

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E EXATAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

SELMA MARIA CAMURI FIRMINO CARLOS

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR ZnPc LIPOSSOMAL SOBRE
Candida albicans

UBERABA

2015

SELMA MARIA CAMURI FIRMINO CARLOS

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR ZnPc LIPOSSOMAL SOBRE
Candida albicans

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre em Inovação Tecnológica.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Marina Scatena

Co-orientador: Prof^º. Dr^º. Tony de Paiva Paulino

Uberaba

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

F557t Firmino Carlos, Selma Maria Camuri
Terapia fotodinâmica mediada por ZnPc lipossomal sobre *Candida albicans* / Selma Maria Camuri Firmino Carlos. -- 2015.
78 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Lúcia Marina Scatena
Coorientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Ftalocianina de zinco lipossomal. 3. *Candida albicans*. I. Scatena, Lúcia Marina. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 615.831

SELMA MARIA CAMURI FIRMINO CARLOS

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR ZnPc LIPOSSOMAL SOBRE
Candida albicans

Trabalho de conclusão apresentado ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 04 de agosto de 2015

Banca Examinadora:



Profª. Dra. Lucia Marina Scatena
Orientadora – UFTM



Profª. Dra. Mônica Hitomi Okura
Membro Titular – UFTM



Profª. Dra. Olga Luisa Tavano
Membro titular – UNIFAL

Dedico este trabalho de Dissertação de Mestrado...

A Deus, meu protetor, por me orientar e conduzir nos momentos mais difíceis e pela oportunidade de seguir à frente.

Ao meu marido, João Firmino, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando, sendo meu parceiro nos momentos de estudo e me ajudando para que eu aproveitasse ao máximo esta oportunidade em minha vida.

Aos amores de minha vida, minhas filhas Gabriela e Izabela, pela presença constante em cada momento, a compreensão, sendo parceiras nos momentos mais difíceis....não tem o que dizer...

Vocês são muitos especiais e únicos!

*“As coisas mais simples da vida são as mais extraordinárias,
e só os sábios conseguem vê-las.”*

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha Orientadora Profª. Drª. Lúcia Marina Scatena por me receber de braços abertos, pelo ensino, profissionalismo, respeito, compreensão, amizade e paciência.

“Uns são homens; alguns são professores; poucos são mestres.

“Aos primeiros, escuta-se; aos segundos, respeita-se; aos últimos, segue-se.”

Raquel Eckert

Agradeço ao meu Co-orientador Profº. Drº Tony de Paiva Paulino pelo incentivo de começar a trabalhar com a pesquisa científica, pelo ensino, confiança, amizade e paciência.

“As pessoas que progredem neste mundo são as que se levantam e procuram as circunstâncias que querem e, se não as encontram, criam-nas.”

George Bernard

A Profª. Drª. Olga Luísa Tavano, pela confiança e incentivo durante o tempo em que me orientou.

“Não basta saber: também é preciso aplicar; não é suficiente querer, também é preciso agir.”

Goethe

Aos professores, Drª. Mônica Hitomi Okura e Drº. Paulo Roberto da Silva, pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação.

“A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las.”

Aristóteles

Aos Professores Drª. Lúcia Helena Pelizer Pasotto, Drº. Marlei Barboza Pasotto, Drª. Márcia Helena Pontieri, pelo ensino e amizade!

Á Sônia Maria Rezende Paolinelli – Bibliotecária – por todas as informações!

A minha amiga Ana Cristina Duque, obrigada de coração, por me ensinar a Oratória!

Ao CEFORES – Centro de Educação Profissional da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM – pela utilização de seu laboratório e de todos os seus equipamentos e materiais disponibilizados na execução deste trabalho.

A Todos a minha Gratidão!

*“Que bom que não sou o melhor de todos
Porque ainda me resta um caminho a percorrer para procurar melhorar.
Que bom que não tenho tudo, só assim me animo a lutar pelo que me falta.
É realmente bom que não saiba tudo,
Se soubesse, não teria que aprender.
Que bom que eu tenho defeitos.
Se não os tivesse, viveria só, não compreenderia as faltas do meu próximo...
Que bom que não sou o mais forte do mundo.
Se o fosse, não precisaria de quem me auxiliasse.
E não compreenderia a solidariedade e a ajuda porque tentaria fazer tudo sozinho.
Que bom que não estou sozinho.
Que bom que somos uma equipe.
Que necessitamos uns dos outros,
Que buscamos caminhos e alternativas para transformar e crescer...”*

Autor desconhecido

RESUMO

No presente trabalho foram construídos lipossomas estáveis vazios e contendo o zinco ftalocianina para a realização da Terapia Fotodinâmica em *Candida albicans*. Os procedimentos experimentais compreenderam a obtenção de uma suspensão padrão de *C. albicans* contendo 10^6 células viáveis por mL, a preparação das células para os ensaios e o delineamento experimental realizado em cinco grupos experimentais: GC; GTFD; GLUZ; GDROGA e GLIPO em quadruplicata. As análises abrangeram a determinação do número de unidades formadoras de colônias – (UFCs); curva de crescimento celular, avaliação do pH do meio de cultivo e consumo de glicose durante o crescimento desta espécie de fungo. Os resultados da construção dos lipossomas mostraram uma produção de vesículas esféricas, com estruturas íntegras, unilamelares, homogêneas, com dimensão de 0,1 μ , com estabilidade física, química e biológica para a realização dos procedimentos experimentais. Para a determinação do número de unidades formadoras de colônias - UFC's - os resultados obtidos mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. ANOVA, ($p < 0,05$), teste de Tukey. $n=15$. Neste estudo, houve uma redução logarítmica de 1,42 UFC/ mL no grupo TFD quando comparado com o grupo C. Através da curva de crescimento de *C. albicans* em meio planctônico durante 24 horas, foi demonstrado uma diminuição de crescimento de células no GTFD em comparação aos grupos C; DROGA; LIPO e LUZ. Um declínio muito significativo de pH ocorreu durante a fase log de crescimento nos grupos C; DROGA; LIPO e LUZ, apresentando uma medida de pH ácido a partir da 12^a h até o final de 24^a h. No GTFD o pH alcalino-neutro permaneceu sem alterações (fase “lag”) até a 13^a h. Após, um pH ácido final de 5,51 na 24^a h. Constatou-se um decréscimo significativo na concentração de glicose dos grupos C; DROGA; LIPO e LUZ em todos os tempos em que a amostra foi colhida (24 h). A partir do qual não há indícios de consumo de glicose. Observou-se no GTFD um consumo reduzido de glicose durante todo o período de 24 hs. A comparação entre os grupos para as variáveis curva de crescimento, medidas de pH e concentração de glicose foram realizadas pela ANOVA, $p < 0,05$, teste de Tukey. O GTFD apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado com os grupos C; DROGA; LIPO e LUZ.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia Fotodinâmica. Zinco Ftalocianina Lipossomal. *Candida albicans*

ABSTRACT

In the present work empty liposomes were stable constructed and phthalocyanine containing zinc for the realization of photodynamic therapy of *Candida albicans*. Experimental procedures included obtaining a standard suspension of *C. albicans* containing 10^6 viable cells per ml, the preparation of cells for testing and experiment conducted in five experimental groups: CG; GTFD; GLUZ; GDROGA and GLIPO in quadruplicate. The analyzes covered the determination of the number of colony forming units - (CFU); Cell growth curve, evaluation of pH of the culture medium and consumption of glucose during the growth of this fungus species. The construction of liposomes results showed a production of spherical vesicles with intact structures, unilamellar, homogeneous, with dimensions of 0.1 μm , to physical, chemical and biological stability to achieve the experimental procedures. To determine the number of colony forming units - CFU - the results showed a statistically significant difference between the experimental groups. ANOVA ($p < 0.05$), Tukey's test. $n = 15$. In this study, there was a 1.42 log reduction of CFU / ml in PDT group compared with group C. Through the growth curve of *C. albicans* planktonic in medium for 24 hours, a decrease of cell growth was demonstrated in GTFD compared to the group; C; DRUG; LIPO and LIGHT. A significant decline of pH occurred during the log phase of growth in the groups; C; DRUG; LIPO and LIGHT, with a pH acid measured from the 12 th h by the end of the 24th h. In GTFD the alkaline neutral pH remained unchanged (phase "lag") until the 13 th hour. After a final pH of 5.51 acid at 24 h. We found a significant decrease in the concentration of glucose in groups C; DRUG; LIPO and LIGHT at all times where the sample was taken (24 h). From which no glucose consumption indications. GTFD observed in a reduced consumption of glucose during the period of 24 hours. The comparison between the groups for the growth curve variables, pH and glucose concentration measurements were performed by ANOVA, $p < 0.05$, Tukey test. The GTFD showed statistically significant differences when compared to the group: C; DRUG; LIPO and LIGHT.

KEYWORDS: Photodynamic Therapy. Zinc phthalocyanine Liposomal. *Candida albicans*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Morfologia de <i>Candida albicans</i>	22
Figura 2 -	Fatores de virulência da <i>Candida albicans</i>	23
Figura 3 -	Esquema representativo da aplicação da TFD.....	28
Figura 4 -	Processos de desativação das moléculas.....	31
Figura 5 -	Diagrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização.....	32
Figura 6 -	Estrutura química do Zinco ftalocianina (ZnPc).....	36
Figura 7 -	Imagem de Lipossoma.....	37
Figura 8 -	Resultado de vesículas de tamanho e distribuição médio.....	39
Figura 9 -	Construção dos Lipossomas.....	42
Figura 10 -	Irradiação das células de <i>Candida albicans</i>	45
Figura 11 -	Imagem Microscópica dos Lipossomas.....	47
Figura 12 -	Medidas de absorbância lipossomal em relação ao tempo (dias).....	48
Figura 13 -	Medidas de absorbância da ZnPc lipossomal em relação ao tempo (dias).....	49
Figura 14 -	Média e intervalo de 95% de Confiança de Log (UFC/ mL) obtida por fotossensibilização de <i>Candida albicans</i>	51
Figura 15 -	Curva de Crescimento de <i>Candida albicans</i> em meio planctônico em função do tempo.....	54
Figura 16 -	Médias e intervalo de 95% de Confiança da curva de crescimento da <i>C. albicans</i> no momento inicial.....	55
Figura 17 -	Medidas de pH do meio de cultivo de <i>Candida albicans</i> em função do tempo de crescimento.....	56
Figura 18 -	Médias e intervalo de 95% de Confiança das medidas de pH da <i>Candida albicans</i> no momento inicial.....	57
Figura 19 -	Consumo de glicose em função do tempo de crescimento de <i>Candida albicans</i>	58
Figura 20 -	Médias e intervalo de 95% de Confiança do consumo de glicose de <i>C. albicans</i> obtido através dos tratamentos realizados no momento inicial....	59
Quadro 1 -	Descrição dos Grupos e Tratamentos utilizados no Delineamento Experimental da Terapia Fotodinâmica na Inativação da <i>C. albicans</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados expressos em Médias e Intervalo de Confiança (IC) e percentagem.....51

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency Syndrome</i>
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATP	Trifosfato de Adenosina
Banda Q	Apresentam máximos de absorção
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
CEC	Centre of Biological Engineering
<i>DLS</i>	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica/ Absorbância
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fase “lag”	Fase de adaptação da cultura
Fase “log”	Fase aonde as células se reproduzem
GC	Grupo Controle
G Droga	Grupo do ZnPc Lipossomal
G Lipo	Grupo Lipossoma
G Luz	Grupo da Luz
G TFD	Grupo da Terapia Fotodinâmica
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IC	Estado de conversão interna
Isc	Cruzamento Intersistema
LED	Diodos Emissores de Luz
LMVs	Vesículas Multilamelares
Log	Logaritmo
LPC	Lisofosfatidilcolina
LUVs	Vesículas Unilamelares
PCs	Fosfatidilcolinas
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato

pH	Potencial Hidrogeniônico
PSs	Fotossensibilizadores
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
SDC	<i>Salt-Dextrose</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
UFC/ mL	Unidades Formadoras de Colônias/ mililitro
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
UFC's	Unidades Formadoras de Colônias
ZnPc	Zinco Ftalocianina
ZnPcMe	Tetrakis-(-3-methylpyridyloxy)
ZnPcS	Tetrakis-(-4-sulfophenoxy)

LISTA DE SIGLAS

CEFORES	Centro de Educação Profissional da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SIMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\bullet\text{O}_2$	Ânion superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
$\text{HO}\bullet$	Radical Hidroxila
J/cm^2	Joules/ centímetro quadrado
Mg	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mW	Milliwatts
Nm	Nanômetro
O_2	Gás Oxigênio
S_0	Estado fundamental
S_1	Primeiro estado excitado singleto
S_n	Estado excitado singleto
T_1	Primeiro estado excitado singleto
W	Watt
Λ	Lambda
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Micrograma/ mililitro
μL	Microlitro
Mm	Micrômetro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVO GERAL.....	19
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1	FUNGOS.....	20
3.2	<i>Candida albicans</i> : UM FUNGO OPORTUNISTA.....	21
3.2.1	Candidíase ou Candidose.....	24
3.3	DROGAS ANTIFÚNGICAS.....	25
3.4	TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD).....	26
3.4.1	Mecanismos de ação fotoquímicos.....	30
3.4.1.1	<i>Processos fotofísicos e fotoquímicos que ocorrem durante a TFD.....</i>	31
3.4.1.1.1	Mecanismos biológicos envolvidos na terapia fotodinâmica.....	33
3.5	AGENTES FOTOSENSIBILIZADORES.....	34
3.6	LIPOSSOMAS.....	36
3.7	ASPECTOS TECNOLÓGICOS DA PREPARAÇÃO LIPÍDICA PARA A FORMA DE DISPERSÃO AQUOSA DE FOSFOLIPÍDIOS: POR EXTRUSÃO.....	38
3.8	FONTES DE IRRADIAÇÃO.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	41
4.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE LIPOSSOMAL.....	42
4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAR A EFETIVIDADE DA TFD NA INATIVAÇÃO DA <i>Candida</i> <i>albicans</i>	43
4.3.1	Obtenção de uma suspensão de <i>Candida albicans</i>.....	43
4.3.2	Preparação das células para os ensaios.....	43

4.3.3	Ensaio da terapia fotodinâmica (TFD) “<i>In vitro</i>”	43
4.3.3.1	<i>Delineamento Experimental</i>	43
4.3.4	Determinação do número de unidades formadoras de colônias – (UFC’s)	44
4.3.5	Curva de crescimento celular, avaliação do pH do meio de cultivo e consumo de glicose durante o crescimento da <i>Candida albicans</i>	44
4.3.6	Descarte de células	45
4.4	ANÁLISE DE DADOS	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	47
5.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE LIPOSSOMAL	48
5.3	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS – UFC’s	50
5.4	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Candida albicans</i>	53
5.4.1	Avaliação do pH do meio de cultivo de <i>Candida albicans</i>	55
5.4.2	Consumo de glicose da <i>Candida albicans</i>	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A – equipamentos e materiais.....	73
	ANEXO B - Meios de cultura, Material microbiológico e Soluções.....	74
	ANEXO C – Roteiro das práticas experimentais.....	76

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e como causa de candidíase em pessoas de todas as partes do mundo. Trata-se de levedura com potencial patogênico bastante conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas como proteínases e fosfolipases (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; DOVIGO et al., 2010; COLOMBO et al., 2014).

Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimaduras ou procedimentos médicos invasivos. Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos (DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSIE, 2003).

Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) encontram-se expostos a um alto risco de desenvolver infecções fúngicas invasivas. Apesar dos melhores esforços da comunidade médica, a taxa de morbidade e mortalidade associadas à candidemia permanece elevada, o diagnóstico precoce da doença invasiva é crítico, gerando como consequência, atraso na administração de uma terapêutica adequada (GAREY et al., 2006; DELAYONE; CALANDRA, 2014).

A era da terapia utilizando antifúngicos iniciou-se nos anos 1950 quando o uso de Anfotericina B Deoxicolato (classe dos polienos) se tornou acessível e resultou em muitos tratamentos bem sucedidos. Porém, com o tempo de tratamento, esta droga demonstrou desvantagens como à dificuldade de administração e seus efeitos tóxicos (CHAUCANÉS, 2014).

Entre as décadas de 70 e 90 surgiram novas drogas como a 5-Flucitosina (fluorado sintético), e os triazóis nos anos 2000 (HEITMAN et al., 2011). No entanto, o aumento do uso de azóis, chamou a atenção para o problema da resistência aos medicamentos antifúngicos, descrevendo a ampla falha de uma terapia antifúngica, resultando na persistência ou a progressão desta infecção principalmente em pacientes imunocomprometidos portadores do *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (BLISS et al., 2004; DOVIGO et al., 2011).

Com a crescente resistência contra os agentes antifúngicos, o interesse renovou a busca de formas de tratamentos alternativos e a Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de microrganismos patogênicos. O foco é principalmente a aplicação da TFD sobre fungos patogênicos, como *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* e especialmente *Candida albicans* (LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005; QUEIROGA et al., 2011; PRATES et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013; KATO et al., 2013; ROSSONI et al., 2014). E em bactérias Gram-positiva como *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (LÓPEZ-JIMÉNEZ et al., 2015). E em bactérias Gram-negativa como *Pseudomonas aeruginosa* (MANTAREVA et al., 2011).

