



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mariana Carvalho Andrade

*Efetividade da terapia fotodinâmica mediada
pela curcumina em Candida spp..*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Reabilitação Oral.

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

ARARAQUARA

2011

Andrade, Mariana Carvalho

Efetividade da terapia fotodinâmica mediada pela curcumina em *Candida* spp.. / Mariana Carvalho Andrade. – Araraquara: [s.n.], 2011.

196 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1. Biofilmes 2. *Candida* 3. Curcumina 4. Fotoquimioterapia
5. Resistência a medicamentos I. Título

MARIANA CARVALHO ANDRADE

**Efetividade da terapia fotodinâmica mediada
pela curcumina em *Candida* spp..**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE:

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

2º Examinador - Prof^a. Dr^a. Eunice Teresinha Giampaolo

3º Examinador - Prof^a. Dr^a. Cláudia Helena Lovato da Silva

Araraquara, 17 de junho de 2011

Dados Curriculares

Mariana Carvalho Andrade

NASCIMENTO: 16 de agosto de 1982 / Salvador, Bahia

FILIAÇÃO: Maria Auxiliadora Carvalho Andrade
Francisco Álvaro da Conceição Andrade

2002/2006 Graduação na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia

2005/2006 Curso de PRÓTESE FIXA E ADESIVA. (Carga horária: 120h). Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.

2006/2007 Curso de PRÓTESE FIXA E METAL-FREE. (Carga horária: 144h). Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.

2008/2009 Professora substituta da disciplina Clínica Integrada; Universidade Federal da Bahia.

2009/2011 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado – Reabilitação Oral, Área de Concentração em Prótese, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2010 Estágio Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho.

Aos meus amados pais, **Francisco** e **Maria Auxiliadora**, por tudo, em especial, pelo amor, confiança, apoio e estímulo constantes em todas as etapas da minha vida. Vocês são exemplos de honestidade, caráter, sabedoria e perseverança, dos quais tanto me orgulho e nos quais busco sempre me espelhar.

Aos meus amados irmãos, **Paulo** e **Marília**, pelo amor e amizade tão intensos que existe entre nós, pelas alegres lembranças de convivência, pela admiração recíproca e por me incentivarem sempre, apesar da imensa saudade.

Ao meu namorado e grande amigo, **Lucas**, por compreender a minha ausência e as minhas dificuldades em prestar-lhe a atenção merecida durante esses anos de mestrado; pelo apoio, paciência, confiança e, sobretudo, pelo amor dedicado durante todos esses anos juntos.

Sem vocês, essa realização não seria possível.

Agradecimentos especiais:

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **Ana Cláudia Pavarina**, pela confiança depositada em mim e pela orientação persistente que me permitiu vencer as inseguranças ao longo do mestrado.

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**, pelo apoio prestado durante o curso.

A **Ana Paula**, amiga verdadeira, alegre e inteligente. Eu jamais esquecerei a ajuda e contribuição prestadas. Obrigada por enriquecer os horizontes que os meus olhos enxergavam e pelos momentos de alegria vividos durante o desenvolvimento deste e de outros trabalhos. A sua amizade foi uma das conquistas mais importantes deste mestrado, que levarei para sempre no meu coração. Obrigada por tudo.

À grande amiga **Carolina**, conquista igualmente inesquecível, agradeço pelos muitos momentos de atenção, longas conversas, apoio, confidências, ajuda e de alegria vividos.

A **Lívia**, por me ensinar a dar os primeiros passos para o desenvolvimento desse trabalho. Sua ajuda foi, sem dúvida, essencial para que eu pudesse caminhar “sozinha” e o seu apoio foi sempre muito importante para mim.

A **Delise Pellizzaro, Mariana Basílio e Ana Paula Turrioni**,
companheiras de apartamento, agradeço pelo gentil acolhimento e por todos e
tantos momentos difíceis pelos quais nos apoiamos e ajudamos mutuamente.
Vocês tornaram fáceis a minha chegada e permanência em Araraquara. Muito
obrigada!

A **Sônia Vargas**, técnica do laboratório de Microbiologia Aplicada, pela
amizade, carinho de mãe, e imensurável ajuda prestada para a realização deste
trabalho.

Agradecimentos:

A todos os **docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral** que, de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e formação.

Aos demais amigos da Pós-Graduação, **Amanda, Ana Lúcia, Camilinha, Cadu, Cris, Diana, Du, Fer Izumida, Filipe, Giovana, Ju Cabrini, Karen, Larissa, Paty, Paula e Sabrina**, pelo apoio e cooperação mútuos por todos os momentos de agradável convivência e companheirismo.

Aos **coordenadores e funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial, aos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, pessoas amigas e prestativas.

Aos **funcionários** da secretaria de Pós-Graduação, pela presteza e eficiência dos serviços prestados durante todo o curso, muito obrigada!

Às técnicas de laboratório **Érica, Stela e Tatiana** pela ajuda e apoio recebido durante a realização deste trabalho.

Aos **funcionários da Biblioteca** pela ajuda na normatização deste trabalho.

A **CAPES**, pelo auxílio financeiro que propiciaram o bom andamento desta pesquisa.

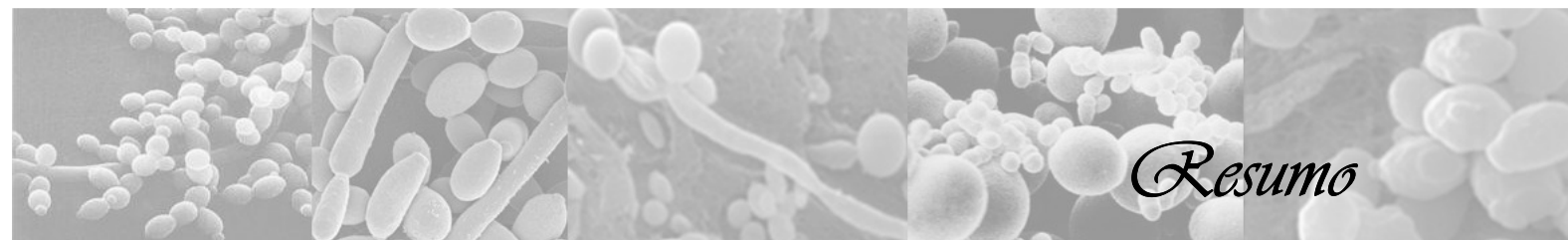
À minha família por compreenderem as dificuldades de prestar-lhes a atenção que merecem durante esse tempo que priorizei a concretização desse trabalho.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

Sumário

Resumo	11
Abstract	14
1 Introdução	17
2 Proposição	24
3 Revisão de Literatura	26
4 Material e Método	90
5 Resultado	120
6 Discussão	134
7 Conclusão	143
8 Referências	145
Apêndices	154



Resumo

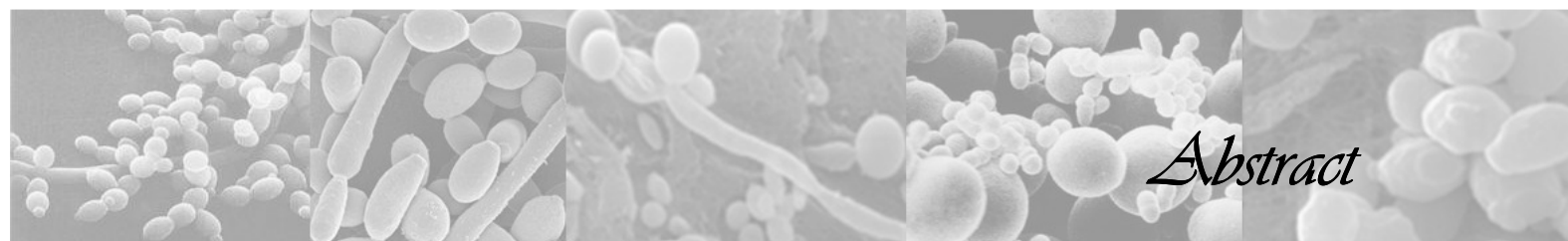
Andrade MC. Efetividade da terapia fotodinâmica mediada pela curcumina em *Candida* spp.. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Resumo

O surgimento da resistência antifúngica aos tratamentos convencionais tem exigido o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento da candidíase bucal. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica (Photodynamic Therapy – PDT) tem sido sugerida como método alternativo para a inativação de micro-organismos patogênicos. O sucesso da PDT depende, dentre outros fatores do tempo de pré-irradiação (TPI), que é o tempo em que o fotossensibilizador (FS) permanece em contato com os micro-organismos previamente à iluminação. O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da PDT mediada pela curcumina (Cur), associando diferentes TPIs, concentrações e doses de luz, na redução da viabilidade celular de três espécies de *Candida* ATCC (*C. albicans* ATCC 90028; *C. glabrata* ATCC 2001; *C. dubliniensis* ATCC 7987), em culturas planctônicas e biofilmes. A Cur foi ativada por um aparelho de LED (luz emitida por diodo) que emite luz no espectro azul, com comprimento de onda predominante de 455 nm. Inicialmente, suspensões celulares padronizadas dos micro-organismos foram transferidas para placas de 96 orifícios, e tratadas com três diferentes concentrações de Cur (5, 10 e 20 μM), ou mantidas nos poços por 48 horas para formação dos biofilmes, seguida de tratamento com outras três concentrações de Cur (20, 30 e 40 μM). As culturas celulares foram deixadas em contato com a Cur por 1, 5, 10 ou 20 minutos, anteriormente à iluminação. Em seguida, as culturas planctônicas foram expostas à dose de luz de 5,28 J/cm^2 . Os biofilmes, por sua vez, foram tratados com duas doses de luz (5,28 e 10,56 J/cm^2). Suspensões/biofilmes adicionais foram

tratados somente com as três concentrações de Cur (pelo maior tempo usado em cada estudo) ou apenas com a maior dose de luz. Amostras controle não foram tratadas com Cur e não receberam luz. Após a PDT, as suspensões celulares foram diluídas e plaqueadas em duplicatas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA), enquanto os resultados para as culturas de biofilmes foram obtidos utilizando o teste de redução do sal de XTT. Os resultados para as culturas planctônicas foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e de Dunn. Para os biofilmes foi feita a análise de variância, teste de Tukey e o t de Student. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes TPIs na PDT mediada pela Cur na inativação das suspensões celulares. A inativação ocorreu de forma concentração-dependente, mas não TPI-dependente. Houve completa inativação das três espécies de *Candida* avaliadas com Cur a 20 µM e 5, 10 ou 20 min de pré-irradiação. Os biofilmes, por sua vez, tiveram significativa redução da viabilidade celular após PDT, a qual se mostrou concentração-dependente. De uma forma geral, todas as espécies de *Candida* avaliadas, alcançaram as maiores reduções de viabilidade celular com a associação da Cur 40 µM e 20 minutos de TPI. Além disso, não foram evidentes as diferenças relacionadas às duas doses de luz testadas. Baseado nesses resultados, foi possível concluir que para as culturas planctônicas, a inativação celular foi concentração-dependente, embora não tenha sido TPI-dependente. Para as culturas de biofilmes a dependência com o TPI pôde ser claramente observada em alguns casos, mas mostrou diferentes comportamentos entre as espécies avaliadas. Entretanto, as maiores reduções na viabilidade dos biofilmes foram alcançadas após associação da Cur 40 µM e 20 min de TPI.

Palavras-chave: Biofilmes; *Candida*; curcumina; fotoquimioterapia; resistência a medicamentos



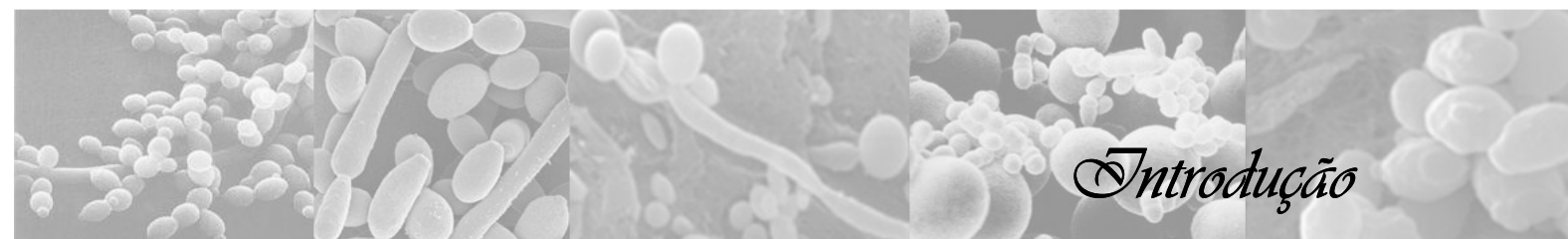
Andrade MC. Effectiveness of curcumin-mediated photodynamic therapy against *Candida* spp. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Abstract

The emergence of antifungal-resistant yeasts to conventional therapy has demanded the development of new therapy modalities against oral candidiasis. On this context, Photodynamic Therapy (PDT) has been suggested as a possible alternative treatment for inactivation of pathogenic microorganisms. PDT success depends, among other factors, on the pre-irradiation time (PIT). The aim of this study was to evaluate the effectiveness of curcumin (Cur)-mediated PDT associating different PITs, Cur concentrations and light doses, against planktonic and biofilm cultures of three different *Candida* species (*C. albicans* ATCC 90028; *C. glabrata* ATCC 2001; *C. dubliniensis* ATCC 7987). Cur was activated by a LED (light emitting diode) device, which emits light on the blue spectrum, with predominant wavelength at 455 nm. Standardized cell suspensions were treated with three different concentrations of Cur (5, 10 e 20 μM), or kept into the wells for 48 hours to allow adhesion and biofilm formation. The biofilms were treated with other three different concentrations of Cur (20, 30 e 40 μM). The cultivated fungus (planktonic and biofilms) were maintained in the dark in contact with the PS for either 1, 5, 10 or 20 minutes before irradiation. The suspensions were exposed to LED light dose of 5.28 J/cm^2 , while the biofilms were exposed to either 5.28, or 10.56 J/cm^2 . Additional samples of suspensions/biofilms were treated only with the three Cur concentrations (for the highest incubation period used in the study), without illumination, or only with the highest light dose, without

Cur. Control samples had neither light nor Cur. After PDT, suspensions were plated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) in duplicate, while biofilm results were read using the XTT-salt reduction method. The results for the planktonic cultures were statistically analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn, while for the biofilms, analysis of variance, Tukey and t-Student analysis were made. The results demonstrated that different PITs showed no statistical differences on Cur-mediated PDT of the cell suspensions of *Candida* spp., although cell viabilities decreased in a concentration-dependent fashion. There was complete inactivation of the three *Candida* species associating Cur 20.0 μ M after 5, 10 or 20 min of PIT. On the other hand, biofilm cultures had significant reduction on cell viability after PDT, which showed to be concentration-dependent. Also, in general, the three *Candida* species evaluated in this study have achieved higher reductions of cell viability associating Cur 40.0 μ M and 20 minutes of PIT. Moreover, no clear differences could be observed between the two light doses tested. Based on these results it was possible to conclude that for the planktonic cultures, the reduction on cell viability was concentration-dependent, although not PIT-dependent. In contrast, for the biofilm cultures PIT-dependence was clearly observed in some cases, although it was observed different behavior among the evaluated species. The highest reductions on biofilm viabilities were achieved after associating Cur 40 μ M and 20 min of PIT.

Keywords: Biofilms; *Candida*; curcumin; drug resistance; photochemotherapy.



Introdução

1 Introdução

As espécies do gênero *Candida* são micro-organismos comensais frequentemente isoladas da cavidade bucal da maioria dos indivíduos saudáveis^{26,31,54}. Em determinadas condições, como o comprometimento da função de glândulas salivares, uso de medicamentos, próteses ou imunossupressão¹, esses micro-organismos podem atuar como patógenos oportunistas, dando origem a lesões superficiais, como as denominadas candidíases orais. A *C. albicans* é a espécie mais prevalente (20–50%)⁴⁴, e a não-*albicans* mais comumente encontrada é a *C. glabrata*^{10,27,31}, com cerca de 15% de envolvimento em infecções orais³¹. A *C. dubliniensis*, por sua vez, é uma espécie comumente isolada da Candidíase de Orofaringe (COF) de pacientes com AIDS⁵⁵, sendo a sua prevalência entre essa população calculada em aproximadamente 17%^{15,32}.

O uso de próteses totais ou parciais removíveis tem sido associado ao aparecimento da estomatite protética, uma infecção fúngica que acomete o palato de aproximadamente 65% dos pacientes portadores de próteses¹⁴, e uma das manifestações mais comuns da candidíase oral²¹. Clinicamente, a estomatite protética se caracteriza pela presença de pontos eritematosos na mucosa sob as próteses removíveis dos pacientes, além de áreas eritematosas difusas⁶⁰. Os pacientes idosos são mais suscetíveis, tendo em vista o uso concomitante das próteses com uma série de medicamentos imunossupressores ou antifúngicos profiláticos. Esse quadro pode alterar a microbiota oral³⁹, além de facilitar a instalação⁴⁴ e disseminação dessa infecção oportunista⁹.

Para o tratamento da candidíase oral podem ser utilizadas medicações antifúngicas tópicas^{13,14} e medicações antifúngicas sistêmicas^{7,10,39}. A escolha de um tratamento ou a associação de mais de um deles deve ser definida em virtude da severidade da infecção decorrente da candidíase, das condições de saúde geral e bucal, da idade e do gênero do paciente⁴⁴.

A medicação sistêmica é a opção de tratamento usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes⁴⁴. Nesses casos, medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B podem ser utilizados. Porém tem sido relatado que a utilização de antifúngicos sistêmicos, particularmente fluconazol e a anfotericina B^{46,47}, pode promover o aparecimento de resistência a esses medicamentos^{3,10,15,26,27,28,32,46,59}. Isso provavelmente é consequência da ação fungistática^{3,28,59} da maioria dos antifúngicos de uso comum, que exige a participação eficiente do sistema imunológico do hospedeiro, portanto, a supressão ou falhas nos mecanismos de defesa dos indivíduos pode facilitar a invasão e disseminação das infecções por *Candida*⁹. Além disso, a *C. glabrata* é uma espécie considerada intrinsecamente resistente aos medicamentos antifúngicos^{31,59} e vem sendo frequentemente isolada de infecções^{10,27,59}. Também tem sido relatado que as espécies de *Candida* possuem a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência às drogas por meio de mutações genéticas⁵⁹. Dessa forma, após o uso prolongado de agentes antifúngicos, as células dos micro-organismos expostos tendem a sofrer modificações que resultam em menor susceptibilidade aos medicamentos. A *C. dubliniensis*, por exemplo, é uma espécie que permite fácil indução in vitro de resistência estável aos azóis^{15,32,39,42}, que é diferente do tipo de resistência induzida em *C. albicans*^{28,42}.

Diante das dificuldades impostas pelo surgimento da resistência microbiana, muitas pesquisas vêm sendo conduzidas buscando terapias alternativas para o tratamento de infecções⁵⁹ como a candidíase. Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos patogênicos é a Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT). Essa técnica foi originalmente aprimorada para o tratamento de lesões cancerosas e vem sendo aplicada com sucesso na área da oncologia, promovendo danos irreversíveis nas células do tecido neoplásico^{16,37}. Estudos posteriores demonstraram o potencial da PDT na inativação microbiana, incluindo alguns tipos de vírus⁵⁸, bactérias^{18,19,58,62} e fungos^{22,23,24,29,62}. Atualmente, a PDT pode ser considerada uma modalidade de tratamento que, embora não substitua as terapias convencionais, funcionam como auxiliar⁵⁸. Essa terapia necessita da presença de uma substância fotoativa, chamada de fotossensibilizador (FS), e uma fonte de luz emitida num espectro próximo ao do pico da absorção do FS utilizado^{2,16,37}. Este, por sua vez, absorve energia dos fótons de luz e, na presença de oxigênio, dá origem a espécies reativas de oxigênio (EROs)³⁷, como o oxigênio singlete e radicais livres que, por reações oxidativas, promovem a morte celular¹⁶. Em geral, os FSs atuam, inicialmente, sobre a membrana celular e, após o aumento da permeabilidade celular, o FS penetra na célula e age sobre outras organelas intracelulares^{5,35}. Portanto, diferentemente dos antifúngicos convencionais, cujo mecanismo de ação limita-se a um único alvo^{28,59}, a PDT atua sobre diversos alvos⁸, tornando improvável o surgimento de resistência^{11,20}.

Embora sejam encontrados estudos que comprovem que a associação entre luz e FS é um procedimento efetivo para inativação microbiológica,

algumas variáveis podem influenciar essa terapia. A luz é um dos componentes indispensáveis à realização da PDT. Estudos têm relatado a utilização de variadas fontes emissoras de luz, dentre elas encontram-se os lasers^{29,38,43,52,56}, as luzes halógenas^{6,25,35} e os LEDs (Luz emitida por Diodo)^{22,23,24,51}. O LED é uma categoria luz que emite irradiação numa faixa mais ampla do espectro, porém com um comprimento de onda predominante. Além disso, apresenta uma emissão de luz espontânea, não coerente e com certo espalhamento, o que permite a iluminação de uma maior área, facilitando o tratamento de lesões superficiais¹⁶. Os LEDs já foram aplicados com sucesso em diversos estudos de PDT antimicrobiana^{22,23,24,51}, e apresentam vantagens como o menor custo do aparelho e tecnologia mais simples, quando comparados aos aparelhos de laser^{20,33}.

Fotossensibilizadores seguros e efetivos têm sido alvos de estudos de muitos pesquisadores para a fotoativação de micro-organismos. A curcumina (Cur) é um pigmento amarelo-alaranjado, extraído do rizoma da planta *Curcuma longa*. É comumente usada como tempero na tradicional culinária asiática e na medicina chinesa, onde já foram comprovadas diversas outras propriedades farmacológicas, como anti-inflamatórias, antitumorais, antifúngicas, antibacterianas e anticarcinogênicas^{40,45,48}. Algumas dessas propriedades são ampliadas após a ativação pela luz^{34,57}.

No caso da Cur, a luz azul é uma opção interessante para sua fotoativação. A faixa azul do espectro de luz (455-492 nm) é capaz de promover efetiva ativação da Cur, além de ser mais segura² e estar numa faixa do espectro comumente utilizada nos consultórios odontológicos para

fotopolimerização das resinas compostas, por meio do uso de aparelhos do tipo LED ou de luz halógena.

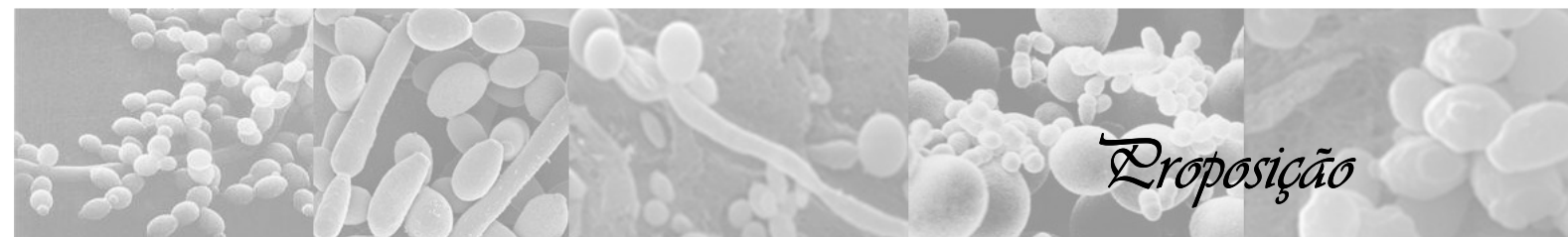
Contudo, a literatura é escassa de informações acerca do uso da Cur na fotoinativação de espécies de *Candida*. Alguns estudos mostram que a fotoinativação de fungos é mais difícil que a fotoinativação de bactérias, devido ao maior tamanho das células fúngicas^{19,20,30,43,62}, cerca de 25 a 50 vezes maior, que exige maiores quantidades de EROs, além do fato de serem micro-organismos eucariontes, cuja presença de envoltório nuclear representa mais uma barreira à ação da PDT^{19,62}. Apesar disso, estudos demonstram que espécies de *Candida*, sejam elas cepas padrão ou resistentes a medicamentos comumente usados na prática clínica, são suscetíveis à PDT^{23,29,38}.

O sucesso da PDT depende de diversos fatores, dentre eles, da espécie^{4,43}, do FS usado e sua concentração^{6,8,24,29,34}, do tempo de iluminação^{12,25,29,32,35,38,62} e do tempo de pré-irradiação (TPI)^{8,25}, que é o tempo em que a substância permanece em contato com os micro-organismos previamente à iluminação. Durante esse período, o FS deverá ligar-se à membrana celular ou penetrar nas células^{11,35} microbianas para que, no ato da iluminação, essa substância seja capaz de exercer a sua função na indução da morte celular.

Vários estudos avaliaram o TPI de alguns FSs na efetividade da PDT e observaram que um maior TPI não reduziu a viabilidade dos micro-organismos avaliados^{11,29,35}. Entretanto, outros estudos demonstraram que alguns FSs necessitam de maior TPI para garantir a sua ligação e/ou captação pelas células^{4,25}. Bliss et al.⁴, avaliaram a captação do Photofrin por células fúngicas de *Candida* e verificaram, por meio de microscopia de fluorescência, a sua captação

após 30 minutos de contato com o FS. Gomes et al.²⁵ avaliaram a captação da alumínio-ftalocianina (AIPc) e da alumínio-ftalocianina tetrasulfatada (AIPcS₄), constatando que a captação da primeira acontece em apenas 10 min, enquanto que a segunda necessita de cerca de 6 horas para produzir efeitos semelhantes de captação pela célula.

Com base nos aspectos abordados, seria interessante avaliar os parâmetros necessários para determinar o êxito da PDT mediada pela Cur, como a concentração, tempo de pré-irradiação e dose de luz, e dessa forma, assegurar a sua aplicabilidade clínica na eliminação de infecções superficiais.



2 Proposição

Este estudo teve como objetivo avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na inativação de três espécies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*) associando a Cur ao LED em função de três variáveis:

- Concentração da Curcumina;
- Tempo de pré-irradiação;
- Dose de luz.

A horizontal strip of five grayscale micrographs showing different types of bacteria. From left to right: 1. A cluster of small, spherical cocci. 2. Several rod-shaped bacilli, some with flagella. 3. A long, thin filamentous bacterium with a bulbous end. 4. A cluster of small, spherical cocci. 5. A cluster of larger, spherical cocci.

Revisão de Literatura

3 Revisão de Literatura

Para facilitar a compreensão e o acompanhamento do texto, essa revisão abordou, separadamente, dois aspectos: o primeiro discorreu acerca de estudos que tratam de *Candida* spp., seu envolvimento em infecções de pacientes imunocomprometidos, lesões orais causadas por fungos, tratamentos para as infecções fúngicas e resistência a antifúngicos; o segundo fez referência a trabalhos relacionados à Terapia Fotodinâmica (PDT) antitumoral e/ou antimicrobiana (emissores de luz, fotossensibilizadores e curcumina).

3.1 *Candida* spp.

O efeito da administração de fluconazol em pacientes com estomatite protética foi avaliado por Budtz-Jorgensen et al.⁷, 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 reestabelecida 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.

Em 1995, Sullivan et al.⁵³ relataram detalhadamente uma análise fenotípica e genotípica de isolados clínicos orais atípicos de *Candida*, obtidos de pacientes com AIDS. As análises envolveram cepas de diversas espécies de *Candida* para fins de comparação e diferenciação. Os resultados mostraram diferenças fenotípicas e genotípicas entre os isolados e as outras espécies avaliadas, entretanto, uma maior proximidade da *C. albicans* e *C. stellatoidea*. Os autores concluíram que os achados forneceram fortes evidências de que se tratava de um grupo único, dentro do gênero *Candida*, para o qual o nome *C. dubliniensis* foi proposto.

Hoepelman, Dupont²⁶, em 1996, realizaram uma revisão de literatura onde abordavam questões relacionadas à resistência e formas de administrar a candidíase oral. Os autores apontam que a *C. albicans* é a causa mais comum de candidíase. Por ser um patógeno oportunista, embora estejam presentes na flora normal de indivíduos saudáveis, não são capazes de desenvolver

candidíase oral. Por outro lado, pacientes imunocomprometidos apresentam elevada frequência de candidíase, demonstrando a importância da imunidade celular do hospedeiro contra as infecções por *Candida*. Com relação ao tratamento da candidíase, os autores ressaltam, ainda, que o uso de antifúngicos sistêmicos tem sido dificultado, dentre outros motivos, pelo surgimento de cepas resistentes de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*. O principal problema relacionado está no desenvolvimento de resistência ao fluconazol em pacientes com AIDS.

Moran et al.⁴² (1997) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a suscetibilidade ao fluconazol e outros antifúngicos de isolados clínicos orais de *C. dubliniensis*, obtidos de pacientes HIV-positivos e HIV-negativos. Experimentos também foram desenvolvidos para determinar se a *C. dubliniensis* poderia desenvolver resistência estável ao fluconazol in vitro, após longa exposição a esse antifúngico. 20 isolados clínicos, além de 2 cepas padrão de *C. dubliniensis* e uma de *C. albicans*, foram obtidas e, posteriormente, submetidas a testes de suscetibilidade ao fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B. Os resultados mostraram que a maioria das cepas apresentavam suscetibilidade ao fluconazol (16 entre as 20). Por outro lado, todas as cepas foram suscetíveis ao itraconazol e anfotericina B. 10 cepas, incluindo as que foram resistentes ao fluconazol, foram suscetíveis ao cetoconazol. Os autores também realizaram testes de indução de resistência ao fluconazol em duas cepas de *C. dubliniensis* inicialmente suscetíveis (MIC de 0,25 e 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e em uma de padrão de *C. albicans*, o que resultou no surgimento de 5 clones derivados de *C. dubliniensis* capazes de crescer satisfatoriamente em 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fluconazol. Essa resistência mostrou ser estável em subculturas e testes sequenciais. Ainda

assim, esses derivados permaneceram suscetíveis ao itraconazol e à anfotericina B (cetoconazol não foi testado). Quanto à *C. albicans*, 4 clones derivados foram capazes de crescer satisfatoriamente em $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, essa resistência não foi estável. Portanto, diferentemente do que acontece com a *C. albicans*, a *C. dubliniensis* tem a habilidade de, rapidamente, desenvolver resistência estável ao fluconazol.

Sullivan et al.⁵⁵, em 1997, realizaram um estudo cujo objetivo foi determinar se os isolados clínicos atípicos de pacientes HIV-positivos da Suíça e do Reino Unido, além de pacientes HIV-negativos da Irlanda eram de *C. dubliniensis*. Os mesmos isolados tiveram suas características e padrões fenotípicos comparados às de cepas padrão de *C. albicans*, *C. stellatoidea* e *C. dubliniensis*. Todos os isolados clínicos apresentaram características de crescimento, formação de colônias, padrão de assimilação de substratos fenotipicamente idênticos às da cepa padrão de *C. dubliniensis*. Mais evidências foram obtidas através de testes genéticos, confirmando que os isolados clínicos atípicos eram de *C. dubliniensis*. Os resultados permitem a conclusão de que a *C. dubliniensis* é um micro-organismo da flora normal causador de doenças bucais e visivelmente espalhado geograficamente.

Em 1998, Kirkpatrick et al.³² realizaram um estudo de coorte em isolados clínicos orais de *Candida* obtidos de 63 pacientes HIV-positivos. Após adequados testes de identificação das espécies de *Candida* encontradas, os resultados mostraram prevalência de *C. dubliniensis* entre essa população de 17% (11 de 63 pacientes). A partir desses 11 pacientes, 22 isolados clínicos orais de *C. dubliniensis* foram obtidos e testados quanto à suscetibilidade a antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e SCH 56592). A

maioria das cepas mostrou suscetibilidade aos antifúngicos. Somente duas cepas de *C. dubliniensis* mostraram resistência ao fluconazol (MIC > 64 µg mL⁻¹) e uma cepa mostrou suscetibilidade dose-dependente ao mesmo antifúngico.

Hunter et al.²⁷, 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*, que 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.

Em uma revisão de literatura, White et al.⁵⁹, 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, micro-organismos 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 à 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 micro-organismos 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 candidíase bucal em pacientes HIV-positivos, foi avaliada por Cartledge et al.¹⁰, em 1999. Para a realização da pesquisa foram selecionados pacientes HIV-positivos com candidíase 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 cetoconazol, outro com itraconazol e outro com fluconazol. Passado este período, a resposta aos tratamentos foi classificada como sucesso (remissão dos sinais de candidíase) ou insucesso (persistência da infecção), e esse resultado foi relacionado à 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 foi identificado 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.

