333	5,21E+06
	3	141	129	122	130,666667	5,23E+06

Tabela A41 – Valores originais obtidos com suspensões celulares do microrganismo *C. glabrata* 87R, sem exposição ao LED, após 48 horas da semeadura em placas de Petri

Photogem®	Amostra	Número de colônias viáveis			Média	ufc/mL
		Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3		
50 mg/L	1	126	149	141	138,66667	5,55E+06
	2	154	142	159	151,66667	6,07E+06
	3	146	123	148	139	5,56E+06
25 mg/L	1	129	136	128	131	5,24E+06
	2	154	146	128	142,66667	5,71E+06
	3	152	149	155	152	6,08E+06
10 mg/L	1	143	128	146	139	5,56E+06
	2	125	159	135	139,66667	5,59E+06
	3	158	155	124	145,66667	5,83E+06
5 mg/L	1	158	142	133	144,33333	5,77E+06
	2	141	125	112	126	5,04E+06
	3	138	134	129	133,66667	5,35E+06
2,5 mg/L	1	148	153	125	142	5,68E+06
	2	119	126	130	125	5,00E+06
	3	126	122	118	122	4,88E+06
0 mg/L	1	159	139	151	149,66667	5,99E+06
	2	127	122	119	122,66667	4,91E+06
	3	149	135	132	138,66667	5,55E+06
	4	151	144	135	143,33333	5,73E+06
	5	148	135	139	140,66667	5,63E+06

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, março de 2007

Livia Nordi Dovigo