O processo fotodinâmico requer a utilização de um composto químico fotossensibilizador (PS), a aplicação de uma luz que corresponde à banda de absorção do PS e a presença de oxigênio, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete, que é altamente reativo no sistema biológico e pode interagir com as proteínas e lipídios promovendo a inativação das células (DOVIGO et al., 2010).

O Zinco Ftalocianina (ZnPc), utilizado neste trabalho, é considerado um PS de segunda geração, com pico de forte absorção na faixa de comprimento de onda máximo entre 600 a 800 nm. É um composto hidrofóbico, necessitando de técnicas alternativas, como a sua incorporação a sistemas carreadores de drogas - os lipossomas, para que a disponibilidade desta droga a sistemas celulares seja realizada (PAULINO, 2006; LONGO et al., 2009; ALVES E SILVA, 2010).

As infecções superficiais e invasivas por *Candida* acometem pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco, onde, esta levedura expõe sua patogenicidade e virulência, aumentando os casos de infecções fúngicas e conseqüentemente o uso excessivo de drogas antifúngicas, favorecendo a resistência aos medicamentos convencionais.

Com a crescente preocupação devido à falta efetiva de agentes antifúngicos e um considerável aumento da resistência fúngica, principalmente pela *Candida albicans* aos agentes existentes, neste trabalho, foi utilizada a TFD, destacando este tratamento realizado através de uma droga hidrofóbica via meio lipossomal, como uma pesquisa de inovação tecnológica na área da saúde como uma terapia não invasiva e local contra infecções fúngicas.

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar os efeitos da “TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR ZnPc LIPOSSOMAL SOBRE *Candida albicans*.”

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir e caracterizar os lipossomas;
- Avaliar a estabilidade Lipossomal;
- Avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica na inativação da *Candida albicans*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FUNGOS

Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila, nem qualquer pigmento fotossintético: não têm celulose na parede celular, exceto em alguns fungos aquáticos; não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies de fungos e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelha às células humanas. São seres vivos eucarióticos com um só núcleo, como as leveduras. Ou multinucleados, como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (fungos macroscópicos) (TRABULSI et al., 2008).

Fungos são seres heterótrofos por absorção e armazenamento de glicogênio (LACAZ et al., 2002).

Eles se comunicam com o meio externo através da parede celular. Esta parede é formada por polissacarídeos associados aos polipeptídeos, constituindo as glicoproteínas. As glicoproteínas desempenham papel tanto enzimático quanto estrutural. São indispensáveis nas vias metabólicas, na manutenção da homeostase e nas inter-relações celulares, em relação ao crescimento e a reprodução. Estruturalmente, a membrana celular dos fungos é semelhante às membranas das células animais e vegetais, apresentando bicamada lipídica com proteínas e glicoproteínas dispersas (SALES, 2006).

A membrana citoplasmática atua como uma barreira semipermeável, no transporte ativo e passivo dos materiais, para dentro e para fora da célula, sendo constituída de uma porção hidrofóbica e de uma porção hidrofílica (TRABULSI et al., 2008).

As membranas das células dos fungos têm em sua composição química o esterol: o ergosterol (CAMPOS; MENEZES; SILVA PONE, 2004).

O ergosterol contribui para uma variedade de funções celulares, incluindo a fluidez, a integridade da membrana e a função adequada de enzimas ligadas à membrana, tais como as proteínas associadas com o transporte de nutrientes e síntese de quitina (LUPETTI et al., 2002; ONYEWU et al., 2003). A interrupção de sua síntese resulta em morte celular (CAMPOS; MENEZES; SILVA PONE, 2004).

De acordo com a sua morfologia, os fungos podem ser classificados como leveduras ou como fungos filamentosos (SALES, 2006).

As colônias leveduriformes, em geral, são pastosas ou cremosas e caracterizam o grupo de leveduras. São microrganismos unicelulares, em que a própria célula cumpre as

funções vegetativas e reprodutivas. Por brotamento da célula-mãe, formam-se os brotos também denominados gêmulas ou blastoconídios, que possuem forma em geral arredondada ou ovalada, que podem desprender-se da célula-mãe, ou permanecer, em determinadas espécies, ligados a ela, em cadeia, formando uma estrutura denominada pseudo-hifa, cujo conjunto é um pseudomicélio (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2012).

As colônias filamentosas, características dos bolores, podem ser algodonosas, aveludadas, pulverulentas, com os mais variados tipos de pigmentação. Esses organismos são constituídos fundamentalmente por elementos multicelulares, em forma de tubos – as hifas – que podem ser contínuas não-septadas ou (cenocíticas) ou septadas (TRABULSI et al., 2008; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2012).

3.2 *Candida albicans*: UM FUNGO OPORTUNISTA

Infecções por *Candida* têm sido observadas desde o tempo do renomado médico Hipócrates (460 ~ 370 A.C.) que descreveu a candidíase oral em pacientes debilitados (SERRACARBASSA; DOTTO, 2003; BARNETT, 2008).

A *Candida albicans* é considerada um dos patógenos oportunistas mais comuns, causadora da candidíase, uma doença da mucosa da boca, vagina e trato alimentar (KIM; SUDBERY, 2011). É o mais estudado e mais prevalente dos fungos patogênicos humano, sua posição é o 4º lugar mais comum causador de infecções nosocomiais (hospitalares) (BERMAN, 2012). Infecções mais graves por *Candida* podem envolver o coração (endocardite), o sangue (septicemia) e o cérebro (meningite) (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 2012). Infecções superficiais de mucosas são documentadas em pacientes imunocomprometidos, como, estomatite crônica atrófica, candidíase crônica mucocutânea e vulvovaginite e em casos mais graves, podem invadir, causando candidemia, infectando órgãos individuais ou múltiplos (ABEGG, 2010). Sendo reconhecidos como os principais agentes de infecção hospitalar, envolvendo a formação de biofilmes em dispositivos implantados, como cateteres, próteses ou válvulas cardíacas. Biofilmes de *Candida albicans* formado em cateter, consistem de microcolônias fechadas em função da matriz de leveduras e hifas, arrançadas em uma estrutura de bicamada, sendo muito resistentes aos agentes antifúngicos, aonde ocorre uma difícil penetração e difusão de fármacos no biofilme, com redução de concentração de até 80%, sendo considerado como um fator de resistência (DOUGLAS, 2003; SUZUKI, 2009). Os micologistas têm observado que os microrganismos praticamente não existem na sua forma livre, planctônico nos tecidos do hospedeiro, mas se

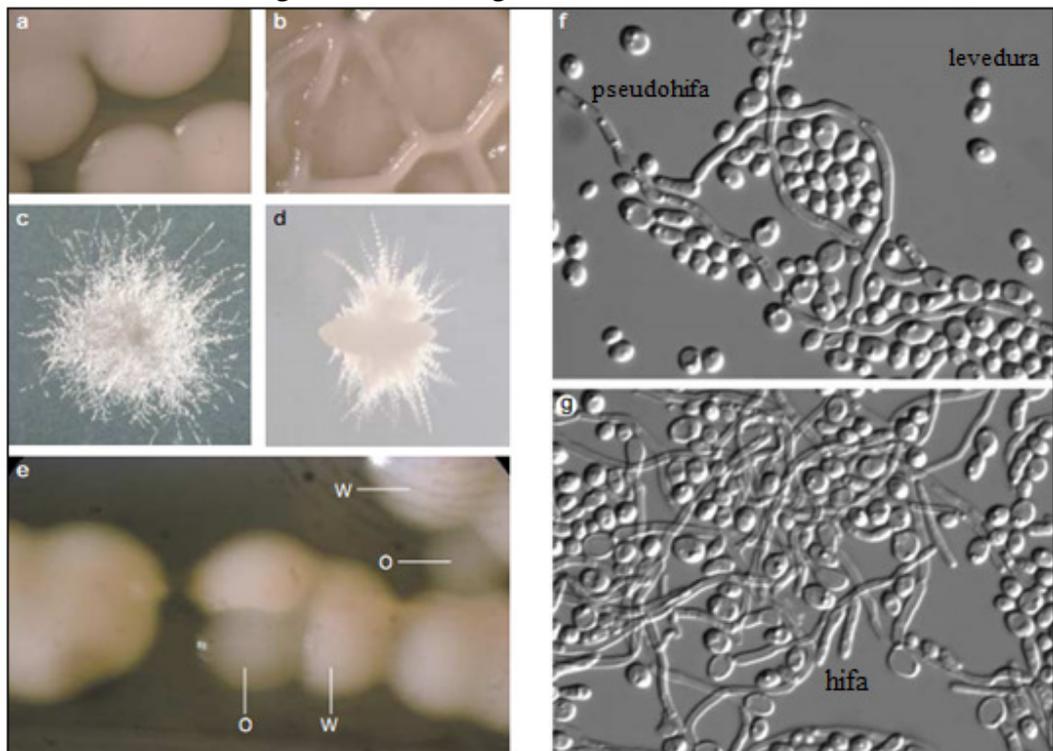
agrupam formando uma comunidade multicelular e plural, tanto sob os tecidos, quanto em próteses, cateteres e outras superfícies (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Esta espécie pode ser cultivada em meio ágar Sabouraud, desenvolvendo-se como colônias cremosas, de cor creme, formadas por elementos leveduriformes, ovais ou arredondadas. A sua forma invasiva produz hifas septadas, com septos espaçados; permitindo observar a presença de células ovaladas ou arredondadas, podendo apresentar pseudo-hifas (SALES, 2006; TRABULSI et al., 2008).

É uma levedura diplóide com uma história de dimorfismo fúngico (FORCHE et al., 2003; BARBEDO; SGARBI, 2010).

Uma impressionante característica de sua biologia é a sua habilidade de crescer em distintos estados morfológicos (FIG. 1).

Figura 1 - Morfologia de *Candida albicans*



Fonte: BERMAN; SUDBERY, 2002; CRAMPIN et al., 2005.

Legenda: A única cepa pode assumir diferentes morfologias em diversos meios ou como consequência de mudança fenotípica:

- Colônias lisas cultivadas em meio salt-dextrose complete (SDC);
- Colônias enrugadas crescidas em meio spider;
- Colônias difusas cultivadas em meio Milk tween agar;
- Colônias crescidas em meio rico que contém sacarose;
- Mudança fenotípica – branco-opaco aparece em meio SDC a 23°C. Como resultado aparecem colônias brancas (W) e colônias opacas (O);
- Gametas de leveduras e pseudo-hifas e
- Hifas verdadeiras.

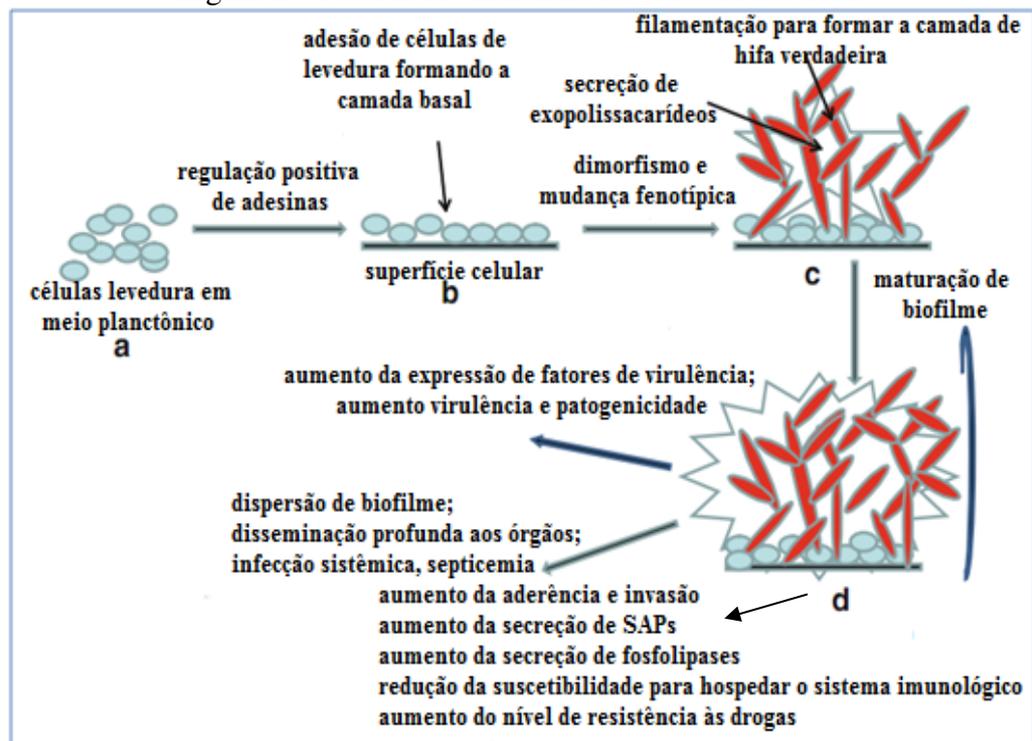
Os mecanismos moleculares envolvidos pelo qual, esta espécie, muda da forma comensal para patogênica no hospedeiro, não são bem compreendidos, embora certamente, um fator importante é a condição imunodeprimida do hospedeiro (FORCHE et al., 2003).

A mudança na morfologia da fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como a variação de temperatura e pH (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004; BARBEDO; SGARBI, 2010).

Esta habilidade é uma característica que a define, acredita-se que cada forma de crescimento possui uma função perigosa, necessário, para seu estilo de vida patogênico (WHITEWAY; BACHEWICH, 2007).

A caracterização de fatores de virulência mostrada na Figura 2 é importante para melhorar a compreensão de sua patogênese e exploração de uma nova droga a ser utilizada (KHAN et al., 2010).

Figura 2 – Fatores de virulência da *Candida albicans*



Fonte: Adaptado de KHAN et al., (2010, p. 39).

Legenda: Esta ilustração mostra os mecanismos utilizados pela *Candida albicans* para infectar o Hospedeiro (SOLL; LOCKHART; ZHAO, 2003; WHITEWAY & BACHEWICH, 2007; BARBEDO; SGARBI, 2010, KHAN et al., 2010):

- Células de levedura em meio planctônico;
- Iniciação da formação de biofilme em tecidos;
- Desenvolvimento do biofilme pela invasão das hifas, secreção de exopolissacarídeos e
- Maturação do biofilme resultante do dimorfismo, mudança fenotípica, produção de enzimas hidrolíticas, adesinas.

A capacidade de invadir tecidos, crescer a 37°C e impedir a fagocitose, denota uma ampla gama de fatores de virulência. Esses fatores são causados principalmente pela produção de enzimas como proteinases, esterases, proteases aspárticas secretoras, fosfolipases, produção do tubo germinativo. A fosfolipase é capaz de catalisar a hidrólise de fosfolipídios, o principal componente das membranas celulares, gerando os lisofosfolipídios, facilitando desta forma a penetração na célula do hospedeiro. É somente produzida pela espécie *albicans*, mostrando a forte correlação entre a presença desta enzima e do seu potencial patogênico, promovendo a disfunção e /ou destruição física da membrana celular do hospedeiro (SALAS; GARCIA; MIRANDA, 2000; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; SALES, 2006; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SUDBERY, 2011).

A morfogênese da *Candida albicans* tem sido um foco de pesquisa, porque sua virulência está associada com a habilidade de mudança da forma de levedura para hifa (BERMAN; SUDBERY, 2002).

3.2.1 Candidíase ou Candidose

Candidíase ou Candidose é a principal infecção fúngica oportunista primária ou secundária, endógena ou exógena, reconhecida como doença sexualmente transmissível (DST) (BARBEDO; SGARBI, 2010). Infecções pelas espécies de *Candida*, especialmente as do trato urinário e as hematogênicas, vêm aumentando consideravelmente, principalmente em centros de terapia intensiva e/ ou de assistência a pacientes críticos, e o destaque é para a *Candida albicans*, que tem sido apontada como relevante patógeno nosocomial, principalmente nas infecções fúngicas hospitalares (NUNES et al., 2011). As micoses causadas por esse fungo mostram um amplo espectro de apresentações clínicas, podendo variar de superficiais, com acometimento cutâneo e mucoso, até infecções profundas, disseminadas, de alta gravidade, como é o caso da candidemia (MENEZES et al., 2004; BARBEDO; SGARBI, 2010; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A maioria dos estudos mostra que esta espécie constitui 80% dos isolados a partir de amostras clínicas em pacientes hospitalizados em estado críticos. No entanto, algumas considerações devem ser observadas, porque outras espécies de *Candida* têm sido relatadas na literatura como agentes etiológicos de Candidíase, como por exemplo: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefír*, *C. lusitaniae*, *C. viswanathii* e *C. famata*. Todas estas espécies já foram isoladas a partir de amostras clínicas (CHAVES;

CAVALCANTI; PORTO, 2003; PRATES et al., 2010; DOVIGO et al., 2010; DOVIGO et al., 2011).