Em um trabalho de revisão de literatura, Calderone, Fonzi⁹, em 2001, descreveram os fatores de virulência da *C. albicans*. De acordo com os autores, a *C. albicans* é um patógeno comensal que se adapta bem a extremos fisiológicos, como o pH, além de ser capaz de atacar o hospedeiro sob diversas condições que vão desde depressões imunológicas até próteses mal adaptadas. Os autores enfatizam que, qualquer falha ou redução nos mecanismos de defesa do paciente permite a ocorrência de candidíase. Esta última 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 candidíase, que se inicia pelo reconhecimento do hospedeiro. A ligação do micro-organismo a proteínas ou competidores do micro-organismo pode evitar a sua identificação e eliminação por parte do hospedeiro. Além disso, embora a revisão seja direcionada aos fatores de virulência da *C. albicans*, os autores descreveram enzimas produzidas por *C. albicans* e *C. glabrata* capazes de promover aderência às células epiteliais bucais do hospedeiro. Com relação à morfogênese, somente a *C. albicans* e a *C. dubliniensis* são capazes de crescer sob duas formas: leveduras e filamentosas (hifas e pseudohifas). De acordo com os autores, a maioria das lesões ocorre na presença das duas formas de crescimento, sugerindo que podem estar envolvidas nas fases de desenvolvimento e progressão da doença. Além disso, outros mecanismos de penetração tecidual podem ocorrer, como a

liberação de enzimas que favorecem a invasividade das cepas. 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, a capacidade de sofrer alterações fenotípicas frequentes, acompanhadas de alterações na expressão antigênica, morfologia de colônia e afinidade aos tecidos da *C. albicans* e outras espécies de *Candida*, favorecem a sua adaptação aos diferentes sítios de colonização. Os autores concluem, dizendo que por sua extensa capacidade adaptativa, a *C. albicans* sobrevive como comensal ou patógeno em diversos sítios e extremos fisiológicos.

Chandra et al.¹³, 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 do sal 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 micro-organismos 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 enxágue 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.¹⁴ desenvolveram um modelo reproduzível de biofilme de *C. albicans* em prótese para determinar a susceptibilidade de isolados do micro-organismo 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 candidíase 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 micro-organismo. 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 a *C. albicans*, quando organizada em biofilmes apresentam resistência aos antifúngicos mais frequentemente utilizados para o tratamento da estomatite protética, quando comparadas às células planctônicas.

Em 2001, Ramage et al.⁴⁶ afirmaram que para colonizar e infectar o ambiente oral, os fungos devem, primeiro, aderir às células e tecidos do hospedeiro, ou superfície de materiais protéticos na cavidade oral. A *C. dubliniensis* tem esse mecanismo facilitado pela presença de propriedades adesivas na superfície celular. Duas consequências do crescimento de biofilme com implicações clínicas profundas são o aumento marcante da resistência a antifúngicos e a proteção contra as defesas do hospedeiro. Esse trabalho teve como objetivo descrever modelos e características dos biofilmes de *C. dubliniensis*. Para isso, os autores usaram 8 isolados clínicos da orofaringe de pacientes HIV+ e uma cepa padrão (NCPF 3949), e realizaram a avaliação da formação do biofilme versus tempo de formação de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas. Observaram que a atividade metabólica aumentava com o tempo, conforme aumentava a massa de células depositadas. Após 8 horas leveduras, tubos germinativos, hifas e pseudo-hifas já eram observadas e recobriam toda a superfície do poço. Na medida em que o biofilme se torna maduro, com 24 e 48 horas de formação, a complexidade aumenta para matriz de biofilme

multicamadas com todas as morfologias fúngicas sendo apresentadas na estrutura final do biofilme. As cinéticas de formação de biofilme dos isolados clínicos e da cepa padrão foram semelhantes, entretanto as atividades metabólicas e propensão em se aderir ao fundo dos poços apresentaram variações. Quando o poço foi condicionado com saliva ou soro (plasmático), anteriormente à contaminação com suspensão de micro-organismo, houve aumento na adesão e crescimento do biofilme. Nos primeiro 30 minutos, a presença do soro aumentou significativamente o crescimento do biofilme. Após 4 e 24 horas, a diferença entre o pré-condicionamento com soro e saliva ainda foram estatisticamente significantes, mas não tão expressivas. Na visualização dos biofilmes em Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Microscopia Confocal Laser de Varredura (CSLM), foi visto que o biofilme maduro consistia de uma densa rede embebida por matriz de material extrapolimérico, e arquitetura tridimensional com formação de canais de água. Nos experimentos que testam a suscetibilidade do biofilme a agentes antifúngicos usados na clínica, foi revelada uma aumentada resistência das células do biofilme de *C. dubliniensis*. Os dados revelaram uma resistência intrínseca ao fluconazol e, embora em menor grau, mas ainda dentro da média considerada de resistência, à anfotericina B. Os autores concluíram que a formação de biofilme pode conferir vantagens ecológicas com a manutenção do seu nicho como comensal e patógeno de humanos, escapando dos mecanismos imunes do hospedeiro, resistindo aos tratamentos com antifúngicos e suportando melhor as pressões competitivas de outros micro-organismos da cavidade oral. Portanto, a formação de biofilme de *C. dubliniensis* pode representar um fator chave para a

sobrevivência da espécie, que parece estar, particularmente, bem adaptada à colonização da cavidade oral, com repercussões clínicas importantes.

A hidrofobicidade e aderência ao acrílico de 33 isolados de *Candida glabrata* e 14 de *Candida albicans* foram avaliadas por Luo, Samaranayake³⁶, 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 micro-organismos, 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 micro-organismos 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.

Um estudo foi realizado por Martinez et al.³⁹, em 2002, com o objetivo de avaliar a prevalência de micro-organismos na orofaringe de pacientes HIV-positivos expostos ao fluconazol. Dos 64 pacientes envolvidos no estudo, 42 apresentaram isolados de *Candida*. Todos os 42 isolados iniciais foram fenotipicamente identificados como *C. albicans* suscetíveis ao fluconazol (FLU). Todos os pacientes foram tratados com 100 mg/dia de FLU. A avaliação final dos isolados clínicos mostrou que apenas 12 isolados de *C. albicans* desenvolveram resistência ao FLU. Dos 30 isolados que não desenvolveram resistência, 8 isolados, inicialmente identificados como *C. albicans* suscetíveis ao FLU, foram identificados como sendo de *C. dubliniensis*. Foi observado, no estudo, substituição de *C. albicans* por *C. dubliniensis* em 27% dos pacientes tratados com FLU, que não desenvolveram *C. albicans* resistentes ao FLU. Os resultados sugerem que o uso de agentes antifúngicos pode resultar no surgimento de micro-organismos mais resistentes e pode afetar na ecologia bucal através da seleção e manutenção de espécies com inata capacidade de resistir, ou mais propícias a desenvolver resistência, a drogas como o FLU.

Douglas²¹, 2003, realizou uma revisão de literatura acerca da formação de biofilmes das espécies de *Candida* e a sua atuação nas infecções. Segundo o

autor, a espécie mais comumente relacionada ao surgimento de infecções é a *Candida albicans*. Essa espécie pode se desenvolver nas morfologias ovais de leveduras ou alongadas, como hifas e pseudohifas. Todas essas formas podem ser encontradas em infecções. A *C. albicans* está bastante associada a infecções nosocomiais, estando entre os quatro maiores agentes causadores de infecções sanguíneas. Além disso, infecções superficiais provocadas por esse patógeno são encontradas frequentemente, sendo a estomatite protética provavelmente a mais comum. O autor alerta para o fato de que modelos de biofilmes criados in vitro podem induzir diferentes expressões gênicas. O material sobre o qual o biofilme se desenvolve e o modo como são armazenados para permitir o crescimento são alguns fatores que induzem a diferenciação. Quando armazenados sob suave agitação, a quantidade de matriz extracelular formada é substancialmente maior que quando armazenadas de forma estática, podendo encobrir os micro-organismos. Quando são estudadas as maneiras mais adequadas para observação microscópica dos biofilmes, o autor afirma que a microscopia eletrônica de varredura possui a desvantagem de necessitar da completa desidratação das amostras para permitir as análises. Por outro lado, a microscopia confocal de varredura a laser permite a visualização das amostras completamente hidratadas, sendo possível a observação da estrutura tridimensional das mesmas. Dessa maneira, estudos recentes puderam avaliar que as estruturas 3D dos biofilmes de *C. albicans* e *C. dubliniensis* são bastante similares, contendo microcolônias circundadas por canais de água. A organização das células em biofilmes garante maior resistência antimicrobiana. Uma das suposições para esse fato é a presença de matriz polimérica extracelular que exclui ou limita o acesso das drogas na profundidade dos

biofilmes. A sobre-expressão de genes que codificam bombas de efluxo de drogas podem garantir o aumento da resistência aos agentes antifúngicos que esses biofilmes apresentam.

Com o objetivo de descrever biofilmes fúngicos e resistência a antifúngicos, em 2004 Jabra-Rizk et al.²⁸, realizaram uma revisão de literatura abordando o assunto. Segundo os autores, as espécies de *Candida* estão entre os maiores causadores de infecções hospitalares. Apesar da maior predominância da *C. albicans*, outras espécies que tendem a apresentar menor suscetibilidade a antifúngicos, como a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, além de uma nova espécie conhecida, *C. dubliniensis*, têm emergido como patógenos oportunistas importantes. A *C. dubliniensis* é capaz de desenvolver resistência estável ao fluconazol, o que a *C. albicans* não é capaz de fazer. Como a maioria dos micro-organismos cresce sob a forma estruturada de biofilmes, os autores abordaram aspectos relativos aos biofilmes de *Candida*. A estrutura de um biofilme maduro (48 horas) de *C. albicans* consiste de uma densa rede de matriz extracelular, leveduras, hifas e pseudohifas, e a camada basal desempenha um importante papel na ancoragem do biofilme às superfícies. De acordo com os autores, os biofilmes trazem vantagens ecológicas, como disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e aquisição de novas expressões genéticas. Mecanismos de resistência aos azóis têm sido reportados nos últimos anos devido ao aumento no uso dessa medicação, somado ao fato de ser uma droga fungistática. Além disso, foi recentemente demonstrado que, durante a formação e desenvolvimento dos biofilmes, há sobre-expressão de genes responsáveis pelas bombas de efluxo de drogas. Adicionalmente, a matriz extrapolimérica presente nos biofilmes restringe a penetração de antimicrobianos. Os autores

fazem referência, também, aos agentes disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas, dando ênfase ao fato de que, na maioria das vezes, o único alvo de ação é a parede celular. Entretanto, esses agentes antifúngicos podem ser úteis na administração de infecções causadas por biofilmes fúngicos.

A fim de avaliar a contribuição do biofilme de *Candida* na etiologia da estomatite protética, Ramage *et al.*⁴⁷, em 2004, avaliaram por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras clínicas removidas das próteses de dois pacientes com estomatite protética. Além disso, esses autores também estudaram a cinética de crescimento de biofilme *in vitro* de *C. albicans*, por meio do ensaio XTT. Para isso, após a padronização da suspensão fúngica, a partir de alguns isolados clínicos coletados de dois pacientes com estomatite protética, os biofilmes foram formados em placas de 96 orifícios e incubados durante os períodos: 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas a 37°C. A susceptibilidade dos biofilmes ao fluconazol e à anfotericina B e o pré-condicionamento das placas com soro e saliva também foram aspectos abordados neste estudo. Os resultados obtidos por meio da MEV evidenciaram a presença do biofilme de *Candida* nas amostras das próteses, caracterizado por uma rede intrincada de lêvedos e hifas profundamente inseridos nas imperfeições e fissuras dos biomateriais, assim como em sua superfície. O XTT demonstrou que os biofilmes *in vitro* de *C. albicans* isolados de pacientes com estomatite protética foram muito ativos metabolicamente nas primeiras 8 horas. Entretanto, com o biofilme maduro e sua complexidade aumentada (24 e 48 horas), a atividade metabólica alcançou um platô, mas permaneceu alta, provavelmente, refletindo o número aumentado de células que constituem o biofilme maduro. Com relação à susceptibilidade antifúngica, os biofilmes estudados apresentaram resistência

aumentada ao fluconazol e à anfotericina, comparados à *C. albicans* em sua forma planctônica. O pré-condicionamento com soro ocasionou aumento significativo na aderência de células fúngicas, principalmente nas fases iniciais de formação do biofilme, ao contrário da película de saliva, que apresentou um efeito mínimo na aderência durante a fase inicial e que, a partir de 4 e 24 horas, esse efeito não foi estatisticamente significativo. Os autores concluíram que a formação dos biofilmes de *Candida* em próteses pode auxiliar na sobrevivência das células fúngicas e contribuir para o processo de doença nos pacientes com estomatite protética.

A *Candida dubliniensis* é uma espécie de *Candida* que foi isolada e identificada em 1995 e tem se mostrado prevalente e altamente associada à candidíase de orofaringe em pacientes com AIDS. Dessa forma, Sullivan et al.⁵⁴, em 2004, realizaram uma revisão de literatura abordando aspectos como epidemiologia, resistência a medicamentos e virulência de *C. dubliniensis* e *C. albicans*. Por apresentarem características fenotípicas quase que idênticas, a *C. dubliniensis* e a *C. albicans* foram, por muito tempo, confundidas. Atualmente, diversos testes já existem para diferenciá-las, sendo os métodos genotípicos considerados os mais confiáveis para esta finalidade. Em indivíduos saudáveis, a *C. dubliniensis*, quando comparada à *C. albicans*, é raramente encontrada na microbiota oral. Entretanto, em pacientes com AIDS, a prevalência se eleva principalmente em casos de infecções recorrentes. Com relação aos fatores de virulência, a *C. dubliniensis* também tem a capacidade de produzir hifas, além de desenvolver maior resistência aos antifúngicos sistêmicos quando comparada à *C. albicans*. De acordo com os autores, é possível que tratamentos com fluconazol resultem em seleção de isolados de *C. dubliniensis* menos

susceptíveis a este antifúngico. Além disso, este micro-organismo apresenta maior nível de produção de enzimas, como a proteinase, e, conseqüentemente, maior capacidade de aderência às células epiteliais. Dessa forma, esses tratamentos favorecem o crescimento desta nova espécie, prejudicando a proliferação de *C. albicans* sob as mesmas condições na cavidade oral. Os autores concluíram que a *C. dubliniensis* deve ser considerada um importante patógeno para os seres humanos e sua prevalência deve ser monitorada, principalmente em pacientes imunocomprometidos, onde esta espécie é mais comumente encontrada e causa infecções recorrentes, principalmente após tratamentos com antifúngicos sistêmicos como o fluconazol.

Perezous et al.⁴⁴, em 2005, realizaram extensa revisão de literatura a respeito da colonização de diferentes espécies de *Candida* em usuários de próteses dentárias, dando ênfase a pacientes portadores do vírus HIV. A existência de *Candida* na cavidade oral como organismos comensais varia de 20 a 50% na população dentada e saudável e em 75% em usuários de prótese. Entretanto, quando as defesas corporais estão deprimidas, como em pacientes HIV+, essa colonização se torna patológica, podendo desenvolver em mais de 90% dos pacientes com AIDS. De acordo com os autores, a ocorrência concomitante de candidíase 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. Além disso, a gravidade de manifestação da candidíase oral está diretamente relacionada à imunossupressão. Os autores destacam também que a presença de biofilme na superfície das próteses dentárias oferece proteção contra agentes antimicrobianos e contra os mecanismos de defesa do hospedeiro,

caracterizando uma reserva protetora aos micro-organismos 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 micro-organismos aos antifúngicos sistêmicos utilizados no tratamento da candidíase 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 manutenção da saúde oral para os pacientes imunocomprometidos é essencial.

Algumas diferenças e similaridades entre a *C. glabrata* e a *C. albicans* foram descritas por Kaur et al.³¹, 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 à 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 candidíase.

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 candidíase sistêmica, no qual ratos foram contaminados com cepas de *C. albicans*. Foram avaliadas 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 à droga podem permitir a ocorrência de concentrações sistêmicas inferiores ao valor mínimo necessário para a inibição do fungo. Este fato, somado à 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.

O desenvolvimento do biofilme sobre uma superfície pode ser avaliado de diferentes maneiras. Métodos como a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), análise espectrofotométrica e ensaios colorimétricos, tais como

2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) podem ser utilizados. Contudo, a reação do XTT é dependente da atividade celular e o seu uso para biofilmes maduros pode ser questionado, considerando que diferentes camadas celulares têm atividades metabólicas diferenciadas. Com isso, em 2008, Silva et al.⁵⁰, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se a adição de glicose à fórmula de XTT diminuiria a variabilidade na mensuração da atividade metabólica. Biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 foi formado em placas de cultura de 96 poços, com tempo de crescimento de 24, 48 e 72 horas. Para avaliar o melhor tempo de incubação do XTT, este foi mantido em tempos de 90, 180 e 270 minutos em temperatura de 37°C. A fórmula padrão do teste de XTT (controle) foi modificada com a adição de 50, 100 e 200 mM de glicose para os grupos experimentais. Os resultados mostraram que a utilização de um tempo de incubação de 270 minutos para o XTT, mostrou uma alta atividade metabólica para o biofilme de 24 horas, superestimando o valor da densidade óptica para o período inicial. O período de incubação de 180 minutos mostrou valores de densidade óptica compatíveis com o aumento da biomassa e atividade metabólica. Por outro lado, os resultados da incubação de 90 minutos apresentaram alta variação dos valores de absorbância, indicando falta de precisão. A adição de glicose interferiu na atividade metabólica, resultando em menores coeficientes de variação (controle = 11,39%; 50 mM = 8,81%; 100 mM = 12,19%; e 200 mM = 6,56%). Com estes resultados, os autores concluíram que o tempo de incubação de 180 minutos utilizando a suplementação de 200 mM de glicose apresenta resultados de atividade metabólica celular com a menor variação para o estudo de biofilme de *C. albicans*.

Em 2009, Chunchanur et al.¹⁵ realizaram um estudo para conhecer a prevalência e o padrão de suscetibilidade a antifúngicos de *Candida dubliniensis* isolados de pacientes com Candidíase de Orofaringe, infectados pelo vírus HIV. Para tanto, realizaram testes de identificação das espécies e testes de suscetibilidade à anfotericina B, ao Cetoconazol e ao Fluconazol. Os resultados mostraram que, dos 135 isolados de *Candida*, 22 (16,3%) foram identificadas com *C. dubliniensis*. Esses 22 isolados mostraram suscetibilidade a anfotericina B, entretanto somente 12 (54,6%) foram suscetíveis ao fluconazol e 14 (63,6%) ao cetoconazol. Além disso, 5 (22,7%) cepas mostraram resistência ao fluconazol e 5 (22,7%) foram intermediárias ao mesmo agente. 4 (18,2%) foram resistentes ao cetoconazol e 4 (18,2%) foram dose dependentes. Entre a *C. albicans*, 11 (12,2%) foram resistentes ao fluconazol e 9 (10%) foram resistentes ao cetoconazol. Foi observado, portanto, alto nível de resistência aos azóis entre as cepas de *C. dubliniensis*, quando comparados aos isolados de *C. albicans*. Diante dos resultados, foi possível concluir que a identificação das cepas presentes em Candidíase de Orofaringe de pacientes HIV positivos é importante para determinar a prescrição do tratamento, principalmente quando na presença de *C. dubliniensis*.

Com o objetivo de determinar a atividade metabólica, in vitro, de biofilmes formados por diferentes espécies de *Candida* não-*albicans*, Silva et al.⁴⁹, em 2010, isolaram 18 cepas de *Candida*: 6 de *C. glabrata*, 6 de *C. parapsilosis* e 6 de *Candida tropicalis*. Adicionalmente, 3 cepas padrão ATCC foram utilizadas como referência. Para a realização do estudo, biofilmes de 48 horas foram formados em placas de 96 orifícios e, para a caracterização dos biofilmes, suas atividades metabólicas foram avaliadas pelo ensaio de redução do sal de XTT.

Além disso, foi feito o cultivo das células do biofilme em SDA para quantificação através da contagem de unidades formadoras de colônias. O terceiro teste realizado foi a avaliação dos biofilmes em microscópio eletrônico de varredura (MEV). A atividade metabólica das células que compõem o biofilme foi comparada à atividade das mesmas células em culturas planctônicas. Os resultados mostraram que a atividade metabólica foi dependente da espécie e da cepa. A atividade metabólica dos biofilmes de *C. glabrata* foi menor que a encontrada para a *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Entretanto, ao contrário do que provavelmente se esperaria, a contagem de UFC e a atividade metabólica não mostraram estar correlacionadas: embora a *C. glabrata* tivesse menor atividade metabólica, essa espécie mostrou maior contagem de células cultiváveis, quando comparadas à *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A avaliação dos biofilmes em MEV mostrou que a *C. glabrata* apresenta uma estrutura celular mais densa que as outras espécies, e não há formação de formas filamentosas. Portanto, fatores intrínsecos dos biofilmes devem ter contribuído diretamente para as respostas obtidas.

3.2 Terapia Fotodinâmica

Tonnesen et al.⁵⁷, 1987, avaliaram a atividade fotobiológica da Cur usando organismos como indicadores sensíveis, a *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Para realizar o teste de fototoxicidade da Cur, cepas de *S. typhimurium* faltando parte da membrana celular foram usadas. Para determinar se a Cur induz danos ao DNA, duas cepas diferentes de *E. coli* diferindo na capacidade de reparo do DNA e na habilidade de fermentar lactose (Lac- ou Lac+) foram usadas. As suspensões celulares das duas espécies foram

preparadas para a realização dos testes. Às suspensões de *S. typhimurium*, foram adicionadas diferentes concentrações de Cur diluídas em dimetil sulfoxide (DMSO). As misturas tiveram uma TPI de 30 minutos para permitir a entrada do composto nas células. Subsequentemente, as suspensões foram irradiadas por um dado período. Após a iluminação, as suspensões foram incubadas por 2 horas a fim de deixá-las em contato com os produtos tóxicos gerados com os micro-organismos. A determinação da viabilidade celular foi realizada através dos cálculos de ufc/mL. Suspensões adicionais foram tratadas com a maior concentração da Cur, porém não iluminadas. Para testar a toxicidade dos produtos de degradação da Cur, após a iluminação, as soluções foram incubadas no escuro por 0, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos. Os resultados dos testes de fototoxicidade mostraram que as suspensões de *S. typhimurium* tratadas com Cur e iluminadas tiveram redução da viabilidade celular de forma concentração-dependente, quando comparada às não irradiadas, demonstrando que a Cur é, claramente fototóxica. Para determinar os efeitos tóxicos dos produtos formados durante a iluminação das soluções de Cur, a mesma foi individualmente iluminada e, após irradiação por 30 minutos, as soluções foram colocadas em contato com as suspensões celulares após 0, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos. Os resultados mostraram que a viabilidade da *S. typhimurium* não foi afetada pela adição de Cur previamente iluminada, o que mostra que a fototoxicidade é causada por produtos intermediários instáveis. Os testes de genotoxicidade mostraram que houve danos genotóxicos somente para as cepas Lac+. A atividade fotobiológica da Cur foi dependente do tempo de irradiação e da concentração.

Dahl et al.¹⁸, 1989, realizaram um estudo para observar as propriedades biológicas da Cur na presença e na ausência de luz, considerando, particularmente, os efeitos letais sobre bactérias. Estas foram cultivadas, sensibilizadas com a Cur e submetidas a diferentes tempos de iluminação. Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas para avaliação de sobrevivência das bactérias através de contagem de colônias viáveis. Além disso, o envolvimento do oxigênio na inativação das cepas também foi avaliado. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações de Cur avaliadas não tiveram toxicidade na ausência de luz. A Cur 1 µM foi capaz de causar completa inativação de *Staphylococcus aureus* após 15 minutos de iluminação. A retirada do oxigênio (O₂) da reação inibe completamente a fototoxicidade da Cur. O tempo de pré-irradiação das células com a Cur, anteriormente à iluminação, não teve efeito na fototoxicidade. Entretanto, a remoção da Cur não ligada às células promoveu redução acentuada dos efeitos tóxicos, sugerindo que a Cur livre, ou fracamente ligada às células, é a responsável pelo efeito fototóxico. Esse efeito, entretanto, não se deve à liberação de oxigênio singlete, visto que em meio prótico há pouca ou nenhuma formação de oxigênio singlete, mas sim, de peróxido de hidrogênio.

Dahl et al.¹⁷, 1994, investigaram o papel que a penetração, entrada ou ligação do FS com as células desempenha na ação fotodinâmica da Cur. Além disso, avaliaram o tempo de vida do reagente citotóxico primário e usaram como ferramenta diagnóstica na avaliação do envolvimento de várias espécies reativas. Para isso, células leucêmicas basofílicas de rato foram plantadas. A Cur a 1 µM foi aplicada sobre as células e iluminada imediatamente, ou incubada por 30 minutos, removida e substituída por PBS para iluminação, ou, ainda, incubada por 30 minutos com Cur, substituída por PBS e, após 30 minutos em

PBS, submetida a iluminação. Os resultados mostraram morte celular rápida, com apenas 2 minutos de iluminação. A remoção da Cur anteriormente à iluminação provocou redução substancial da toxicidade, mostrando que a maior parte da toxicidade advém de produtos intermediários, formados na parte livre. Foi demonstrado que a penetração na célula é rápida (2-4 minutos), entretanto, apenas 1/10 é incorporada, deixando 90% na forma livre. Para avaliação da meia vida do agente citotóxico, iluminou-se a Cur e, em seguida a colocou em contato com o meio celular, deixando agir por 1 minuto. Quanto maior o tempo decorrido entre a iluminação e o contato com as células, menor foi a ação citotóxica da Cur. Encontrou-se uma meia vida de 27 segundos. E, como o efeito da iluminação/exposição simultânea foi semelhante ao efeito da Cur colocada sobre as células imediatamente após a iluminação, conclui-se que todo efeito da morte celular se encontra na fase livre durante a iluminação.

Os princípios básicos de ação da PDT contra o câncer, e alguns FSs, foram revisados por Colussi et al.¹⁶, 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 FS 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 à morte celular. Um composto

químico, para ser usado como FS na PDT, 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 FSs destrutivos com seletividade às 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, Wainwright⁵⁸, em 1998, apresentou os FSs disponíveis para a realização da PDT antimicrobiana. De acordo com o autor, a utilização das porfirinas, um tipo de FS macrocíclico, é decorrente do seu emprego no tratamento fotodinâmico de câncer. Os derivados de hematoporfirina são uma combinação de FSs 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 fotoinativação 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 mostrado 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.

Em 1999, Wood et al.⁶¹, realizaram um estudo com o objetivo de determinar se a PDT tem efeito na estrutura e na população bacteriana de biofilmes orais humanos. O FS usado para esse estudo foi a ftalocianina de Zn(II) catiônica que já mostrou ser efetiva contra bactérias Gram positivas e Gram negativas em culturas planctônicas. Para a realização do estudo, ftalocianina Zn(II) (PPC) foi dissolvida em água à concentração de 1 mg/mL e guardada a -20°C até o uso. Pequenos discos de esmalte de dentes extraídos e esterilizados foram aderidos à superfície vestibular de 2 molares superiores de 8 voluntários. Os 2 dispositivos (1 controle e 1 teste) foram deixados por 7 dias, e foram, então, removidos e colocados em meio adequado para transporte (reduzidor e estéril, pH 8). Os dispositivos foram incubados com ftalocianina na concentração de 20 µg/ml por 01 hora. Depois irradiados usando luz branca 400W (lâmpada de filamento de tungstênio). Os controles foram expostos à droga ou à luz somente, e avaliados com microscópio confocal ou processados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os resultados encontrados mostraram que a ftalocianina foi incorporada ao biofilme e não foi removida com lavagem, o que mostra associação entre FS e biofilme. A ocorrência da inativação de bactérias (tanto Gram positivas, quanto Gram negativas)

demonstrou efetividade da PDT mediada pela PPC. Vacuolização e condensação do citoplasma foram os danos mais observados, com citoplasma aparentemente retraído da parede da membrana. As membranas pareciam estar mais definidas que o grupo controle. Após a PDT, o biofilme passou de heterogêneo e com presença de canais e espaços vazios em torno dos agregados bacterianos, para um biofilme com aproximadamente metade da espessura, menos denso e se assemelhando a colunas de agregados bacterianos se estendendo acima da superfície dentária. Segundo os autores, a PDT usando a ftalocianina catiônica causa redução do biofilme e pode ser de grande valia como terapia alternativa.

O objetivo do estudo de Jackson et al.²⁹, em 1999, foi avaliar se suspensões de *C. albicans*, em forma de leveduras e hifas, poderiam ser fotoativadas. 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 (2, 5, 15 e 30 minutos). Além disso, duas cepas de *C. albicans* com resistência ao 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 candidíase. Além disso, as duas cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol avaliadas foram inativadas pela PDT, no entanto, a redução obtida foi menor em relação aos resultados dos experimentos anteriores.

Em 1999, Gomes et al.²⁵ realizaram um estudo cujo propósito inicial foi comparar o curso de incorporação da alumino-ftalocianina tetra sulfatada (AIPcS₄) com o da alumino-ftalocianina (AIPc) em duas diferentes linhagens celulares (células linfoblastóides CCRF-CEM e células de feocromocitoma PC12) com expressões fenotípicas bem distintas. As células CCRF-CEM foram usadas como modelo para avaliação dos efeitos de diferentes períodos de pré-irradiação na eficiência fotossensibilizadora das AIPcS₄ e AIPc, já que ela permite a entrada máxima do FS. A AIPcS₄ foi preparada a 10 mmol/L, enquanto a AIPc, a 1 mmol/L. As culturas celulares foram adequadamente preparadas e mantidas a 37°C em incubadora com 5% CO₂. As ftalocianinas foram, então, adicionadas às culturas celulares diretamente das soluções estoque. A incorporação da AIPc pelas células PC12 e CCRF-CEM foi medida através da extração do FS intracelular, após 10 minutos ou 6 horas de incubação com o FS, e a

absorbância dos sobrenadantes foi mensurada por espectrofotômetro. Pela mesma razão, após incubação das células com AIPcS₄ por 6 ou 24 h, a fluorescência nas células foi determinada usando espectrofotômetro. A fluorescência das células não incubadas com a ftalocianina foi usada como controle e a incorporação da AIPcS₄ foi, então, calculada. Após incubação com os FSs, as culturas celulares foram irradiadas com uma lâmpada de tungstênio/halogênio de 2000 W, e o efeito de diferentes doses de luz sob as mesmas condições, também foi avaliado. A fotossensibilização foi avaliada usando o ensaio colorimétrico de MTT, para avaliação do crescimento e sobrevivência celular após PDT. Os resultados mostraram que a incorporação da AIPc foi maior nas células CCRF-CEM que nas PC12 para cada período de incubação avaliado. O máximo de incorporação da AIPc foi atingido aos 10 min de incubação com as duas linhagens celulares. O acúmulo de AIPcS₄ foi significativamente mais lento, com o máximo de incorporação alcançado após 6 h de incubação com as duas linhagens celulares. Na avaliação das doses de luz, após incubação das células CCRF-CEM com AIPcS₄ por 6 h e irradiação com doses de 2 a 6 J/cm², houve uma pequena diminuição na redução do MTT. Quando pré-incubadas por 24 h, as mesmas doses tiveram maiores efeitos sobre a redução do MTT. Por outro lado, quando a fluência de luz foi aumentada, o efeito da PDT sobre as células foi quase independente do tempo de pré-irradiação com o FS. Além disso, para todas as doses de luz testadas, o efeito da irradiação sobre as células CCRF-CEM incubadas com AIPc foi praticamente independente do tempo de pré-irradiação. Entretanto, quando usadas doses de 2 J/cm², foi observada diferença significativa na redução do MTT após 10 min ou 6 h de incubação com a AIPc. Comparando o efeito da

fluência de luz sobre o crescimento celular, foi observado que, usando o mesmo período de pré-irradiação com o FS, a fototoxicidade foi maior quando as células foram irradiadas com 10 mW/cm², que quando irradiadas com 3 ou 5 mW/cm². Diante dos resultados, os autores concluíram que a eficiência fotossensibilizadora da AIPcS₄ sobre as células CCRF-CEM foi dependente do tempo de pré-irradiação com a ftalocianina e da fluência de luz utilizadas. Por outro lado, a fotossensibilização com a AIPc foi influenciada pela fluência de luz, mas não pelo tempo de pré-irradiação com a ftalocianina.

Machado³⁷, em 2000, 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 micro-organismos 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). Dentre as fontes de luz empregadas estão os lasers e diodos emissores de luz (LEDs). Os lasers, entretanto, apresentam elevado custo, enquanto os LEDs têm se tornado viável, possibilitando uma maior redução no custo dos procedimentos. A primeira geração de agentes FSs, 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.⁵, 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 FS para o interior celular, a ocorrência de danos na função de organelas como a mitocôndria e a inativação celular.

A fotoinativação de micro-organismos cutâneos foi objeto de estudo de Zeina et al.⁶², 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 micro-organismo 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.

Teichert et al.⁵⁶, em 2002 realizaram um estudo com o objetivo de determinar a eficácia da PDT mediada pelo azul de metileno no tratamento de candidíase em camundongos imunossuprimidos. Os autores verificaram a susceptibilidade de *C. albicans* presente em línguas de camundongos. 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), 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 ao laser. Entretanto, as concentrações de 450 e 500 mg/L eliminaram totalmente o micro-organismo da cavidade bucal dos animais após a ativação por luz.

Bliss et al.⁴, 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 micro-organismos 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 às 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 após 30 min de TPI. 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.

Chan, Wu¹² realizaram um estudo, em 2004, onde descreveram os efeitos da Cur sobre o ciclo de apoptose de células A431 fotossensibilizadas com Rose Bengal (RB). Para isso, células de carcinoma epidermal humano, A431, foram cultivadas e, para a PDT, foram incubadas em meios contendo diferentes concentrações de RB por 30 minutos a 37°C. Em seguida, iluminadas por lâmpada comum (120W) por 30 minutos. Para avaliação da ação da Cur na morte celular induzida por PDT, as células A431 incubadas somente com diferentes concentrações de Cur, expostas à PDT com RB ou expostas à PDT com RB após pré-irradiação com Cur. A Cur sozinha não teve efeito na viabilidade das células. Aproximadamente 60% das células morreram após PDT, entretanto, a pré-irradiação com Cur inibiu a morte celular de modo dose-dependente. Em seguida, os autores investigaram se a prevenção da morte celular induzida pela PDT, pela Cur, foi devido à inibição da apoptose. As células foram, então, tratadas, lisadas e os extratos celulares avaliados para identificação de proteínas de interesse. Os resultados mostraram que a Cur é um potente inibidor da apoptose induzida pela PDT. Ela previne as mudanças bioquímicas induzidas pela PDT por sua habilidade em captar o oxigênio singlete. Além disso, o pré-tratamento das células A431 com Cur inibiu a liberação de citocromo C pela mitocôndria, a atividade da JNK, ambos, marcadores bioquímicos para a apoptose. Conclui-se, portanto, que os mecanismos de ação da Cur consumida na dieta devem ser estudados por

proteger as células dos efeitos da PDT. Cuidados especiais devem ser tomados com pacientes em quimioterapia ou recebendo PDT.

Monfrecola et al.⁴⁰, em 2004, avaliaram o efeito in vitro da PDT com ácido aminolevulínico-5 associado a luz visível na *Candida albicans*. Suspensões do fungo foram preparadas contendo 10 unidades formadoras de colônia/ μ l. Para o experimento, 30 μ l da suspensão foram pré-incubadas com a droga em diferentes concentrações (125, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 750, 1000 mg/ml) por três horas no escuro. Após esse período, o microrganismo foi irradiado com uma dose de luz fixa (40 J/cm²) por uma fonte de luz visível com pico de emissão no comprimento de onda de 630 nm. As soluções contidas em cada tubo teste foram plaqueadas em SDA e incubadas por 48 horas, quando então as colônias foram contadas. Algumas espécies obtidas a partir de colônias tratadas com PDT foram fixadas em glutaraldeído e examinadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observou-se que o ALA associado à luz inibiu o crescimento da *Candida albicans* sendo dose dependente. As concentrações de até 250 mg/ml não afetaram o crescimento; a de 300 mg/ml reduziu em 50% o número de colônias e a completa inibição só ocorreu com concentrações acima de 600 mg/ml. Na MEV foram observadas alterações na membrana celular do fungo. A partir desses resultados, os autores concluíram que o ALA associado à luz visível foi capaz de inibir o crescimento da *Candida* in vitro. Segundo os autores, estudos futuros podem comprovar que a PDT é uma terapia com potencial para tratar candidose.

Sharma et al.⁴⁸, em 2005, realizaram uma abordagem científica acerca da Cur e suas propriedades. No que refere às propriedades químicas, a Cur age como potente doadora de átomos de hidrogênio em pH ácido, por outro lado, em

pH acima de 8, atua como doadora de elétrons, eliminando a atividade antioxidante. Essa substância é praticamente insolúvel em água, entretanto dissolve em acetona, dimetil sulfoxide (DMSO) e etanol. No ano de 1986, os primeiros estudos foram desenvolvidos no sentido de avaliar a estabilidade fotoquímica da Cur, além de sugerir o seu potencial na atividade antimicrobiana através da fotossensibilização. A máxima absorção ocorre na região ultra-violeta do espectro de luz, por volta dos 420 nm. Os autores ainda enfatizam que a Cur exibe baixa biodisponibilidade sistêmica após ingestão oral. Isso limita a obtenção de concentrações que causem efeitos benéficos nos tecidos alvo. Apesar disso, a obtenção de altos níveis de Cur no trato gastrointestinal, particularmente no cólo e reto, tem sido demonstrado em animais e humanos. Com relação às suas atividades biológicas, os autores afirmam que alguns estudos sugerem que a Cur induz efeitos sistêmicos relevantes na quimioprevenção do câncer em tecidos mamários e hepáticos. Outros estudos demonstraram citotoxicidade da Cur numa variedade de linhagens celulares cultivadas *in vitro*. Essa substância inibe a proliferação celular, induz apoptose e causa acúmulo das células na fase G2/M do ciclo celular. Esse acúmulo deixa as células mais suscetíveis aos efeitos citotóxicos da radiação, sugerindo que a Cur pode agir como radiosensibilizadora. A Cur também é capaz de inibir a proliferação celular e induzir apoptose de fungos e vírus. Os mecanismos responsáveis pela indução da apoptose são variados: instabilidade da p53, liberação de citocromo-C e pela geração de EROs. Como outras atividades biológicas, a Cur age como anti-inflamatório e antioxidante. A angiogênese, processo associado ao crescimento do tumor, é inibida pela Cur. Essa

substância afeta ainda as proteínas relacionadas à adesão célula-célula e inibe a produção de citocinas relevantes ao crescimento tumoral.

A Cur é um fotossensibilizador natural que apresenta grande potencial no tratamento de lesões orais. Entretanto, ela tem variações comportamentais a depender do veículo utilizado para levar a substância ao local da infecção. Quando em meio aquoso, os FSs tendem a causar danos às membranas citoplasmáticas e mitocondriais, enquanto que, quando em carreadores de albumina, as substâncias são depositadas, principalmente na matriz extracelular. Bruzell et al.⁶, 2005, realizaram esse estudo com o objetivo avaliar a fototoxicidade da Cur em células acinares de glândulas salivares em vários meios aquosos. Essa substância foi preparada em meios contendo DMSO 5%, em micelas não-iônicas, em ciclodextrinas, lipossomos e em polímeros hidrofílicos. Todas as soluções foram feitas com solução tampão (PBS) ao pH de 6,1, para evitar a degradação da Cur. Para a irradiação foi utilizada luz halógena de comprimento de onda entre 350 e 550nm, com pico máximo em 490nm. A iluminação foi feita de baixo pra cima para evitar a interferência da solução na chegada da luz às células em monocamadas. Os resultados mostraram que a solução de DMSO 5% com luz permitiu crescimento celular e que, associada à Cur e luz, a redução da viabilidade celular foi diretamente dependente da concentração de Cur. As curcuminas testadas (natural e sintética) mostraram comportamentos semelhantes na redução da viabilidade celular, quando testadas as mesmas concentrações e doses de luz. Na avaliação do tipo de morte celular, foi observado que o mecanismo pelo qual as células são mortas é dependente da concentração de Cur (0-13,5 μM). Em baixas concentrações (0,7 μM), em DMSO 5% e irradiadas a 6 J/cm^2 de luz azul, a maior parte das mortes

são por apoptose, enquanto que acima de 5 μM mais de 50% das mortes celulares foram por necrose, chegando a mais de 80% de mortes por necrose na concentração de 13,5 μM . Além disso, testes que confirmam morte por apoptose não apresentaram evidências positivas quando utilizadas soluções em DMSO 5%. Não houve formação de peróxido de hidrogênio no teste com Cur 13,5 μM em ciclodextrina 5% associada à iluminação.

Lambrechts et al.³⁵, 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 10^6 e 10^7 células/mL. Em seguida, essas suspensões foram incubadas com a porfirina catiônica TriP [4], na concentração de 25 μM , 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 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 micro-organismo. 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 ligar-se à parede celular da *C. albicans*, previamente a exposição luminosa. Durante a iluminação, ocorreram danos na membrana celular, que se tornou mais permeável à 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.

Chabrier-Roselló et al.¹¹, 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 micro-organismo 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 micro-organismo 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 FS 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 micro-organismo. A microscopia de fluorescência revelou captura uniforme de Photofrin® pelos organismos após 5 minutos. Foi verificada resistência na resposta adaptativa do micro-organismo 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 micro-organismo 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 aos efeitos fotodinâmicos é improvável.

Demidova, Hamblin¹⁹, 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 fotoinativação foi testada com a utilização dos FSs rose bengal, azul de toluidina e conjugado de polilisina, em várias concentrações, associados a uma fonte de luz não coerente, composta de

pacotes de fibras intercambiáveis. Inicialmente, as suspensões celulares dos três micro-organismos 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 200µL 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 à membrana celular dos micro-organismos 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 micro-organismos afetou 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 polilisina foi o FS mais efetivo para promover a fotossensibilização das bactérias e do fungo. A susceptibilidade dos três micro-organismos variou em decorrência do micro-organismo 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.

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 provoca o surgimento de efeitos colaterais nos tecidos próximos à 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.⁵², 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 às 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, foram feitas diluições seriadas de cada amostra (10⁻² e 10⁻³), plaqueadas em meio de cultura SDA e 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.³⁰ 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 micro-organismos patogênicos. A PDT parece oferecer muitas vantagens para o tratamento de infecções originadas por micro-organismos, tais como um amplo espectro de ação, a inativação de micro-organismos 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 micro-organismos, que exige uma maior quantidade de oxigênio singlete para que a inativação celular ocorra, em comparação com bactérias. Particularmente no caso da candidíase, a aplicação tópica de FS associada à luz para a inativação microbiológica parece oferecer um importante avanço para o tratamento de pacientes imunodebilitados, como os HIV positivos. 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.

Visando formas alternativas para o tratamento do carcinoma de nasofaringe, Koon et al.³⁴, 2006, estudaram a citotoxicidade da Cur em células da linhagem NPC/CNE₂. Além disso, avaliaram o modo de indução da morte

celular dessas linhagens celulares. A Cur foi diluída em DMSO, mantendo a concentração em solução menor que 0,1%. As células foram cultivadas, inoculadas em poços de uma placa de 96 orifícios e mantidas *overnight* para adesão. Em seguida, foram incubadas com diferentes concentrações de Cur (10, 20, 30, 40 e 50 μM). Para avaliação da toxicidade no escuro, as células foram incubadas com Cur por 48 horas. Por outro lado, para avaliação da fototoxicidade, as células foram expostas à luz visível após 24 horas de incubação com a Cur, e ainda incubadas por mais 24 horas após a irradiação. O teste de MTT foi usado para avaliar a viabilidade das células usadas no experimento. A citotoxicidade no escuro mostrou-se concentração-dependente. Cerca de 70% de morte celular foi observada após 48 horas de incubação com Cur a 20 μM . A fototoxicidade da Cur foi avaliada após exposição à luz visível. À medida que a dose de luz era aumentada, a toxicidade da Cur aumentava de maneira proporcional. Dessa forma, Cur 20 μM associada à dose de 300 kJ/m^2 induziu cerca de 95% de fototoxicidade celular. Os resultados sugerem que a aplicação de luz amplia a citotoxicidade induzida pela Cur em células NPC/CNE2. Na avaliação do tipo de morte celular induzida, a microscopia de fluorescência, mostrou encolhimento das células e descamação da membrana, caracterizando morte por apoptose.

Buytaert et al.⁸, em 2007, publicaram uma revisão de literatura baseada nos efeitos moleculares iniciados pela terapia fotodinâmica nas diferentes vias de morte celular. Segundo os autores, múltiplas cascatas sinalizadoras são ativadas concomitantemente nas células expostas ao estresse fotodinâmico e dependendo da localização subcelular do FS e conseqüentemente das espécies reativas de oxigênio, esses sinais são traduzidos em respostas adaptativas ou

de morte celular. Estudos recentes indicam que a PDT pode causar morte das células induzindo a apoptose ou outros tipos de morte celular (necrose ou morte celular por autofagia). A extensão do dano e a citotoxicidade após a PDT é multifatorial e depende de fatores como: a molécula do FS, sua localização no momento da irradiação, concentração do agente fotossensibilizante, dose de luz, intervalo entre a administração da droga e a irradiação, nível de oxigenização do tecido, dentre outros. A nível molecular, a destruição celular pela PDT é causada por danos irreversíveis aos alvos vitais, como membrana plasmática, membrana intracelular mitocondrial, lisossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Como em geral os FSs não se acumulam no núcleo, a PDT tem potencial mutagênico e genotóxico muito baixo por não causar dano ao DNA. Os FSs que se acumulam nas mitocôndrias ou retículo endoplasmático causam apoptose; enquanto, os que se acumulam na membrana plasmática ou lisossomos predispõem as células para necrose. A morte celular por apoptose é caracterizada por alterações no fenótipo envolvendo condensação nuclear e contração (encolhimento) celular generalizada. A necrose é caracterizada por intumescência celular e uma rápida perda da integridade da membrana plasmática, o que gera reação inflamatória devido à liberação de componentes celulares e moléculas pró-inflamatórias. A morte por autofagia celular se caracteriza pela presença de vacúolos autofágicos e ocorre uma digestão celular via lisossomo. Os autores concluíram que a compreensão das diferenças moleculares e a identificação desses tipos de morte é importante para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para a PDT no intuito de aumentar a eficiência dos tratamentos anti-tumorais.

Em 2007, Konopka, Goslinski³³, realizaram uma revisão de literatura onde abordaram as diversas aplicações da PDT na Odontologia nas diferentes áreas como: tratamento de câncer bucal, terapia para infecções bacteriana e fúngicas e diagnóstico fotodinâmico de lesões bucais potencialmente malignas. Segundo os autores, a PDT apresenta algumas vantagens, uma vez que não é invasiva, apresenta efeitos adversos moderados e seletividade para as células alvo sem causar danos aos tecidos subjacentes saudáveis, entre outras. Os autores acreditam que a PDT possa se tornar o tratamento de escolha para o câncer de cabeça e pescoço, incluindo tanto as lesões pré-malignas quanto lesões primárias, recorrentes e metástases. A PDT como terapia antimicrobiana foi iniciada há mais de um século, no entanto, com a descoberta dos antibióticos seu desenvolvimento ficou restrito. Com a emergência de várias cepas microbianas resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, a PDT voltou a ser considerada como possível tratamento. O desenvolvimento de resistência contra a PDT parece ser improvável, pois o oxigênio singlete e os demais radicais livres gerados interagem em diversas estruturas celulares por diferentes mecanismos. De acordo com alguns estudos, a PDT tem sido utilizada no controle de biofilmes bacterianos, pois atua tanto nos micro-organismos quanto na matriz extracelular, promovendo a desorganização do biofilme. Entretanto, os biofilmes de *C. albicans* mostraram ser menos suscetíveis à PDT antimicrobiana. Esse padrão distinto de suscetibilidade, quando comparado ao do biofilme bacteriano, pode ser explicado por diferenças estruturais entre os biofilmes fúngicos e bacterianos, ou pela inabilidade de a luz penetrar o espesso biofilme formado por espécies de *Candida*. Além disso, tem sido empregada no controle de agentes patogênicos periodontais, na desinfecção de canais radiculares e no

tratamento da estomatite protética. Os estudos recentes se baseiam na descoberta de FSs específicos, para que atuem nos patógenos selecionados e não promovam uma intensa destruição microbiana deixando o paciente susceptível a infecções oportunistas. Devido à facilidade de iluminação da cavidade oral, a PDT se torna uma terapia com potencial para ser aplicado clinicamente tanto no tratamento de infecções bucais como tratamento de câncer bucal e lesões com displasia epitelial. Segundo os autores, o futuro da terapia fotodinâmica depende das interações entre sua aplicação clínica e o desenvolvimento de inovações tecnológicas.

Donnelly et al.²⁰, em 2008, realizaram um trabalho de revisão de literatura sobre a terapia fotodinâmica como tratamento antifúngico. Em comparação com a terapia antibacteriana, a terapia antifúngica é limitada a um pequeno número de drogas. Além disso, o tratamento é longo e efeitos adversos e interações medicamentosas estão presentes. Com o aumento da expectativa de vida dos pacientes HIV positivos e imunossuprimidos, houve maior incidência de fungos resistentes às drogas disponíveis. Dessa forma, a terapia fotodinâmica tornou-se um tratamento alternativo para controle das infecções fúngicas devido à facilidade de seu mecanismo de ação (droga, luz e oxigênio) e à impossibilidade do fungo em desenvolver resistência a essa terapia. De acordo com a revisão, a localização do FS e sua seletividade para o micro-organismo são fatores imprescindíveis para o sucesso da PDT. Alguns estudos observaram que a *Candida albicans* como outras leveduras foram mais difíceis de serem inativadas pela PDT quando comparadas a bactérias Gram positivas. Essa dificuldade resultou na utilização de uma maior concentração de FS e um aumento da dose e luz. Os autores justificaram que isso ocorreu pela presença da membrana

nuclear, maior tamanho da célula e redução do número de alvos para o oxigênio singlete por unidade de volume da célula. Além disso, a similaridade da célula fúngica com a célula de mamíferos torna mais difícil a seleção do agente fotossensibilizante. Inúmeros FSs foram testados para tratamento antifúngico, dentre eles: fenotiazínicos, porfirinas, ácido aminolevulínico-5 e ftalocianinas. Esses FSs apresentaram sucesso na inativação de fungos, com mecanismos de ação específicos. Os autores sugerem que a seletividade desses FSs pelas células fúngicas e a ausência de relatos científicos de efeitos genotóxicos ou mutagênicos indicam o sucesso dessa terapia contra fungos. Segundo os autores é necessário que as empresas farmacêuticas e agências de fomento invistam recursos para o desenvolvimento de FSs específicos para células fúngicas com um sistema de distribuição da droga que a permite atuar unicamente em seu sítio de ação.

Soares et al.⁵¹, em 2009, analisaram a suscetibilidade de diferentes isolados de *Candida* à inativação fotodinâmica (PDI) e investigaram a inibição da adesão às células epiteliais bucais (CEB) através da fotossensibilização letal. Para este estudo, utilizaram o azul de toluidina (TOB) como FS e a luz LED. Foram utilizadas 9 cepas de *Candida* spp. isoladas de lesões orais da mucosa associadas ao uso e prótese: 6 de *C. albicans*, 2 de *C. tropicalis* e 1 de *C. parapsilosis*; e 3 cepas de referência, *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750 e uma de *C. parapsilosis* ATCC 22019. Um isolado clínico de *C. albicans* e um de *C. parapsilosis* foram classificados com resistentes ao fluconazol (MIC \geq 128 μ g/mL). Para otimização das condições de tratamento, o efeito das concentrações do FS e o efeito dos tempos de iluminação foram testados. A concentração de 25 μ M do FS foi escolhida e mantida, bem como o

tempo pré-irradiação de 5 minutos e de iluminação de 15 minutos (180 J/cm²). As suspensões celulares das 12 cepas de *Candida* foram preparadas e divididas em 4 grupos: sem tratamento (grupo 1); irradiado por LED, mas sem FS (grupo 2); exposto ao TBO, mas sem irradiação (grupo 3); e o grupo tratado com TBO e LED (grupo 4). Após tratamentos, 500 µL das suspensões foram inoculadas em 500 µL das suspensões de CEB já adequadamente isoladas e preparadas. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 1 hora e o número de leveduras aderidas às CEB foram quantificadas por microscópio de luz. Os 5 minutos de pré-irradiação foram suficientes para permitir a penetração do FS na célula. Os resultados dos grupos 1, 2 e 3 não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$), o que significa que o grupo sem nenhum tratamento foi semelhante aos efeitos somente da luz ou do FS sozinho, sem a ação da luz. Por outro lado, os grupos tratados com PDI tiveram redução significativa da viabilidade celular. A suscetibilidade à PDI mostrou-se semelhante entre as diferentes cepas. Assim como a PDI, os testes de adesão às CEB não mostraram resultados estatisticamente significantes entre os grupos 1, 2 e 3. Entretanto, o grupo tratado com TBO e LED teve uma média de 55% de inibição da adesão às CEB. No entanto, foram observadas variações entre as diferentes cepas: duas cepas de *C. albicans* tiveram 61,5% de inibição, enquanto uma teve apenas 34,5%; as cepas resistentes ao fluconazol de *C. albicans* e *C. tropicalis* tiveram 61% e 66% de inibição, respectivamente. Os autores concluíram, portanto, que a associação entre TBO e LED foi capaz de reduzir a viabilidade celular das cepas estudadas, como também a adesão às CEB, inclusive das cepas resistentes ao fluconazol.

Priyadarsini⁴⁵, em 2009, realizou uma revisão de literatura, onde abordou assuntos relacionados à Cur, como propriedades físico-químicas, a influência dos solventes e do pH nas propriedades fotofísicas do estado excitado da Cur e explicações acerca de sua degradação e fototoxicidade. A revisão apresenta a Cur como um pigmento extraído do rizoma da planta *Curcuma longa*, comumente usada na culinária indiana como tempero. O autor cita as propriedades farmacológicas da Cur, motivos pelos quais ela possui grande potencial de aplicação terapêutica na medicina indiana e chinesa. São elas a ação anti-inflamatória, anticarcinogênica, para tratamento de doenças neurológicas, cárdio-vasculares e doenças de pele, dentre outras. A Cur apresenta também, propriedades fototóxicas contra sistemas bacterianos. Com relação à solubilidade e estabilidade da Cur, o autor afirma que a Cur é praticamente insolúvel em água em pH 7,0, sendo, entretanto, solúvel em diversos solventes orgânicos, como metanol, etanol, DMF, DMSO, clorofórmio, acetomitrila, dentre outros. Na maioria dos solventes orgânicos, a Cur existe na sua forma de enol, mais estável que a forma de diceto. A Cur apresenta, na sua forma sólida, grande absorção na região UV do espectro de luz, com máxima absorção ente 408 e 434 nm. Com relação espectro de fluorescência, a máxima fluorescência é dependente da natureza do solvente, variando com a constante dielétrica e índice de refração. Em DMSO, a fluorescência máxima varia entre 535 e 560 nm. A máxima fluorescência, entretanto, parece ser independente do comprimento de onda usada para excitação, entre 300 e 470 nm. A Cur mostra-se estável em pH baixo em soluções aquosas alcoólicas, mas sofre degradação química e hidrólise em pH básico. O mecanismo de degradação não está claro. Em solventes orgânicos, a Cur sofre fotólise sob a luz UV e formação de 3

produtos de degradação. A exposição à luz do Sol promoveu maior formação de produtos de degradação que a fotólise por UV. Os autores relataram, ainda, que a Cur tem ação fototóxica, já bastante reportada, contra sistemas bacterianos e células de mamíferos. A fototoxicidade é dependente do oxigênio, e bactérias Gram negativas foram mais resistentes à PDT que as Gram positivas. O papel da Cur na atividade fotobiológica mediada pelo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é controversa, visto que alguns estudos mostram a formação dessas EROs, enquanto outros afirmaram que é captadora de $^1\text{O}_2$. A Cur apresenta vários alvos moleculares. Por ser uma molécula lipofílica, ela interage, primeiro, com a membrana celular e as proteínas de ligação da membrana e, então, é distribuída para diferentes partes da célula.

Uma vez que a atividade antifúngica da Cur foi avaliada por experimentos que utilizavam extratos crus da *Curcuma longa*, Martins et al.⁴⁰, 2009, realizaram esse trabalho e concentraram o interesse na avaliação da atividade antifúngica da Cur contra 23 cepas fúngicas de interesse clínico, assim como na sua habilidade de inibir a adesão de *Candida* spp. às células epiteliais humanas. Visando esse fim, análises in vitro da suscetibilidade das cepas foram procedidas usando Cur (0,5 – 256 mg/L) e fluconazol (0,06 – 64 mg/L) como controle positivo. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) foram encontradas, e os resultados mostraram que a Cur foi até 32 vezes mais potente que o fluconazol na completa inibição de uma cepa de *P. brasiliensis*. 32 mg/L de Cur foi capaz de causar completa inativação de 2 isolados clínicos de *C. dubliniensis*. Além disso, foram realizados testes de adesão, expondo *Candida* à MIC de Cur por 1h e, em seguida, incubando por mais 1h com CEB. Os resultados mostraram que a Cur foi capaz de inibir a adesão de espécies de *Candida* às

CEB e, os 2 isolados clínicos de *C. dubliniensis* (Cd22 e Cd28) foram os que tiveram maior redução na capacidade de adesão (63 e 74%, respectivamente). A partir dos resultados obtidos, os autores puderam concluir que a Cur teve maior atividade antifúngica sobre o crescimento celular e foi mais eficiente na inibição da adesão às CEB que o fluconazol.

Dovigo et al.²², em 2010, realizaram um estudo avaliando a atividade fotodinâmica do Photogem associado ao LED na inativação de 4 diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Para a realização do estudo, suspensões celulares foram obtidas e padronizadas numa concentração de 10^6 células/mL. A partir de então, foram testadas 9 condições experimentais para cada micro-organismo, cruzando 3 diferentes concentrações do FS (10, 25 e 50 mg/L) com 3 doses de luz (18, 25,5 e 37,5 J/cm²). Adicionalmente, o efeito da aplicação isolada do FS na ausência de luz e o efeito da luz somente foram avaliados. Um grupo sem FS ou luz foi usado como controle. As suspensões foram diluídas e plaqueadas, e, após 48 horas, a viabilidade celular foi avaliada através da contagem de colônias viáveis e cálculo do número de ufc/mL. Para todas as espécies avaliadas, houve redução significativa das colônias viáveis após PDT. Houve completa inativação de *C. albicans* (associando 50 mg/mL com 18 J/cm² ou 10mg/mL com 25,5 J/cm²), da *C. dubliniensis* (associando 25 mg/mL com 18 J/cm² ou 10mg/mL com 25,5 J/cm²) e da *C. tropicalis* (associando 25 mg/mL com 25,5 J/cm² ou 10mg/mL com 37,5 J/cm²). Foi observada uma redução significativa da viabilidade celular da *C. krusei*, mas nenhuma associação entre concentração e dose de luz testada nesse estudo causou completa fotoinativação desta espécie. Esses resultados sugerem que a PDT é um método efetivo na inativação de fungos, apresentando

efeito fungicida em suspensões celulares de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, e causando significativa redução da viabilidade celular da *C. krusei*.

Mang et al.³⁸, 2010, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a habilidade da PDT na inativação de diferentes espécies de *Candida* padrão, bem como de isolados clínicos de pacientes HIV-positivos. Para o estudo, foram testadas cepas ATCC de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Além disso, uma cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol (FL), uma de *C. glabrata* resistente ao FL e à anfotericina B (AB), e uma FL resistente, uma cepa de *C. guilliermondi* AB resistente, uma de *C. parapsilosis* sensível ao FL e uma cepa de *C. krusei* FL e AB resistente foram isoladas e avaliadas no estudo. O FS testado foi o Photofrin® e a fonte emissora de luz, o KTP: YAG-DYE LASER ($\lambda=630\text{nm}$), com potência de 150 mW/cm^2 e doses de luz: 45, 90 e 135 J/cm^2 . Os resultados mostraram que, no grupo de células ATCC, a aplicação do FS na ausência de luz não determinou redução significativa da viabilidade celular, demonstrando ausência de toxicidade no escuro. Entretanto, os grupos submetido à PDT, com tempo de pré-irradiação de 1 ou 24 horas, apresentaram redução de viabilidade celular dose-dependente; todas as cepas mostraram sensibilidade à PDT, embora a *C. krusei* tenha mostrado menor sensibilidade na dose de 45 J/cm^2 , porém significativa morte com 135 J/cm^2 . Os resultados com os isolados clínicos mostraram que todas as cepas (FL resistente, FL e AB resistente, FL sensível e AB resistente) mostraram sensibilidade à PDT e comportamentos similares aos das cepas ATCC. Inclusive a *C. krusei* apresentou menor sensibilidade na dose de 45 J/cm^2 , porém significativa morte com 135 J/cm^2 . A partir dos resultados, foi possível concluir que as cepas

testadas, sejam elas ATCC ou isolados clínicos resistentes a medicamentos, foram sensíveis aos efeitos tóxicos da PDT.

Para avaliar a eficácia do PDT na morte de cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol, Dovigo et al.²³, 2011, avaliaram diferentes concentrações do FS (Photogem: 2,5, 5, 10, 25 e 50 mg/L) e doses de luz LED (10,5, 18, 25,5 e 37,5 J/cm²) com o objetivo de encontrar a concentração mínima do FS e dose de luz que promoveria inativação completa das cepas em culturas planctônicas. Numa segunda etapa do experimento, a combinação do FS e luz (LED) mais adequada para a fotoinativação foi avaliada contra biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*. Para esse estudo foram usados 6 isolados de pacientes com cepas resistentes ao fluconazol (FR): *C. albicans* 10R, 15R, 23R / *C. glabrata* 50R, 63R e 87R. Adicionalmente, cepas ATCC foram usadas como referência. Às suspensões padronizadas de *Candida* (10⁶ células/ml), o FS foi adicionado e, após a incubação no escuro por 30 minutos (tempo de pré-irradiação) cada placa foi irradiada por LED (Grupos P+L+). Para determinar se o FS sozinho tinha algum efeito na viabilidade celular, poços adicionais foram confeccionados sob as mesmas condições que as anteriores, exceto pela exposição ao LED (P+L-). O efeito do LED sozinho foi determinado pela exposição das células ao LED sem adição do FS (P-L+). Suspensões sem exposição ao FS ou ao LED foram usadas como controle geral (P-L-). Para determinar a viabilidade celular o número de ufc/mL foi calculado. A completa inativação de todas as cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol foi alcançada com 50 mg/L e 18 J/cm², enquanto as cepas resistentes ao fluconazol de *C. glabrata* foram inativadas com 25 mg/L e iluminação com 25,5 e 37,5 J/cm². Para completa inativação das cepas ATCC de *C. albicans* e *C. glabrata*,

as concentrações exigidas foram menores. A PDT foi capaz de reduzir a viabilidade dos biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, quando expostos a 25 mg/L do FS e 37.5 J/cm² de luz. Apesar disso, a redução do número de colônias viáveis foi menor que 1 log₁₀ em todo o experimento, sugerindo que os organismos quando organizados em biofilmes podem ter sua susceptibilidade à PDT reduzida.

Em 2011, Pereira et al.⁴³ realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a suscetibilidade de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* à PDT. Para essa finalidade, os autores confeccionaram corpos-de-prova de resina acrílica, sobre os quais os biofilmes cresceriam. Suspensões celulares de *C. albicans* ATCC 18804, *S. aureus* ATCC 6538 e *S. mutans* ATCC 35688 foram padronizadas a 10⁶ células/mL. Os autores distribuíram os discos de resina acrílica em 7 grupos, de acordo com o biofilme que estava sendo desenvolvido: GI – simples de *C. albicans*; GII – simples de *S. aureus*; GIII – simples de *S. mutans*; GIV – biofilmes de *C. albicans* e *S. aureus*; GV – biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans*; GVI – biofilmes de *S. aureus* e *S. mutans*; e GVII – biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. A seguir, 100 µL das suspensões padronizadas de cada espécie foram individualmente inoculados em uma placa de 24 orifícios contendo um corpo-de-prova de resina acrílica e 2 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion), de acordo com o grupo (GI a GVII) desejado. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 5 dias, onde os biofilmes foram desenvolvidos. O FS utilizado no estudo foi o Azul de Metileno (AM), e a fonte emissora de luz foi o laser de Fosfeto Índio-galio-alumínio. Cada grupo de biofilmes foi submetido a 4 condições experimentais: S+L+ (expostos ao AM e ao laser), S+L- (expostos ao AM, mas não expostos à luz), S-L+ (expostos ao laser,

mas não ao AM) e S-L- (grupo controle, não expostos ao laser ou ao AM). Após o quinto dia, os discos de resina acrílica foram lavados para a remoção de células não aderidas e transferidos para outros poços da placa de 24 orifícios. Então, 100 µL de AM foram adicionados aos grupos S+L+ e S+L-, enquanto 100 µL de solução salina foram adicionados aos grupos S-L- e S-L+. As amostras foram deixadas no escuro por 5 minutos (tempo de pré-irradiação), e os grupos S+L+ e S-L+ foram iluminados na dose de 350 J/cm². Ao final dos experimentos, as células foram desprendidas dos corpos-de-prova e submetidas a diluições seriadas e plaqueamento para a contagem de colônias e cálculo das ufc/mL. A microscopia eletrônica de varredura foi usada pelos autores para avaliar os efeitos da PDT. Os resultados mostraram que os biofilmes simples apresentaram maior suscetibilidade à PDT, quando comparados aos de múltipla-espécies. Adicionalmente, os biofilmes simples de *C. albicans* apresentaram maior resistência à inativação que os biofilmes simples de *S. aureus* e *S. mutans*. Na análise em MEV foi possível observar que a PDT foi capaz de reduzir a quantidade de agregados celulares e matriz polimérica extracelular dos biofilmes simples e multi-espécies. Entretanto, os dados sugeriram que a fotoinativação ocorreu principalmente nas camadas superficiais dos biofilmes.