A infecção mamilar é um problema crescente na lactação, das 29 amostras coletadas em processos inflamatórios da mama em mães que estavam amamentando no Banco de Leite Humano da Maternidade - Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará (UFC), 13 - (44,8%) apresentaram crescimento por fungo; identificando como o principal agente etiológico a *C. albicans* - 11 - (84,6%) seguida, *C. stellatoidea* - 1 - (7,7%); e *C. guilliermondii* - 1 - (7,7%) (MENEZES, et al., 2004).

3.3 DROGAS ANTIFÚNGICAS

A maioria dos agentes antifúngicos atua sobre os esteróis da membrana das células fúngicas ou contra enzimas que regulam a síntese de ácidos nucleicos (AGUIRRE URIZAR, 2002).

Os agentes antifúngicos convencionais são geralmente fungistáticos - impedem o crescimento do fungo -, cuja ação não promove a erradicação completa do microrganismo, dessa forma, somente a inibição do crescimento do agente etiológico poderá não ser suficiente para prevenir a disseminação do microrganismo em pacientes com sistema imunológico prejudicado. As drogas antifúngicas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química e os mecanismos de ação. Os poliênicos, como a anfotericina B, o imidazólico: cetoconazol, os triazólicos: fluconazol e itraconazol; os novos triazólicos: voriconazol, posaconazol e ravuconazol; e as equinocandinas, como a caspofungina, são utilizadas para o tratamento de micoses sistêmicas (VIRIATO, 2014).

No mecanismo de ação interagem com o ergosterol presente na membrana citoplasmática do fungo, danificando suas funções de barreira. Os azólicos são inibidores da biossíntese do ergosterol. Essa inibição impede a formação do ergosterol, alterando a fluidez e a permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo. (LOGUERCIO-LEITE, et al., 2006; VIRIATO, 2014).

A anfotericina B e os derivados azólicos, como fluconazol e itraconazol, são as drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções fúngicas graves. Anfotericina é a droga que apresenta os melhores resultados, mas, ainda assim, com sucesso terapêutico limitado, e, entre os novos “*in vivo*” triazólicos, somente o voriconazol está disponível na clínica e é

administrado ao paciente após falha terapêutica com uso de anfotericina B, para o tratamento de candidíase esofaríngea (VIRIATO, 2014).

Novas formulações da anfotericina B, na forma de lipossomas e de dispersão coloidal, produzem menos efeitos colaterais, como resultado da redistribuição do fármaco nos tecidos e da seletividade de liberação, mas o preço destas formulações é muitas vezes maior que o das antigas (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

Em comparação com as terapias antibacterianas, o tratamento antifúngico está limitado a um menor número de substâncias medicamentosas, frequentemente o tratamento é prolongado com muitos efeitos secundários graves e interações medicamentosas que aceleram a gravidade da situação. Ocorrendo em muitos casos, o tratamento tornando-se ineficaz, originando uma incidência de resistência aos agentes antifúngicos, particularmente em grupos de alto risco, como pacientes de AIDS (DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008; PRATES, 2010).

As dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções fúngicas, levam ao uso indiscriminado de agentes antifúngicos promovendo a seleção natural de cepas microbianas resistentes e deixa uma franca oportunidade para recombinação genética dos fatores de resistência e mutação (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PRATES, et al., 2010).

Como podemos constatar, então, os medicamentos antifúngicos para infecções sistêmicas utilizados atualmente não satisfazem a necessidade médica completamente, devido a problemas relacionados a espectro, potência, segurança e propriedades farmacocinéticas dos agentes disponíveis. Considerando-se o aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas e o conseqüente aumento na mortalidade populacional relacionada, percebemos que se faz necessário o surgimento de nova terapêutica de tratamento, que ofereça um tratamento não invasivo, seguro e eficaz contra as micoses.

3.4 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

Há mais de 4000 anos os egípcios utilizavam a combinação da ingestão oral de plantas contendo psoralenos e luz solar para tratar doenças como o vitiligo (STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998). Apesar do conceito da morte celular induzida pela interação da luz com fármacos fotossensíveis ter sido reconhecido há mais de cem anos, os estudos sistemáticos das reações de fotossensibilização foram iniciados apenas no final do século XIX por Oscar Raab (1899). Este pesquisador observou a inativação de organismos do gênero

Paramecium através da ação de corantes de acridina e luz. Além disso, ele demonstrou a dependência deste fenômeno com a presença do oxigênio e relatou o uso clínico da eosina como um fotossensibilizador para o tratamento do câncer de pele, *Condyloma lata* e *Cutaneous lúpus*. No início do século 20, Finsen, demonstrou que a radiação solar poderia ser utilizada para controlar infecção por *Lupus vulgaris*, conhecida como tuberculose cutânea, que afeta principalmente pessoas que tiveram contato prévio com *Mycobacterium tuberculosis*, agente da tuberculose. Logo após em 1904, Von Tappeiner e Jodlbauer, conduziram uma longa série de experimentos com a reação ocorrida entre luz e os corantes, criando o termo “*photodynamic erscheinung*” (ação fotodinâmica) e demonstraram que uma grande variedade de corantes era capaz de fotossensibilizar uma série de microrganismos. Em 1913, Meyer-Betz fez uma autoinjeção de 200 mg de hematoporfirina pura e não sentiu nenhum efeito, porém ao se expor à luz solar teve fotossensibilidade na pele por vários meses (STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998; PAULINO, 2006; ALBUQUERQUE, 2008; ALVES E SILVA, 2010; GARCÊS, 2014).

Policard, em 1924 mencionou a utilização potencial de porfirinas, combinada com a presença de oxigênio e aplicação de luz, no tratamento de tumores malignos (SPESIA, et al., 2009; GARCÊS, 2014).

Em 1976, Weishaupt; Gomer e Dougherty postularam que o oxigênio singlete, gerado por sensibilização, a partir da transferência de energia do agente fototerapêutico no estado triplete excitado para o oxigênio molecular, era o agente citotóxico responsável pela inativação de células tumorais. Em fins dos anos 70, a partir dos trabalhos de Dougherty e colaboradores, a TFD passou a ser reconhecida como uma alternativa para o tratamento do câncer, tendo sido empregada com sucesso no tratamento de tumores, além de outras condições clínicas (UCHOA-FERNANDES, 2007; GARCÊS, 2014).

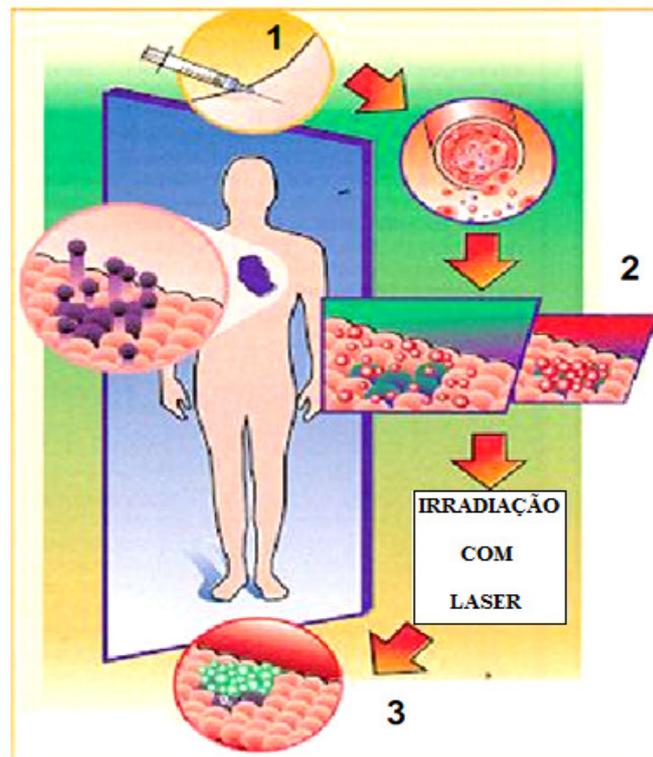
Aplicações clínicas da TFD no tratamento de câncer de pulmão vêm sendo feitas no Japão desde 1980. Este tratamento pode preservar a função pulmonar, é bem tolerado e de baixo custo, quando comparado a outros tratamentos. Na década de 90 houve uma grande difusão de procedimentos envolvendo a TFD nos países do primeiro mundo. Ainda em 1994, o governo Japonês autorizou o emprego da droga denominada *Photofrin*[®] na terapia do câncer de pulmão. Em 1995, o governo Norte-Americano autorizou o uso dessa mesma droga no tratamento do câncer de esôfago. Nesses países, em virtude dos estímulos concedidos à pesquisa neste campo, diversos procedimentos clínicos têm sido estabelecidos e muitos deles já têm o seu emprego autorizado. No Brasil, algumas iniciativas já vêm ocorrendo, todas

baseadas no estado de São Paulo, nas quais se emprega um composto homólogo ao *Photofrin*[®] (RIBEIRO, 2003).

Desde 1995, esta forma de terapia vem sendo aperfeiçoada pelo grupo de Pesquisa em Fotobiologia e Fotomedicina da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto-SP, o qual desenvolve trabalhos que avaliam as propriedades fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas de novos sistemas de liberação de fármacos fotossensíveis aplicados à TFD (ALVES E SILVA, 2010). Estudos recentes têm sido realizados no Laboratório de Pesquisa do Cefores – Centro de Educação Profissional da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), com *Candida albicans*, utilizando diversos fármacos e sistemas de liberação.

O objetivo principal da Terapia Fotodinâmica (TFD) é induzir a morte das células doentes por um processo de fotossensibilização, onde existe a ação de um agente fotossensibilizador sendo irradiado por um laser em comprimento de onda adequado e oxigênio, produzindo espécies reativas de oxigênio, culminando na morte dessas células, minimizando ao máximo os danos aos tecidos vizinhos e efeitos colaterais, sendo estas as principais vantagens da TFD frente aos demais tratamentos clássicos (BARBUGLI, 2010) (FIG. 3).

Figura 3 – Esquema representativo da aplicação da TFD



Fonte: BARBUGLI, 2010

Legenda: 1) Administração endovenosa do fármaco;
2) Acúmulo do fármaco em células tumorais e
3) Irradiação e morte da lesão neoplásica.

Diante do seu reconhecimento por parte do FDA (Food and Drug Administration), o interesse pelo uso da TFD tem aumentado, não apenas para o tratamento de câncer, mas como uma terapia eficaz para o tratamento de diversas doenças (ALVES E SILVA, 2010).

Friedberg et al. (2001) demonstraram a significativa atividade fungicida “*in vitro*” sobre *Aspergillus fumigatus* com o fotossensibilizador *Green 2W*, irradiado com luz no comprimento de onda em 630 nm.

Em seus estudos, Komerik e seus colaboradores em 2003 avaliaram a ação da TFD com o corante azul de toluidina em diversas concentrações e variadas doses de energia em molares de ratos infectados periodontalmente por *Porphyromonas gingivalis*. Os melhores resultados quanto ao poder de desinfecção da TFD nesse estudo foram encontrados na dose de 48 J (irradiação total de 8 min.) e concentração de 1 mg/ mL. Para a avaliação os autores utilizaram contagem de UFC's e a média de redução conseguida neste grupo foi de 2 log₁₀ (SOUZA, 2011).

Bliss et al. (2004) comprovaram que *C. albicans* foi extremamente sensível aos efeitos fototóxicos de *Photofrin*[®], um composto que já está aprovado para uso clínico, em concentrações tão baixas como 1 µg/ mL “*in vitro*”.

Para uma melhor eficácia da terapia fotodinâmica em fungos clinicamente relevantes, como a *Candida albicans*, Lambrechts; Aalders e Van Marle (2005), empregaram em seu trabalho o composto catiônico Porfirina 5-phenyl-10, 15,20-Tris(N-methyl-4pyridyl) porphyrin chloride (TriP[4]) que em combinação com luz branca a partir de uma lâmpada de halogênio de 500W, pode inativar com sucesso a *Candida albicans*.

Tardivo et al. (2005) em seus estudos sobre o agente fotossensível azul de metileno, mostrou características interessantes que conferem a esta molécula um grande potencial para aplicação da TFD. Ela absorve luz intensivamente na janela terapêutica, são eficientes geradores de oxigênio singlete, danifica biomoléculas e induz a morte de forma eficiente as células, nos tratamentos para vários tipos de câncer, vírus e infecções fúngicas.

Resultados de investigações experimentais nos estudos de Donnelly; McCarron e Tunney (2008) demonstraram conclusivamente que dermatomycetes e leveduras podem ser efetivamente irradiados por ação fotodinâmica empregando os fotossensibilizadores: fenotiazínico, porfirina e ftalocianina.

Costa et al. (2011), em seus estudos, utilizaram culturas planctônicas de suspensões padronizadas (10⁶ cells/ mL) de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* tratadas com concentrações de eritrosina de (0,39 – 200) µM e LEDs em placas de microtitulação de 96

poços fundos. E biofilmes, respectivamente, com 400 μM de eritrosina. O efeito antimicrobiano da TFD contra as culturas planctônicas e biofilmes foram verificadas pela contagem de unidades de colônias (UFC/ mL), e os dados submetidos à análise de variância e teste de comparação múltipla de média, teste de Tukey ($p < 0,05$). *C. albicans* e *C. dublinensis* não foram detectadas após a TFD de culturas planctônicas com concentrações de eritrosina iguais e maiores de 3,12 μM . Os valores UFC/ mL obtidos a partir de biofilmes foram uma redução de 0,74 \log_{10} para *C. albicans* e 0,21 \log_{10} para *C. dublinensis*. Concluíram que *C. albicans* e *C. dublinensis* são suscetíveis à eritrosina e LED mediada por TFD, mas o biofilme de ambas as espécies são mais resistentes do que as homólogas células planctônicas.

Alves et al. (2014) avaliou a influência do tempo da pré-irradiação (5, 10 ou 15 min) da terapia fotodinâmica na inativação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* tratadas com Photogem® e luz LED azul, os resultados da investigação demonstraram que TFD foi efetiva para inativar “*in vitro*” estas espécies de *Candida*. Este estudo demonstrou que as concentrações do fotossensibilizador e fluência de luz são ambos determinantes fatores para fotoinativar estas espécies de *Candida*, enquanto o tempo de pré-irradiação não influencia a resposta do TFD.

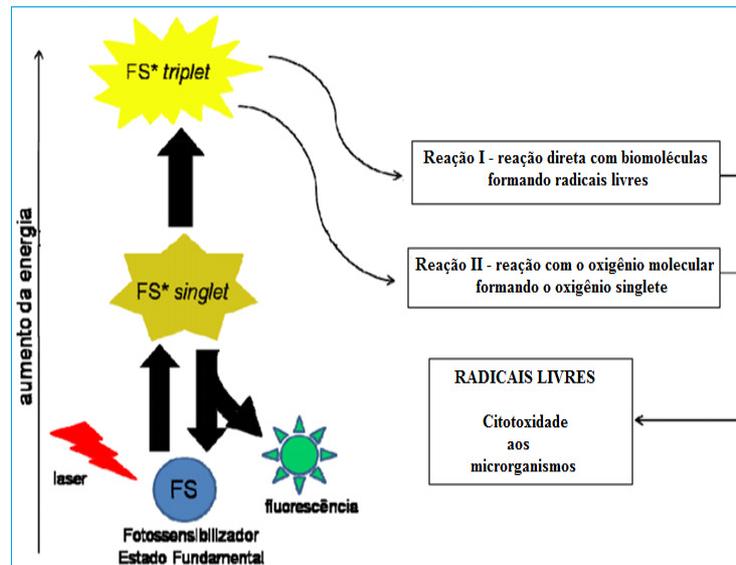
López-Jiménez et al. (2015) avaliando os efeitos da terapia fotodinâmica sobre biofilmes de *Enterococcus faecalis*, utilizou o agente fotossensível azul de metileno, e um laser diodo em 670 nm (potência de 280 mW durante 30 s) e azul de toluidina em 628 nm (potência de 1000 mW durante 30 s), induzindo severos danos, provocando a lise celular.

3.4.1 Mecanismos de ação fotoquímicos

O princípio básico da TFD é a geração de agentes citotóxicos através da interação dinâmica entre um fármaco fotossensibilizador excitado por luz visível em comprimento de onda específico e oxigênio que normalmente está presente nos tecidos e meio racional. A absorção de fótons pelo fotossensibilizador gera a ativação destes compostos, levando estas moléculas a uma instabilidade química, com a mudança do padrão de organização eletrônica normal. A tendência natural de qualquer composto em um estado excitado eletronicamente é retornar ao seu estado fundamental, pois ele é energeticamente mais favorável. Este retorno ao estado fundamental ocorre com emissão de energia na mesma intensidade da energia de absorção do fóton absorvido. Os processos de desativação das moléculas são simultâneos e competitivos entre si, sendo importante determinar contribuição de cada processo, ou seja, o rendimento quântico de cada processo. Atingido o estado excitado, diversos processos podem

ocasionar a desativação de uma molécula: a energia pode ser devolvida ao ambiente na forma de calor, pode ser liberada na forma luminosa (fluorescência), ou fazer cruzamento intersistema, atingindo o estado triplete, que pode ser desativado por fosforescência (STERNBERG; DOLPHI; BRÜCKNER, 1998; MCCAUGHAN, 1999; LUKSIENE, 2003; PAULINO, 2006; LONGO, 2008; FEUSER, 2012) (FIG.4).

Figura 4 – Processos de desativação das moléculas



Fonte: LONGO, 2008

Legenda: No tratamento por TFD, o FS incorporado nas células é irradiado através de um laser ou de outra fonte luminosa que emite de absorção do corante promovendo a excitação eletrônica.

3.4.1.1. Processos fotofísicos e fotoquímicos que ocorrem durante a TFD

O passo inicial no processo de fotossensibilização é a excitação eletrônica. Uma característica importante do (FS) utilizado em TFD é que ele possa ser excitado em comprimentos de onda de maior penetração no tecido biológico (UCHOA- FERNANDES, 2007).

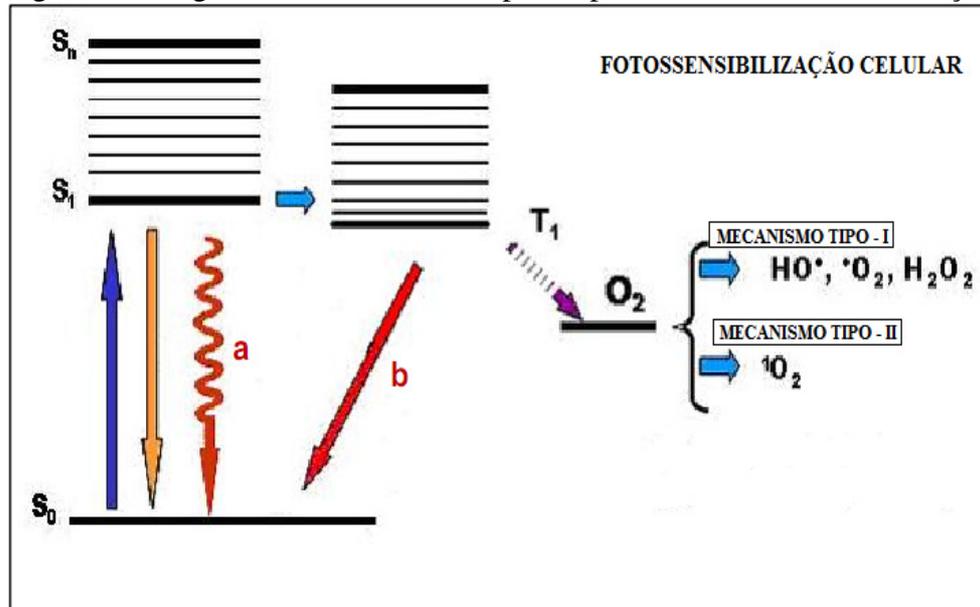
Os danos causados pelos FSs em biomoléculas podem ocorrer por dois mecanismos principais. Mecanismos Tipo I e Tipo II de fotossensibilização (FIG. 5). Qualquer um dos dois mecanismos envolve a reação do fotossensibilizador no seu estado excitado triplete (PAULINO, 2006; BARBUGLI, 2010; FEUSER, 2012).

No primeiro (mecanismo TIPO I), a energia das moléculas excitadas é transferida para o oxigênio molecular através da transferência de elétrons que culmina em danos diretos às biomoléculas através da formação de espécies reativas de oxigênio EROs (INDIG et al., 2000; BARBUGLI, 2010). As EROs são radicais livres com alta energia que podem reagir com

praticamente qualquer biomolécula, levando a modificações químicas que impedem seu funcionamento normal. A geração de uma cascata de espécies reativas após a aplicação da TFD é considerado o fator fundamental para a citotoxicidade causada pela terapia devido a sua alta capacidade de interações com diferentes biomoléculas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

No mecanismo TIPO II, a energia de excitação é transferida para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é altamente citotóxico, sendo capaz de causar danos em membranas, proteínas e DNA, tanto por ação direta quanto por formação de radicais a partir de oxigênio singlete (RAVANAT et al., 2000; DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; RAVANAT et al., 2004; BARBUGLI, 2010).

Figura 5 – Diagrama de JABLONSKI para o processo de fotossensibilização



Fonte: BARBUGLI, 2010

Legenda: S_0 (estado fundamental), S_1 (primeiro estado excitado singlete), S_n (estado excitado singlete), T_1 (primeiro estado excitado triplete), O_2 (oxigênio), HO^\bullet (radical hidroxila), $^\bullet\text{O}_2$ (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete). Seta azul (absorção), seta laranja (fluorescência), seta vermelha a. (conversão interna), seta vermelha b. (fosforescência).

Os processos do Tipo II são predominantes, uma vez que os mecanismos do tipo I são muito rápidos porque a sobreposição de orbitais envolvidos, durante a formação do complexo excitado é máxima (MACHADO, 2000). Ambos os processos são de particular interesse para TFD, uma vez que conduzem à formação de moléculas muito reativas (SNYDER et al., 2005). A reação do tipo II é predominante no caso da ftalocianina de zinco. A TFD induz a produção de agentes citotóxicos que rapidamente destroem as células neoplásicas; esta resposta é afetada “*in vivo*” pela complexidade dos sistemas biológicos. Diversos alvos

celulares podem ser afetados durante a TFD, incluindo mitocôndria, lisossomos, membranas plasmáticas, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e núcleo, e a morte celular pode ocorrer por necrose ou apoptose (FEUSER, 2012).

O tempo de vida do estado triplete é grande o suficiente para permitir a supressão por transferência de energia por colisão com o O_2 , levando à formação de 1O_2 . O oxigênio singlete (1O_2) pode ser detectado por emissão luminosa no infravermelho próximo (PAULINO, 2006).

As propriedades fluorescentes dos agentes fotossensíveis têm sido úteis para a visualização, localização e delimitação da lesão maligna. Contudo, a ação fotodinâmica é dependente do processo de cruzamento intersistemas (isc), caracterizado pela inversão do spin eletrônico. Através deste processo, a molécula do agente fotossensível passa a popular os estados excitados tripletes (BONNETT, 2001; PAULINO, 2006).

3.4.1.1.1 Mecanismos biológicos envolvidos na terapia fotodinâmica

Os Radicais livres e peróxidos levam à destruição tumoral por três mecanismos biológicos principais: (1) destruição da massa tumoral, (2) alteração da vascularização tumoral, gerando áreas de hipoxia nas massas tumorais e (3) a ativação do sistema imunológico pela necrose e/ou apoptose que atuaria em uma fase secundária na redução da massa tumoral (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; LONGO, 2008; FEUSER, 2012).

A morte celular caracterizada por necrose, está relacionada à presença de um agente agressor de alta intensidade como o promovido pela formação de EROs após a aplicação da TFD. Uma das características marcantes da necrose são as alterações funcionais em diferentes regiões subcelulares, com especial atenção às membranas biológicas que provocam a liberação dos conteúdos celulares e consequente perda de viabilidade. Associada à destruição das membranas celulares, ocorre a liberação de fosfolípidios, consequentemente, a geração de intenso processo inflamatório (RICH; ALLEN; WYLLIE, 2000).

Os eventos morfológicos observados em células em apoptose são a compactação nuclear, o empacotamento e liberação de fragmentos citoplasmáticos e de organelas em microvesículas envoltas em membrana plasmática, os corpos apoptóticos. A liberação dessas vesículas contendo material celular são fagocitadas pelas células vizinhas, desencadeando processos inflamatórios em menor intensidade quando comparados aos processos relacionados à necrose, isto ocorre, devido a não-liberação de fosfolípidios de membrana. Na

TFD esse processo via de morte celular ocorre em menos escala nos tecidos neoplásicos (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007).

3.5 AGENTES FOTOSSENSIBILIZADORES

Uma das linhas de pesquisa fundamentais para a evolução da terapia fotodinâmica é o desenvolvimento de novos Fotossensibilizadores. Estes são definidos como substâncias capazes de absorverem a luz e transferirem esta energia absorvida para moléculas de oxigênio molecular gerando as EROs, bem como causarem danos biológicos. Neste sentido, pesquisadores buscam compostos que apresentem melhorias em relação aos já existentes. Os estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” destes Fotossensibilizadores, tem apresentado grandes contribuições, não só por serem mais eficazes, mas também no entendimento dos mecanismos de ação e da relação entre a estrutura e a atividade, contribuindo assim para o avanço da TFD (STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998; MCCAUGHAN JR, 1999; TARDIVO et al., 2005; MARANHO, 2008).

Os pontos a serem analisados em novos compostos: baixa toxicidade no escuro e carcinogenicidade dos fármacos, seletividade pelas células alvo; possíveis efeitos adversos decorrentes de exposição à luz, via de administração, baixo custo, capacidade de eliminação das drogas, comprimento de onda para ativação e efetividade clínica, características fotofísicas favoráveis, fotossensibilidade não prolongada, incorporação em tumores e a citolocalização celular. A análise de todos estes fatores muitas vezes torna-se complexa, porém estes valores devem ser pesados e um fator de efetividade calculado subjetivamente para justificar a escolha de FSs entre as várias opções terapêuticas (STERNBERG; DOLPHI; BRÜCKNER, 1998; MCCAUGHAN JR, 1999; MACHADO, 2000; BONNETT, 2001; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; MARANHO, 2008).

Alguns agentes fotossensíveis têm sido criados para emprego na sua forma pura, não em misturas. Neste sentido, mitocôndrias, lisossomos, membranas plasmáticas, ácidos nucleicos de células tumorais têm se tornado alvo potencial para a terapia (DOUGHERTY, et al., 1998).

Compostos desenvolvidos e utilizados em muitas pesquisas: as Eosinas (FERH et. al, 1996); Porfirinas (HUDSON; SAVOIE; BOYLE, 2005); Fenotiazínicos (TARDIVO et. al., 2005); Clorinas (HARVEY et al., 2005); Hipericina (THONG et. al, 2006; FLOREZ, 2012); Ftalocianinas (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007; FEUSER, 2012);

Protoporfirinas (TYRRELL; CAMPBELL; CURNOW, 2010); Feofitinas (LI; CHANG; HSIEH, 2011); entre outros.

Os fotossensibilizadores que absorvem na região do infravermelho próximo permitem o tratamento em tecidos mais profundos (1 centímetro), possibilitando o tratamento de tumores maiores e mais internos. Entre os FSs com estas características destacam-se alguns grupos, tais como as clorinas, bacterioclorinas e seus derivados, e as ftalocianinas. As ftalocianinas são as mais utilizadas, por serem mais estáveis e de fácil purificação (BONNETT, 2001; UCHOA-FERNANDES, 2007). Um bom FS deve fazer cruzamento intersistema, apresentando um alto rendimento quântico do estado triplete e de geração de oxigênio singlete (STERNBERG; DOLPHI; BRÜCKNER, 1998; MCCAUGHAN JR, 1999).

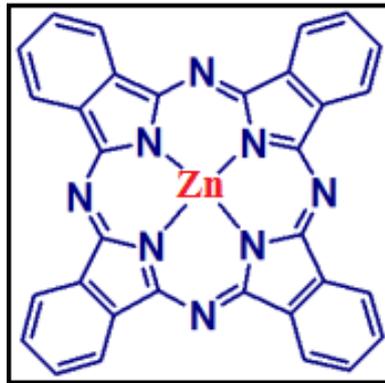
Por este motivo as ftalocianinas têm despertado grande interesse da comunidade científica sendo considerado um promissor agente fotossensibilizador de segunda geração, visto sua aumentada eficiência na produção de oxigênio singlete (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004; FEUSER, 2012). Este corante, insolúvel em meio aquoso, exibe um forte espectro na região do vermelho. São corantes sintéticos semelhantes às porfirinas e estruturalmente consideradas azoporfirinas (LAIA; COSTA; FERREIRA, 2006). As ftalocianinas são ativadas por luz em comprimento de onda em (650-800 nm), o que confere maior penetração, além de apresentarem baixa toxicidade, uma alta capacidade de se acumular seletivamente no tecido tumoral (ALLISON et al., 2004; MARANHO, 2008; ALVES E SILVA, 2014; NEGRI, 2015).

Outra importante característica desta classe de FS é sua hidrofobicidade. Quando as ftalocianinas estão agregadas, há o comprometimento do rendimento quântico de oxigênio singlete produzido, diminuindo a eficácia da TFD (NEGRI, 2015). Devido a esta característica química, estes fármacos necessitam ser incorporados a sistemas de liberação de drogas específicos para que possam circular através de plasma sanguíneo. Um dos sistemas de liberação descritos para o carreamento de drogas lipossolúveis são os lipossomas (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004; ALVES E SILVA, 2010; FEUSER, 2012). Além da capacidade de fluir livremente pelo plasma sanguíneo, a associação de ftalocianinas com lipossomas apresenta outras vantagens, como sua maior captação pelas células tumorais. As estruturas dos lipossomas podem ser modificadas pela adição de algumas substâncias como colesterol. A presença deste lipídio na parede do lipossoma tende a aumentar a captação dos fármacos pelos tecidos tumorais. Esse aumento se refere ao fato de existir um aumento de receptores de membrana com afinidade para colesterol. Esta afinidade química permite que

haja uma maior captação desse fotossensibilizador pelas células neoplásicas (OLIVEIRA et al., 2006).

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente dependentes do íon do metal central e, entre as ftalocianinas metálicas, a zinco (II) (complexo zinco ftalocianina) (ZnPc) e o Alumínio (III) (complexo de cloroalumínio ftalocianina) apresentam favoráveis propriedades fotofísicas para aplicações em TFD, com estado singlete excitado de uma relativa longa vida (3-8 ns) e estado triplete, também com um tempo de vida longo, são formados (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004; ALVES E SILVA, 2010) (FIG. 6).

Figura 6 – Estrutura química do Zinco ftalocianina (ZnPc)



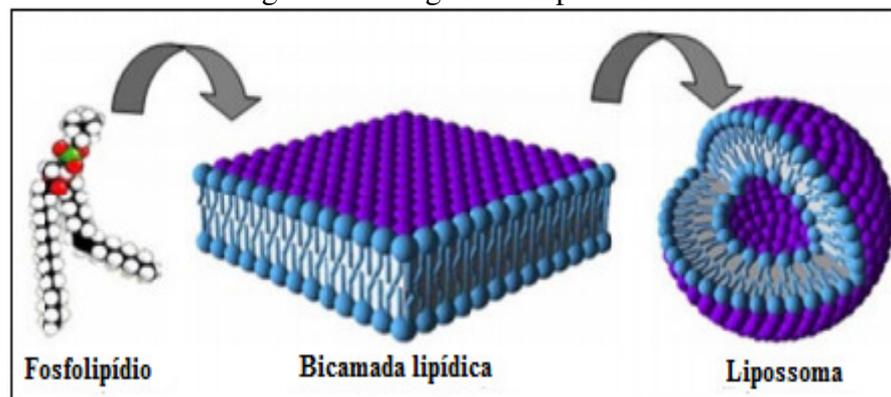
Fonte: NEGRI, 2015

3.6 LIPOSSOMAS

Lipossomas pertencem à classe dos cristais líquidos liotrópicos. Suas características físico-químicas e sua biocompatibilidade com membranas celulares terem-lhes dado várias vantagens: dissolver, proteger e entregar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas. Várias aplicações de lipossomas estão relacionadas a uma ampla gama de ciências e disciplinas, tais como: bioquímica, química, biologia, medicina, biofísica, física e matemática. Os lipossomas possuem formulações ideais que funcionam como sistema de entrega de drogas (FIG. 7). É importante notar que a implicação de lipossomas ou de outros sistemas coloidais como nanopartículas poliméricas, complexos de micelas e outros, na entrega da droga torna possível alterar as características farmacocinéticas e o perfil de biodistribuição da molécula incorporada. Os parâmetros que influenciam o comportamento dos lipossomas em ambientes biológicos são a fluidez da membrana, carga de superfície, hidratação, o tamanho do lipossoma e o método de preparação (BARENHOLZ, 2001; LAVAN; MCGUIRE; LANGER, 2003; OLIVEIRA; MACHADO; PESSINI, 2005; DEMETZOS, 2008). Estas vantagens, tais

como a biocompatibilidade e biodegradabilidade, são essenciais para seu uso terapêutico. A encapsulação das drogas dentro dos lipossomas depende de vários parâmetros, como a composição do lipídio, carga superficial, entre outros. Os recentes desenvolvimentos em tecnologia de lipossomas permitem a introdução de novas estratégias para controlar as suas propriedades físico-químicas, sua estabilidade e resposta farmacológica após a administração (DEMETZOS, 2008).

Figura 7 – Imagem de Lipossoma



Fonte: BOLFARINI, 2012

Os sistemas de liberação de fármacos são espontaneamente formados quando fosfolípidios são dispostos em meio aquoso, e quando isto acontece, deve-se à interação hidrofílica da cabeça polar dos grupos fosfato com a água, resultando na formação de sistemas multilamelares. Já os sistemas unilamelares (vesículas) consistem em simples bicamadas lipídicas em forma esférica, que são parecidas (mimetizam) com membranas biológicas cuja formação se dá a partir do fornecimento de energia aos sistemas multilamelares (como por exemplo, sonicação ou extrusão). São considerados potenciais sistemas de liberação para uma variedade de compostos que incluem moléculas de baixo peso molecular como fármacos (inclusive agentes fotossensíveis), proteínas terapêuticas e agentes para diagnóstico (PAULINO, 2006; ALVES E SILVA, 2010).