Dovigo et al.²⁴, 2011, estudaram os efeitos da PDT mediada pela Cur em *C. albicans*. Os autores cultivaram *C. albicans* ATCC 90028 em culturas planctônicas e em biofilmes de 48 horas. As suspensões celulares foram padronizadas a 10⁷ células/mL. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para cavidades de uma placa de 96 orifícios. As amostras foram submetidas a 4 condições experimentais: P-L- (amostras controle que não receberam Cur ou luz); P+L-(amostras sensibilizadas com a Cur, porém não iluminadas); P-L+

(amostras que não foram sensibilizadas com a Cur, mas foram iluminadas) P+L+ (amostras sensibilizadas pela Cur e iluminadas). Alíquotas de 100 μL de Cur foram adicionadas às amostras P+L+ e P+L- sensibilizadas com 9 concentrações de Cur (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 μM). Às amostras que não receberam a Cur (P-L- e P-L+), foram adicionados 100 μL de solução salina estéril. Em seguida, as suspensões foram mantidas no escuro por 20 minutos (tempo de pré-irradiação), e as amostras que receberam luz foram iluminadas por uma dose de 37,5 J/cm^2 com aparelho de LED azul ($\lambda=455\text{ nm}$). As suspensões foram diluídas e plaqueadas. Após 48 horas a 37°C, foi feita a contagem de colônias viáveis e o número de ufc/mL foi calculado. Após obtenção dos resultados iniciais dos experimentos, as concentrações de 5, 10 e 20 μM foram testadas, submetendo as suspensões a doses menores de luz (1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,60; 13,20 e 26,4 J/cm^2). A influência do tempo de pré-irradiação também foi avaliada associando Cur 20 μM ao LED após incubação por 5 e 20 minutos no escuro. Os autores ainda avaliaram a influência do oxigênio singlete na efetividade da PDT mediada pela Cur, através do uso de supressores de oxigênio singlete. Para a formação dos biofilmes, 100 μL das suspensões padronizadas foram individualmente transferidas para orifícios de placas de 96 cavidades e incubados por 48 horas a 37°C. As amostras foram submetidas às concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 μM de Cur, permaneceram no escuro por 5 ou 20 minutos e foram iluminadas (P+L+ e P-L+) na dose de 5,28 J/cm^2 . Após os experimentos, a viabilidade celular foi avaliada por meio da redução do sal de XTT. Além de avaliar os efeitos da PDT contra as culturas de *C. albicans*, foram feitas análises dos efeitos da PDT sobre macrófagos e análises do espectro de absorção e fluorescência da Cur. Os resultados desse

estudo mostraram que o espectro de absorção da Cur reduziu progressivamente à medida que o tempo de iluminação aumentou. Após a dose de $0,4 \text{ J/cm}^2$, aproximadamente 70% da Cur já havia sido degradada. Adicionalmente, doses acima de $5,28 \text{ J/cm}^2$ não influenciaram a toxicidade da PDT contra *C. albicans*. Os melhores resultados contra culturas planctônicas foram obtidos com as concentrações de Cur de 5, 10 e $20 \mu\text{M}$. Além disso, a concentração de $20 \mu\text{M}$ associada ao LED $5,28 \text{ J/cm}^2$ foi capaz de resultar em completa inativação das culturas planctônicas. O TPI de 5 ou 20 minutos não promoveu mudanças na fotoinativação das células. Entretanto, a remoção da Cur previamente à iluminação promoveu redução acentuada dos efeitos fototóxicos da Cur. O uso de supressores de oxigênio singlete não modificou os resultados obtidos, sugerindo que a PDT mediada pela Cur independe da produção de oxigênio singlete. Para os biofilmes, as maiores reduções no metabolismo celular foram alcançadas com $40 \mu\text{M}$ e TPI de 20 minutos. A PDT contra macrófagos demonstrou provocar redução do metabolismo celular quando concentrações acima de $1 \mu\text{M}$ foram usadas. Quando o mesmo protocolo foi usado contra *C. albicans* e os macrófagos ($20 \mu\text{M}/5,8 \text{ J/cm}^2$), *C. albicans* foi completamente inativada, mas o mesmo não aconteceu com os macrófagos, demonstrando que a *C. albicans* é mais suscetível aos efeitos fototóxicos da PDT que os macrófagos. Diante dos resultados desse estudo, os autores puderam concluir que a PDT mediada pela Cur foi efetiva contra *C. albicans*, e que os efeitos fotodinâmicos são grandemente aumentados quando a Cur está presente no meio circundante.



Material e Método

4 Material e Método:

4.1 Materiais

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 (ATCC 90028).
2. Cultura de *Candida glabrata* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA (ATCC 2001).
3. Cultura de *Candida dubliniensis* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA (ATCC 7987).
4. Água destilada.
5. Meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), produzido pela Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA; Lote nº 102833.
6. Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com Cloranfenicol, produzido pela Himedia, Índia; Lote nº 66484.
7. Meio de cultura RPMI 1640, produzido pelo Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA; Lote nº 127K83042.
8. Curcumina/Curcumin, pureza $\geq 95\%$, marca Fluka, produzida por Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; Lote nº 31908326.
9. Dimethyl Sulfoxide (DMSO), pureza $\geq 99,9\%$, produzido por Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; Lote nº 02944DE

10. Sal de MOPS (Ácido 3-N-Morfolinopropanossulfônico), produzido pela Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA; Lote nº 098K0033.
11. Cloreto de Sódio (P.A.-A.C.S.), produzido pela Qhemis, Cotia, São Paulo, Brasil; Lote nº Q0021.
12. Cloreto de Potássio (P.A.-A.C.S.), produzido pela Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil; Lote nº 32811.
13. Fosfato de Sódio Bibásico Anidro, produzido pelo laboratório Synth, Diadema, São Paulo, Brasil; Lote nº 127403.
14. Fosfato de Potássio Mono. P.A.-A.C.S., produzido pela Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil; Lote nº 31963.
15. D-glicose Anidra (Dextrose) P.A.-A.C.S., produzida pelo laboratório Synth, Diadema, São Paulo, Brasil; Lote nº 126228.
16. Acetona P.A.-A.C.S., produzida pelo laboratório Qhemis, Cotia, São Paulo, Brasil; Lote nº 32915.
17. Menadiona, produzida por Sigma Co., St. Louis, MO, EUA; Lote nº 065K0230
18. Pontas descartáveis para micropipeta, fabricadas pela Axygen Scientific, Union City, California, EUA.
19. Micotubos tipo Eppendorfs Graduado, produzido por Homo Polymer-Boie Proof.
20. Sal de Tetrazólium (XTT), produzido pela Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA; Lote nº 128K1275.
21. Placa de orifícios TPP® com 96 cavidades de fundo chato estéril, embaladas individualmente, fabricadas pela TPP, Trasadingen, Suíça.

22. Tubos tipo Falcon de 50 mL, fundo cônico estéril, produzidos pela TPP, Trasadingen, Suíça.

23. Frasco coletor universal translúcido estéril 80mL;

24. Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis, estéreis, fabricadas pelo J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, Paraná, Brasil.

4.1.2 Instrumentos

1. Sistema de filtração a vácuo com poros de 0,22 μ m, estéril e embalado individualmente, 500 mL, fabricado pela TPP, Trasadingen, Suíça.

2. Tubos de ensaio, fabricados por Pyrex, Massachusetts, EUA.

3. Béquer graduado, fabricado pela Vidrolabor, São Paulo, Brasil.

4. Erlenmeyer graduado, fabricado pela Vidrolabor, São Paulo, Brasil.

5. Micropipeta de 20-200 μ L, fabricada pela Boeco, Alemanha

6. Micropipeta de 100-1000 μ L, fabricada pela Boeco, Alemanha

7. Micropipeta de 1-10 mL, fabricada pela Boeco, Alemanha

8. Micropipeta de 1-5 mL, fabricada pela Boeco, Alemanha

9. Micropipeta Multicanal HTL Discovery Comfort, 12 Canais, 50-300 μ L, fabricada pela HTL, Warsaw, Polônia.

10. Bico de Bunsen, fabricado por J.Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, Paraná, Brasil.

11. Alça para inoculação de micro-organismos, fabricadas pela Lab Plast, Osasco, São Paulo, Brasil.

12. Alça de Drigalsky, fabricada pela Vidrolabor, São Paulo, Brasil.

4.1.3 Equipamentos

1. Balança de precisão, fabricada por Gehaka – Indústria e Comércio Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil Modelo: BG 400 No 016450;
2. pHmetro de bancada, fabricado pela qualxtron, modelo QX 1500 plus;
3. Centrífuga, fabricada por Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha. Modelo: 5810R;
4. Centrífuga Revan, fabricada por Revan do Brasil Modelo: Ciclo CI;
5. 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;
6. Autoclave vertical, fabricada pela Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil Modelo : AV 60 No 6614;
7. Estufa para secagem e esterilização, fabricada por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil Modelo: MA 033 Série: 9819;
8. Espectrofotômetro – Biospectro, produzido por Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil. Modelo: SP-220;
9. Espectrofotômetro – produzido pela Ocean Optics Inc, Dunedin, FL, USA. Modelo: USB – 4000, (Software: SpectraSuite);
10. Agitador de tubos, fabricado por Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil Modelo: AP 56 Série: 9803;

11. Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Limitada, Piracicaba, São Paulo, Brasil Modelo – MA 0324 Série – 9819011;

12. Incubadora de bancada shaker, fabricada por Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil. Modelo: Q816M20;

13. Leitora automática de microplacas de 96 poços, 405-750nm, oito canais, fabricada por Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China. Modelo TP Reader;

14. Mesa difusora de iluminação com LEDs azuis (455 nm) desenvolvido no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos (IFSC), intitulado “*Bio Table*”.

4.2.1 Preparo dos materiais microbiológicos:

O Tryptic Soy Broth (TSB) é um meio de cultura que foi preparado para a reativação das espécies de *Candida* estudadas para as culturas planctônicas. É considerado universal, permitindo o crescimento de vários tipos de microorganismos. 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 e misturada a fim de garantir a completa dissolução do meio de cultura. Após o preparo, o meio foi esterilizado em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos, a seguir, o recipiente foi deixado ao ar livre até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, foi armazenado em geladeira a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais. Alíquotas de 5 mL do meio de

cultura preparado foram pipetadas e dispensadas individualmente em tubos do tipo Falcon, que foram devidamente identificados e datados.

O meio de cultura RPMI 1640 foi preparado para a reativação das espécies de *Candida* usadas para as culturas em biofilmes. RPMI 1640 é recomendado para o crescimento da maioria das *Candida* spp. Para o preparo do meio, inicialmente é necessário ressuspender o RPMI 1640 em 900 mL de água destilada. Em seguida, foram dissolvidos 34,32 g de MOPS e, com o auxílio de um phmetro, o pH da solução foi ajustado para 7,0, usando HCl ou NaOH. Toda a solução foi colocada numa proveta calibrada e o seu volume foi complementado até 1 L com água destilada. Em seguida, o meio foi esterilizado por filtração com uma membrana de porosidade de 0,22 μm e, posteriormente, armazenado em geladeira à temperatura de aproximadamente 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais. Alíquotas de 5 mL de RPMI 1640 foram pipetadas e dispensadas individualmente em tubos do tipo Falcon. Esses tubos foram devidamente identificados, datados e incubados por 48 horas a 37°C para controle de esterilidade.

A solução salina foi usada nas lavagens das células, ressuspensão e padronização das suspensões celulares. Além disso, foi usada nas diluições seriadas realizadas após os testes em culturas planctônicas deste estudo. A solução foi preparada pela diluição completa de 8,5 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada. Após a dissolução, a solução salina resultante, na concentração de 0,15 M, 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 hidrofóbico 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 à temperatura de aproximadamente 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais.

A solução tampão Phosphate Buffered Saline (PBS) é uma solução salina difusora de fosfato, utilizada para a lavagem das células previamente à formação dos biofilmes e para a lavagem dos biofilmes, previamente à PDT, a fim de remover as células não aderidas. Para a sua obtenção, foram preparadas duas soluções (A e B). Para o preparo da solução A, foi utilizada uma proporção de 4 g de NaCl, 0,12 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de KCl para 250 mL de água destilada. Para o preparo da solução B, uma proporção de 0,72 g de Na_2HPO_4 para 250 mL de água destilada foi utilizada. A seguir, as soluções foram esterilizadas no interior de garrafas apropriadas em autoclave vertical a 121°C por 20 minutos e resfriadas, lentamente, até atingirem a temperatura ambiente. Após o resfriamento, as soluções foram misturadas em uma única garrafa que foi, então, coberta com papel alumínio, identificada e datada.

O SDA contendo 5 µg/mL de cloranfenicol é um meio seletivo para fungos e foi usado nas sementeiras das placas de Petri após procedimentos experimentais envolvendo as culturas planctônicas. Para o preparo do meio de cultura, foram utilizados 65 g do pó para 1 L de água destilada, conforme a proporção recomendada pelo fabricante. Após dissolução completa do meio de cultura, o béquer contendo a mistura foi levado à autoclave vertical para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, ainda na fase líquida, cerca de 20 mL do meio foi vertido em placas de Petri estéreis descartáveis, mantendo proximidade de 10 cm da chama do bico de busen. As placas de Petri

foram individualmente fechadas e mantidas em temperatura ambiente até a completa solidificação do meio de cultura. Após a solidificação, todas as placas de Petri foram devidamente identificadas e datadas. 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 micro-organismos (diluição seriada por quadrante). Finalmente, as placas de Petri foram armazenadas em geladeira a 5°C para serem utilizadas nos procedimentos de semeadura dos micro-organismos.

O PBS 200 mM é a solução de PBS adicionada de glicose a 200 mM que foi usada para preparo da solução final do XTT para o ensaio de redução do sal de tetrazolium XTT. Para o preparo da solução de PBS 200 mM, as soluções A e B foram obtidas como descrito anteriormente para a obtenção do PBS. Após sua esterilização, 18 g de glicose foram adicionados à solução A, que foi filtrada a vácuo e misturada à solução B em uma garrafa. A seguir, essa garrafa foi também coberta com papel alumínio, identificada e datada.

Para o preparo da solução final do XTT e realização dos ensaios de redução do sal 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT), foram utilizadas solução de PBS 200 mM,⁵⁰ solução de XTT e solução de menadiona. A solução de XTT foi preparada por meio da mistura de água Milli-Q com o pó de XTT a uma concentração de 1 mg/mL. Essa mistura foi filtrada a vácuo, e alíquotas de 8 mL foram individualmente dispensadas em tubos Falcon de 15 mL, o qual foi mantido a -70°C até o momento da realização do experimento. A solução de menadiona foi preparada pela mistura de 0,007 g de pó de menadiona em 1 mL de acetona a

0,4 mM. A solução resultante foi vertida em tubo eppendorf e submetida a um procedimento de diluição seriada até 10^{-2} . Esta solução foi preparada imediatamente antes de cada experimento e foi utilizada a diluição de 10^{-2} . Para a obtenção de 200 μ L da solução final do XTT, as proporções utilizadas na mistura dos reagentes foram: 158 μ L de PBS 200 mM / 40 μ L de sal de XTT / 2 μ L de menadiona.

4.2.2 Aplicação da terapia fotodinâmica

PREPARO DO AGENTE FOTOSSENSIBILIZADOR E DA FONTE DE LUZ

A fotossensibilização das amostras de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* foi realizada com a utilização do agente fotossensibilizador curcumina (Cur). A Cur utilizada para fins de pesquisa neste estudo é fabricada nos Estados Unidos e apresenta-se na forma de um pó amarelo-alaranjado. Em solução, a Cur apresenta uma banda característica de absorção com pico máximo em, aproximadamente, 430 nm (Figura 1).

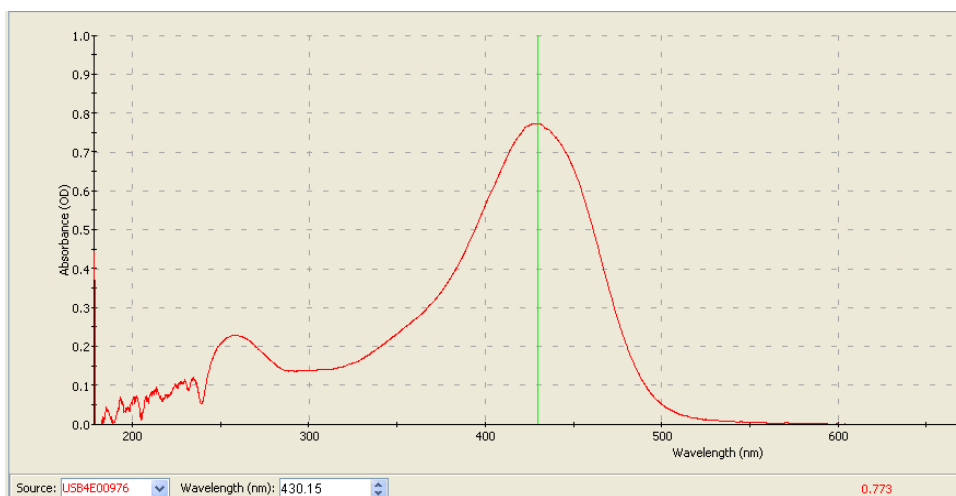


FIGURA 1 - Print Screen da curva de absorção de luz. Absorbância de 0,773 no comprimento de onda de 430,15 nm.

Para a realização deste experimento, 0,006 g do pó de Cur foi pesado e, em seguida, despejado no interior de um balão com calibração de volume, onde foi diluído em 1 mL de DMSO, dando origem a uma solução de 0,016 M de Cur. Essa solução, chamada de “Solução Mãe”, fora armazenada em microtubo de plástico, adequadamente vedado com filme de plástico e alojado no interior de um frasco de alumínio com rosca e fita isolante para impedir a penetração do oxigênio e da luz. A partir dessa solução, alíquotas de 75 μL de Cur 0,016 M foram misturadas a 1.925 μL de DMSO, dando origem à solução estoque de 600 μM (Figura 2), usadas para obtenção das concentrações dos experimentos com culturas planctônicas e biofilmes. A curva de absorção de luz da Cur diluída em DMSO utilizada neste estudo pode ser observada através de um *print screen* da leitura de um espectrofotômetro a 430,15 nm (Figura 1).



FIGURA 2 - Solução estoque de Cur a 600 μM envolvida em papel alumínio até o momento das diluições.

A capacidade fotossensibilizadora da Cur foi avaliada por meio da utilização de cinco concentrações desse agente: 5, 10, 20, 30 e 40 μM . Para isso, alíquotas da solução estoque de Cur (600 μM) foram diluídas em solução

salina estéril, até a obtenção das cinco concentrações do FS, mantendo, em todas as concentrações finais, a mesma matriz de 10% de DMSO em solução. As concentrações usadas nos experimentos com culturas planctônicas foram de 5, 10 e 20 μM . Elas foram, entretanto, preparadas nas concentrações de 10, 20 e 40 μM , o dobro das concentrações finais desejadas, já que, quando estas soluções foram adicionadas a iguais volumes de suspensões de *Candida* spp., a concentração da Cur foi reduzida à metade, atingindo-se as concentrações finais de 5, 10 e 20 μM , respectivamente. Pelo mesmo motivo, as soluções foram preparadas com 20% de DMSO e, quando diluídas no mesmo volume de suspensão celular, essa concentração cai para 10%. Para os experimentos com biofilmes, as concentrações usadas foram de 20, 30 e 40 μM . É importante ressaltar que a Cur é uma substância fotossensível, isto é, pode sofrer degradação de seus componentes quando exposto à luz. Assim, a manipulação dessa substância durante o preparo da solução estoque e, posteriormente, na sensibilização dos micro-organismos, foi realizada em ambiente escuro.

O preparo das diluições a partir da solução estoque de Cur 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 proporções desejadas (ver Apêndice 1).

Para os experimentos com as suspensões celulares, as soluções de Cur foram preparadas no dobro das concentrações desejadas, conforme explicado anteriormente. Para a obtenção de 1,5 mL de solução em qualquer concentração, 300 μL (20%) foi da mistura entre Cur e DMSO. Os 1200 μL restantes (80%) foram de solução salina estéril. Para a solução de 10 μM , além

dos 1200 μL de solução salina estéril, foram adicionadas alíquotas de 25,5 μL de Cur a 600 μM e 274,5 μL de DMSO; para a solução de 20 μM , alíquotas de 51 μL de Cur 600 μM e 249 μL de DMSO foram adicionadas aos 1200 μL de solução salina estéril. Para a obtenção de solução de 40 μM , 101,5 μL de Cur 600 μM e 199,5 μL de DMSO foram adicionadas à solução salina estéril.

Para os experimentos com biofilmes, maiores quantidades das soluções de Cur foram preparadas e, como foram colocadas diretamente sobre o biofilme, os cálculos foram feitos para obtenção das concentrações finais desejadas (20, 30 e 40 μM em 10% de DMSO). Então, para a obtenção de 9000 μL das soluções de Cur, 900 μL (10%) correspondia à mistura da Cur em DMSO e 8100 μL (90%) de solução salina estéril. Portanto, para conseguirmos a concentração final de 20 μM , alíquotas de 306 μL de Cur 600 μM e 594 μL de DMSO foram adicionadas aos 8100 μL de solução salina estéril. Da mesma forma, para obtenção da solução de Cur a 30 μM , alíquotas de 450 μL de Cur 600 μM e 450 μL de DMSO foram adicionadas aos 8100 μL de solução salina estéril. Finalmente, para a obtenção da solução de 40 μM , alíquotas de 603 μL da Cur 600 μM e 297 μL de DMSO foram adicionadas aos 8100 μL de solução salina estéril (ver Apêndice 1). As soluções foram preparadas e agitadas vigorosamente para sua completa homogeneização.

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 3). 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 22 mW/cm^2 , e a luz emitida se encontra numa estreita faixa do espectro fotomagnético, predominantemente em 455 nm , próximo da 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:

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

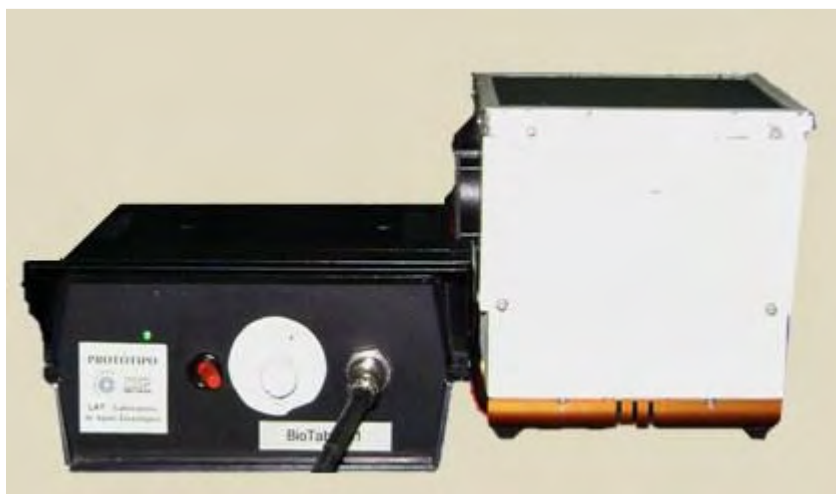


FIGURA 3 - *Bio Table*: Aparelho difusor de luz LED num comprimento de onda predominante de 455 nm .

Para a avaliação da efetividade da PDT na inativação de suspensões celulares de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*, foi testada apenas uma dose de luz: $5,28 \text{ J/cm}^2$.²⁴ Para avaliação da efetividade da PDT sobre biofilmes dos mesmos micro-organismos, foram testadas as doses de $5,28$ e $10,56 \text{ J/cm}^2$.

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 4 e 8 minutos para 5,28 e 10,56 J/cm², respectivamente. Os cálculos realizados para obtenção dos tempos de iluminação estão descritos no Apêndice 2.

MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS AVALIADAS

Os micro-organismos selecionados para execução deste estudo foram três diferentes cepas de *Candida*: uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 90028), uma de *C. dubliniensis* (ATCC 7987) e uma de *C. glabrata* (ATCC 2001). As culturas dos três micro-organismos testados neste estudo foram armazenadas em meio de cultura YEPD acrescido de glicerol no interior de microtubos a -70°C, até o momento de sua utilização.

Experimentos com culturas planctônicas: Para a realização dos experimentos em culturas planctônicas, os micro-organismos foram individualmente semeados em SDA com Cloranfenicol e incubados em estufa microbiológica para sua reativação por 48 horas. Com o auxílio de uma alça loop, duas alçadas de cada levedura recém cultivada foram inoculadas em 10 mL de TSB contido em um tubo do tipo Falcon, o qual foi incubado a 37°C durante 16 horas (período denominado *overnight*). Após incubação, o tubo Falcon foi agitado vigorosamente por 30 segundos, para se verificar o

crescimento microbiológico por meio da turvação do meio de cultura. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 4000 rpm, durante 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células (sedimentado) foram ressuspensas em 5 mL de solução salina estéril para lavagem das células. O tubo foi agitado novamente por 30 segundos e os mesmos passos de centrifugação foram repetidos duas vezes. As células foram, finalmente, ressuspensas em solução salina estéril e ajustadas a uma concentração celular equivalente a 10^6 células/mL, com o auxílio de um espectrofotômetro. Para isso, uma alíquota de 3 mL de solução salina estéril, usada como “*Blank*”, foi transferida para uma cubeta que permite a leitura do espectro de absorção em espectrofotômetro a 520 nm. Em seguida, acrescentamos pequenas alíquotas de suspensão celular até alcançarmos a concentração final desejada, que é aquela obtida quando a densidade óptica da suspensão celular lida no comprimento de onda de 520 nm é de 0,38, o que corresponde à concentração celular de aproximadamente 1×10^6 células/mL.

A susceptibilidade das três cepas de *Candida* à PDT mediada por Cur foi avaliada por meio da exposição das suspensões celulares a três concentrações da Cur (5, 10 e 20 μ M), quatro TPIs (20, 10, 5 e 1 minutos) e uma dose de luz ($5,28 \text{ J/cm}^2$)²⁴ no comprimento de onda azul (predominantemente em 455 nm). Assim, para cada micro-organismo, foram testadas 12 condições experimentais, obtidas a partir do cruzamento dos quatro diferentes TPIs, com as três concentrações de Cur avaliadas, denominadas de P+L+. Adicionalmente, o efeito da aplicação isolada de cada concentração da Cur deixada em contato com a suspensão pelo maior TPI usado no estudo (P+L-) e da luz sobre as suspensões celulares (P-L+) também foram avaliados, o que totalizou 16 condições experimentais. As amostras referentes ao grupo controle positivo não

foram sensibilizadas com Cur e não foram iluminadas com o LED (P-L-). Dessa forma, foram obtidas 17 condições experimentais que avaliaram o efeito do TPI na PDT mediada por Cur na inativação de suspensões celulares de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* ATCC. Essas condições estão descritas na Tabela A1 do Apêndice 3.

A seguir, estão descritas as etapas realizadas para a avaliação da efetividade da PDT mediada por Cur na inativação das 3 cepas de *Candida* avaliadas em culturas planctônicas. 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.

❖ **P+L+**

Para cada cepa de *Candida* avaliada, alíquotas de 100 µL da suspensão de celular, em solução salina, foram transferidas individualmente para orifícios de quatro placas de 96 cavidades. Em seguida, cada uma dessas amostras foi sensibilizada com o mesmo volume de Cur (100 µL), em uma das concentrações avaliadas (5, 10 ou 20 µM; n = 5) (Figura 4), configurando os grupos P+L+5, P+L+10 e P+L+20. Cada placa de 96 orifícios, contendo as suspensões resultantes, foi deixada em repouso no escuro durante 20, 10, 5 ou 1 minutos, para promover a sensibilização das amostras (tempo de pré-irradiação). Após os diferentes períodos de pré-irradiação, cada placa foi posicionada sobre o vidro difusor da “Bio Table”. O aparelho foi então, acionado e todos os orifícios da placa foram iluminados uniforme e simultaneamente (Figura 5).

O procedimento descrito anteriormente foi realizado para a avaliação dos quatro TPIs propostos neste estudo (20, 10, 5 e 1 minutos). Dessa forma, quatro

placas de orifícios com 15 amostras, foram utilizadas. Cada uma delas foi exposta à dose de luz única, obtida com 4 minutos de iluminação ($5,28 \text{ J/cm}^2$).

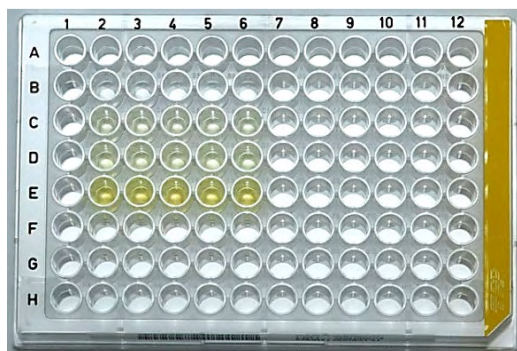


FIGURA 4 - Amostras sensibilizadas com Cur nas concentrações de 5, 10 e 20 μM .

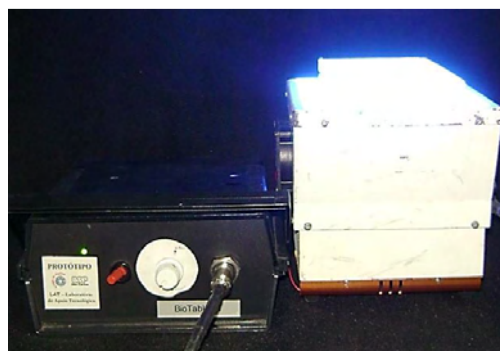


FIGURA 5 - Placa sobre o vidro difusor de luz.

❖ **P+L-**

Para que fosse avaliada a existência de efeitos tóxicos da aplicação da Cur sobre as suspensões celulares, foram incluídas neste estudo amostras sensibilizadas com o FS que não foram iluminadas. Para cada cepa de *Candida* avaliada, alíquotas de 100 μL da suspensão de celular foram pipetadas individualmente em 15 orifícios de uma placa de 96 cavidades. Em seguida, o mesmo volume de Cur foi transferido para cada um desses orifícios. Para cada concentração de Cur avaliada (5, 10 e 20 μM), foram utilizados cinco orifícios, configurando os grupos P+L+5, P+L+10 e P+L+20. A placa foi deixada em repouso durante 20 minutos no escuro (tempo equivalente ao maior TPI), e em seguida, foi deixada sobre a bancada durante 4 minutos (tempo equivalente à dose de luz aplicada nas amostras P+L+).

❖ P-L+

Da mesma forma que na condição anterior, foi avaliado se a aplicação de luz, na ausência do FS, poderia apresentar efeitos tóxicos para os micro-organismos avaliados. Assim, alíquotas de 100 µL da suspensão de celular de cada micro-organismo avaliado foram transferidas individualmente para cinco orifícios de uma placa de 96 cavidades. A seguir, o mesmo volume da mistura de solução salina estéril e DMSO (20% em volume, dobro da concentração final desejada) foi transferido para cada um dos orifícios. A placa foi deixada em repouso no escuro durante 20 minutos (equivalente ao maior TPI), e em seguida foi colocada sobre a “*Bio Table*” para ser iluminada na dose avaliada.

❖ P-L-

Nesta condição experimental, foram incluídas amostras de cada micro-organismo 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 sensibilização com Cur e iluminação com o LED. Alíquotas de 100 µL das suspensões celulares de cada micro-organismo avaliado foram pipetadas individualmente em cinco orifícios de uma placa de 96 cavidades. A seguir, o mesmo volume da mistura de solução salina estéril e DMSO (20% em volume, dobro da concentração final desejada), foi transferido para cada um dos orifícios. A placa foi deixada em repouso durante 24 minutos no escuro (equivalente ao maior TPI somado ao tempo equivalente ao de iluminação).

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 obtidas⁵¹ (Figura 6). 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 foram pipetadas e plaqueadas em duplicata. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes das 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. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa.



FIGURA 6 – Diluições seriadas.

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 o número de unidades formadoras de colônias foi calculado. Os experimentos descritos acima foram realizados em duas ocasiões distintas.

Experimentos com culturas de biofilmes: Para a realização dos experimentos em culturas de biofilmes, os micro-organismos foram individualmente semeados em SDA e incubados em estufa microbiológica para sua reativação por 48 horas. Em seguida, com o auxílio de uma alça loop, foram recolhidas duas alçadas de leveduras recém cultivadas (Figura 7) e inoculadas em 5 mL de RPMI 1640 em tubo Falcon, o qual foi incubado a 37°C durante 16 horas (período denominado *overnight*) em incubadora orbital a 120 rpm.

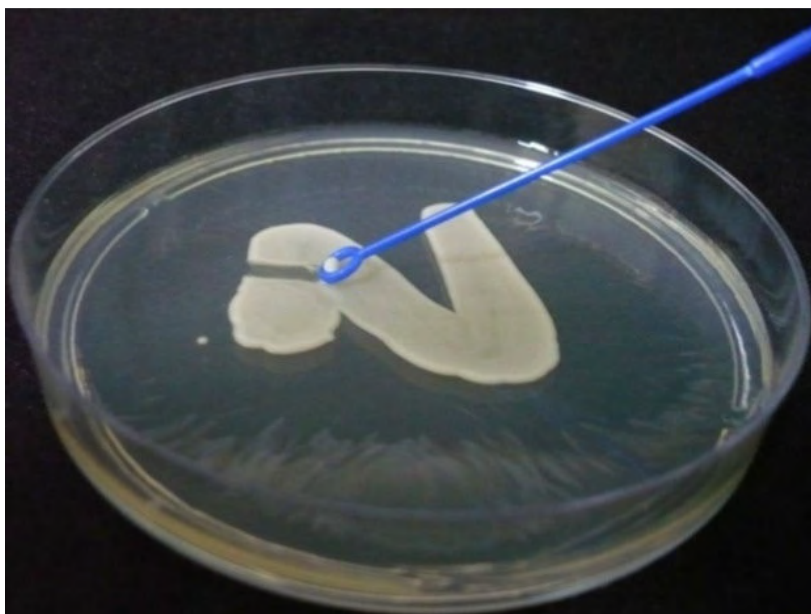


FIGURA 7 - Coleta de *Candida* com o auxílio de uma alça loop.

Após a incubação, o tubo Falcon foi colocado em agitador de tubos e agitado vigorosamente por 30 segundos, para verificação do crescimento microbiológico por meio da turvação do meio de cultura. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 4000 rpm, durante 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células (sedimentado) foram ressuspensas em 5 ml de PBS. O tubo foi agitado novamente por 30 segundos e os mesmos passos de centrifugação foram repetidos duas vezes para a lavagem das células. As células foram, então, ressuspensas em PBS e as suspensões foram padronizadas. Para isso, uma alíquota de 3 mL de PBS, usada como “*Blank*”, foi transferida para uma cubeta que permite a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 520 nm. Em seguida, acrescentamos pequenas alíquotas de suspensão celular até alcançarmos a concentração final desejada, que é aquela obtida quando a densidade óptica da suspensão celular, lida no mesmo comprimento de onda de 520 nm, é de 0,38, o que corresponde à concentração celular de aproximadamente 1×10^6 células/mL. Com as suspensões celulares padronizadas, alíquotas de 100 μ L foram transferidas individualmente para poços de placas de 96 orifícios. Essas suspensões foram colocadas em incubadora orbital a 75 rpm para aguardar a fase de adesão de 90 minutos. Após a fase de adesão, o meio líquido e as células não aderidas foram cuidadosamente removidas com o auxílio de uma pipeta. Os poços foram cuidadosamente lavados duas vezes com 150 μ L de PBS para remoção das células não aderidas, e, em seguida, 150 μ L de RPMI 1640 fresco foram acrescentados a cada poço e incubados a 37°C por 48 horas para permitir a maturação de biofilmes de espécie única²⁴.

A susceptibilidade dos três biofilmes de *Candida* à PDT mediada por Cur após diferentes TPIs foi avaliada por meio da exposição dos mesmos a três concentrações da Cur (20, 30 e 40 μM), quatro TPIs (20, 10, 5 e 1 minutos) e duas doses de luz (5,28 e 10,56 J/cm^2). Assim, para cada micro-organismo, foram testadas 24 condições experimentais, obtidas a partir do cruzamento dos 4 diferentes tempos de contato com o FS, anteriormente à iluminação, com as 3 concentrações de Cur avaliadas e as 2 doses de luz aplicadas, denominadas de P+L+. Adicionalmente, o efeito da aplicação isolada de cada concentração da Cur foi avaliado (P+L-) e o efeito isolado da luz sobre a viabilidade celular dos biofilmes também foi avaliado sob as duas doses de luz aplicadas (P-L+), o que totalizou 29 condições experimentais. As amostras referentes ao grupo controle positivo não foram sensibilizadas com Cur e não foram iluminadas com o LED (P-L-). Dessa forma, foi obtido um total de 30 procedimentos experimentais para cada micro-organismo estudado, que avaliaram o efeito do TPI na PDT mediada por Cur na viabilidade celular de biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Essas condições estão descritas na Tabela A2 do Apêndice 3. As etapas deste experimento foram realizadas em três ocasiões distintas.

A seguir, estão descritas as etapas realizadas para a avaliação da efetividade da PDT mediada por Cur na inativação dos biofilmes das três cepas de *Candida* avaliadas neste estudo. 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.

❖ P+L+

Para cada cepa de *Candida* avaliada, alíquotas de 100 µL da suspensão de celular foram transferidos individualmente para 60 orifícios de duas placas de 96 cavidades para a fase de adesão das células (n = 5). Após essa fase, 150 µL de meio RPMI 1640 foram adicionados a cada orifício e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para a maturação do biofilme. Após a fase de maturação, todos os orifícios contendo os biofilmes foram cuidadosamente lavados com 200 µL de PBS para a remoção do meio de cultura e das células não aderidas. Em seguida, 15 amostras (5 para cada concentração da Cur) foram sensibilizadas com 150 µL de Cur em uma das concentrações avaliadas (20, 30 ou 40 µM) (Figura 8), configurando os grupos P+L+ 20, P+L+ 30 e P+L+ 40. Essas amostras permaneceram em contato com a Cur por 20 minutos. Quando faltavam 10 minutos de pré-irradiação, outras 15 amostras foram sensibilizadas com cada concentração de Cur. Os mesmos procedimentos foram realizados quando faltavam 5 e 1 minutos para o final dos 20 minutos de pré-irradiação, obtendo, então, amostras incubadas com a Cur por 20, 10, 5 e 1 minutos previamente à iluminação. Cada placa de 96 orifícios, contendo as soluções resultantes, foi iluminada de cima para baixo, para evitar a interferência do biofilme na passagem de luz e fotoativação da substância (Figura 9).



FIGURA 8 - Colocação das substâncias sobre as amostras de biofilme que ficarão incubadas por 28 minutos.

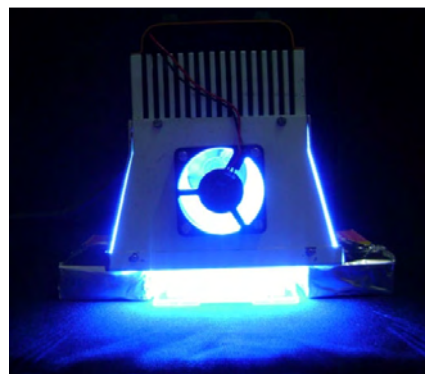


FIGURA 9 - Placa contendo as amostras de biofilme submetidas à irradiação (P+L+ e P-L+).

Os procedimentos descritos anteriormente foram realizados para a avaliação dos quatro TPIs propostos neste estudo (20, 10, 5 e 1 minutos), 3 concentrações (20, 30 e 40 μM) e duas doses de luz (5,28 e 10,56 J/cm^2). Dessa forma, duas placas de orifícios com 60 amostras cada uma, foram utilizadas. Cada uma delas foi exposta a uma das doses estudadas, obtidas após 4 e 8 minutos de iluminação (5,28 e 10,56 J/cm^2 , respectivamente).

❖ **P+L-**

Para que fosse avaliada a existência de efeitos tóxicos após a aplicação da Cur sobre os biofilmes, foram incluídas neste estudo amostras sensibilizadas com Cur que não foram iluminadas. Para cada uma das três cepas de *Candida* avaliadas, alíquotas de 100 μL da suspensão de celular foram pipetadas individualmente em 15 orifícios de uma placa de 96 cavidades para formação dos biofilmes de 48 horas da mesma forma descrita anteriormente. Em seguida, 150 μL de Cur foram transferidos para cada um desses orifícios. Para cada concentração de Cur (20, 30 e 40 μM), foram utilizados cinco orifícios. A placa foi deixada em repouso durante 20 minutos no escuro (tempo equivalente ao maior

TPI), e em seguida foi deixada sobre a bancada durante 8 minutos (tempo equivalente à maior dose de luz aplicada nas amostras P+L+), configurando os grupos P+L- 20, P+L- 30 e P+L- 40

❖ **P-L+**

Da mesma forma que na condição anterior, foi avaliado se a aplicação de luz, na ausência do FS, poderia apresentar efeitos tóxicos para os micro-organismos avaliados. Assim, após formação dos biofilmes, alíquotas de 150 µL da mistura de solução salina estéril e DMSO a 10% em volume foram transferidas para cada um dos orifícios. A placa foi deixada em repouso no escuro durante 20 minutos (equivalente ao maior TPI). Em seguida, a placa foi iluminada de cima para baixo, da mesma forma que na condição experimental P+L+, por 4 e 8 minutos, o que equivale às dose de luz aplicadas sobre os biofilmes.

❖ **P-L-**

Nesta condição experimental, foram incluídas 5 amostras 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 amostras submetidas à sensibilização e à iluminação. Alíquotas de 150 µL da mistura de solução salina estéril e DMSO a 10% em volume foi transferido para cada um dos orifícios (Figura 10). A placa foi deixada em repouso no escuro durante 20 minutos (equivalente ao maior TPI), em seguida, deixada sobre a bancada por mais 8 minutos, o que equivale ao maior tempo de iluminação usado para os biofilmes (Figura 11).

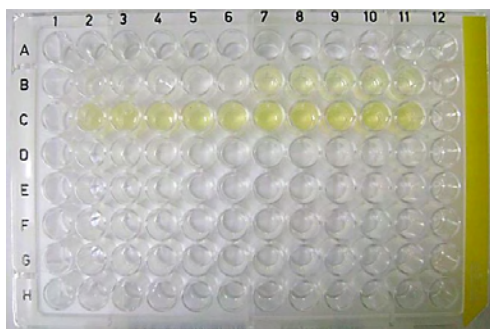


FIGURA 10 - Placa controle com amostras contendo os grupos controles P+L- e P-L- e as amostras sensibilizadas com a Cur, na ausência de luz.

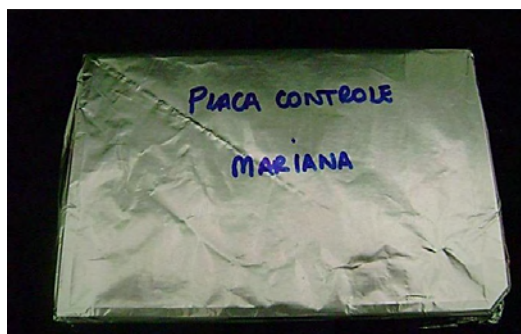


FIGURA 11 - Placa contendo as amostras controle incubadas por 28 minutos.

Ensaio de XTT:

Os biofilmes foram submetidos à avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de redução de 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT). O XTT, sal amarelo, é reduzido, por desidrogenases mitocondriais de leveduras metabolicamente ativas, em um produto solúvel em água, o formazano, o qual é medido espectrofotometricamente. Para o ensaio de XTT, a solução de XTT foi preparada utilizando água Mili-Q, numa proporção de 1mg/mL e mantida a -70°C até o momento do experimento. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM, imediatamente antes do experimento. A solução de XTT obtida é composta por PBS a 200 mM de glicose, o sal de XTT previamente dissolvido e menadiona, na seguinte proporção: 158 μ L, 40 μ L e 2 μ L, respectivamente.

Portanto, após a realização das condições experimentais e controle, as soluções de Cur e/ou solução salina, presentes nos poços associadas aos biofilmes, foram removidas e substituídas por 200 μ L da solução final de XTT (Figura 12). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 3 horas⁵⁰ (Figura

13). Após esse período, uma alíquota de 100 μ L do produto da degradação do XTT de cada amostra foi transferida outra placa de 96 orifícios (Placa de Elisa). Adicionalmente, uma alíquota de 100 μ L do XTT não reagido foi usada como “Blank”. O resultado desta reação química foi medido através das mudanças colorimétricas e espectro de absorção da solução de XTT, utilizando uma leitora de placas Elisa com filtro de 492 nm.

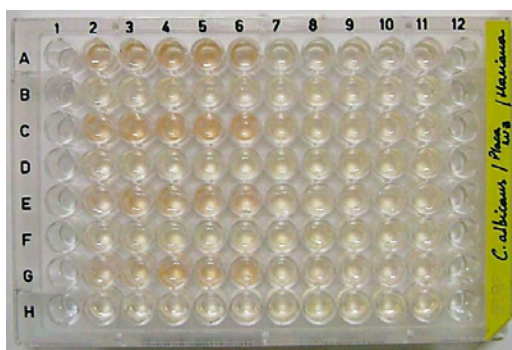


FIGURA 12 - Amostras imediatamente após a colocação do XTT.

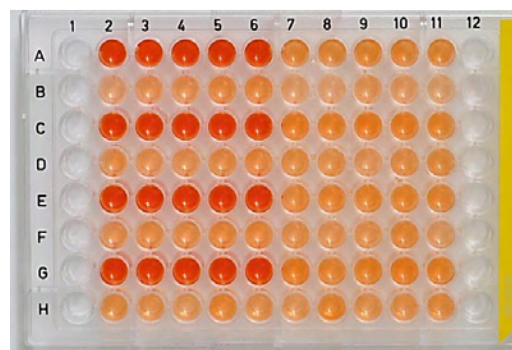


FIGURA 13 - Amostras após 3 horas de incubação com o XTT.

4.2.3 Análise Experimental

Para cada condição experimental das culturas planctônicas avaliadas neste estudo, foram realizadas dez repetições divididas em duas ocasiões distintas. O plaqueamento das amostras foi realizado em duplicata 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 micro-organismos viáveis, em valores de ufc/mL, obtido nas amostras experimentais e controles. Para o cálculo desses valores, as colônias viáveis presentes nas placas de Petri de cada duplicata foram contadas com o contador de colônias digital. É importante ressaltar que, para cada duplicata dos grupos controle (P-L-, P+L- e P-L+), a contagem do número de colônias foi realizada em uma das diluições

semeadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), cujos valores situavam-se 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 pôde 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. Após a contagem, foi obtida a média entre as duplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foi calculado. Para o cálculo de ufc/mL, utilizou-se a fórmula a seguir:

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

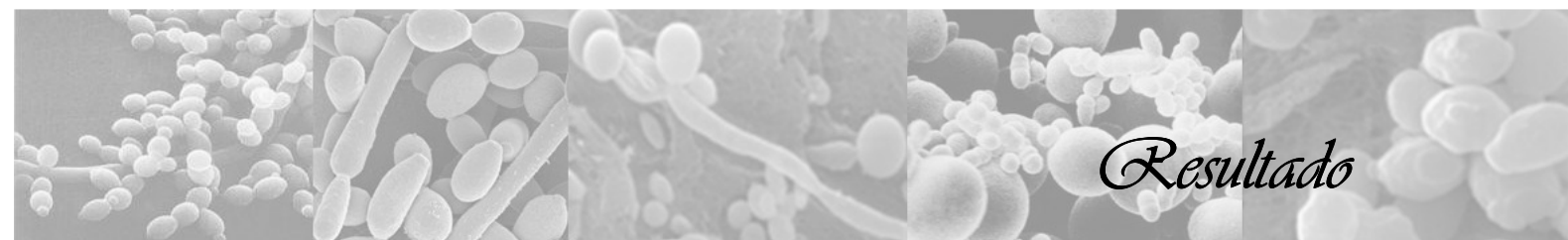
Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas. No presente estudo, $q = 0,025$ já que foram pipetados 25 μL para cada diluição. Os valores de ufc/mL obtidos foram deixados em notação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

As contagens de células não se provaram com distribuição normal, mesmo com a utilização de transformação logarítmica. Portanto, no estudo das suspensões celulares de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, separadamente para cada micro-organismo. Este teste foi complementado por comparações múltiplas pelo teste de Dunn.

Para cada condição experimental das culturas de biofilmes, foram realizadas quinze repetições divididas em três ocasiões distintas. No estudo das culturas de biofilmes, onde se mediu a absorvância das amostras, mostrou-se

adequada a análise de variância. Na avaliação dos controles entre si aplicou-se análise de variância de um fator, enquanto na avaliação dos grupos P+L+ consideraram-se os fatores TPI e concentração de Cur, além de um terceiro fator referente às diferentes ocasiões. Esta análise foi complementada pelo teste de Tukey.

O teste t de Student foi aplicado na comparação de duas médias de absorbâncias, uma referente à iluminação por 4 min, e a outra à iluminação por 8 min, ambas com o mesmo TPI e a mesma concentração de Cur. Em todos os procedimentos adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão.



5 Resultado

O número de colônias obtido em cada duplicata de todas as amostras avaliadas neste estudo, assim como os valores de absorvância de todas as amostras de biofilmes realizadas, estão representados no Apêndice 4, no qual as Tabelas A3 e A6 são referentes à *C. albicans*, as Tabelas A4 e A7 são relativas à *C. glabrata* e as Tabelas A5 e A8, à *C. dubliniensis*.

5.1 Avaliação do efeito de diferentes tempos de pré-irradiação na efetividade da PDT em culturas planctônicas

Na Tabela 1 podem ser observadas as estatísticas descritivas, mediana, mínimo e máximo de logaritmos decimais das contagens de células das culturas planctônicas. Todos os grupos controle mantiveram as contagens de células com a mesma ordem de grandeza do ajuste inicial de 10^6 células/mL. Quando aplicadas a Cur simultaneamente ao LED, ocorreu inativação significativa das cepas de *Candida*.

O teste de Kruskal-Wallis apontou diferenças significativas para os grupos P+L+ ($p < 0,001$) para os três micro-organismos. Para identificar grupos significativamente diferentes foi aplicado o teste de Dunn, ao nível de significância de 5%, com o resultado resumido na Tabela 1. As diferentes letras, no sentido vertical, apontam para grupos com diferenças estatísticas significantes.

As análises foram realizadas dentro de uma mesma espécie, ou seja, no sentido vertical. Dessa forma, de modo geral, não foram observadas diferenças significativas entre grupos P+L+ quanto aos TPIs, utilizando-se

qualquer uma das três concentrações de Cur. Ou seja, quando se compara os grupos P+L+ de mesma concentração de Cur, mesmo incubados por diferentes TPIs no escuro, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na fotoinativação das espécies avaliadas. Para todos os microorganismos, independente do TPI, a concentração de 20 µM de Cur produziu sempre a maior redução de contagem de células e a concentração de 5 µM, a menor. A Cur a 10 µM produziu contagens de células de valores intermediários, algumas vezes equivalente ao da Cur 5 µM e outras vezes equivalente ao da Cur 20 µM.

TABELA 1 - Mediana, mínimo e máximo de logaritmos de contagens de células de suspensões celulares três espécies de *Candida*.

Grupo	TPI (min)	Cur (µM)	<i>C. albicans</i> (+)	<i>C. glabrata</i> (+)	<i>C. dubliniensis</i> (+)
P-L-	-	-	6,32 (6,21; 6,48) c	6,65 (6,41; 6,98) c	6,51 (6,38; 6,64) d
P-L+	20	-	6,36 (6,23; 6,60) c	6,69 (6,65; 6,73) c	6,39 (6,29; 6,45) cd
P+L-	-	5	6,26 (6,07; 6,41) c	6,75 (6,51; 6,98) c	6,28 (6,12; 6,56) c
		10	6,26 (5,95; 6,33) c	6,66 (6,56; 6,76) c	6,28 (6,22; 6,41) c
		20	6,37 (6,07; 6,63) c	6,79 (6,61; 6,96) c	6,45 (6,09; 6,72) cd
			(++)	(++)	(++)
P+L+	1	5	2,23 (1,61; 3,15) a	3,05 (2,30; 3,81) b	3,28 (3,02; 3,47) b
		10	0,00 (0,00; 1,79) a	1,47 (0,00; 2,00) ab	1,83 (0,00; 2,78) a
		20	0,66 (0,00; 1,79) a	0,66 (0,00; 2,21) a	0,00 (0,00; 1,00) a
	5	5	2,53 (2,21; 2,90) b	3,23 (2,51; 3,96) b	2,60 (1,91; 2,94) b
		10	1,32 (0,00; 1,79) ab	1,47 (0,00; 2,21) ab	0,81 (0,00; 2,68) ab
		20	0,00 (0,00; 1,00) a	0,00 (0,00; 1,32) a	0,00 (0,00; 1,00) a
	10	5	1,85 (0,00; 2,51) a	3,20 (2,34; 3,89) b	2,39 (0,00; 3,15) b
		10	0,00 (0,00; 1,79) a	1,32 (0,00; 2,34) ab	0,00 (0,00; 1,79) a
		20	0,00 (0,00; 1,00) a	0,00 (0,00; 1,32) a	0,00 (0,00; 1,00) a
	20	5	2,74 (0,00; 3,22) b	2,86 (2,45; 3,19) b	2,71 (1,61; 3,03) b
		10	1,66 (0,00; 2,53) ab	1,47 (0,00; 2,30) ab	2,52 (0,00; 2,75) ab
		20	0,00 (0,00; 1,00) a	0,00 (0,00; 1,00) a	0,00 (0,00; 1,00) a

(+ e ++) Comparações entre grupos controles e P+L+, respectivamente, pelo teste de Dunn ao nível de significância de 5%: medianas acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes.

De acordo com a Tabela 1, foi possível a obtenção de valores nulos de crescimento microbiológico para as 3 espécies avaliadas após a aplicação da PDT utilizando a Cur a 20 μM associada ao LED, após 5, 10 ou 20 minutos de pré-irradiação (Figura 14A). Embora não tenha causado completa inativação, a Cur a 20 μM incubada com a *C. albicans* e a *C. glabrata* por apenas 1 minuto resultou em redução de 89,5% da contagem de ufc/mL. Os valores da Tabela 1 também demonstram a ocorrência de reduzidos valores de ufc/mL nos grupos tratados com Cur nas concentrações de 5 ou 10 μM , após qualquer TPI estudado, que embora não tenham sido capazes de inviabilizar as suspensões celulares, promoveram uma redução significativa (Figura 14B) dos micro-organismos em relação ao controle (Figura 14C) das *C. albicans*, *C. glabrata* (Figura 14) e *C. dubliniensis*.

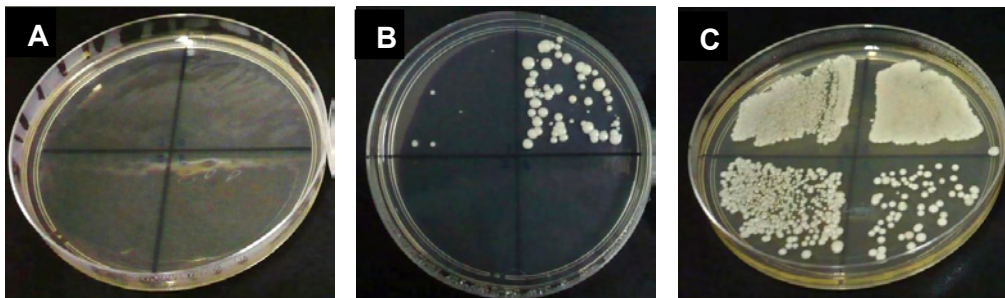


FIGURA 14 - *Candida glabrata*: Grupo P+L+ 20 μM ; Placa de Petri mostrando inativação total; grupo P+L+ 5 μM ; Placa de Petri mostrando inativação parcial; grupo controle P-L-; Placa de Petri mostrando crescimento de *C. glabrata*.

Os gráficos de estatísticas descritivas, apresentados nas Figuras 15 a 17 oferecem uma visualização desses resultados.

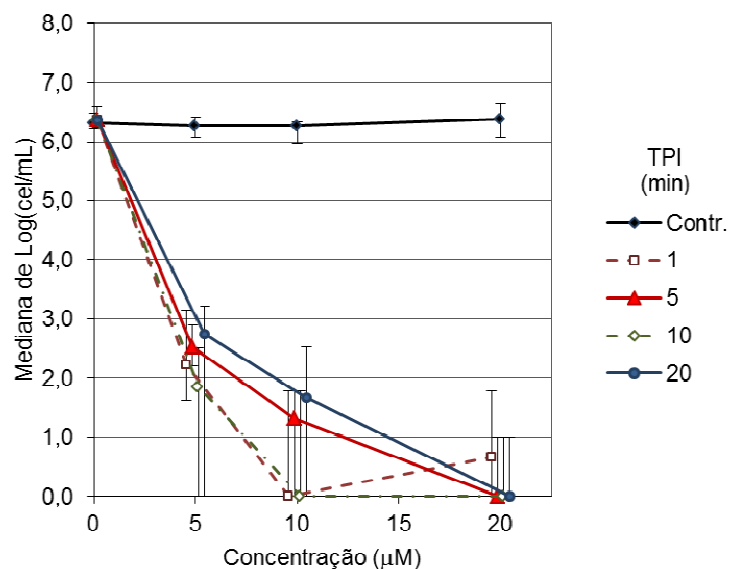


FIGURA 15 - Representação gráfica de medianas de logaritmos de contagens de células de suspensões celulares de *Candida albicans*. A barra vertical indica o mínimo e o máximo.

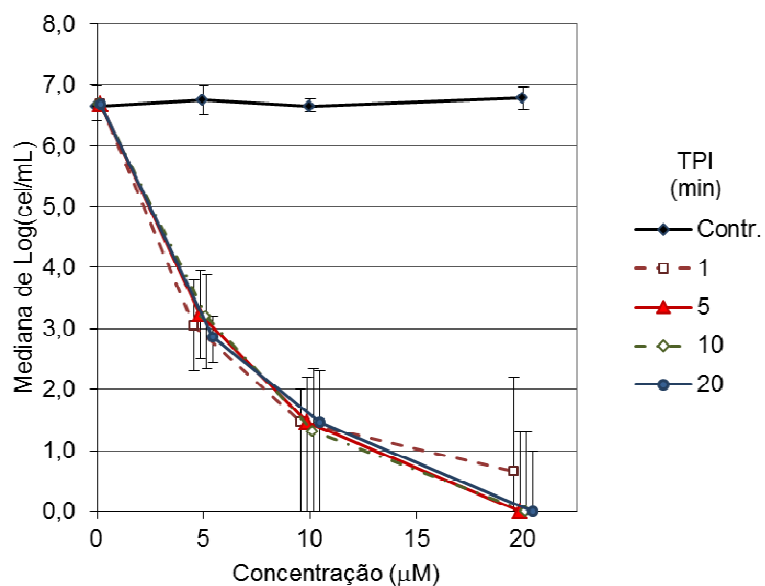


FIGURA 16 - Representação gráfica de medianas de logaritmos

de contagens de células de suspensões celulares de *Candida glabrata*. A barra vertical indica o mínimo e o máximo.

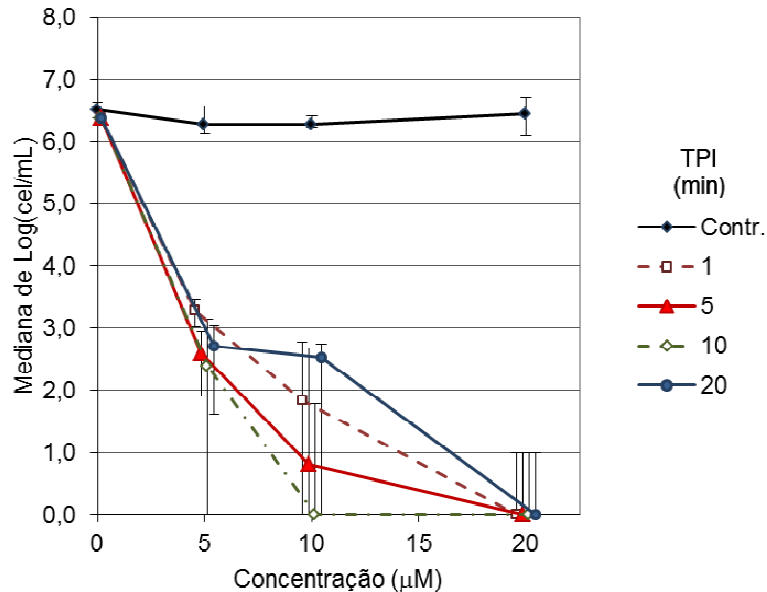


FIGURA 17 - Representação gráfica de medianas de logaritmos de contagens de células de suspensões celulares de *Candida dubliniensis*. A barra vertical indica o mínimo e o máximo.

5.2 Avaliação do efeito de diferentes tempos de pré-irradiação na efetividade da PDT nas culturas de biofilmes

Na Tabela 2 são apresentadas as estatísticas descritivas, média e desvio padrão, das absorbâncias obtidas após os experimentos de biofilmes com os micro-organismos em estudo, nos tempos de iluminação de 4 e 8 minutos, 5,28 e 10,56 J/cm², respectivamente. Os grupos controles apresentaram médias de absorbância mais altas que as dos grupos P+L+, mostrando que a associação entre a Cur e a luz LED tem efeito na diminuição da viabilidade celular.

No estudo da *Candida albicans* a análise de variância sobre os grupos P+L+, com tempo de iluminação de 4 minutos ou 8 minutos, indicou efeito significativo dos TPI ($p < 0,001$) e de concentração de Cur ($p < 0,001$), mas sem

efeito significativo da interação desses fatores ($p > 0,05$). Portanto, o TPI e a concentração têm efeitos independentes sobre a viabilidade celular. Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados detalhes das comparações múltiplas pelo teste de Tukey expondo-se apenas as comparações entre TPIs dentro de uma mesma concentração de Cur (Tabela 3) e, na Tabela 4, as comparações entre as concentrações de Cur dentro de cada TPI.

Para a *C. albicans*, seja com iluminação de 4 ou 8 minutos, a viabilidade celular diminuiu de forma proporcional ao aumento do TPI, não importando a concentração de Cur utilizada. Assim sendo, a média de absorbância atingiu o menor valor com TPI de 20 minutos e 40 μM de Cur.

Quanto à *Candida glabrata* a análise de variância sobre os grupos P+L+, com tempo de iluminação de 4 minutos ou 8 minutos, indicou efeito significativo da interação entre os dois fatores principais: TPI e concentração da Cur ($p = 0,001$ e $p = 0,015$, respectivamente). O teste de Tukey foi aplicado para o estudo dessa interação, estando o resultado, agora de interpretação mais complexa, resumido na Tabela 2. Quanto às concentrações de Cur, as maiores reduções da viabilidade celular foram obtidas com 40 μM e as menores com 20 μM , mas na concentração de 30 μM , os valores para viabilidade celular ora foram equivalentes à maior ora equivalentes à menor. Dessa forma, a dependência com o TPI não ficou bem definida.

TABELA 2 - Média e desvio padrão de absorvância relativas à viabilidade celular dos biofilmes das três espécies de *Candida*.