O uso de formulações lipossomais como sistema de liberação de fármacos, é viável clinicamente por serem tipicamente feitos de moléculas lipídicas de origem natural, biodegradável e não tóxica. Os lipossomas podem proteger o fármaco da degradação enzimática, possibilitam o aumento da concentração de droga no sítio alvo e podem ser utilizados como excipientes não tóxicos para a solubilização de fármacos hidrofóbicos como as ftalocianinas, além de prolongar o tempo do fármaco na circulação, permitindo um possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos (BOLFARINI, 2012).

3.7 ASPECTOS TECNOLÓGICOS DA PREPARAÇÃO LIPÍDICA PARA A FORMA DE DISPERSÃO AQUOSA DE FOSFOLIPÍDIOS: POR EXTRUSÃO

Biomateriais, tais como, sistemas de entrega controlada de fármacos, biorreatores de enzimas imobilizadas, biossensores, e dentre estas, envolve um veículo formado por fosfolipídios incorporando um medicamento para um tipo de célula ou órgão específico, estão sendo investigados dentro do contexto da ciência da Engenharia Química e Engenharia Biomédica (LANGER, 1995).

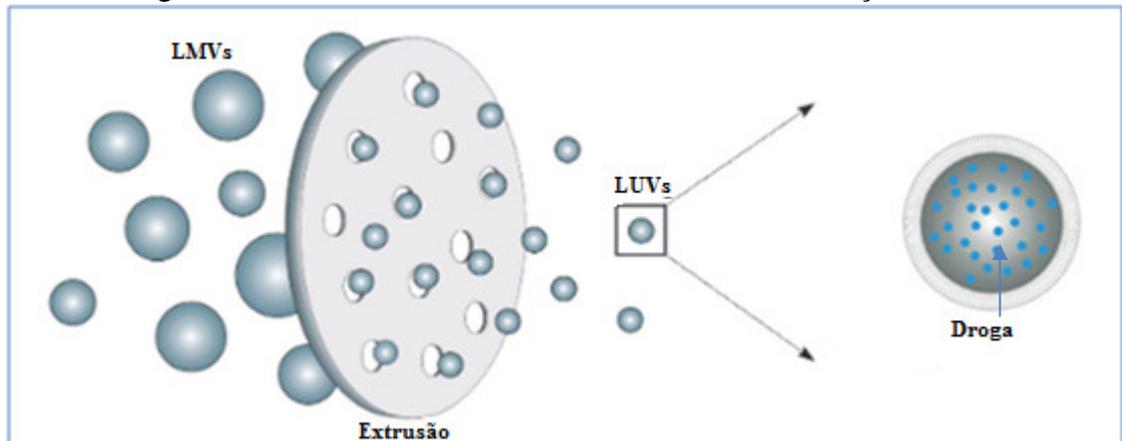
Segundo os pioneiros pesquisadores: Olson et al. (1979); Hope et al. (1985); MacDonald et al. (1991), grandes vesículas unilamelares (LUV) são produzidas pela técnica de extrusão e apresentam várias vantagens em estudos envolvendo modelos de membrana. O arranjo de seus constituintes lipídicos encontra-se em equilíbrio e não apresenta restrições desestabilizadoras sobre os lipídios constituintes, são relativamente homogêneas em tamanho e estrutura, assemelham-se as membranas celulares em ser unilamelares e são capazes de conter relativamente grandes volumes.

Podendo ser preparadas rapidamente e facilmente a partir de lipídio seco em menos de 1 hora. As grandes vesículas unilamelares, com suas especificações, incluem uma bicamada produtiva e distribuições assimétricas de proteína e lipídios para alcançar um modelo mais realista de uma membrana biológica (HOPE et al., 1985).

Extrusão é atualmente um dos mais comuns métodos para produção de vesículas unilamelares monodispersas e controla seus tamanhos. Uma suspensão lipídica é forçada através de uma membrana de policarbonato com tamanho de poros definido para produção de vesículas com um diâmetro próximo ao tamanho do poro da membrana utilizada na sua preparação. Esta técnica evita a necessidade de se remover solventes orgânicos ou detergentes no final da preparação (comum problema associado com outros protocolos), pode ser aplicada para uma variedade de tipos de misturas e lipídios. Talvez a vantagem mais significativa do processo de extrusão é reproduzir facilmente como resultado vesículas de tamanho médio e de distribuição, devido ao método de processamento físico (LAPINSKI et al., 2007; JESORKA e OMAR, 2008; RAEMDONCK et al., 2014; HADIAN et al., 2014) (FIG. 8). Os lipossomas são considerados estruturas funcionais muito versáteis. Desde o início de sua pesquisa em 1965, o campo de sua utilização progrediu enormemente e estão bem estabelecidos em diversas áreas, tais como para a entrega de drogas (JESORKA; OMAR, 2008). O desenvolvimento de novas tecnologias para confeccionar estas vesículas permite a introdução de novas estratégias para o controle das propriedades físico-químicas de lipossomas, para

manter sua estabilidade e farmacologia como resposta após a administração (DEMETZOS, 2008).

Figura 8 – Resultado de vesículas de tamanho e distribuição médio



Fonte: Adaptado RAEMDONCK et al, 2014.

Legenda: A hidratação de uma película fina de lipídios conduz a uma dispersão de vesículas multilamelares com uma ampla distribuição de tamanhos. Extrusão das LMVs através de uma membrana de polycarbonato com poros estreitos sendo usada para converter as vesículas multilamelares obtidas em grandes vesículas unilamelares ou LUVs monodispersas.

3.8 FONTES DE IRRADIAÇÃO

A terapia fotodinâmica tem aplicação moderadamente complexa porque requer não só a dose certa da substância fotossensibilizadora como também a dose certa de luz para a sua ativação. A fonte luminosa precisa ter a capacidade de gerar luz com comprimento de onda adequado e com suficiente intensidade para ativar o fotossensibilizador escolhido, além do que esta fonte precisa ser móvel e dirigível para que apenas a área alvo seja iluminada (PAULINO, 2006).

Nas fontes de irradiação empregadas na TFD, o intervalo do espectro eletromagnético mais significativo está na região entre 600 e 800 nm, onde a membrana celular apresenta baixa absorvibilidade. Nesta região é possível magnitudes na penetração da luz próximas a três centímetros em tecidos dotados de baixa pigmentação (OCSHNER, 1996). Deste modo é possível evitar destruições desnecessárias causadas às demais organelas presentes no meio que não possui a droga sensibilizadora. Embora a maioria das aplicações da TFD esteja associada à luz, fontes de luz não laser têm sido empregadas (BRANCALEON e MOSELEY, 2001).

Nas primeiras aplicações da TFD as fontes empregadas na ativação de agentes fotodinâmicos baseavam-se em radiações policromáticas não coerentes, como lâmpadas de arco voltaico (lâmpadas de arco de xenônio) ou mesmo lâmpadas incandescentes. Por meio de filtros ópticos, essas lâmpadas são capazes de fornecer radiações no comprimento de onda apropriado para a maioria dos fotossensibilizadores. Esse tipo de sistema, infelizmente, exibe um aquecimento relevante, dificilmente permite um controle preciso na dosagem de luz, e normalmente apresenta baixa intensidade luminosa (BEYER, 1996). Tem se observado no mercado vários aperfeiçoamentos no sentido da minimização dessas desvantagens por meio de cuidadosos projetos da engenharia e design. Diodos Emissores de Luz (LED) são também empregados em sistemas de irradiação voltados a TFD. Os LED além de constituírem uma alternativa de baixo custo, possuem grande homogeneidade luminosa (LIM, 2011), permitindo que a radiação seja facilmente dosada e calculada em diversas aplicações. A emissão de um LED é bem definida e normalmente específica para um determinado comprimento de onda. Esse fator, associado à relativa intensidade (como os modelos chamados alto brilho), dispensa o aparato de filtragem encontrado nos sistemas baseados em lâmpadas policromáticas. Além destes fatores, a baixa dissipação térmica, combinada à emissão monocromática de moderada intensidade, em sistema simples, robusto e diminutivo, qualificam atraentemente o uso de LED em dispositivo para aplicações de TFD (RIOS et. al., 2011).

Atualmente, espécies reativas de oxigênio geradas na TFD são ativadas principalmente por lasers. As vantagens dos lasers estão no caráter da luz monocromática e na alta intensidade obtida nesse dispositivo (YUAN et. al., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa do Cefores – Centro de Educação Profissional da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) no período de março de 2013 a dezembro de 2014. Os equipamentos e materiais utilizados foram descritos no Anexo A. Os meios de cultura, material microbiológico e soluções foram descritos no Anexo B. No anexo C encontra-se o roteiro das práticas experimentais.

Para cumprir os objetivos específicos foram utilizados os procedimentos descritos nos itens 4.1, 4.2, 4.3.

4.1 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Para a realização dos experimentos foram construídos dois tipos de vesículas:

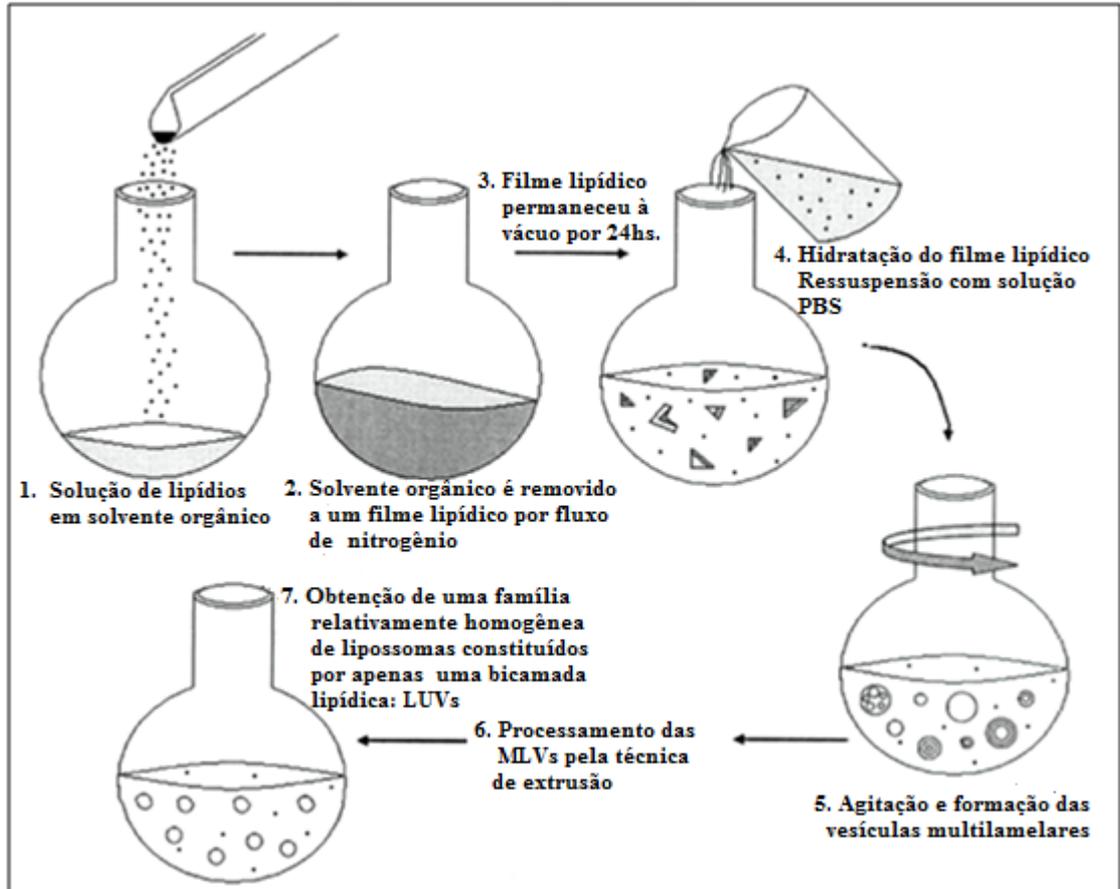
- i) Lipossomas (também chamados de lipossomas vazios)

Vesículas lipossomais foram construídas em suspensão pela técnica de extrusão (HOPE et al., 1985; MAC DONALD et al., 1991). Um volume de 1 mL de suspensão foi preparado através da composição de 3,0 mg/mL de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e 0,3 mg/mL de Lisofosfatidilcolina (LPC) em clorofórmio. Esta suspensão foi evaporada sob uma atmosfera de gás nitrogênio para formação de um filme lipídico na parede do tubo de ensaio e em seguida dessecada “overnight”, sob vácuo, em temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH=7,4) ao filme que fora obtido e incubado a 60°C (temperatura de transição dos lipídeos) em banho seco (Aquecimento á seco - Nova Ética Ltda.) durante 1 hora, com intervalos de vigorosa agitação a cada 10 minutos (vórtex - QL 901 – Biomix). A amostra foi processada pelo mini-extrusor (AVANTI POLAR LIPIDS, Alabaster, AL, USA) através de membranas de policarbonato com poros de 100 nm, por 15 vezes consecutivas, formando os lipossomas (FIG. 9). Por indisponibilidade de equipamentos estas vesículas foram caracterizadas por análise em microscopia óptica de luz (ZEISS) com imagens (1000 x aumento). A captura de imagens foi realizada adicionando cerca de 10 µL da suspensão lipossomal obtida pela técnica de extrusão, em uma lâmina de vidro, coberta com uma lamínula e em seguida foi analisada por iluminação direta.

- ii) Lipossomas contendo Zinco ftalocianina

No momento inicial da preparação para a construção do lipossoma descrito no item i, foi incorporado à suspensão 10 μL da solução estoque de Zinco ftalocianina seguindo o protocolo anterior e em seguida a amostra foi extrusionada. As amostras finais corresponde à suspensão ZnPcLipossomal e foram avaliadas através de medidas de absorvância, em seguida, a ser utilizadas nos ensaios.

Figura 9 – Construção dos Lipossomas



Fonte: Adaptado de SOUSA, 2006.

4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE LIPOSSOMAL

A avaliação da estabilidade lipossomal para as vesículas vazias e vesículas contendo o zinco ftalocianina foram realizadas por meio da medida de turbidez, utilizando o espectrofotômetro (UV- 1600 – Angstrom Advanced) ($\lambda = 600 \text{ nm}$) com leitura diária durante 07 dias. A suspensão micro-heterogênea foi mantida durante este período a 4°C no refrigerador. As alterações na turbidez serviram como parâmetro para a estabilidade da referida suspensão (PAULINO, 2006).

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAR A EFETIVIDADE DA TFD NA INATIVAÇÃO DA *Candida albicans*

Para a realização dos procedimentos experimentais foram preparadas, a suspensão padrão de *Candida albicans* e as células para os ensaios. Em seguida foram realizados os ensaios da TFD.

4.3.1 Obtenção de uma suspensão de *Candida albicans*

Uma suspensão padrão contendo 10^6 células viáveis por mL foi obtida de acordo com SOUZA et al. (2010). Para isso, *C. albicans* foi semeada no meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubada em estufa microbiológica (Revco – Thermo Electron Corporation) durante 48h a 37°C. Após incubação, o microrganismo foi cultivado em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI). O número de células viáveis na suspensão foi ajustado em espectrofotômetro (UV-1600 – Angstrom Advanced), utilizando um comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,680.

4.3.2 Preparação das células para os ensaios

Para a preparação das células para os ensaios foi retirado o volume de 1 mL da suspensão de *Candida albicans* preparada no item 4.3.1 e colocado em um ependorf (2 mL) à 5000 RPM por 10 min (Centrífuga – Biofuge) e em seguida o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspendido de acordo com cada grupo para a execução dos ensaios da TFD.

4.3.3 Ensaios da terapia fotodinâmica (TFD) “*In Vitro*”

4.3.3.1 Delineamento Experimental

A seguir estão descritos os grupos e os respectivos tratamentos utilizados para avaliação da efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida albicans* (QUADRO 1). Para garantir a significância desses resultados às análises foram realizadas em quadruplicata.

Quadro 1 - Descrição dos Grupos e Tratamentos utilizados no Delineamento Experimental da Terapia Fotodinâmica na Inativação da *Candida albicans*.

Grupos	Descrição dos Tratamentos
Grupo 1 C	Células de <i>Candida albicans</i> sem tratamento (600 µL)
Grupo 2 TFD	<i>Candida albicans</i> + ZnPc Lipossomal (10 µL/600 µL) + Laser (20 min)
Grupo 3 LUZ	Células de <i>Candida albicans</i> + Laser (20min)
Grupo 4 DROGA	<i>Candida albicans</i> + ZnPc Lipossomal (10 µL/600 µL)
Grupo 5 LIPO	Células de <i>Candida albicans</i> + Lipossoma (600 µL)

Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015

4.3.4 Determinação do número de unidades formadoras de colônias - (UFC's)

Para o ensaio da determinação das UFC's os grupos experimentais descritos no item 4.3.3.1, foram bem homogeneizados e em seguida foram levados para a estufa microbiológica à 37° C por 30 min. Após, 200 µL da suspensão dos Grupos - TFD e LUZ - sofreram irradiação por 20 min. com o sistema laser Coherent Cube – 660 nm (fonte de luz laser vermelha) com uma potência de 50 mW e fluência de 50 J/cm², em uma placa de 96 poços profundos de fundo chato (Craplast) (FIG.10). Os grupos DROGA e LIPO não foram irradiados. Posteriormente, foi realizada a diluição de 10⁻³ para cada grupo. Em seguida foi empregada a técnica da semeadura (Spread plate) em placa (J. Prolab). Foram espalhadas 50 µL de suspensão celular que fora diluída em cada placa contendo o meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD) empregando-se a alça de Drigalski (3B Cientific). Estas placas foram incubadas a 37°C em estufa microbiológica por 48 horas para determinação dos números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC's).