Ilum. (min)	Grupo	TPI (min)	<i>C. albicans</i> (+)	<i>C. glabrata</i> (+)	<i>C. dubliniensis</i> (+)
-	P-L-	-	1,171 (0,04) j	1,188 (0,10) ef	1,000 (0,08) f
4	P-L+	20	1,234 (0,07) l	1,116 (0,10) e	1,003 (0,10) f
8	P-L+	20	1,202 (0,07) j	1,113 (0,20) e	0,916 (0,14) f
-	P+L- 20	-	1,235 (0,06) l	1,316 (0,07) g	0,692 (0,05) e
-	P+L- 30	-	1,214 (0,06) k	1,282 (0,06) fg	0,948 (0,11) f
-	P+L- 40	-	1,230 (0,10) m	1,198 (0,09) efg	0,739 (0,05) e
4	P+L+ 20	1	0,367 (0,07) i	0,391 (0,08) d	0,325 (0,06) bcd
	P+L+ 30	1	0,264 (0,07) h	0,374 (0,05) cd	0,313 (0,06) bcd
	P+L+ 40	1	0,218 (0,04) g	0,234 (0,09) b	0,276 (0,04) bc
	P+L+ 20	5	0,303 (0,08) f	0,469 (0,11) d	0,372 (0,06) d
	P+L+ 30	5	0,234 (0,06) e	0,283 (0,10) bc	0,276 (0,06) bc
	P+L+ 40	5	0,178 (0,04) d	0,219 (0,09) ab	0,184 (0,06) a
	P+L+ 20	10	0,290 (0,05) f	0,470 (0,14) d	0,345 (0,08) cd
	P+L+ 30	10	0,270 (0,08) e	0,246 (0,08) b	0,314 (0,11) bcd
	P+L+ 40	10	0,230 (0,08) d	0,188 (0,06) ab	0,266 (0,05) b
	P+L+ 20	20	0,225 (0,04) c	0,367 (0,14) cd	0,343 (0,12) cd
	P+L+ 30	20	0,136 (0,06) b	0,220 (0,05) ab	0,250 (0,08) ab
	P+L+ 40	20	0,101 (0,05) a	0,125 (0,06) a	0,188 (0,06) a
8	P+L+ 20	1	0,307 (0,06) l *	0,419 (0,09) F	0,369 (0,05) l *
	P+L+ 30	1	0,218 (0,05) H *	0,353 (0,08) DEF	0,254 (0,07) H *
	P+L+ 40	1	0,206 (0,06) G	0,284 (0,05) BCD	0,240 (0,09) G
	P+L+ 20	5	0,197 (0,04) F *	0,399 (0,08) EF	0,322 (0,04) F *
	P+L+ 30	5	0,179 (0,04) E *	0,241 (0,08) ABC	0,223 (0,10) E
	P+L+ 40	5	0,139 (0,04) D *	0,172 (0,09) A	0,188 (0,07) D
	P+L+ 20	10	0,237 (0,10) F	0,356 (0,07) DEF *	0,338 (0,05) FI
	P+L+ 30	10	0,178 (0,06) E *	0,318 (0,06) CDE *	0,260 (0,06) EH
	P+L+ 40	10	0,146 (0,05) D *	0,215 (0,06) AB	0,198 (0,05) DG *
	P+L+ 20	20	0,198 (0,06) C	0,313 (0,08) CDE	0,230 (0,06) C *
	P+L+ 30	20	0,120 (0,04) B	0,186 (0,06) A	0,179 (0,08) B *
	P+L+ 40	20	0,074 (0,03) A	0,163 (0,08) A	0,150 (0,08) A

Letras minúsculas comparam os grupos controles entre si e os grupos tratados com dose de 5,28 J/cm² (4 minutos), enquanto as letras maiúsculas comparam os grupos tratados com dose de 10,26 J/cm² (8 minutos).

(+) Comparações dentro de controles, P+L+ com iluminação por 4 min e por 8 min pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%: médias acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes

* médias entre iluminações 4 min e 8 min, com a mesma concentração de Cur e mesmo TPI, significativamente diferentes pelo teste t de Student

TABELA 3 - Resultados das comparações estatísticas entre os grupos P+L+ de uma mesma concentração de Cur, nível de significância de 5%.

PIT (min)	Cur (μ M)	<i>C. albicans</i>			<i>C. glabrata</i>			<i>C. dubliniensis</i>		
		4min*	8min**	t ⁺	4min*	8min**	t ⁺	4min*	8min**	t ⁺
1	20	c	C	+	a	B		a	C	+
5		b	B	+	a	AB		a	B	+
10		b	B		a	AB	+	a	BC	
20		a	A		a	A		a	A	+
1	30	c	C	+	b	C		a	C	+
5		b	B	+	ab	AB		a	B	
10		b	B	+	a	BC	+	a	BC	
20		a	A		a	A		a	A	+
1	40	c	C		b	B		b	C	
5		b	B	+	ab	A		a	B	
10		b	B	+	ab	AB		b	BC	+
20		a	A		a	A		a	A	

* Comparações múltiplas (teste de Tukey) entre diferentes TPIs, dentro de uma mesma concentração de Cur, iluminadas por 4 minutos. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas somente entre as linhas de mesma concentração de Cur e espécie.

** Comparações múltiplas (teste de Tukey) entre diferentes TPIs, dentro de uma mesma concentração de Cur, iluminadas por 8 minutos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas somente entre as linhas de mesma concentração de Cur e mesma espécie.

+ Comparação entre os valores médios dos grupos iluminados por 4 e 8 minutos (com mesma concentração de Cur e mesmo TPI) que apontaram ter diferença significativa pelo teste t de student.

Em relação aos biofilmes da *Candida dubliniensis* a análise de variância para a iluminação por 4 minutos apresentou interação significativa entre TPI e concentração da Cur ($p=0,001$), enquanto a análise de variância para a iluminação por 8 minutos teve interação não significativa, com efeitos significativos de TPI ($p<0,001$) e de concentração de Cur ($p<0,001$). O teste de Tukey foi aplicado para estudar a interação no primeiro caso ou para estudar os efeitos principais no segundo. O resultado é mostrado na Tabela 2.

Para as amostras iluminadas por 4 minutos, o resultado foi semelhante ao descrito no parágrafo anterior para a *C. glabrata*. Entretanto, para as amostras iluminadas por 8 minutos, o resultado foi mais simples de ser interpretado, devido a não existência de efeito de interação. Para qualquer TPI as reduções mais elevadas na viabilidade celular ocorreram com a concentração de Cur mais alta (40 μ M), diminuindo gradativamente conforme a concentração foi ficando menor. Independente da concentração de Cur utilizada, a maior redução da viabilidade celular foi alcançada com o maior TPI (20 minutos) e a menor com o menor TPI (1 minuto). Os TPI de 5 e 10 minutos produziram valores de viabilidade celular intermediários.

TABELA 4 - Resultados das comparações estatísticas entre os grupos P+L+ de um mesmo TPI, nível de significância de 5%.

PIT (min)	Cur (μ M)	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. dubliniensis</i>	
		4min [*]	8min ^{**}	4min [*]	8min ^{**}	4min [*]	8min ^{**}
1	20	c	C	b	B	a	C
	30	b	B	b	AB	a	B
	40	a	A	a	A	a	A
5	20	c	C	b	B	c	C
	30	b	B	a	A	b	B
	40	a	A	a	A	a	A
10	20	c	C	b	B	b	C
	30	b	B	a	B	ab	B
	40	a	A	a	A	a	A
20	20	c	C	b	B	b	C
	30	b	B	a	A	a	B
	40	a	A	a	A	a	A

* Comparações múltiplas (teste de Tukey) entre diferentes concentrações de Cur, dentro de um mesmo TPI, iluminadas por 4 minutos. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas somente entre as linhas de mesmo TPI e mesma espécie.

** Comparações múltiplas (teste de Tukey) entre diferentes concentrações de Cur, dentro de um mesmo TPI, iluminadas por 8 minutos. Letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas somente entre as linhas de mesmo TPI e mesma espécie.

Os gráficos de médias amostrais de absorvâncias apresentados nas Figuras 18 a 23 permitem uma visualização desses resultados. Nesses gráficos, os intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais sugerem as precisões sobre as médias determinadas.

Finalmente, duas médias de absorvâncias, uma referente à iluminação por 4 minutos e a outra à iluminação por 8 minutos, ambas com o mesmo TPI e a mesma concentração de Cur, foram comparadas pelo teste t de Student. O resultado está na Tabela 2. A redução na viabilidade celular foi, na maioria das vezes, maior com tempo de iluminação de 8 minutos, mas somente significativa em alguns casos.

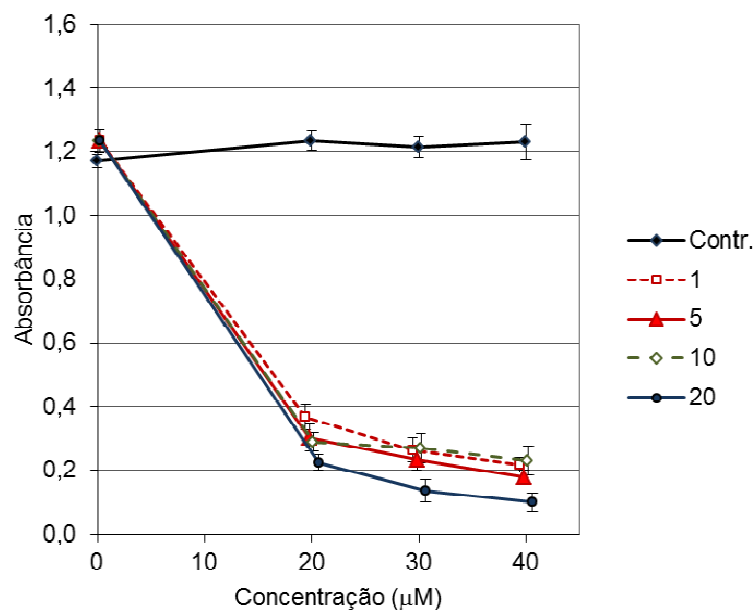


FIGURA 18 - Representação gráfica de médias de absorvância de biofilmes de *Candida albicans*, iluminados por 4 min. A barra vertical indica um intervalo de confiança de 95% para a média populacional.

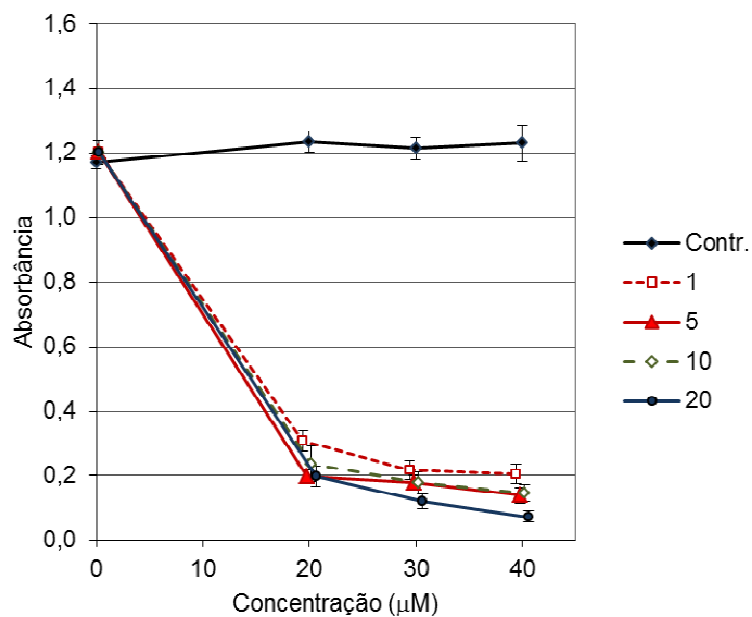


FIGURA 19 - Representação gráfica de médias de absorvância de biofilmes de *Candida albicans*, iluminados por 8 min. A barra vertical indica um intervalo de confiança de 95% para a média populacional.

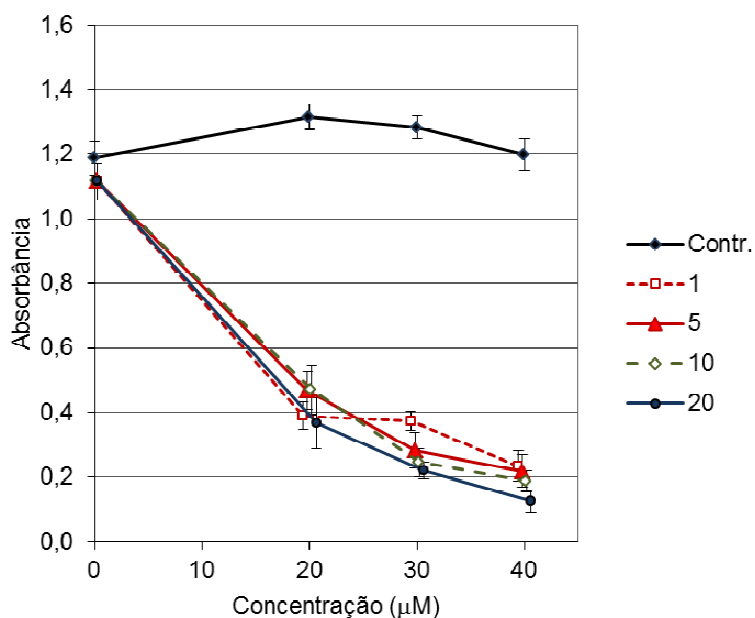


FIGURA 20 - Representação gráfica de médias de absorvância de biofilmes de *Candida glabrata*, iluminados por 4 min. A barra vertical indica um intervalo de confiança de 95% para a média populacional.

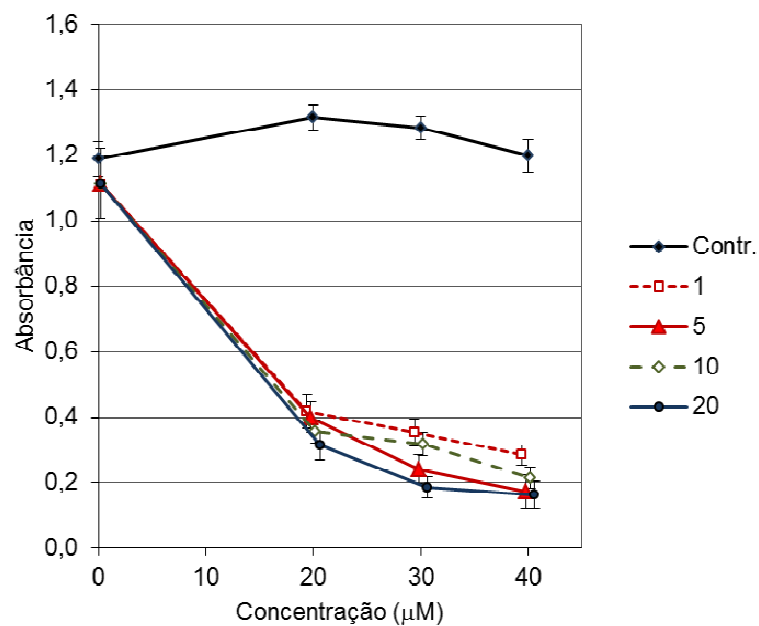


FIGURA 21 - Representação gráfica de médias de absorbância de biofilmes de *Candida glabrata*, iluminados por 8 min. A barra vertical indica um intervalo de confiança de 95% para a média populacional.

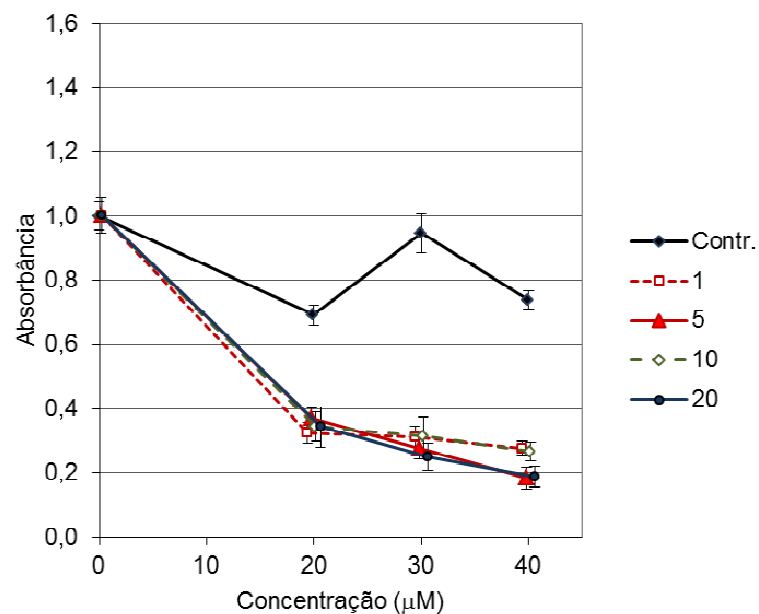


FIGURA 22 - Representação gráfica de médias de absorbância de biofilmes de *Candida dubliniensis*, iluminados por 4 min. A barra vertical indica um intervalo de confiança de 95% para a média populacional.

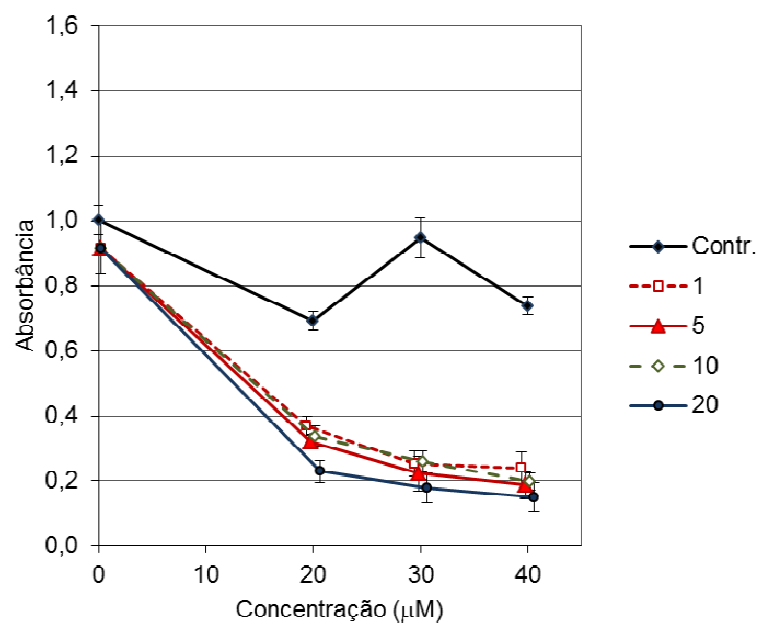
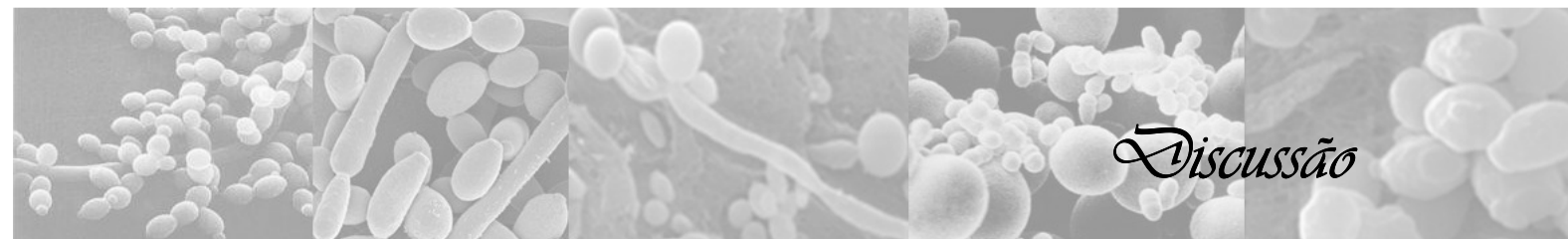


FIGURA 23 - Representação gráfica de médias de absorbância de biofilmes de *Candida dubliniensis*, iluminados por 8 min. A barra vertical indica um intervalo de confiança de 95% para a média populacional.



6 Discussão

A Terapia Fotodinâmica tem sido empregada para inativação de micro-organismos patogênicos^{10,18,19,22,23,24,29,58,62}, tendo o primeiro relato de investigações in vitro do efeito fotodinâmico datado de 1900³⁰. A disseminação da AIDS e o surgimento de cepas resistentes a medicamentos despertou novamente o interesse pela PDT^{30,33}. Esse interesse advém de certas vantagens, como a simplicidade no mecanismo de ação, que resulta da interação entre um agente fotossensibilizante e luz visível em um comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do FS^{8,33}. Outra vantagem da PDT é o baixo potencial mutagênico^{8,29}, tornando improvável o surgimento de cepas resistentes^{8,11,33}, Chabrier-Roselló et al.¹¹ avaliaram a resposta adaptativa de *C. albicans* a injúria oxidativa. Para isso, os micro-organismos foram submetidos repetidamente a tratamentos com H₂O₂, PDT ou associação de ambos os tratamentos. Foi verificada resistência na resposta adaptativa do micro-organismo 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. Os autores concluíram que a PDT é uma alternativa terapêutica para a inativação microbiana, pois o desenvolvimento de resistência aos efeitos fotodinâmicos é improvável.

Embora sejam encontrados estudos que comprovem a efetividade da PDT antimicrobiana, algumas variáveis podem influenciar essa terapia, dentre elas, o tempo de pré-irradiação (TPI) do micro-organismo com o FS^{8,11,24,25,29,41}. O TPI é o período no qual o FS permanece em contato com o micro-organismo previamente à iluminação para garantir a sua ligação e/ou captação pelas

células. Um adequado TPI para promover efetiva morte microbiana parece depender das propriedades do FS. Como exemplo, as porfirinas e os fenotiazínicos^{11,29} necessitam de menor TPI, quando comparados ao ácido aminolevulínico⁴¹. Em contraste, outros estudos observaram que o TPI não apresentou importância significativa na efetividade da PDT e que maior TPI não promove maior redução na viabilidade das células avaliadas^{11,29,35}. Dessa forma, a compreensão da dinâmica da interação entre o FS e a célula podem contribuir para o sucesso da PDT no controle de infecções.

Conforme relatado por pesquisadores, bactérias apresentam maior suscetibilidade aos efeitos fototóxicos da PDT, quando comparadas aos fungos^{19,62}. Demidova, Hamblin¹⁹ compararam a efetividade da PDT mediada por vários FSs na inativação de suspensões celulares de *Escherichia coli* (bactéria Gram negativa), *S. aureus* (bactéria Gram positiva), e de *C. albicans* (fungo). Nesse estudo, o conjugado de polilisina mostrou ser altamente efetivo contra as suspensões de bactérias e fungos. Apesar disso, concentrações mais baixas foram requeridas para a fotoinativação bactérias (0,75 μM) que para as suspensões de *C. albicans* (5 μM). O azul de toluidina necessitou de concentrações/doses de luz de 10 $\mu\text{M}/32 \text{ J}/\text{cm}^2$ para promover inativação do *S. aureus*, 35 $\mu\text{M}/32 \text{ J}/\text{cm}^2$ para promover a inativação da *E. coli* e 50 $\mu\text{M}/40 \text{ J}/\text{cm}^2$ para a fotoinativação da *C. albicans*. Igualmente, para promover a inativação usando o Rose Bengal como FS, foi necessário 0,25 $\mu\text{M}/4 \text{ J}/\text{cm}^2$ para o *S. aureus*, 35 $\mu\text{M}/8 \text{ J}/\text{cm}^2$ para a *E. coli* e 200 $\mu\text{M}/40 \text{ J}/\text{cm}^2$ para a *C. albicans*. Portanto, a *C. albicans* tem se apresentado mais resistente à PDT, quando comparada às bactérias, o que pode ser atribuído às diferenças no tamanho celular. As espécies de *Candida* são 25-50 vezes maiores que as células

bacterianas^{19,20,30,62} o que exige maiores quantidades de EROs para causar a morte celular.⁶² Além disso, são micro-organismos eucarióticos, cuja presença do envoltório nuclear pode atuar como uma barreira adicional aos FSs^{19,62}.

Este estudo verificou a efetividade da PDT mediada pela Cur na fotoinativação das espécies de *Candida* avaliadas. Para as culturas planctônicas de *Candida* spp. os resultados demonstraram que, quando comparados os grupos P+L+ com a mesma concentração de Cur e incubados por diferentes TPIs, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na fotoinativação de nenhuma das espécies avaliadas. Esses resultados concordam com Dahl et al.¹⁸ e Dovigo et al.²⁴. Ambos os trabalhos verificaram que maiores TPIs não promovem aumento na fototoxicidade da Cur. Adicionalmente, em estudo recente Dovigo et al.²⁴, não encontraram diferenças significativas na fototoxicidade exercida pela Cur sobre culturas planctônicas de *C. albicans*, após 5 ou 20 minutos de TPI. Além disso, no presente estudo foi constatado que a associação da Cur 20 µM ao LED após 5, 10 ou 20 min de TPI promoveu completa inativação das células de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Quando os resultados desses estudos são analisados e comparados, podemos constatar que a concentração necessária para causar fotoinativação das espécies de *Candida* (20 µM) são maiores que as concentrações requeridas para a fotoinativação de bactérias Gram positivas (1 µM) e Gram negativas (10 µM), obtidas por Dahl et al.¹⁸. Esses resultados são coerentes com os dados relatados por Demidova, Hamblin¹⁹, que também encontraram maior resistência fúngica aos efeitos tóxicos da PDT. Dahl et al.¹⁸ e Dovigo et al.²⁴ observaram também que a Cur que permaneceu em contato com as células bacterianas por diferentes períodos previamente à iluminação não causou mudanças

significativas nos efeitos fototóxicos da Cur. Constataram, ainda, que a remoção da Cur anteriormente à iluminação promoveu redução significativa da sua fototoxicidade, sugerindo que a Cur livre ou fracamente ligada às células são as responsáveis pela maior parte dos efeitos fototóxicos. Por ser uma molécula lipofílica, a Cur interage primeiro com a membrana celular e as proteínas de ligação das membranas, e então é distribuída para diferentes partes das células⁴⁵. A natureza dessas interações pode justificar os resultados obtidos para as culturas planctônicas avaliadas nesse estudo, onde o aumento do TPI não promoveu alterações substanciais na fotoinativação das três espécies de *Candida* avaliadas.

A incubação das suspensões de *C. albicans* e *C. glabrata* com Cur 20 μM por apenas 1 min resultou em 89,5% de fotoinativação, além de completa fotoinativação da *C. dubliniensis*. Esses achados estão de acordo com o estudo de Dahl et al.¹⁷. Esses autores investigaram o papel que a penetração, entrada ou ligação do FS com as células desempenha na ação fotodinâmica da Cur. Os resultados mostraram que a penetração da substância na célula é rápida (de 2 a 4 minutos), entretanto, apenas 10% da Cur exerce a sua fototoxicidade após incorporada, enquanto o restante da Cur permanece na fase livre, sendo responsável por 90% da sua fototoxicidade¹⁷. Assim, o tempo de 1 minuto, o menor TPI avaliado no presente estudo, pode não ter sido suficiente para permitir a entrada dos 10% da Cur em solução, resultando em aproximadamente 90% de redução do metabolismo celular, que corresponde à ação fototóxica da qual a fase livre em solução é responsável.

Quando organizadas em biofilmes, Cur 20, 30 e 40 μM causaram significativa redução da viabilidade celular após PDT. Apesar disso, os resultados

demonstraram menor suscetibilidade à fotoinativação, quando comparados às culturas planctônicas. Esses resultados estão de acordo com os achados de Dovigo et al.²³. Esses autores analisaram biofilmes e culturas planctônicas de *C. albicans* e *C. glabrata* expostos a 25 mg/mL de Photogem® e iluminados com luz LED (37,5 J/cm²). Os autores obtiveram redução significativa da viabilidade celular dos biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, entretanto essa redução foi menor que a observada nas culturas planctônicas, sugerindo que, quando organizados em biofilmes, os micro-organismos ficam menos suscetíveis à ação da PDT. Isso pode ser explicado pela organização séssil observada nas culturas de biofilmes, o que garante vantagens ecológicas⁴⁶ e proteção contra agentes antimicrobianos^{14,44,46}, já que restringe a penetração de antimicrobianos,⁴⁶ garantindo a sobrevivência de células localizadas nas porções basais dos biofilmes. Além disso, a sobre-expressão de genes que codificam bombas de efluxo de drogas foi recentemente demonstrada durante a formação e desenvolvimento dos biofilmes de algumas espécies de *Candida*²⁸. Adicionalmente, pesquisadores sugerem que a matriz polimérica extracelular pode excluir ou reduzir o acesso da droga utilizada aos organismos localizados mais profundamente no biofilme^{21,28}. Pereira et al.⁴³ avaliaram a suscetibilidade de biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans* à PDT e, após análises no Microscópio Eletrônico de Varredura, eles observaram que os efeitos da terapia ocorreram predominantemente nas camadas mais superficiais dos biofilmes. Adicionalmente, Wood et al.⁶¹, observaram biofilmes bacterianos através de microscopia confocal ou processados por microscopia eletrônica de transmissão, e verificaram que após a PDT, os biofilmes passaram a ter aproximadamente metade da espessura, ser menos densos e se assemelhando a colunas de

agregados bacterianos. Dessa forma, as substâncias precisam penetrar efetivamente na sua matriz extracelular para que aconteça o contato íntimo com as células que os compõem. Por essas razões, para qualquer uma das espécies de *Candida* avaliadas, concentrações e doses de luz, o TPI de 20 min promoveu as maiores reduções na viabilidade celular. O mesmo resultado foi encontrado em estudo recente de Dovigo et al²⁴. Os autores avaliaram os efeitos fototóxicos da Cur sobre biofilmes de *C. albicans* após 5 ou 20 min de TPI e observaram maiores reduções no metabolismo celular após 20 min de TPI.

Os resultados referentes à iluminação por 5,28 J/cm² e 10,56 J/cm², considerando os mesmos parâmetros de concentração da Cur e TPI, demonstraram que a iluminação por 10,56 J/cm² resultou, na maioria dos casos, em maior redução da viabilidade celular, mas somente significativa em alguns casos. Após análises do espectro de absorção da Cur, Dovigo et al.²⁴ verificaram que o espectro de absorção da Cur reduziu progressivamente à medida que o tempo de iluminação aumentou. Após a dose de 0,4 J/cm², aproximadamente 70% da Cur já havia sido degradada. Concluíram, portanto, que doses acima de 5,28 J/cm² podem não influenciar a toxicidade da PDT mediada pela Cur contra *C. albicans*.

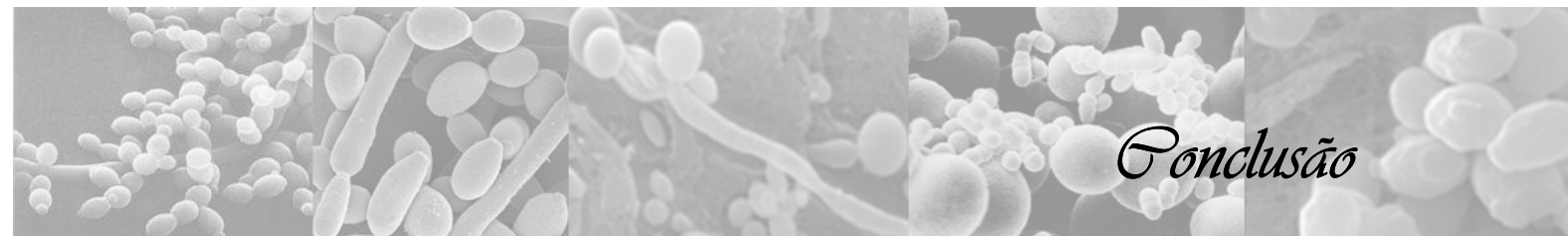
A *C. albicans* pareceu ser a única espécie cuja viabilidade celular foi claramente dependente do TPI, independentemente do tempo de iluminação que as amostras foram submetidas. Essa espécie apresentou maior redução da viabilidade celular após 20 min de incubação no escuro (p<0,01). À medida que o TPI aumentou, foi observada uma redução significativa na viabilidade celular. A viabilidade celular dos biofilmes de *C. dubliniensis* iluminada por 8 minutos também se apresentou dependente do TPI. Entretanto, a *C. dubliniensis*

irradiada por 4 minutos e a *C. glabrata* (irradiada por 4 ou 8 minutos) não apresentaram clara tendência de dependência do TPI na inativação das células dos biofilmes, apesar de TPIs de 1 e 20 minutos, em geral, terem apresentado os piores e melhores resultados, respectivamente. A morfologia dos microorganismos parece ser de grande importância na PDT. Um estudo realizado por Jackson et al²⁹ avaliou a morte celular induzida pela PDT em hifas e leveduras de *C. albicans*. Os resultados revelaram que ambas as formas são suscetíveis aos efeitos fototóxicos da PDT, entretanto as hifas apresentaram maior suscetibilidade à PDT que as leveduras. No presente estudo, os biofilmes foram desenvolvidos em meio RPMI 1640 que induz a formação de hifas¹³. A *C. albicans* e *C. dubliniensis* são capazes de crescer de forma dimórfica (leveduras e filamentosas)^{9,21,46,54}. Por outro lado, a *C. glabrata* possui morfologia única de leveduras,⁴⁹ não sendo capaz de alternar para a forma de hifas. Portanto, considerando a possibilidade de que, em cada TPI, a Cur alcance a mesma profundidade nos biofilmes das três espécies, as hifas formadas e sensibilizadas pela Cur podem ter sido mais suscetíveis aos efeitos fototóxicos da PDT. Isso pode justificar o fato de a *C. glabrata* ter sido a única espécie que não demonstrou clara tendência de dependência do TPI em nenhuma das condições avaliadas.

Devido às diferenças estruturais e biológicas, diferentes comportamentos são esperados de cepas distintas de *Candida*. A *C. glabrata* produz adesinas capazes de promover aderência às células epiteliais bucais do hospedeiro.⁹ Além disso, essa espécie possui maior afinidade pelo acrílico (superfície na qual os biofilmes foram desenvolvidos) e mecanismos de co-adesão, que promovem à adesão das células às outras células³⁶, sendo capaz de formar biofilmes mais

densos que outras espécies⁴⁹. Os biofilmes dessa espécie produzem matrizes extracelulares com maiores quantidades de proteínas e carboidratos⁴⁹. Portanto, é possível que haja maior dificuldade de penetração na estrutura do biofilme, o que pode justificar o fato dessa espécie não ter apresentado dependência com o TPI.

A PDT mediada pela Cur mostrou ser efetiva contra biofilmes de espécies de *Candida*. A necessidade de penetração do FS na intimidade do biofilme²¹ pode exigir maior tempo para sua atuação, dessa forma, o TPI de 20 minutos associado à Cur a 40 µM produziu os maiores valores de redução da viabilidade celular. Foram observados 94%, 89% e 85% de redução do metabolismo celular de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*, respectivamente. Embora não deva ser usada como substituta das terapias convencionais⁵⁸, a PDT mediada pela Cur pode ser considerada uma terapia promissora para atuar de forma sinérgica no tratamento da candidíase oral de pacientes imunocomprometidos e/ou em uso prolongado de medicamentos, cujo aparecimento de cepas resistentes é provável.



7 Conclusão

Com base nas condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir que:

1. A utilização da PDT associando o LED azul à Cur foi efetiva na redução da viabilidade celular das três espécies de *Candida* ATCC avaliadas;

2. A fotoinativação dos micro-organismos nas culturas planctônicas foi dependente da concentração de Cur, porém não foi dependente do TPI, mostrando que as suspensões celulares, independente do tempo de contato com o FS, apresentaram inativações celulares estatisticamente semelhantes;

3. A combinação de 20 μM de Cur com iluminação a 5,28 J/cm^2 promoveu a total inviabilização de todas as suspensões celulares de *Candida* avaliadas, quando associadas a 5, 10 ou 20 minutos de pré-irradiação;

4. A PDT mostrou ser efetiva contra biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*, resultando, respectivamente, em 94%, 89% e 85% de redução do metabolismo celular;

5. A redução na viabilidade celular para as culturas de biofilmes foi, na maioria das vezes, maior com a dose de luz de 10,56 J/cm^2 , mas somente significativa em alguns casos;

6. Para todos os micro-organismos, independente da dose de luz, a redução da viabilidade celular das culturas em biofilmes foi mais acentuada quando associadas à Cur 40 μM e o TPI de 20 minutos.

A horizontal strip of five grayscale micrographs showing various bacterial morphologies. From left to right: 1. A dense cluster of small, spherical cocci. 2. A group of rod-shaped bacilli, some appearing in pairs or chains. 3. A long, thin, filamentous bacterium with a bulbous end. 4. A cluster of spherical cocci, some appearing to be in chains. 5. A group of large, oval-shaped cocci.

Referências

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. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
5. 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.
6. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci.* 2005; 4: 523-30.
7. Budtz-Jorgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 1859-63.

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

8. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1776: 86-107.
9. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 327-35.
10. Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Non-*albicans* oral candidosis in HIV positive patients. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 43: 419-22.
11. 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.
12. Chan WH, Wu HJ. Anti-apoptotic effects of curcumin on photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells. *J Cell Biochem*. 2004; 92: 200-12.
13. 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: 5385-94.
14. 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.
15. Chunchanur SK, Nadgir SD, Halesh LH, Patil BS, Kausar Y, Chandrasekhar MR. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. *Indian J Pathol Microbiol*. 2009; 52: 501-4.

16. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. Rev Assoc Med Bras. 1996; 42: 229-36.
17. Dahl TA, Belski P, Rezka KJ, Chignell CF. Photocytotoxicity of Curcumin. Photochem Photobiol. 1994; 59: 290-4.
18. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by natural dye curcumin. Arch Microbiol. 1989; 151: 183-5.
19. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2329-35.
20. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res. 2008; 163: 1-12.
21. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003; 11: 30-6.
22. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Adriano CS, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogem[®]. Braz J Microbiol. 2010; 41: 42-9.
23. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Mycoses. 2011; 54: 123-30.
24. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CAS, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. Photochem Photobiol. 2011 Apr 22 Epub ahead of print.
25. Gomes ER, Cruz T, Lopes CF, Carvalho AP, Duarte CB. Photosensitization of lymphoblastoid cells with phthalocyanines at different saturating incubation times. Cell Biol Toxicol. 1999; 15: 249-60.

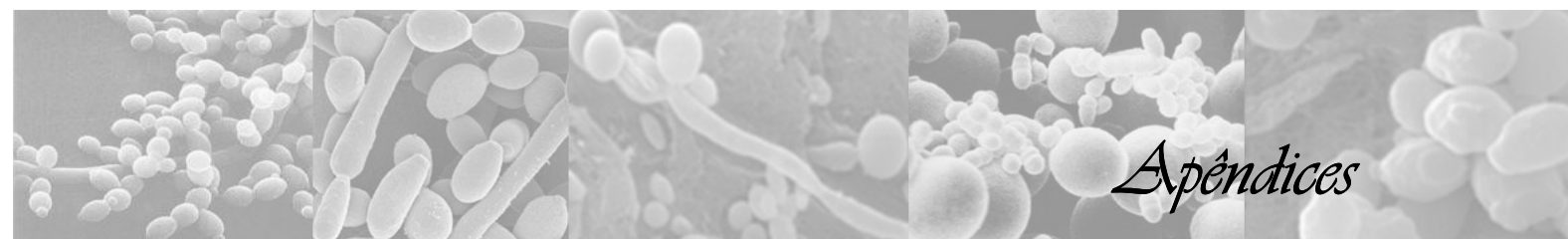
26. Hoepelman IM, Dupont B. Oral candidiasis: the clinical challenge of resistance and management. *Int J Antimicrob Agents*. 1996; 6: 155-9.
27. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85: 558-64.
28. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10: 14–9.
29. 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.
30. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti 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.
31. 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.
32. Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 3007-12.
33. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86: 694-707.

34. Koon HK, Leung AWN, Yue KKM, Mak NK. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006; 25: 205-15.
35. 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.
36. 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.
37. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova*. 2000; 32: 237-43.
38. Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010; 7: 98-105.
39. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3135-9.
40. Martins CVB, Silva DL, Neres ATM, Magalhães TFF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63: 337-9.
41. Monfrecola G, Procaccini EM, Bevilacqua M, Manco A, Calabro G, Santoianni P. In vitro effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci*. 2004; 3: 419-22.

42. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 617-23.
43. Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2011; 26: 341-8.
44. 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.
45. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J Photochem Photobiol C: Photochem Reviews.* 2009; 10: 81–95.
46. Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3234-40.
47. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 53-9.
48. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005; 41: 1955-68.

49. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro Biofilm Activity of Non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol.* 2010; 61: 534-40.
50. Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J.* 2008; 19: 364-9.
51. Soares BM, Silva DL, Sousa GR, Amorim JCF, Resende, MA, Pinotti M, et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J Photochem Photobiol B.* 2009; 94: 65-70.
52. 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.
53. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology.* 1995; 141: 1507-21.
54. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2004; 4: 369-76.
55. Sullivan DJ, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S, et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 960-4.

56. 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.
57. Tonnesen HH, Vries H, Karlsen J, Van Henegouwen GB. Studies on Curcumin and curcuminoids IX: investigation of photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci.* 1987; 76: 371–3.
58. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 13-28.
59. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:382-402.
60. Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J.* 1998; 185: 380-4.
61. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 50: 1-7.
62. 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 da curcumina, a partir da solução estoque.

❖ Proporção utilizada para obtenção da concentração de 10 μM (que foi diluída à metade, 5 μM):

Solução estoque: 600 μM ----- 100%	Solução total: 1500 μL ----- 100%
Solução diluída: 10 μM ----- X	Solução 10 μM : Y ----- 1,7%
X = 1,7%	Y = 25,5 μL Cur 600 μM

❖ Proporção utilizada para obtenção da concentração de 20 μM (que foi diluída à metade, 10 μM):

Solução estoque: 600 μM ----- 100%	Solução total: 1500 μL ----- 100%
Solução diluída: 20 μM ----- X	Solução 20 μM : Y ----- 3,4%
X = 3,4%	Y = 51 μL Cur 600 μM

- ❖ Proporção utilizada para obtenção da concentração de 30 μM :

Solução estoque: 600 μM ----- 100%	Solução total: 9000 μL ----- 100%
Solução diluída: 30 μM ----- X	Solução 30 μM : Y ----- 5%
X = 5%	Y = 450 μL Cur 600 μM

- ❖ Proporção utilizada para obtenção da concentração de 40 μM (que foi diluída, nos experimentos com suspensões celulares, à metade: 20 μM):

Solução estoque: 600 μM ----- 100%	Solução total: 1500 μL ----- 100%
Solução diluída: 40 μM ----- X	Solução 40 μM : Y ----- 6,7%
X = 6,7 %	Y = 100,5 μL Cur 600 μM

- ❖ Proporção utilizada para obtenção da concentração de 40 μM para os experimentos com biofilmes:

Solução estoque: 600 μM ----- 100%	Solução total: 9000 μL ----- 100%
Solução diluída: 40 μM ----- X	Solução 40 μM : Y ----- 6,7%
X = 6,7 %	Y = 603 μL Cur 600 μM

Adicionalmente, os volumes foram complementados com DMSO para manutenção da matriz da solução de 10% em volume.

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):

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

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 (Watts divididos por mil), para inserir esse valor na fórmula, foi preciso fazer a transformação de unidades. Dessa forma, o valor da intensidade de 22,0 mW/cm^2 foi convertido para $22 \times 10^{-3} \text{W}/\text{cm}^2$.

Cálculo do tempo de iluminação para a dose de 5,28 J/cm^2 :

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

$$5,28 \text{ J}/\text{cm}^2 = 0,022 \text{ W}/\text{cm}^2 \times T$$

$$T = 5,28 \text{ J}/\text{cm}^2 / 0,022 \text{ W}/\text{cm}^2$$

$$T = 240 \text{ segundos ou } 4 \text{ minutos}$$

Cálculo do tempo de iluminação para a dose de 10,56 J/cm²:

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

$$10,56 \text{ J/cm}^2 = 0,022 \text{ W/cm}^2 \times T$$

$$T = 10,56 \text{ J/cm}^2 / 0,022 \text{ W/cm}^2$$

$$T = 480 \text{ segundos ou } 8 \text{ minutos}$$

Apêndice 3

Tabela A1 e A2 – Condições experimentais avaliadas para cada micro-organismo exposto à PDT. Os parâmetros dose de luz e concentração de curcumina foram variados:

Para culturas planctônicas:

TABELA A1

Condições Experimentais		Parâmetros da Terapia Fotodinâmica	
Tempo de pré-irradiação		Dose de Luz (J/cm ²)	Concentração da curcumina (µM)
24 minutos (Tempo em que foram deixadas no escuro)	P-L- (Controle positivo)	----	----
	P+L- 5	----	5
	P+L- 10	----	10
	P+L- 20	----	20
20 minutos	P-L+	5,28	----
	P+L+ 5	5,28	5
	P+L+ 10	5,28	10
	P+L+ 20	5,28	20
10 minutos	P+L+ 5	5,28	5
	P+L+ 10	5,28	10
	P+L+ 20	5,28	20
5 minutos	P+L+ 5	5,28	5
	P+L+ 10	5,28	10
	P+L+ 20	5,28	20
1 minuto	P+L+ 5	5,28	5
	P+L+ 10	5,28	10
	P+L+ 20	5,28	20

Para culturas em biofilmes:

TABELA A2:

Condições Experimentais		Parâmetros da Terapia Fotodinâmica	
Tempo de pré-irradiação		Dose de Luz (J/cm ²)	Concentração da curcumina (µM)
28 minutos (Tempo em que foram deixadas no escuro)	P-L- (Controle positivo)	----	----
	P+L- 20	----	20
	P+L- 30	----	30
	P+L- 40	----	40
20 minutos	P-L+ (4 min)	5,28	----
	P-L+ (8 min)	10,56	----
	P+L+ 20	5,28	20
	P+L+ 20	10,56	20
	P+L+ 30	5,28	30
	P+L+ 30	10,56	30
	P+L+ 40	5,28	40
	P+L+ 40	10,56	40
10 minutos	P+L+ 20	5,28	20
	P+L+ 20	10,56	20
	P+L+ 30	5,28	30
	P+L+ 30	10,56	30
	P+L+ 40	5,28	40
	P+L+ 40	10,56	40
5 minutos	P+L+ 20	5,28	20
	P+L+ 20	10,56	20
	P+L+ 30	5,28	30
	P+L+ 30	10,56	30
	P+L+ 40	5,28	40
	P+L+ 40	10,56	40
1 minuto	P+L+ 20	5,28	20
	P+L+ 20	10,56	20
	P+L+ 30	5,28	30
	P+L+ 30	10,56	30
	P+L+ 40	5,28	40
	P+L+ 40	10,56	40

Apêndice 4

TABELA A3 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. albicans* (ATCC 90028) a diferentes tempos de pré-irradiação e 5,28 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri.

Amostra	Grupo	TPI (min)	Duplicata 1	Duplicata 2	Média	Diluição	ufc/mL	Log (ufc/mL)
1a	P-L- (SEM ILUMINAÇÃO)	24	53	80	66,5	3	2660000	6,42
2a		24	66	86	76	3	3040000	6,48
3a		24	74	70	72	3	2880000	6,46
4a		24	38	43	40,5	3	1620000	6,21
5a		24	44	42	43	3	1720000	6,24
1b	P-L- (SEM ILUMINAÇÃO)	24	48	59	53,5	3	2140000	6,33
2b		24	46	36	41	3	1640000	6,21
3b		24	37	63	50	3	2000000	6,30
4b		24	45	46	45,5	3	1820000	6,26
5b		24	65	74	69,5	3	2780000	6,44
1a	P+L- 5 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	33	48	40,5	3	1620000	6,21
2a		24	52	49	50,5	3	2020000	6,31
3a		24	36	38	37	3	1480000	6,17
4a		24	33	39	36	3	1440000	6,16
5a		24	33	26	29,5	3	1180000	6,07
1b	P+L- 5 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	58	64	61	3	2440000	6,39
2b		24	39	43	41	3	1640000	6,21
3b		24	66	62	64	3	2560000	6,41
4b		24	66	54	60	3	2400000	6,38
5b		24	58	59	58,5	3	2340000	6,37
1a	P+L- 10 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	17	28	22,5	3	900000	5,95
2a		24	24	31	27,5	3	1100000	6,04
3a		24	37	41	39	3	1560000	6,19
4a		24	23	37	30	3	1200000	6,08
5a		24	42	49	45,5	3	1820000	6,26
1b	P+L- 10 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	49	46	47,5	3	1900000	6,28
2b		24	52	55	53,5	3	2140000	6,33
3b		24	41	49	45	3	1800000	6,26
4b		24	52	40	46	3	1840000	6,26
5b		24	50	55	52,5	3	2100000	6,32

1a		24	42	82	62	3	2480000	6,39
2a		24	49	63	56	3	2240000	6,35
3a		24	38	41	39,5	3	1580000	6,20
4a		24	17	42	29,5	3	1180000	6,07
5a	P+L- 20 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	34	32	33	3	1320000	6,12
1b		24	75	71	73	3	2920000	6,47
2b		24	47	39	43	3	1720000	6,24
3b		24	111	103	107	3	4280000	6,63
4b		24	61	64	62,5	3	2500000	6,40
5b		24	73	68	70,5	3	2820000	6,45
1a		20	38	46	42	3	1680000	6,23
2a		20	60	53	56,5	3	2260000	6,35
3a		20	56	54	55	3	2200000	6,34
4a		20	63	50	56,5	3	2260000	6,35
5a	P-L+	20	60	48	54	3	2160000	6,33
1b		20	55	61	58	3	2320000	6,37
2b		20	65	74	69,5	3	2780000	6,44
3b		20	65	68	66,5	3	2660000	6,42
4b		20	82	70	76	3	3040000	6,48
5b		20	98	103	100,5	3	4020000	6,60
1a		20	21	24	22,5	0	900	2,95
2a		20	31	22	26,5	0	1060	3,03
3a		20	58	25	41,5	0	1660	3,22
4a		20	31	44	37,5	0	1500	3,18
5a	P+L+ 5 µM	20	109	111	110	0	780	2,89
1b		20	0	0	0	0	0	0,00
2b		20	0	2	1	0	40	1,61
3b		20	0	3	1,5	0	60	1,79
4b		20	0	5	2,5	0	100	2,00
5b		20	8	11	9,5	0	380	2,58
1a		20	8	9	8,5	0	340	2,53
2a		20	4	3	3,5	0	140	2,15
3a		20	0	0	0	0	0	0,00
4a		20	3	7	5	0	200	2,30
5a	P+L+ 10 µM	20	9	6	7,5	0	300	2,48
1b		20	0	0	0	0	0	0,00
2b		20	0	0	0	0	0	0,00
3b		20	0	0	0	0	0	0,00
4b		20	0	1	0,5	0	20	1,32
5b		20	1	4	2,5	0	100	2,00

1a		20	0	0	0	0	0	0,00
2a		20	0	0	0	0	0	0,00
3a		20	0	0	0	0	0	0,00
4a		20	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+	20	0	0	0	0	0	0,00
1b	20 µM	20	0	0	0	0	0	0,00
2b		20	0	0	0	0	0	0,00
3b		20	0	0	0	0	0	0,00
4b		20	0	0	0	0	0	0,00
5b		20	0	0	0	0	0	0,00
<hr/>								
1a		10	9	7	8	0	320	2,51
2a		10	0	2	1	0	40	1,61
3a		10	2	1	1,5	0	60	1,79
4a		10	4	4	4	0	160	2,21
5a	P+L+	10	2	7	4,5	0	180	2,26
1b	5 µM	10	0	0	0	0	0	0,00
2b		10	0	0	0	0	0	0,00
3b		10	1	5	3	0	120	2,08
4b		10	0	0	0	0	0	0,00
5b		10	1	3	2	0	80	1,91
<hr/>								
1a		10	0	0	0	0	0	0,00
2a		10	0	0	0	0	0	0,00
3a		10	0	0	0	0	0	0,00
4a		10	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+	10	0	0	0	0	0	0,00
1b	10 µM	10	0	0	0	0	0	0,00
2b		10	0	0	0	0	0	0,00
3b		10	1	2	1,5	0	60	1,79
4b		10	1	1	1	0	40	1,61
5b		10	1	2	1,5	0	60	1,79
<hr/>								
1a		10	0	0	0	0	0	0,00
2a		10	0	0	0	0	0	0,00
3a		10	0	0	0	0	0	0,00
4a		10	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+	10	0	0	0	0	0	0,00
1b	20 µM	10	0	0	0	0	0	0,00
2b		10	0	0	0	0	0	0,00
3b		10	0	0	0	0	0	0,00
4b		10	0	0	0	0	0	0,00
5b		10	0	0	0	0	0	0,00

1a		5	7	3	5	0	200	2,30
2a		5	5	8	6,5	0	260	2,42
3a		5	8	25	16,5	0	660	2,82
4a		5	16	19	17,5	0	700	2,85
5a	P+L+	5	18	22	20	0	800	2,90
1b	5 µM	5	13	9	11	0	440	2,64
2b		5	9	6	7,5	0	300	2,48
3b		5	4	4	4	0	160	2,21
4b		5	2	11	6,5	0	260	2,42
5b		5	9	10	9,5	0	380	2,58
1a		5	0	1	0,5	0	20	1,32
2a		5	0	2	1	0	40	1,61
3a		5	0	1	0,5	0	20	1,32
4a		5	0	1	0,5	0	20	1,32
5a	P+L+	5	2	1	1,5	0	60	1,79
1b	10 µM	5	0	1	0,5	0	20	1,32
2b		5	1	1	1	0	40	1,61
3b		5	0	0	0	0	0	0,00
4b		5	1	1	1	0	40	1,61
5b		5	0	1	0,5	0	20	1,32
1a		5	0	0	0	0	0	0,00
2a		5	0	0	0	0	0	0,00
3a		5	0	0	0	0	0	0,00
4a		5	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+	5	0	0	0	0	0	0,00
1b	20 µM	5	0	0	0	0	0	0,00
2b		5	0	0	0	0	0	0,00
3b		5	0	0	0	0	0	0,00
4b		5	0	0	0	0	0	0,00
5b		5	0	0	0	0	0	0,00
1a		1	2	1	1,5	0	60	1,79
2a		1	7	3	5	0	200	2,30
3a		1	3	3	3	0	120	2,08
4a		1	3	3	3	0	120	2,08
5a	P+L+	1	3	4	3,5	0	140	2,15
1b	5 µM	1	1	1	1	0	40	1,61
2b		1	8	16	12	0	480	2,68
3b		1	16	30	23	0	920	2,96
4b		1	24	28	26	0	1040	3,02
5b		1	43	28	35,5	0	1420	3,15

1a		1	0	0	0	0	0	0,00
2a		1	0	0	0	0	0	0,00
3a		1	2	0	1	0	40	1,61
4a		1	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+	1	0	0	0	0	0	0,00
1b	10 µM	1	1	0	0,5	0	20	1,32
2b		1	0	0	0	0	0	0,00
3b		1	2	0	1	0	40	1,61
4b		1	0	0	0	0	0	0,00
5b		1	2	1	1,5	0	60	1,79
1a		1	0	0	0	0	0	0,00
2a		1	0	3	1,5	0	60	1,79
3a		1	2	0	1	0	40	1,61
4a		1	2	1	1,5	0	60	1,79
5a		1	0	0	0	0	0	0,00
1b	P+L+ 20µM	1	0	1	0,5	0	20	1,32
2b		1	0	0	0	0	0	0,00
3b		1	0	0	0	0	0	0,00
4b		1	1	0	0,5	0	20	1,32
5b		1	0	0	0	0	0	0,00

TABELA A4 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. glabrata* (ATCC 2001) a diferentes tempos de pré-irradiação e 5,28 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri.

Amostras	Grupo	TPI (min)	Duplicata 1	Duplicata 2	Média	Diluição	ufc/mL	Log (ufc/mL)
1a		24	92	91	91,5	3	3660000	6,56
2a		24	147	122	134,5	3	5380000	6,73
3a		24	86	96	91	3	3640000	6,56
4a		24	130	174	152	3	6080000	6,78
5a	P-L- (SEM ILUMINAÇÃO)	24	62	66	64	3	2560000	6,41
1b		24	177	148	162,5	3	6500000	6,81
2b		24	224	259	241,5	3	9660000	6,98
3b		24	169	189	179	3	7160000	6,85
4b		24	59	76	67,5	3	2700000	6,43
5b		24	101	78	89,5	3	3580000	6,55
1a		24	170	182	176,0	3	7040000	6,85
2a		24	101	120	110,5	3	4420000	6,65
3a		24	141	153	147,0	3	5880000	6,77
4a	P+L- 5 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	137	127	132,0	3	5280000	6,72
5a		24	110	89	99,5	3	3980000	6,60
1b		24	177	148	162,5	3	5680000	6,75
2b		24	224	259	241,5	3	5380000	6,73
3b		24	169	189	179	3	4800000	6,68
4b		24	99	108	103,5	3	5740000	6,76
5b		24	84	77	80,5	3	4720000	6,67
1a		24	138	146	142,0	3	5680000	6,75
2a		24	114	155	134,5	3	5380000	6,73
3a		24	111	129	120,0	3	4800000	6,68
4a	P+L- 10 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	115	172	143,5	3	5740000	6,76
5a		24	187	49	118,0	3	4720000	6,67
1b		24	93	99	96	3	5100000	6,71
2b		24	103	109	106	3	6380000	6,80
3b		24	101	108	104,5	3	9140000	6,96
4b		24	102	80	91	3	5620000	6,75
5b		24	101	116	108,5	3	6860000	6,84
1a	P+L- 20 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	134	121	127,5	3	5100000	6,71
2a		24	158	161	159,5	3	6380000	6,80
3a		24	227	230	228,5	3	9140000	6,96
4a		24	151	130	140,5	3	5620000	6,75
5a		24	178	165	171,5	3	6860000	6,84

1b		24	159	139	149	3	6500000	6,81
2b	P+L-	24	200	224	212	3	9660000	6,98
3b	20 µM	24	221	153	187	3	7160000	6,85
4b	(SEM	24	102	101	101,5	3	4140000	6,62
5b	ILUMINAÇÃO)	24	98	104	101	3	3220000	6,51
1a		20	151	120	135,5	3	5420000	6,73
2a		20	117	126	121,5	3	4860000	6,69
3a		20	133	131	132	3	5280000	6,72
4a		20	117	129	123	3	4920000	6,69
5a	P-L+	20	135	116	125,5	3	5020000	6,70
1b		20	121	108	114,5	3	4580000	6,66
2b		20	106	117	111,5	3	4460000	6,65
3b		20	132	110	121	3	4840000	6,68
4b		20	136	120	128	3	5120000	6,71
5b		20	116	118	117	3	4680000	6,67
1a		20	10	16	13	0	520	2,72
2a		20	31	7	19	0	760	2,88
3a		20	21	17	19	0	760	2,88
4a		20	17	51	34	0	1360	3,13
5a	P+L+ 5 µM	20	39	39	39	0	1560	3,19
1b		20	6	17	11,5	0	460	2,66
2b		20	10	25	17,5	0	700	2,85
3b		20	24	15	19,5	0	780	2,89
4b		20	24	10	17	0	680	2,83
5b		20	7	7	7	0	280	2,45
1a		20	1	7	4	0	160	2,21
2a		20	3	0	1,5	0	60	1,79
3a		20	0	0	0	0	0	0,00
4a		20	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+ 10	20	4	6	5	0	200	2,30
1b	µM	20	0	0	0	0	0	0,00
2b		20	0	2	1	0	40	1,61
3b		20	0	0	0	0	0	0,00
4b		20	1	1	1	0	40	1,61
5b		20	0	1	0,5	0	20	1,32
1a		20	0	0	0	0	0	0,00
2a		20	0	0	0	0	0	0,00
3a		20	0	0	0	0	0	0,00
4a		20	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+ 20	20	0	0	0	0	0	0,00
1b	µM	20	0	0	0	0	0	0,00

2b		20	0	0	0	0	0	0,00
3b	P+L+ 20	20	0	0	0	0	0	0,00
4b	μM	20	0	0	0	0	0	0,00
5b		20	0	0	0	0	0	0,00
1a		10	124	141	132,5	0	5300	3,72
2a		10	178	207	192,5	0	7700	3,89
3a		10	153	140	146,5	0	5860	3,77
4a		10	201	170	185,5	0	7420	3,87
5a	P+L+ 5 μM	10	155	172	163,5	0	6540	3,82
1b		10	10	8	9	0	360	2,56
2b		10	5	6	5,5	0	220	2,34
3b		10	12	12	12	0	480	2,68
4b		10	9	11	10	0	400	2,60
5b		10	9	10	9,5	0	380	2,58
1a		10	0	0	0	0	0	0,00
2a		10	0	0	0	0	0	0,00
3a		10	3	1	2	0	80	1,91
4a		10	0	1	0,5	0	20	1,32
5a	P+L+ 10	10	5	6	5,5	0	220	2,34
1b	μM	10	1	2	1,5	0	60	1,79
2b		10	1	0	0,5	0	20	1,32
3b		10	0	0	0	0	0	0,00
4b		10	5	6	5,5	0	220	2,34
5b		10	0	1	0,5	0	20	1,32
1a		10	0	0	0	0	0	0,00
2a		10	0	1	0,5	0	20	1,32
3a		10	0	0	0	0	0	0,00
4a		10	1	0	0,5	0	20	1,32
5a	P+L+ 20	10	0	0	0	0	0	0,00
1b	μM	10	0	0	0	0	0	0,00
2b		10	0	0	0	0	0	0,00
3b		10	0	0	0	0	0	0,00
4b		10	0	1	0,5	0	20	1,32
5b		10	0	0	0	0	0	0,00
1a		5	168	164	166	0	6640	3,82
2a		5	210	251	230,5	0	9220	3,96
3a		5	197	173	185	0	7400	3,87
4a		5	176	183	179,5	0	7180	3,86
5a	P+L+ 5 μM	5	162	179	170,5	0	6820	3,83
1b		5	11	11	11	0	440	2,64
2b		5	8	8	8	0	320	2,51

3b		5	10	10	10	0	400	2,60
4b	P+L+ 5 µM	5	7	10	8,5	0	340	2,53
5b		5	11	6	8,5	0	340	2,53
1a		5	1	0	0,5	0	20	1,32
2a		5	1	0	0,5	0	20	1,32
3a		5	0	2	1	0	40	1,61
4a		5	1	3	2	0	80	1,91
5a	P+L+ 10 µM	5	2	2	2	0	80	1,91
1b		5	0	2	1	0	40	1,61
2b		5	4	4	4	0	160	2,21
3b		5	0	1	0,5	0	20	1,32
4b		5	0	0	0	0	0	0,00
5b		5	0	0	0	0	0	0,00
1a		5	0	1	0,5	0	20	1,32
2a		5	0	0	0	0	0	0,00
3a		5	0	0	0	0	0	0,00
4a		5	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+ 20 µM	5	0	0	0	0	0	0,00
1b		5	1	0	0,5	0	20	1,32
2b		5	0	0	0	0	0	0,00
3b		5	0	0	0	0	0	0,00
4b		5	0	0	0	0	0	0,00
5b		5	0	0	0	0	0	0,00
1a		1	113	88	100,5	0	4020	3,60
2a		1	111	103	107	0	4280	3,63
3a		1	61	68	64,5	0	2580	3,41
4a		1	168	154	161	0	6440	3,81
5a	P+L+ 5 µM	1	119	132	125,5	0	5020	3,70
1b		1	15	9	12	0	480	2,68
2b		1	3	7	5	0	200	2,30
3b		1	16	7	11,5	0	460	2,66
4b		1	12	7	9,5	0	380	2,58
5b		1	6	9	7,5	0	300	2,48
1a		1	2	1	1,5	0	60	1,79
2a	P+L+ 10 µM	1	3	2	2,5	0	100	2,00
3a		1	1	0	0,5	0	20	1,32
4a		1	1	2	1,5	0	60	1,79

5a		1	1	1	1	0	40	1,61
1b		1	0	0	0	0	0	0,00
2b	P+L+ 10	1	0	1	0,5	0	20	1,32
3b	μM	1	2	0	1	0	40	1,61
4b		1	0	0	0	0	0	0,00
5b		1	1	0	0,5	0	20	1,32
<hr/>								
1a		1	1	0	0,5	0	20	1,32
2a		1	0	0	0	0	0	0,00
3a		1	0	0	0	0	0	0,00
4a		1	0	1	0,5	0	20	1,32
5a	P+L+ 20	1	0	0	0	0	0	0,00
1b	μM	1	0	1	0,5	0	20	1,32
2b		1	6	2	4	0	160	2,21
3b		1	3	0	1,5	0	60	1,79
4b		1	0	0	0	0	0	0,00
5b		1	0	0	0	0	0	0,00

TABELA A5 – Valores originais obtidos com a exposição das suspensões de *C. dubliniensis* (ATCC 7987) a diferentes tempos de pré-irradiação e 5,28 J/cm², após 48 horas da semeadura em placas de Petri.