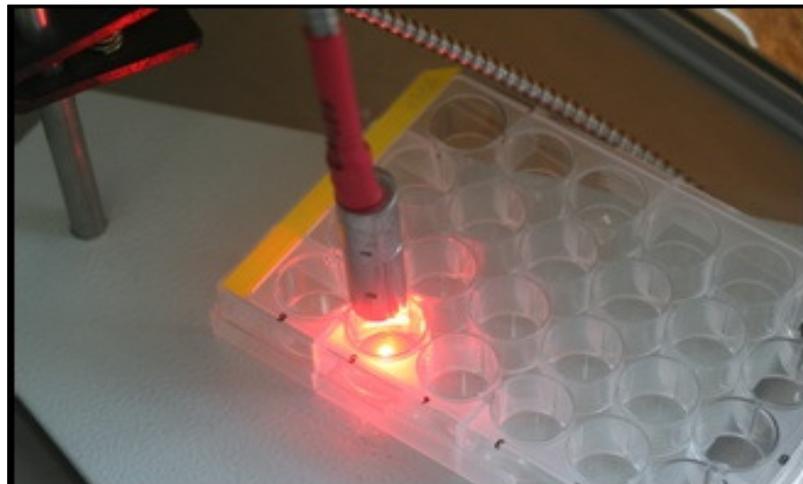
4.3.5 Curva de crescimento celular, avaliação do pH do meio de cultivo e consumo de glicose durante o crescimento da *Candida albicans*.

O experimento para a construção da curva de crescimento celular, avaliação do pH do meio de cultivo e o consumo de glicose durante o crescimento de *Candida albicans*, foram realizados em meio planctônico. Após os tratamentos realizados em cada grupo experimental conforme o protocolo seguido do item 4.3.3.1, foram retirados 50 μ L de cada grupo e inserido em seus respectivos tubos Falcon contendo o meio líquido BHI com um volume final de 50 mL para cada grupo. Os tubos foram muito bem homogeneizados. Após cada coleta, guardados em estantes a 37°C na estufa microbiológica.

Durante o crescimento do microrganismo foi coletada, a cada hora, uma alíquota de 2 mL da suspensão celular de cada grupo durante 24 horas para:

- i) Determinação da turbidez do meio: utilizando-se um espectrofotômetro (λ_{530} nm) (UV – 1600 - Angstrom Advanced).
- ii) Determinação das alterações de pH: utilizando-se um pHmetro de bancada (Gehaka).
- iii) Determinação das alterações da concentração de glicose: kit enzimático (Biotécnica - Biotecnologia).

Figura 10 – Irradiação das células de *Candida albicans*



Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015

4.3.6 Descarte das células

As células de *Candida albicans*, meios de cultura e outros materiais contaminados ou não utilizados nos experimentos foram autoclavados a 127°C durante 20 minutos e posteriormente descartados.

4.4 ANÁLISE DE DADOS

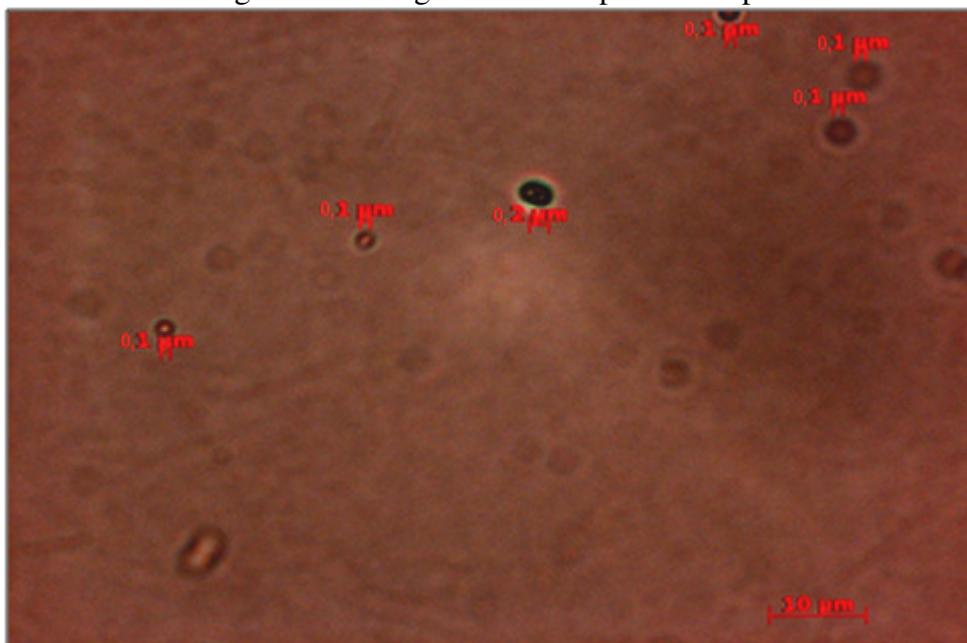
A comparação entre os grupos para as variáveis: número de unidades formadoras de colônias Log (UFC/mL), absorvância, pH e glicose foram realizadas por meio de comparação de médias. Desta forma, foi utilizado a análise de variância One-Way e teste de comparação múltipla de médias - Teste Tukey. A ANOVA foi aplicada as variáveis que satisfizeram as pressuposições de homocedasticidade e normalidade. A homocedasticidade foi verificada pelo teste de Levene e a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as análises que indicaram violação dos critérios para o uso ANOVA foi utilizado o procedimento de transformação de dados e para as análises que continuaram a violar os critérios para o uso da ANOVA foi usada análise não-paramétrica, com o uso do teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância estatística adotado em todos os testes foi de 5% (SAMPAIO, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

A caracterização dos lipossomas é uma importante tarefa e muitas técnicas são empregadas tais como: termodinâmica, mecânica, química, microscopia, espectroscopia e cromatografia, têm sido utilizadas por todo mundo a fim de testar as características físicas e químicas das formulações lipossomais, como lamelaridade, eficiência de encapsulação e sua estabilidade ao longo do tempo (DEMETZOS, 2008). Em nosso trabalho os lipossomas foram confeccionados pela técnica de extrusão. As vesículas (vazias) foram caracterizadas pela técnica de microscopia óptica de luz ilustrando uma produção de vesículas esféricas, mantendo a integridade estrutural, unilamelares com distribuição de tamanho homogênea, resultado de uma preparação lipídica com composição de 3,0 mg/ mL de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e 0,3 mg/ mL de lisofosfatidilcolina (LPC) com dimensão média em torno de 0,1 μm , assim classificadas na literatura como vesículas unilamelares grandes (LUV) (HADIAN et al., 2014), (FIG. 11).

Figura 11 – Imagem Microscópica dos Lipossomas



Fonte: Elaborado pelos Autores, 2014

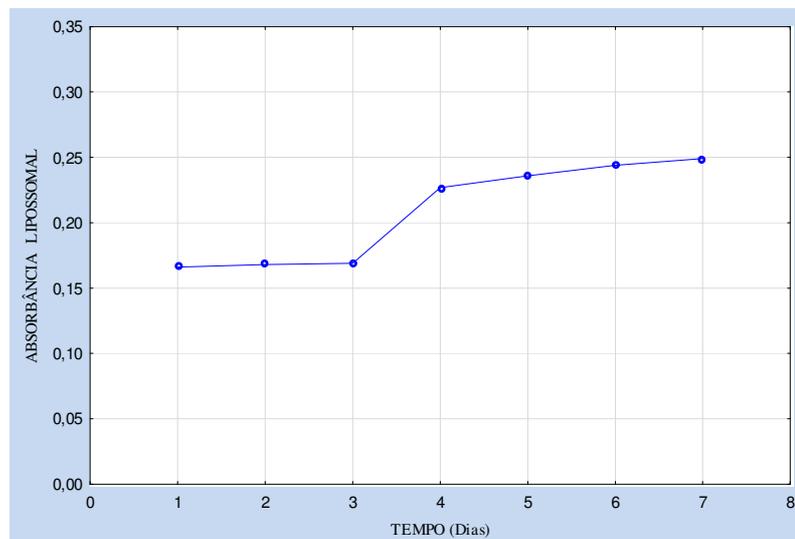
Os Trabalhos dos pioneiros como os de Olson et al. (1979); Hope et al. (1985) e Mac Donald et al. (1991), demonstraram que a técnica de extrusão seqüencial de vesículas multilamelares através de membranas de polycarbonato produzem uma população de

lipossomas relativamente homogênea no tamanho e estrutura, sem causar degradação aos seus lipídios constituintes e pode duplicar a eficiência de encapsulação de lipossomas e relembram membranas celulares biológicas e são capazes de conter relativamente grandes volumes. Os lipídios (DPPC) e (LPC) aqui utilizados na construção pertencem à família das fosfatidilcolinas (PCs) sendo consideradas como a mais utilizada em estruturas de lipossomas. Com propriedades físico-químicas semelhantes a membranas celulares, como a permeabilidade, atividade osmótica, interação com vários solutos, características como fluidez e transforma-se numa estrutura com bicamadas ou lamelas (LAPINSKI et al., 2007; DEMETZOS, 2008).

5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE LIPOSSOMAL

A avaliação da estabilidade lipossomal foi realizada por meio da determinação da turbidez utilizando um espectrofotômetro ($\lambda_{600\text{nm}}$). A Figura 12 mostra uma medida de absorvância inicial estável de 0,166 até o 3º dia. A partir do 4º dia de medição a respectiva amostra da suspensão micro-heterogênea tornou-se turva coincidindo com um aumento gradual na densidade óptica (0,227), finalizando para 0,249 no 7º dia. Os resultados da densidade óptica indicam que até o 3º dia, o sistema lipossômico, na forma de suspensão aquosa, manteve-se estável, evitando, assim, processos de agregação ou fusão de suas vesículas extrusionadas, podendo ser utilizados nos experimentos.

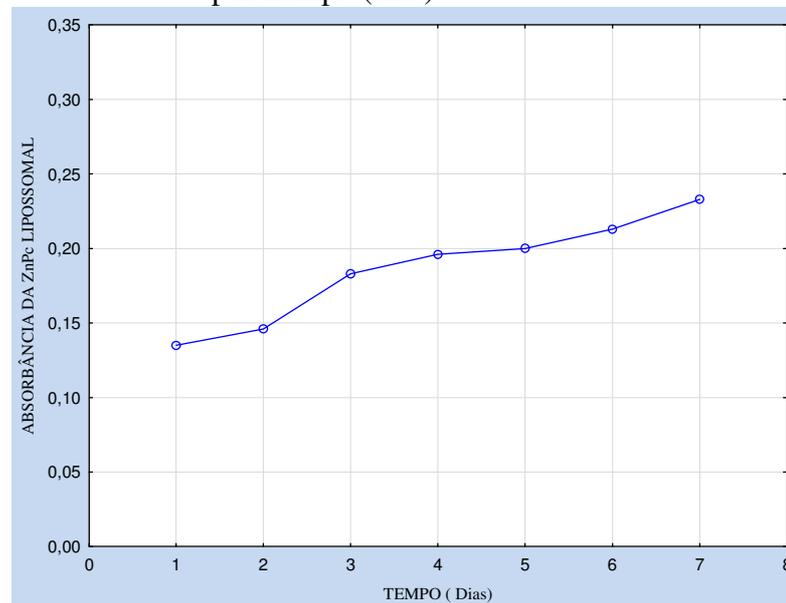
Figura 12 - Medidas de absorvância lipossomal por Tempo (dias)



Fonte: Elaborado pelos autores, 2015

A Figura 13 mostra o resultado da avaliação da estabilidade do lipossoma contendo zinco ftalocianina, com uma medida de densidade óptica inicial de 0,135 ($\lambda_{600\text{nm}}$). A partir do 2º dia aumentando para uma D.O = 0,146, chegando a um valor final de 0,233 no 7º dia de avaliação. Estes resultados da densidade óptica afirmam que os lipossomas contendo o ZnPc, permanecem estáveis apenas no 1º dia. Esse tempo (dias) de estabilidade reduzida em relação à estabilidade do lipossoma vazio pode estar ocorrendo por conta da própria estrutura química do ZnPc (plana), hidrofóbico, se agregando, encapsulado em lipossomas, interferindo no sistema lipossomal (BOLFARINI, 2012).

Figura 13 - Medidas de absorvância da ZnPc lipossomal por Tempo (dias).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2015

Os lipossomas confeccionados neste estudo foram utilizados para os experimentos no dia em que foram confeccionados.

A avaliação da estabilidade dos sistemas de liberação é um estudo essencial, pois leva em consideração a interação química entre o fármaco veiculado e os componentes da formulação, que podem sofrer modificações com o tempo de estocagem cuja formulação venha a ser submetida (BOLFARINI, 2012).

Parâmetros como a composição das bicamadas lipídica, condições de armazenamento, processo de formulação são importantes fatores que afetam a estabilidade física dos lipossomas (DEMETZOS, 2008). E o processo de extrusão desempenha um papel-chave no controle desses parâmetros acima influenciando nas propriedades de distribuição de tamanho, permeabilidade e integridade lipossomal (CHO et al., 2013).

Chorilli et al. (2007) demonstraram através de seus estudos sobre a estabilidade de lipossomas unilamelares pequenos contendo cafeína, por turbidimetria, que este método é adequado para avaliação da estabilidade lipossomal. Diversos autores relatam que a medida da turbidez e a determinação do tamanho dos lipossomas por espalhamento dinâmico de luz (*DLS – Dynamic Light Scattering*) são técnicas utilizadas para avaliar a estabilidade de lipossomas (KHLEBTSOV et al., 2003; NACKA et al., 2001; SIVAKUMAR; RAO, 2001).

Para Matsuzaki et al. (2000), a turbidez, embora seja um método menos sensível, é superior ao espalhamento dinâmico de luz para o estudo de estabilidade dos lipossomas, o nosso estudo corrobora com os autores citados acima. A partir desses resultados, o zinco ftalocianina estará incorporado aos lipossomas especificamente dentro de sua bicamada lipídica conforme já descrito na literatura para a realização da terapia fotodinâmica. (PAULINO, 2006)

Estudos foram realizados por 'Curic' et al. (2013) demonstrando a caracterização e otimização do processo de encapsulação da droga itraconazol dentro de um lipossoma, mostrando que através de suas abordagens, seus resultados produziram uma alta eficiência de encapsulação desta droga, utilizados em candidíase oral e micoses sistêmica.

5.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS – UFC's

A cepa de *Candida albicans* testada, neste estudo, foi sensível a TFD mediada por ZnPc lipossomal na concentração de $3,87 \times 10^{-4}$ mol/L em dimetilsulfóxido e irradiação ao sistema laser Coherent Cube – 660 nm. Foi realizada uma contagem de todos os grupos, na qual foram obtidos os números de UFC/ mL de todos os grupos, em seguida, transformados em \log_{10} . A comparação mostrou como resultado uma redução significativa do número de células no grupo da TFD quando comparado com os grupos C, DROGA; LIPO e LUZ.

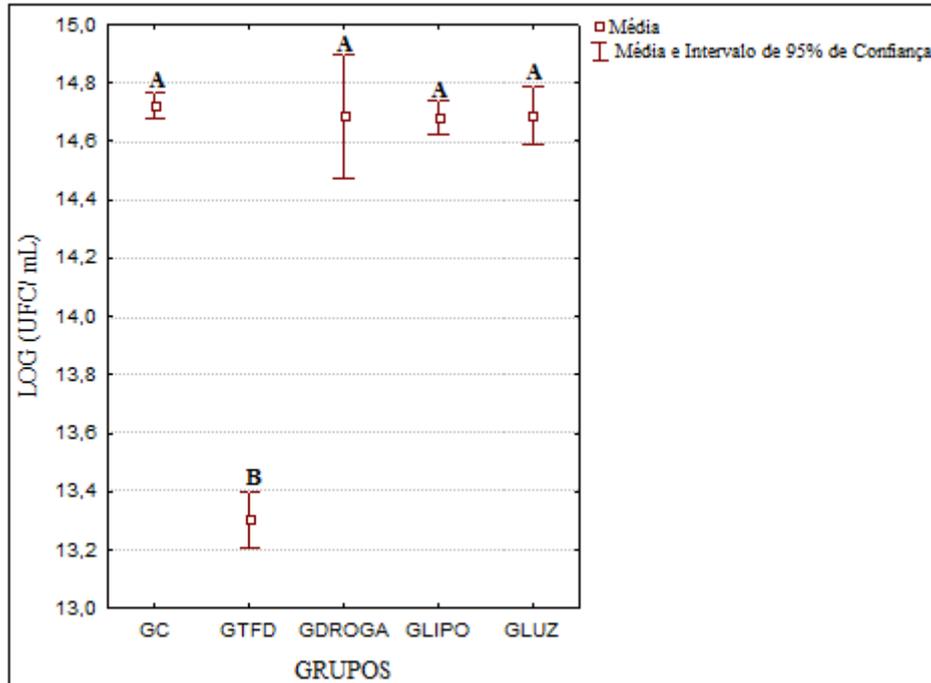
Ao realizar a comparação do grupo C com estes últimos três grupos (DROGA, LIPO E LUZ), observou-se que não existem diferenças entre os resultados finais.

Neste estudo houve uma redução logarítmica de 1,42 UFC/mL nas médias do GTFD quando comparado com o GC.

De acordo com a literatura, de um ponto de vista microbiológico um mínimo de 3 \log_{10} de redução deve ser alcançado para obter efeito antimicrobiano (BOYCE; PITTET, 2002; ROSSONI et al., 2014). Embora a nossa redução obtida neste estudo fosse menor do

que o nível microbiológico exigido mostrou uma diferença estatisticamente significativa. Isto é mostrado através da análise estatística (FIG. 14).

Figura 14 – Médias e Intervalo de 95% de Confiança de Log (UFC/ mL)
Obtida por fotossensibilização de *Candida albicans*.



Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015

Legenda: Diferentes letras (A, B) representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. ANOVA, $p < 0,05$, teste de Tukey.

Foi calculada a percentagem de redução sobre *Candida albicans* quando comparamos o GC com os demais grupos experimentais: a) 9,7% para o GTFD; b) 0,3% para o GDROGA; c) 0,3% para o GLIPO e d) 0,2% para o GLUZ. A tabela 1 visualiza as médias, o intervalo de confiança e a percentagem de diminuição de todos os grupos experimentais.

Tabela 1 - Dados expressos em médias e intervalo de confiança (IC) (normalizados por log) e diminuição em percentagem de *Candida albicans* comparando todos os grupos Experimentais com o controle.

GRUPOS	MÉDIAS (log)	± 95% (IC)	% Diminuição de <i>C. albicans</i>
C	14,72	-14,67%; +14,77%	-
TFD	13,30	-13,21%; +13,40%	9,7
DROGA	14,68	-14,47%; +14,89%	0,3
LIPO	14,68	-14,62%; +14,74%	0,3
LUZ	14,69	-14,59%; + 14,79%	0,2

Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015.

Uma explicação plausível por não ter ocorrido uma maior redução logarítmica de UFC/ mL é que as ftalocianinas embora sejam consideradas moléculas fotossensibilizadoras de segunda geração, são essencialmente hidrofóbicas e insolúveis, por isso são conhecidas por serem menos eficazes em TFD (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004; DONELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008; BARBUGLI, 2010; BOLFARINI, 2012). Esta desvantagem de fácil agregação em solução aquosa e esta propriedade influencia negativamente nas características fotofísicas e leva a uma redução do efeito fotodinâmico, motivos que são ligados a um sistema transportador, assim se tornam apropriados para aplicações decorrentes em TFD (MANTAREVA et al., 2011). Por outro lado são compostos potencialmente ativos, absorvem luz na região do vermelho do espectro eletromagnético (comprimento de ondas maiores que 650 nm) demonstrando baixa toxicidade no escuro e eliminação rápida reduzindo os efeitos tóxicos e com alta eficiência fotodinâmica no tratamento de tumores animais (OLIVEIRA et al., 2005; MARANHO, 2008; BOLFARINI, 2012; ALVES E SILVA, 2014; NEGRI, 2015).

Todas essas características da ZnPc, nos leva a acreditar que é exigido altas doses deste medicamento, encapsulado por um sistema de liberação de fármacos, para uma efetiva irradiação do microrganismo, visto que, estas vesículas vazias são estáveis por 3 dias, enquanto que, as vesículas contendo o ZnPc são estáveis por apenas 1 dia, para que as concentrações efetivas estejam presentes no momento da irradiação do microrganismo. E possivelmente, dependendo das doses utilizadas deste agente fotossensível possam interferir na estabilidade do lipossoma, como demonstrado.

Muitos estudos como o de Mantareva et al. (2007) avaliaram a atividade fotodinâmica da tetrakis-(3-methylpyridyloxy) (ZnPcMe) e tetrakis-(4_sulfophenoxy)(ZnPcS) - phthalocyanine zinc (II) para a gram-positiva *Staphylococcus aureus*, a gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*. As ftalocianinas estudadas exibem banda Q de absorção de $\lambda = 675$ nm e fluorescência máxima em dimetilsulfóxido (DMSO) em $\lambda = 690$ nm. A formação de monômeros em ambas ZnPcs depende da concentração do meio de diluição. Neste caso a agregação pode ser reduzida por uso de um sistema carreador ou por adição de detergentes. O DMSO foi o solvente escolhido para dissolver estes compostos no estado de monômeros. Em seus resultados para *Candida albicans* a fotoinativação foi somente de $1 - 2 \log_{10}$, quando tratada com a aniônica ZnPcS e para a catiônica ZnPcMe foram totalmente fotoinativadas nas densidades celulares 10^6 e 10^8 cells/ mL e alta concentração de droga ($6 \mu\text{M}$) e mais potente luz (100 mW/ cm^{-2}). Mantareva et al. (2007),

finaliza concluindo que a eficácia da TFD nos diversos microrganismos é dependente da dose de luz e da droga utilizada.

Estudos mostram que bactérias gram-positivas são sensíveis à ação fotodinâmica de fotossensibilizadores, independentemente de sua carga ou hidrofobicidade. Enquanto que as bactérias gram-negativas e os fungos são resistentes às ftlocianinas aniônicos e neutros (BERTOLINI et al., 1990; MANTAREVA et al., 2011).

Alves et al. (2014) mostraram que os parâmetros que influenciam a terapia fotodinâmica sobre estes microrganismos são: fluência da luz e as concentrações da droga.

Estes fatores são determinantes para induzir a uma fotoinativação nas espécies de *Candida* (CHABRIER-ROSELLÓ et al., 2005; BAGNATO, 2008; SOARES et al., 2009; DOVIGO et al. 2011).

Podemos concluir que *Candida albicans* foi sensível à fototerapia utilizando o zinco ftalocianina lipossomal e que parâmetros como concentração da droga e fluência da luz, são fatores primordiais que influenciam a terapia fotodinâmica.

5.4 CURVA DE CRESCIMENTO DE *Candida albicans*

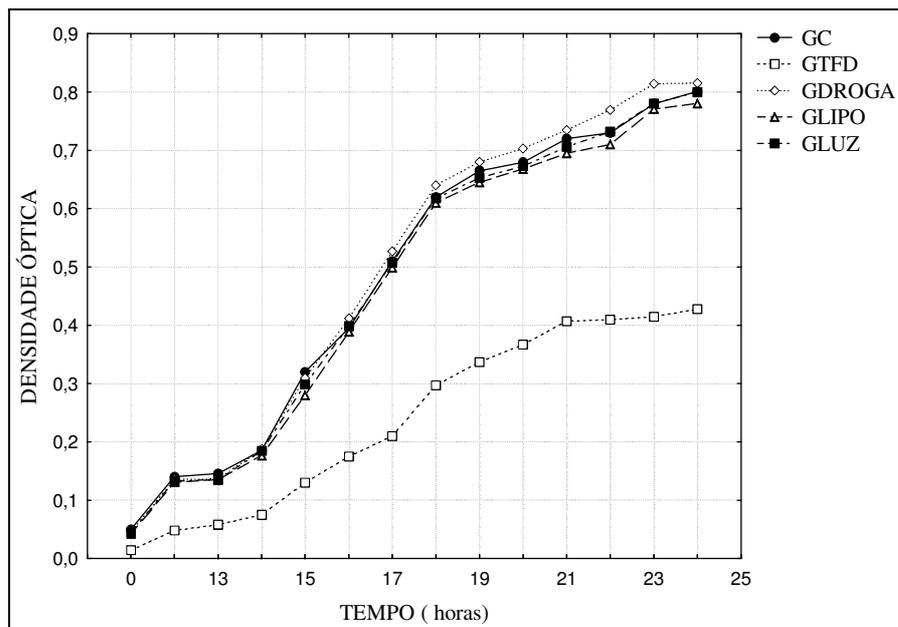
O comportamento do crescimento celular de *Candida albicans*, em todos os grupos experimentais foi acompanhado durante 24 horas (FIG.15). Nas primeiras 14 horas que corresponde à fase “Lag”, foi verificado nos grupos (C; DROGA; LIPO e LUZ), pouca ou ausência de divisão celular, considerada como uma fase de adaptação, mais com intensa atividade metabólica. Após, foi observado o início do processo de divisão (aumento logarítmico), com intenso crescimento celular, isto pode ser observado porque a turbidez do meio aumentou rapidamente até a 23ª hora, surgindo uma fase onde não há um crescimento substancial (fase estacionária), devido à redução de determinados nutrientes indispensáveis para sua multiplicação celular.

No GTFD uma diminuição da densidade óptica foi observada desde o momento zero até a 24ª hora. A fase “lag” perdura desde a 1ª medição (0 hora) até a 14ª hora. Em seguida, inicia um período pequeno de crescimento até a 21ª hora. Entrando na fase estacionária.

Uma explicação para as diminuições nas taxas de crescimento celular de *Candida albicans* no GTFD está relacionada ao stress oxidativo promovido por peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), resultado da fotossensibilização empregando o zinco ftalocianina (TEMPLE; PERRONE; DAWES, 2005; ALBY; BENNETT, 2009). Estes agentes oxidantes produzidos pela TFD influenciam diretamente no crescimento celular em

diferentes fases do ciclo celular deste microrganismo (FLATTERY-O'BRIEN; DAWES, 1998; SASNAUSKIENE et al., 2009). Devemos considerar que os principais fatores de virulência das leveduras: capacidade de expressão de enzimas extracelulares, fosfolipases e proteínases, que degradam os tecidos do hospedeiro; produção de substâncias tóxicas que causam lesão celular; capacidade de adesão a células e tecidos; formação de biofilmes sobre células e superfícies inanimadas; produção de tubo germinativo por algumas espécies de *Candida spp.*; produção de hemolisinas; hidrofobicidade da superfície celular (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). A interferência nestes fatores de virulência provoca inibição do crescimento, podendo ser causada por diferentes mecanismos: a diminuição do metabolismo celular causada pela redução de absorção de nutrientes, ou pela função bioenergética da mitocôndria com danos, via um sinal direto gerado na mitocôndria relatada na inibição do crescimento. Metabolismo celular pode ser reduzido depois da TFD devido à diminuição de carboidratos, aminoácidos ou fosfatos através de proteínas transportadoras ligadas a membrana. A ação fotodinâmica pode também atrapalhar o metabolismo de carbono e produção de ATP ocorrendo à eliminação de enzimas intracelulares. Além disso, o dano fotodinâmico provocado na mitocôndria pode aumentar a expressão de p 21, um inibidor da quinases dependentes de ciclina, levando à inibição do crescimento (KATO, et al., 2013).

Figura 15 – Curva de Crescimento de *C. albicans* em meio planctônico em função do tempo.

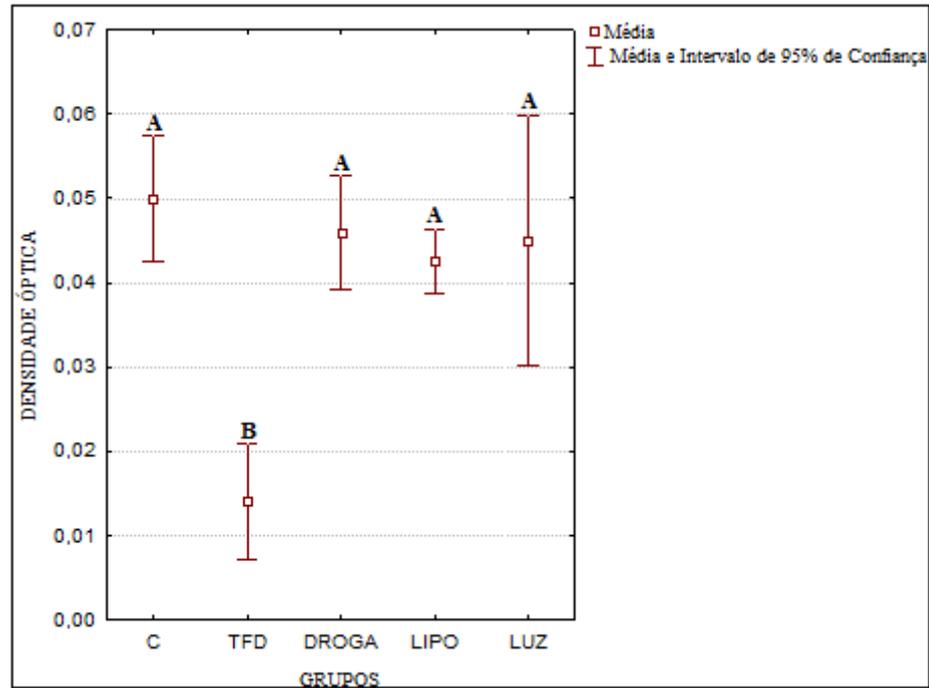


Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015

Legenda: Cada ponto representa a média de 4 repetições.

Podemos concluir através dos resultados e afirmar através das análises de dados que a TFD mediada por ZnPc Lipossomal reduziu o crescimento celular de *Candida albicans* (FIG. 16).

Figura 16 – Médias e Intervalo de 95% de Confiança da Curva de Crescimento da *C. albicans* no momento inicial.



Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015

Legenda: Diferentes letras (A, B) representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. ANOVA, $p < 0,05$, teste de Tukey.

5.4.1 Avaliação do pH do meio de cultivo de *Candida albicans*

Foi testado o efeito do pH inicial até o período de 24 horas, do meio de crescimento de *C. albicans* dos grupos: C; TFD; DROGA; LIPO e LUZ. O pH normal do caldo BHI utilizado foi $7,4 \pm 0,2$ sem ajustes. Mostrou como resultado um decaimento muito significativo desde o momento inicial (zero) até a 12ª hora, exibindo um pH ácido, seguindo com um decréscimo dessas medidas de pH ácido até o final da 24ª hora, nos GC; DROGA; LIPO e LUZ.

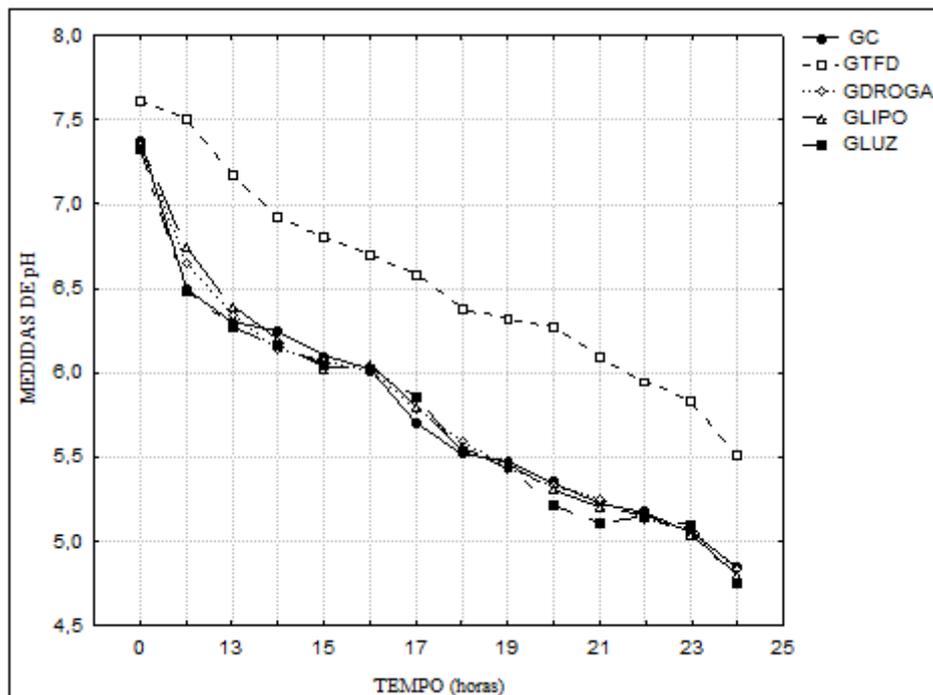
No GTFD, nas primeiras 12 horas o pH não alterou, iniciando após, um discreto e menor decaimento por durante todo o período de tempo de 24 horas.

Conforme os resultados visualizados *Candida albicans* cresceu melhor em pH ácido ocorrido nos grupos sem tratamento (C; DROGA; LIPO e LUZ) em comparação ao GTFD (com a Terapia Fotodinâmica). Vários Autores como Samaranayake et al. (1986); Vargas et

al. (2002); Barbedo e Sgarbi (2010), através de seus estudos afirmaram que as espécies de *Candida* apresentam características acidogênicas e heterofermentativas particularmente em condições ricas em carboidratos. E nestes ambientes crescem satisfatoriamente.