Amostras	Grupo	TPI (min)	Duplicata 1	Duplicata 2	Média	Diluição	ufc/mL	Log (ufc/mL)
1a		24	90	84	87	3	3480000	6,54
2a		24	63	57	60	3	2400000	6,38
3a		24	73	59	66	3	2640000	6,42
4a	P-L- (SEM ILUMINAÇÃO)	24	62	66	64	3	2560000	6,41
5a		24	75	78	76,5	3	3060000	6,49
1b		24	99	89	94	3	3760000	6,58
2b		24	82	80	81	3	3240000	6,51
3b		24	86	84	85	3	3400000	6,53
4b		24	84	77	80,5	3	3220000	6,51
5b		24	114	103	108,5	3	4340000	6,64
1a		24	28	38	33	3	1320000	6,12
2a		24	45	46	45,5	3	1820000	6,26
3a		24	55	46	50,5	3	2020000	6,31
4a	P+L- 5 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	37	40	38,5	3	1540000	6,19
5a		24	59	58	58,5	3	2340000	6,37
1b		24	92	90	91	3	3640000	6,56
2b		24	72	79	75,5	3	3020000	6,48
3b		24	37	41	39	3	1560000	6,19
4b		24	46	41	43,5	3	1740000	6,24
5b		24	53	57	55	3	2200000	6,34
1a		24	65	60	62,5	3	2500000	6,40
2a		24	48	49	48,5	3	1940000	6,29
3a		24	40	52	46	3	1840000	6,26
4a	P+L- 10 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	36	52	44	3	1760000	6,25
5a		24	33	50	41,5	3	1660000	6,22
1b		24	60	68	64	3	2560000	6,41
2b		24	46	41	43,5	3	1740000	6,24
3b		24	54	60	57	3	2280000	6,36
4b		24	49	46	47,5	3	1900000	6,28
5b		24	46	54	50	3	2000000	6,30
1a		24	76	81	78,5	3	3140000	6,50
2a	P+L- 20 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	24	81	67	74	3	2960000	6,47
3a		24	63	107	85	3	3400000	6,53
4a		24	51	53	52	3	2080000	6,32
5a		24	68	68	68	3	2720000	6,43

1b		24	29	32	30,5	3	1220000	6,09
2b	P+L-	24	52	62	57	3	2280000	6,36
3b	20 µM	24	65	87	76	3	3040000	6,48
4b	(SEM ILUMINAÇÃO)	24	36	29	32,5	3	1300000	6,11
5b		24	131	129	130	3	5200000	6,72
1a		20	59	68	63,5	3	2540000	6,40
2a		20	48	54	51	3	2040000	6,31
3a		20	58	58	58	3	2320000	6,37
4a		20	52	56	54	3	2160000	6,33
5a	P-L+	20	64	69	66,5	3	2660000	6,42
1b		20	63	68	65,5	3	2620000	6,42
2b		20	56	58	57	3	2280000	6,36
3b		20	65	73	69	3	2760000	6,44
4b		20	44	54	49	3	1960000	6,29
5b		20	62	79	70,5	3	2820000	6,45
1a		20	8	4	6	0	240	2,38
2a		20	0	2	1	0	40	1,61
3a		20	17	5	11	0	440	2,64
4a		20	2	1	1,5	0	60	1,79
5a	P+L+	20	0	3	1,5	0	60	1,79
1b	5 µM	20	28	24	26	0	1040	3,02
2b		20	23	30	26,5	0	1060	3,03
3b		20	17	28	22,5	0	900	2,95
4b		20	19	11	15	0	600	2,78
5b		20	20	24	22	0	880	2,94
1a		20	13	13	13	0	520	2,72
2a		20	9	16	12,5	0	500	2,70
3a		20	10	11	10,5	0	420	2,62
4a		20	14	14	14	0	560	2,75
5a	P+L+	20	11	12	11,5	0	460	2,66
1b	10 µM	20	0	0	0	0	0	0,00
2b		20	5	8	6,5	0	260	2,42
3b		20	1	0	0,5	0	20	1,32
4b		20	2	2	2	0	80	1,91
5b		20	1	0	0,5	0	20	1,32
1a		20	0	0	0	0	0	0,00
2a		20	0	0	0	0	0	0,00
3a		20	0	0	0	0	0	0,00
4a		20	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+	20	0	0	0	0	0	0,00
1b	20 µM	20	0	0	0	0	0	0,00

2b		20	0	0	0	0	0	0,00
3b	P+L+	20	0	0	0	0	0	0,00
4b	20 µM	20	0	0	0	0	0	0,00
5b		20	0	0	0	0	0	0,00
1a		10	3	1	2	0	80	1,91
2a		10	5	5	5	0	200	2,30
3a		10	17	9	13	0	520	2,72
4a		10	4	4	4	0	160	2,21
5a	P+L+	10	5	10	7,5	0	300	2,48
1b	5 µM	10	3	4	3,5	0	1400	3,15
2b		10	0	1	0,5	0	200	2,30
3b		10	2	3	2,5	0	1000	3,00
4b		10	0	3	1,5	0	600	2,78
5b		10	0	0	0	0	0	0,00
1a		10	0	1	0,5	0	20	1,32
2a		10	0	0	0	0	0	0,00
3a		10	0	0	0	0	0	0,00
4a		10	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+	10	0	0	0	0	0	0,00
1b	10 µM	10	0	0	0	0	0	0,00
2b		10	0	0	0	0	0	0,00
3b		10	0	0	0	0	0	0,00
4b		10	0	0	0	0	0	0,00
5b		10	1	2	1,5	0	60	1,79
1a		10	0	0	0	0	0	0,00
2a		10	0	0	0	0	0	0,00
3a		10	0	0	0	0	0	0,00
4a		10	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+	10	0	0	0	0	0	0,00
1b	20 µM	10	0	0	0	0	0	0,00
2b		10	0	0	0	0	0	0,00
3b		10	0	0	0	0	0	0,00
4b		10	0	0	0	0	0	0,00
5b		10	0	0	0	0	0	0,00
1a		5	20	15	17,5	0	700	2,85
2a		5	24	20	22	0	880	2,94
3a		5	13	13	13	0	520	2,72
4a		5	14	14	14	0	560	2,75
5a	P+L+	5	14	21	17,5	0	700	2,85
1b	5 µM	5	9	1	5	0	200	2,30
2b		5	6	8	7	0	280	2,45

3b	P+L+ 5 µM	5	3	12	7,5	0	300	2,48
4b		5	3	1	2	0	80	1,91
5b		5	2	4	3	0	120	2,08
1a		5	0	0	0	0	0	0,00
2a		5	0	0	0	0	0	0,00
3a		5	0	0	0	0	0	0,00
4a		5	1	4	2,5	0	100	2,00
5a	P+L+ 10 µM	5	0	0	0	0	0	0,00
1b		5	13	9	11	0	440	2,64
2b		5	2	0	1	0	40	1,61
3b		5	0	0	0	0	0	0,00
4b		5	9	15	12	0	480	2,68
5b		5	10	8	9	0	360	2,56
1a		5	0	0	0	0	0	0,00
2a		5	0	0	0	0	0	0,00
3a		5	0	0	0	0	0	0,00
4a		5	0	0	0	0	0	0,00
5a	P+L+ 20 µM	5	0	0	0	0	0	0,00
1b		5	0	0	0	0	0	0,00
2b		5	0	0	0	0	0	0,00
3b		5	0	0	0	0	0	0,00
4b		5	0	0	0	0	0	0,00
5b		5	0	0	0	0	0	0,00
1a		1	40	24	32	0	1280	3,11
2a		1	30	30	30	0	1200	3,08
3a		1	47	48	47,5	0	1900	3,28
4a		1	24	28	26	0	1040	3,02
5a	P+L+ 5 µM	1	49	41	45	0	1800	3,26
1b		1	45	50	47,5	0	1900	3,28
2b		1	53	62	57,5	0	2300	3,36
3b		1	68	80	74	0	2960	3,47
4b		1	62	51	56,5	0	2260	3,35
5b		1	79	62	70,5	0	2820	3,45
1a		1	3	8	5,5	0	220	2,34
2a		1	14	16	15	0	600	2,78
3a		1	8	6	7	0	280	2,45
4a		1	10	7	8,5	0	340	2,53
5a	P+L+ 10 µM	1	5	11	8	0	320	2,51
1b		1	1	0	0,5	0	20	1,32
2b		1	0	0	0	0	0	0,00
3b		1	0	0	0	0	0	0,00

4b	P+L+	1	0	0	0	0	0	0,00
5b	10 µM	1	0	0	0	0	0	0,00
1a		1	0	0	0	0	0	0
2a		1	0	0	0	0	0	0
3a		1	0	0	0	0	0	0
4a		1	0	0	0	0	0	0
5a	P+L+	1	0	0	0	0	0	0
1b	20µM	1	1	1	1	0	0	0
2b		1	0	0	0	0	0	0
3b		1	0	0	0	0	0	0
4b		1	0	0	0	0	0	0
5b		1	0	0	0	0	0	0

TABELA A6 – Valores originais obtidos com a exposição dos biofilmes de *C. albicans* (ATCC 90028) a diferentes tempos de pré-irradiação e 5,28 e 10,56 J/cm², após leitura da redução do sal de XTT.

Amostras	Grupos controles	TPI (min)	Viabilidade celular após iluminação	
			5,28 J/cm ² (4 minutos)	10,56 J/cm ² (8 minutos)
1a		28	-	1,135
2a		28	-	1,143
3a		28	-	1,149
4a		28	-	1,112
5a		28	-	1,158
1b		28	-	1,191
2b		28	-	1,172
3b	P-L- (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,196
4b		28	-	1,141
5b		28	-	1,194
1c		28	-	1,170
2c		28	-	1,191
3c		28	-	1,240
4c		28	-	1,141
5c		28	-	1,228
1a		28	-	1,145
2a		28	-	1,209
3a		28	-	1,153
4a		28	-	1,171
5a		28	-	1,177
1b		28	-	1,251
2b		28	-	1,260
3b	P+L- 20 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,327
4b		28	-	1,240
5b		28	-	1,252
1c		28	-	1,282
2c		28	-	1,316
3c		28	-	1,286
4c		28	-	1,209
5c		28	-	1,244
1a		28	-	1,107
2a		28	-	1,151
3a		28	-	1,171
4a		28	-	1,153
5a		28	-	1,143
1b	P+L- 30 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,287
2b		28	-	1,221

3b		28	-	1,300
4b		28	-	1,251
5b		28	-	1,216
1c	P+L- 30 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,289
2c		28	-	1,208
3c		28	-	1,279
4c		28	-	1,198
5c		28	-	1,242
1a		28	-	1,113
2a		28	-	1,101
3a		28	-	1,101
4a		28	-	1,099
5a		28	-	1,121
1b		28	-	1,292
2b	P+L- 40 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,334
3b		28	-	1,375
4b		28	-	1,348
5b		28	-	1,296
1c		28	-	1,291
2c		28	-	1,185
3c		28	-	1,292
4c		28	-	1,212
5c		28	-	1,292
1a		20	1,314	1,201
2a		20	1,288	1,163
3a		20	1,362	1,144
4a		20	1,275	1,083
5a		20	1,242	1,174
1b		20	1,251	1,304
2b	P-L+	20	1,092	1,327
3b		20	1,162	1,240
4b		20	1,184	1,225
5b		20	1,263	1,291
1c		20	1,232	1,197
2c		20	1,252	1,213
3c		20	1,176	1,161
4c		20	1,200	1,155
5c		20	1,210	1,146
1a	P+L+ 20 µM	20	0,228	0,110
2a		20	0,227	0,113
3a		20	0,249	0,165
4a		20	0,262	0,165

5a		20	0,253	0,171
1b		20	0,256	0,215
2b		20	0,230	0,198
3b		20	0,246	0,218
4b	P+L+ 20 µM	20	0,266	0,195
5b		20	0,231	0,136
1c		20	0,144	0,210
2c		20	0,282	0,268
3c		20	0,152	0,227
4c		20	0,182	0,249
5c		20	0,167	0,324
1a		20	0,124	0,193
2a		20	0,213	0,086
3a		20	0,166	0,115
4a		20	0,141	0,106
5a		20	0,182	0,101
1b		20	0,171	0,154
2b		20	0,077	0,130
3b	P+L+ 30 µM	20	0,030	0,127
4b		20	0,051	0,089
5b		20	0,035	0,125
1c		20	0,167	0,111
2c		20	0,249	0,089
3c		20	0,126	0,219
4c		20	0,161	0,073
5c		20	0,144	0,082
1a		20	0,116	0,054
2a		20	0,069	0,100
3a		20	0,118	0,120
4a		20	0,135	0,032
5a		20	0,113	0,097
1b		20	0,040	0,080
2b		20	0,108	0,095
3b	P+L+ 40 µM	20	0,010	0,079
4b		20	0,100	0,072
5b		20	0,026	0,143
1c		20	0,128	0,047
2c		20	0,164	0,050
3c		20	0,040	0,035
4c		20	0,194	0,054
5c		20	0,155	0,048

1a		10	0,250	0,333
2a		10	0,299	0,227
3a		10	0,267	0,226
4a		10	0,334	0,271
5a		10	0,324	0,296
1b		10	0,212	0,114
2b		10	0,325	0,114
3b	P+L+ 20 µM	10	0,217	0,127
4b		10	0,231	0,086
5b		10	0,383	0,170
1c		10	0,323	0,237
2c		10	0,283	0,287
3c		10	0,334	0,327
4c		10	0,231	0,311
5c		10	0,335	0,425
<hr/>				
1a		10	0,229	0,292
2a		10	0,168	0,197
3a		10	0,245	0,208
4a		10	0,231	0,167
5a		10	0,218	0,129
1b		10	0,371	0,197
2b		10	0,365	0,041
3b	P+L+ 30 µM	10	0,357	0,172
4b		10	0,405	0,194
5b		10	0,370	0,225
1c		10	0,276	0,190
2c		10	0,188	0,222
3c		10	0,186	0,178
4c		10	0,236	0,143
5c		10	0,207	0,119
<hr/>				
1a		10	0,111	0,253
2a		10	0,176	0,185
3a		10	0,219	0,153
4a		10	0,120	0,148
5a		10	0,178	0,094
1b		10	0,300	0,147
2b		10	0,198	0,139
3b	P+L+ 40 µM	10	0,118	0,112
4b		10	0,246	0,104
5b		10	0,244	0,142
1c		10	0,384	0,111
2c		10	0,311	0,215

3c		10	0,319	0,099
4c	P+L+ 40 µM	10	0,308	0,173
5c		10	0,223	0,119
1a		5	0,355	0,239
2a		5	0,206	0,255
3a		5	0,302	0,249
4a		5	0,203	0,204
5a		5	0,108	0,192
1b		5	0,344	0,213
2b		5	0,299	0,212
3b	P+L+ 20 µM	5	0,349	0,197
4b		5	0,285	0,189
5b		5	0,319	0,155
1c		5	0,392	0,157
2c		5	0,330	0,180
3c		5	0,424	0,217
4c		5	0,274	0,173
5c		5	0,355	0,127
1a		5	0,233	0,233
2a		5	0,130	0,130
3a		5	0,135	0,135
4a		5	0,167	0,167
5a		5	0,224	0,224
1b		5	0,255	0,227
2b		5	0,269	0,134
3b	P+L+ 30 µM	5	0,239	0,185
4b		5	0,273	0,244
5b		5	0,230	0,217
1c		5	0,285	0,181
2c		5	0,165	0,175
3c		5	0,278	0,139
4c		5	0,335	0,146
5c		5	0,288	0,141
1a		5	0,206	0,206
2a		5	0,181	0,181
3a		5	0,183	0,183
4a		5	0,159	0,159
5a		5	0,069	0,069
1b		5	0,209	0,161
2b		5	0,157	0,163
3b	P+L+ 40 µM	5	0,156	0,183
4b		5	0,130	0,121

5b		5	0,172	0,111
1c		5	0,209	0,087
2c	P+L+ 40 µM	5	0,164	0,145
3c		5	0,224	0,103
4c		5	0,215	0,087
5c		5	0,235	0,126
1a		1	0,340	0,208
2a		1	0,583	0,281
3a		1	0,356	0,279
4a		1	0,375	0,360
5a		1	0,291	0,356
1b		1	0,301	0,254
2b	P+L+ 20 µM	1	0,318	0,267
3b		1	0,330	0,323
4b		1	0,335	0,303
5b		1	0,371	0,249
1c		1	0,462	0,329
2c		1	0,390	0,430
3c		1	0,392	0,298
4c		1	0,332	0,284
5c		1	0,336	0,391
1a		1	0,310	0,260
2a		1	0,228	0,208
3a		1	0,215	0,222
4a		1	0,331	0,226
5a		1	0,252	0,208
1b		1	0,162	0,184
2b	P+L+ 30 µM	1	0,283	0,126
3b		1	0,247	0,142
4b		1	0,263	0,156
5b		1	0,232	0,189
1c		1	0,230	0,302
2c		1	0,461	0,251
3c		1	0,237	0,291
4c		1	0,266	0,232
5c		1	0,245	0,269
1a		1	0,193	0,156
2a	P+L+ 40 µM	1	0,166	0,211
3a		1	0,163	0,208
4a		1	0,165	0,161
5a		1	0,172	0,205
1b		1	0,247	0,166

2b		1	0,189	0,122
3b		1	0,258	0,176
4b		1	0,198	0,161
5b		1	0,268	0,178
1c	P+L+ 40µM	1	0,252	0,252
2c		1	0,219	0,249
3c		1	0,287	0,342
4c		1	0,248	0,221
5c		1	0,243	0,283

TABELA A7 – Valores originais obtidos com a exposição dos biofilmes de *C. glabrata* (ATCC 2001) a diferentes tempos de pré-irradiação e 5,28 e 10,56 J/cm², após leitura da redução do sal de XTT.

Amostras	Grupos controles	TPI (min)	Viabilidade celular após iluminação	
			5,28 J/cm ² (4 minutos)	10,56 J/cm ² (8 minutos)
1a		28	-	1,261
2a		28	-	1,219
3a		28	-	1,251
4a		28	-	1,207
5a		28	-	1,298
1b		28	-	1,104
2b		28	-	1,268
3b	P-L- (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,266
4b		28	-	1,148
5b		28	-	1,144
1c		28	-	1,264
2c		28	-	1,131
3c		28	-	1,098
4c		28	-	0,938
5c		28	-	1,227
1a		28	-	1,169
2a		28	-	1,205
3a		28	-	1,322
4a		28	-	1,288
5a		28	-	1,330
1b		28	-	1,352
2b		28	-	1,383
3b	P+L- 20 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,459
4b		28	-	1,363
5b		28	-	1,315
1c		28	-	1,294
2c		28	-	1,295
3c		28	-	1,355
4c		28	-	1,292
5c		28	-	1,314
1a		28	-	1,155
2a		28	-	1,165
3a		28	-	1,222
4a		28	-	1,281
5a		28	-	1,266
1b	P+L- 30 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,326
2b		28	-	1,245

3b		28	-	1,349	
4b		28	-	1,337	
5b	P+L- 30 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,309	
1c		28	-	1,319	
2c		28	-	1,361	
3c		28	-	1,253	
4c		28	-	1,310	
5c		28	-	1,332	
1a		28	-	1,196	
2a		28	-	1,170	
3a		28	-	1,203	
4a		28	-	1,044	
5a		28	-	1,032	
1b	P+L- 40 µM (SEM ILUMINAÇÃO)	28	-	1,209	
2b		28	-	1,129	
3b		28	-	1,230	
4b		28	-	1,098	
5b		28	-	1,236	
1c		28	-	1,341	
2c		28	-	1,245	
3c		28	-	1,316	
4c		28	-	1,249	
5c		28	-	1,269	
1^a		20	1,046	0,928	
2^a		20	0,909	0,839	
3^a		20	0,952	1,039	
4^a		20	0,970	0,765	
5^a		20	1,097	0,870	
1b	P-L+	20	1,192	1,243	
2b		20	1,145	1,094	
3b		20	1,216	1,104	
4b		20	1,130	1,064	
5b		20	1,154	1,195	
1c		20	1,241	1,311	
2c		20	1,134	1,236	
3c		20	1,195	1,423	
4c		20	1,154	1,253	
5c		20	1,208	1,332	
1a		P+L+ 20 µM	20	0,214	0,303
2a			20	0,151	0,247
3a			20	0,241	0,145
4a			20	0,197	0,212

5a		20	0,178	0,252
1b		20	0,536	0,323
2b		20	0,565	0,348
3b	P+L+ 20 µM	20	0,514	0,416
4b		20	0,492	0,397
5b		20	0,400	0,332
1c		20	0,399	0,393
2c		20	0,344	0,288
3c		20	0,335	0,410
4c		20	0,466	0,268
5c		20	0,468	0,367
1a		20	0,211	0,308
2a		20	0,206	0,181
3a		20	0,203	0,243
4a		20	0,236	0,212
5a		20	0,233	0,251
1b		20	0,177	0,145
2b		20	0,111	0,103
3b	P+L+ 30 µM	20	0,195	0,181
4b		20	0,229	0,159
5b		20	0,257	0,226
1c		20	0,261	0,197
2c		20	0,306	0,149
3c		20	0,226	0,175
4c		20	0,265	0,159
5c		20	0,186	0,095
1a		20	0,135	0,195
2^a		20	0,161	0,318
3a		20	0,072	0,075
4a		20	0,065	0,165
5a		20	0,023	0,304
1b		20	0,174	0,150
2b		20	0,230	0,223
3b	P+L+ 40 µM	20	0,137	0,156
4b		20	0,057	0,171
5b		20	0,024	0,180
1c		20	0,172	0,078
2c		20	0,139	0,106
3c		20	0,176	0,056
4c		20	0,149	0,175
5c		20	0,163	0,086

1a		10	0,502	0,374
2a		10	0,408	0,306
3a		10	0,364	0,248
4a		10	0,311	0,293
5a		10	0,277	0,322
1b		10	0,650	0,418
2b		10	0,628	0,250
3b	P+L+ 20 µM	10	0,563	0,351
4b		10	0,744	0,388
5b		10	0,623	0,325
1c		10	0,420	0,441
2c		10	0,350	0,434
3c		10	0,387	0,340
4c		10	0,381	0,398
5c		10	0,446	0,451
<hr/>				
1a		10	0,402	0,462
2a		10	0,257	0,285
3a		10	0,269	0,279
4a		10	0,278	0,273
5a		10	0,245	0,215
1b		10	0,268	0,425
2b		10	0,071	0,291
3b	P+L+ 30 µM	10	0,156	0,347
4b		10	0,260	0,258
5b		10	0,226	0,354
1c		10	0,242	0,341
2c		10	0,170	0,349
3c		10	0,368	0,317
4c		10	0,253	0,305
5c		10	0,222	0,267
<hr/>				
1a		10	0,277	0,280
2a		10	0,225	0,202
3a		10	0,110	0,042
4a		10	0,132	0,212
5a		10	0,165	0,242
1b		10	0,189	0,217
2b		10	0,232	0,198
3b	P+L+ 40 µM	10	0,063	0,230
4b		10	0,112	0,229
5b		10	0,198	0,139
1c		10	0,223	0,240
2c		10	0,189	0,257

3c		10	0,247	0,264
4c	P+L+ 40 µM	10	0,218	0,265
5c		10	0,238	0,201
1a		5	0,460	0,412
2a		5	0,357	0,369
3a		5	0,314	0,367
4a		5	0,437	0,256
5a		5	0,252	0,249
1b		5	0,591	0,524
2b		5	0,565	0,463
3b	P+L+ 20 µM	5	0,536	0,552
4b		5	0,631	0,480
5b		5	0,514	0,411
1c		5	0,531	0,415
2c		5	0,481	0,353
3c		5	0,374	0,394
4c		5	0,438	0,355
5c		5	0,549	0,381
1a		5	0,506	0,397
2a		5	0,305	0,147
3a		5	0,390	0,179
4a		5	0,385	0,147
5a		5	0,356	0,283
1b		5	0,251	0,310
2b		5	0,181	0,331
3b	P+L+ 30 µM	5	0,193	0,273
4b		5	0,283	0,302
5b		5	0,305	0,291
1c		5	0,340	0,201
2c		5	0,193	0,126
3c		5	0,137	0,186
4c		5	0,191	0,226
5c		5	0,224	0,219
1a		5	0,365	0,149
2a		5	0,274	0,232
3a		5	0,115	0,124
4a		5	0,274	0,173
5a	P+L+ 40 µM	5	0,329	0,214
1b		5	0,257	0,236

2b		5	0,360	0,372
3b		5	0,239	0,262
4b		5	0,206	0,221
5b		5	0,163	0,236
1c	P+L+ 40 µM	5	0,152	0,062
2c		5	0,085	0,075
3c		5	0,209	0,109
4c		5	0,132	0,085
5c		5	0,235	0,029
1a		1	0,470	0,495
2a		1	0,359	0,412
3a		1	0,405	0,401
4a		1	0,349	0,314
5a		1	0,336	0,283
1b		1	0,488	0,617
2b		1	0,534	0,331
3b	P+L+ 20 µM	1	0,437	0,458
4b		1	0,444	0,524
5b		1	0,453	0,287
1c		1	0,287	0,473
2c		1	0,321	0,376
3c		1	0,337	0,477
4c		1	0,283	0,401
5c		1	0,362	0,431
1a		1	0,416	0,375
2a		1	0,368	0,355
3a		1	0,400	0,290
4a		1	0,353	0,295
5a		1	0,287	0,280
1b		1	0,447	0,410
2b		1	0,381	0,463
3b	P+L+ 30 µM	1	0,327	0,474
4b		1	0,458	0,443
5b		1	0,322	0,445
1c		1	0,363	0,285
2c		1	0,391	0,237
3c		1	0,427	0,282
4c		1	0,397	0,311
5c		1	0,276	0,357

1a		1	0,224	0,361
2a		1	0,231	0,317
3a	P+L+ 40 µM	1	0,289	0,347
4a		1	0,159	0,225
5a		1	0,189	0,240
1b		1	0,253	0,339
2b		1	0,382	0,286
3b		1	0,020	0,260
4b		1	0,319	0,298
5b		1	0,217	0,254
1c	P+L+ 40µM	1	0,288	0,304
2c		1	0,225	0,352
3c		1	0,317	0,189
4c		1	0,159	0,201
5c		1	0,236	0,288

TABELA A8 – Valores originais obtidos com a exposição dos biofilmes de *C. dubliniensis* (ATCC 7987) a diferentes tempos de pré-irradiação e 5,28 e 10,56 J/cm², após leitura da redução do sal de XTT.

Amostras	Grupos controles	TPI (min)	Viabilidade celular após iluminação	
			5,28 J/cm ² (4 minutos)	10,56 J/cm ² (8 minutos)
1a		28	-	0,918
2a		28	-	1,008
3a		28	-	1,085
4a		28	-	1,076
5a		28	-	1,029
1b		28	-	1,160
2b		28	-	1,028
3b	P-L-	28	-	1,030
4b		28	-	1,018
5b		28	-	0,980
1c		28	-	1,031
2c		28	-	0,899
3c		28	-	0,937
4c		28	-	0,943
5c		28	-	0,865
1a		28	-	0,705
2a		28	-	0,636
3a		28	-	0,686
4a		28	-	0,673
5a		28	-	0,684
1b		28	-	0,679
2b		28	-	0,611
3b	P+L- 20 µM	28	-	0,777
4b		28	-	0,696
5b		28	-	0,730
1c		28	-	0,693
2c		28	-	0,707
3c		28	-	0,600
4c		28	-	0,809
5c		28	-	0,695
1a		28	-	0,929
2a		28	-	0,840
3a		28	-	0,878
4a	P+L- 30 µM	28	-	0,829
5a		28	-	0,714
1b		28	-	1,042
2b		28	-	1,019

3b		28	-	1,169
4b		28	-	0,988
5b		28	-	1,004
1c	P+L- 30 µM	28	-	1,090
2c		28	-	0,934
3c		28	-	0,938
4c		28	-	0,904
5c		28	-	0,938
1a		28	-	0,735
2a		28	-	0,781
3a		28	-	0,720
4a		28	-	0,713
5a		28	-	0,770
1b		28	-	0,788
2b	P+L- 40 µM	28	-	0,658
3b		28	-	0,759
4b		28	-	0,721
5b		28	-	0,629
1c		28	-	0,842
2c		28	-	0,762
3c		28	-	0,726
4c		28	-	0,729
5c		28	-	0,747
1a		20	1,005	0,873
2a		20	0,960	0,797
3a		20	0,986	0,843
4a		20	0,961	0,840
5a		20	0,967	0,799
1b		20	0,985	1,051
2b	P-L+	20	0,996	1,054
3b		20	0,985	1,027
4b		20	0,882	0,950
5b		20	0,832	1,059
1c		20	1,239	1,247
2c		20	1,152	0,778
3c		20	1,026	0,844
4c		20	0,984	0,807
5c		20	1,087	0,772

1a		20	0,139	0,174
2a		20	0,252	0,175
3a		20	0,180	0,171
4a		20	0,180	0,136
5a		20	0,238	0,138
1b		20	0,409	0,225
2b		20	0,435	0,261
3b	P+L+ 20 µM	20	0,411	0,226
4b		20	0,466	0,249
5b		20	0,466	0,277
1c		20	0,458	0,338
2c		20	0,411	0,326
3c		20	0,332	0,253
4c		20	0,416	0,223
5c		20	0,358	0,273
<hr/>				
1a		20	0,101	0,076
2a		20	0,138	0,025
3a		20	0,141	0,088
4a		20	0,266	0,116
5a		20	0,183	0,106
1b		20	0,336	0,226
2b		20	0,322	0,222
3b	P+L+ 30 µM	20	0,282	0,283
4b		20	0,314	0,243
5b		20	0,223	0,216
1c		20	0,338	0,161
2c		20	0,249	0,199
3c		20	0,278	0,275
4c		20	0,328	0,300
5c		20	0,245	0,156
<hr/>				
1a		20	0,160	0,087
2a		20	0,150	0,150
3a		20	0,162	0,065
4a		20	0,109	0,070
5a		20	0,176	0,014
1b		20	0,256	0,186
2b		20	0,216	0,164
3b	P+L+ 40 µM	20	0,208	0,199
4b		20	0,290	0,168
5b		20	0,286	0,180
1c		20	0,211	0,290
2c		20	0,190	0,231

3c		20	0,140	0,261
4c	P+L+ 40 µM	20	0,151	0,103
5c		20	0,114	0,087
1a		10	0,343	0,359
2a		10	0,355	0,364
3a		10	0,345	0,210
4a		10	0,282	0,353
5a		10	0,258	0,298
1b		10	0,422	0,438
2b		10	0,386	0,380
3b	P+L+ 20 µM	10	0,439	0,368
4b		10	0,456	0,355
5b		10	0,459	0,325
1c		10	0,290	0,316
2c		10	0,414	0,328
3c		10	0,232	0,398
4c		10	0,213	0,302
5c		10	0,288	0,283
1a		10	0,212	0,274
2a		10	0,188	0,237
3a		10	0,150	0,282
4a		10	0,185	0,304
5a		10	0,270	0,309
1b		10	0,441	0,222
2b		10	0,360	0,250
3b	P+L+ 30 µM	10	0,358	0,278
4b		10	0,375	0,380
5b		10	0,268	0,326
1c		10	0,501	0,238
2c		10	0,229	0,116
3c		10	0,345	0,214
4c		10	0,396	0,255
5c		10	0,432	0,213
1a		10	0,285	0,235
2a		10	0,160	0,187
3a		10	0,244	0,190
4a		10	0,178	0,178
5a	P+L+ 40 µM	10	0,201	0,178
1b		10	0,303	0,248
2b		10	0,324	0,177
3b		10	0,254	0,220
4b		10	0,265	0,272

5b		10	0,242	0,295
1c		10	0,351	0,185
2c	P+L+ 40 µM	10	0,309	0,185
3c		10	0,274	0,165
4c		10	0,314	0,117
5c		10	0,280	0,141
1a		5	0,357	0,326
2a		5	0,286	0,323
3a		5	0,388	0,334
4a		5	0,312	0,358
5a		5	0,263	0,317
1b		5	0,432	0,386
2b		5	0,393	0,328
3b	P+L+ 20 µM	5	0,320	0,351
4b		5	0,353	0,315
5b		5	0,361	0,356
1c		5	0,425	0,359
2c		5	0,444	0,228
3c		5	0,394	0,271
4c		5	0,444	0,315
5c		5	0,410	0,263
1a		5	0,324	0,131
2a		5	0,318	0,204
3a		5	0,298	0,197
4a		5	0,229	0,196
5a		5	0,173	0,185
1b		5	0,380	0,396
2b		5	0,290	0,442
3b	P+L+ 30 µM	5	0,244	0,246
4b		5	0,238	0,281
5b		5	0,241	0,279
1c		5	0,407	0,240
2c		5	0,278	0,142
3c		5	0,212	0,117
4c		5	0,268	0,119
5c		5	0,247	0,173
1a		5	0,261	0,276
2a		5	0,135	0,174
3a		5	0,200	0,204
4a	P+L+ 40 µM	5	0,143	0,178
5a		5	0,138	0,166
1b		5	0,156	0,218

2b		5	0,203	0,259
3b		5	0,142	0,241
4b		5	0,178	0,299
5b		5	0,257	0,274
1c	P+L+ 40 µM	5	0,278	0,078
2c		5	0,285	0,133
3c		5	0,193	0,129
4c		5	0,111	0,082
5c		5	0,087	0,109
1a		1	0,305	0,351
2a		1	0,327	0,333
3a		1	0,272	0,425
4a		1	0,347	0,374
5a		1	0,238	0,355
1b		1	0,268	0,336
2b		1	0,349	0,366
3b	P+L+ 20 µM	1	0,327	0,361
4b		1	0,340	0,448
5b		1	0,286	0,407
1c		1	0,395	0,381
2c		1	0,466	0,456
3c		1	0,377	0,328
4c		1	0,292	0,365
5c		1	0,282	0,256
1a		1	0,257	0,252
2a		1	0,213	0,297
3a		1	0,339	0,305
4a		1	0,288	0,278
5a		1	0,336	0,337
1b		1	0,349	0,327
2b		1	0,316	0,296
3b	P+L+ 30 µM	1	0,375	0,267
4b		1	0,309	0,317
5b		1	0,322	0,286
1c		1	0,441	0,229
2c		1	0,298	0,115
3c		1	0,262	0,180
4c		1	0,258	0,151
5c		1	0,328	0,173

1a		1	0,307	0,264
2a		1	0,227	0,338
3a		1	0,330	0,352
4a		1	0,231	0,321
5a		1	0,265	0,214
1b		1	0,302	0,255
2b		1	0,317	0,253
3b	P+L+ 40μM	1	0,253	0,341
4b		1	0,246	0,294
5b		1	0,305	0,303
1c		1	0,328	0,133
2c		1	0,308	0,120
3c		1	0,286	0,183
4c		1	0,202	0,114
5c		1	0,227	0,114

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

Araraquara, 17 de junho de 2011.

MARIANA CARVALHO ANDRADE