Depois de 24 horas, os grupos: C; TFD; DROGA; LIPO e LUZ, apresentaram uma medida final de pH: 4,85; 5,51; 4,83; 4,80 e 4,75, respectivamente (FIG. 17).

Figura 17 – Medidas de pH do meio de cultivo de *Candida albicans* em função do tempo de crescimento.



Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015

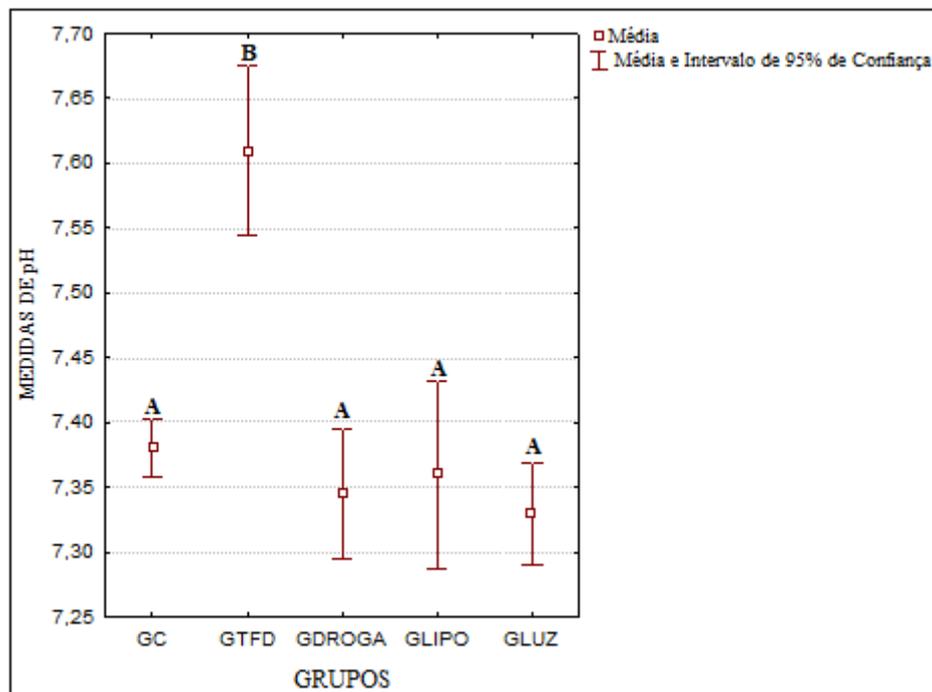
Legenda: Cada ponto representa a média de 4 repetições.

Estudos desenvolvidos “*in vitro*” por Samaranayake et al. (1986) demonstraram que o desenvolvimento da *Candida albicans* na presença da saliva é acompanhado de um rápido declive no pH de 7,5 a 3,2 em 48 horas, e que a maioria dos componentes ácidos da saliva como piruvatos e acetados, mantém este pH baixo. Estes metabólitos ácidos podem desempenhar um papel na patogênese da candidíase oral.

No entanto, Odds (1988) revisou todas as probabilidades de avaliação dos resultados dos efeitos do pH sobre o crescimento de *Candida* e sugere que a medida de pH por si só não é propiciador de afetar a taxa de crescimento ou de sobrevivência da *Candida*, mas, talvez afetar a capacidade dos fungos para aderir e invadir o hospedeiro. *Candida albicans* é o mais importante fungo patógeno de humanos, causando doenças em muitas locais do corpo. A capacidade de alternar entre várias morfologias é um traço de virulência chave nesta espécie

promovendo a disseminação e invasão de tecidos no hospedeiro. A variação do pH é causada pela libertação de amônia a partir de células produzidas durante a decomposição de aminoácidos. Esta situação é inédita num patógeno humano e pode substancialmente impactar a fisiologia do hospedeiro por estar associado à morfogênese, adaptação do pH, metabolismo de carbono e interações com células hospedeira as quais são essenciais para a patogenia (VYLCOVA et al., 2011). Podemos concluir que as variações de medidas de pH ocorridas dentro do GTFD, apresentaram uma diferença estatística significativa em comparação aos outros grupos (C; DROGA; LIPO e LUZ) devido ao emprego da TFD com o zinco ftalocianina lipossomal e luz laser 660 nm com fluência de 50 J/ cm² (FIG. 18).

Figura 18 – Médias e Intervalo de 95% de Confiança das medidas de pH da *Candida albicans* no momento inicial.



Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015

Legenda: Os valores seguidos por letras diferentes (A, B) diferem significativamente entre os cinco grupos experimentais: GC; GTFD; GDROGA; GLIPO e LUZ. ANOVA, $p < 0,05$, teste de Tukey.

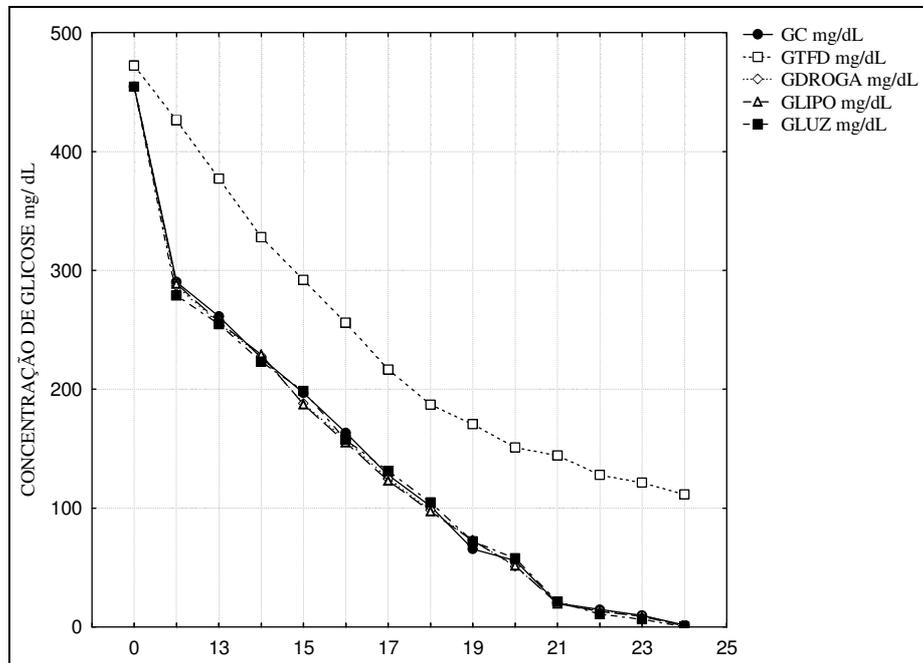
5.4.2 Consumo de glicose da *Candida albicans*

A determinação do consumo de glicose foi observada durante todo o período de 24 horas de crescimento celular deste microrganismo em todos os grupos experimentais (C; TFD; DROGA; LIPO e LUZ) (FIG. 19). Foi constatado um declínio acentuado na concentração de glicose nas 12 primeiras horas, prosseguindo com um decaimento gradual até

o final do tempo de 24 horas nos grupos: C; DROGA; LIPO e LUZ. A partir da qual não há indícios de consumo de glicose.

Os resultados experimentais do GTFD mostraram um consumo menor da concentração de glicose por todo o tempo de 24 horas, quando comparamos com os grupos sem tratamento (C; DROGA; LIPO e LUZ). Após 24 horas, a concentração de glicose de cada grupo: C; TFD; DROGA; LIPO e LUZ foram respectivamente: 1,64; 111,52; 1,31; 0,98 e 0,32 (mg/ dL) (FIG. 19).

Figura 19 – Consumo de glicose em função do tempo de crescimento de *Candida albicans*



Fonte: Elaborado pelos Autores, 2015

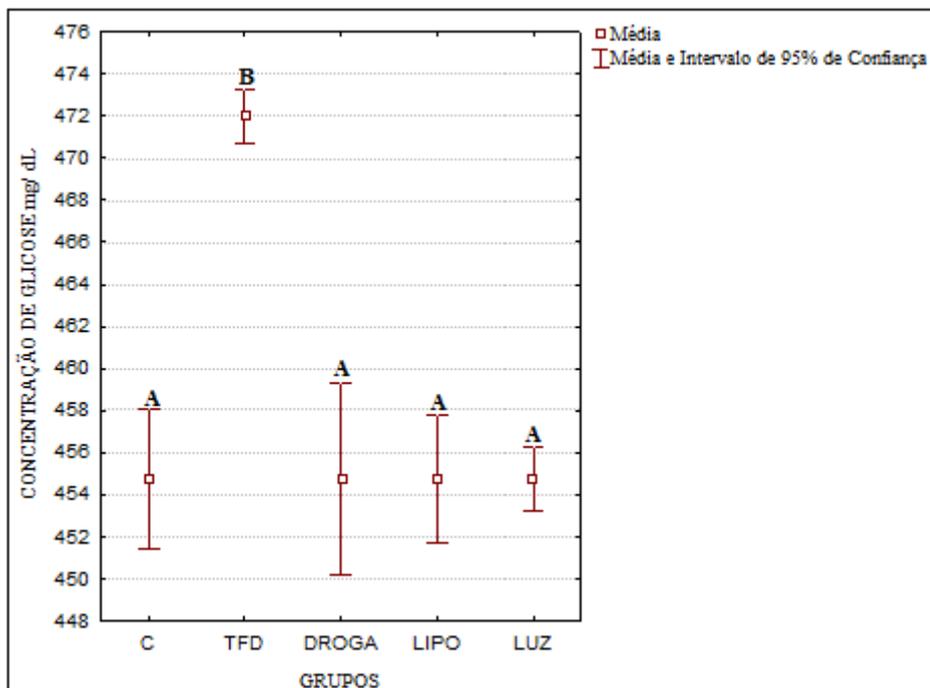
Legenda: Cada ponto representa a média de 4 repetições.

O consumo maior de glicose apresentado pelos grupos: C; DROGA; LIPO e LUZ estão relacionadas com a sua colonização em células hospedeiras. A via glicolítica é um caminho metabólico utilizado pelas células em geral, e particularmente pelos microrganismos com a finalidade de produzir polissacarídeos de reserva, de colonização e aderência, assim como para obter energia, o que resulta, conseqüentemente, na produção de ácidos (SIMÕES; ARAÚJO; ARAÚJO, 2008).

A glicose atua na transição de levedura para hifas que é um determinante vital da sua virulência e patogenicidade, desempenhando um papel central como fonte de carbono e energia (BROWN; SEXTON; JOHNSTON, 2006). Diante dos resultados revelados na

determinação da glicose, podemos afirmar que o GTFD apresentou um menor consumo de glicose (FIG. 20).

Figura 20 – Médias e Intervalo de 95% de Confiança do consumo de Glicose de *Candida albicans* obtido através dos tratamentos no momento inicial.



Fonte : Elaborado pelos Autores, 2015

Legenda: Os valores seguidos por letras diferentes (A, B) diferem significativamente entre os cinco grupos: C; TFD; DROGA; LIPO e LUZ. ANOVA, $p < 0,05$, teste de Tukey.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

São recentes os estudos que utilizam o zinco ftalocianina encapsulado em lipossomas, sendo esta molécula hidrofóbica e de fácil agregação. Para isto, houve a necessidade de standardizar o método de preparação dos lipossomas utilizando os fosfolipídios DPPC e LPC, que são muito utilizados para esta finalidade.

A construção de vesículas unilamelares grandes foi realizada pelo processo de extrusão apresentando lipossomas com dimensão média em torno de 0,1 μm . A microscopia de luz possibilitou visualizar suas características físicas, tais como, a estrutura e o tamanho homogêneo.

A medida de densidade óptica avaliou a estabilidade dos lipossomas (vazios) e contendo o ZnPc e os considerou estáveis para o uso na terapia fotodinâmica dentro de 72 h e 24 horas, respectivamente.

Os resultados preliminares da determinação do número de unidades formadoras de colônias – UFC's – mostraram que a terapia fotodinâmica mediada por zinco ftalocianina lipossomal apresentaram uma redução logarítmica nas células de *Candida albicans* em meio planctônico em comparação com os outros grupos que não foram submetidos à irradiação e nem a droga.

A curva de crescimento mostrou a avaliação do crescimento de *Candida albicans* em função do tempo, sendo possível a completa visualização da fase logarítmica de crescimento em todos os grupos. Uma diferença significativa foi mostrada pelo GTFD após o stress oxidativo sofrido pela TFD em comparação a todos os grupos experimentais.

Através dos resultados apresentados pelas medidas de pH foi possível observar que *Candida albicans* cresceu melhor em pH ácido, que ocorreu principalmente nos grupos sem tratamento.

Nos ensaios da determinação da glicose observamos que o GTFD apresentou um menor consumo de glicose.

Os resultados finais da curva de crescimento, medidas de pH e determinação da glicose, mostraram que existe uma relação entre o crescimento da *Candida albicans*, um pH ácido e consumo de glicose com a sua colonização no hospedeiro.

Este estudo nos possibilitou confirmar a eficiência do lipossoma em solubilizar compostos que apresentam alta hidrofobicidade, como é o caso do ZnPc. Dessa forma, pode ser empregada com sucesso na administração e liberação de fármacos. Assim, sendo utilizado

na TFD como agente antimicrobiano revelou que os ensaios experimentais apresentaram sensibilidade à *Candida albicans*.

Com perspectivas futuras, pretende-se explorar mais a atividade deste fotossensibilizador na TFD contra microrganismos patogênicos.

7 REFERÊNCIAS

- AGUIRRE URIZAR, J.M. Candidiasis orales. **Revista Ibero americana de Micologia**. v.19, n.1, p. 17-21, 2002.
- ABEGG, M. A. **Estresse oxidativo em espécies de *Candida* com relevância clínica**. 2010. 1456 f. (Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, 2010.
- ALBUQUERQUE, I. O. de **Citotoxicidade *In Vitro* da Terapia Fotodinâmica com Alumínio-Cloro-Ftalocianina Lipossomal em Melanoma Murino (B16F10)**. 2008. 66f. (Dissertação em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília - Faculdade de Ciências da Saúde - Brasília, DF, 2008.
- ALBY K., BENNETT R. J. Stress-Induced Phenotypic Switching in *Candida albicans*. **Molecular Biology of the cell**. v. 20, p. 3178-3191, 2009.
- ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.
- ALVES E SILVA, A. R. **Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas**. 2010. 142f. (Tese Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Ribeirão Preto, SP, 2010.
- ALVES, F. et al. The influence of photodynamic therapy parameters on the inactivation of *Candida* spp: *in vitro* and *in vivo* studies. **Laser Physics**. v. 24, p. 1-8, 2014.
- BAGNATO, V. S. **NOVAS TÉCNICAS ÓPTICAS – para a área da saúde**. 1ª edição. 2008. Editora livraria de Física. P.241.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. **Candidiasis. DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais**. 2010. 121f. (Tese Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Ribeirão Preto, SP, 2010.
- BARENFOLZ, Y. Liposome application: problems and prospects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, n.1, p. 66-77, 2001.
- BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans* a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**. v. 3, n. 12, p. 918-930, 2002.
- BERMAN, J. *Candida albicans*. **Current Biology**. v.22, n. 16, p. 620-622, 2012.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part I, *Candida albicans*. **Yeast**. v. 25, n. 6, p. 385-417, 2008.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. New Antifungic Drugs: a Review. **Visão Acadêmica**. v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.

BERTOLONI et al. Photosensitizing activity of water-and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 59, n. 1-2, p. 149-55, 1990.

BEYER, W. Systems for light application and dosimetry in photodynamic therapy. **Journal of photochemistry and photobiology B: Biology**. v. 36, n. 2, p. 153-156, 1996.

BLISS, J. M. et al. Susceptibility of *Candida* species do photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 48; n. 6; p. 2000-2006, 2004.

BOLFARINI, G. C. **Avaliação Fotobiológica da Ftalocianina de Zinco complexada á Cucurbiturila Aplicada na Terapia Fotodinâmica e na Hipertemia Celular**. 2012. 117f. - (Dissertação de Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP – Ribeirão Preto, SP., 2012.

BONNETT, R. Chemical aspects of photodynamic therapy by Raymond Bonnett (University of London). Gordon and Breach Science Publishers: London and Newark. **Journal of the American Chemical Society**. v. 123, n. 15, p. 3622, 2001.

BOYCE J. M.; PITTET D. Guideline for hand hygiene in healt-care settings: recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v. 30, n. 8, p. S1-S46, 2002.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Laser in Medical Science**. v. 17, n. 3, p. 173-186, 2001.

BROWN, V.; SEXTON, J. A.; JOHNSTON, M. A glucose sensor in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**. v.5, n.10, p. 1726-1737, 2006.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

CAMPOS, J. M. S.; MENEZES, L. F. de; SILVA PONE, M. V. da Infecções Fúngicas no Período Neonatal. In: MOREIRA, M.; LOPES, J. M. A.; CARALHO, M., orgs. **O recém-nascido de alto risco: teoria e prática do cuidar** (on line). Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 564p.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.

CHABRIER-ROSELLÓ et al. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 49, n. 10, p. 4288-4295, 2005.

- CHAUCANÉS, C. P. B. **Expressão e caracterização enzimática da Tioredoxina redutase (Trr1) e do seu substrato Tioredoxina (Trx1) e identificação de novas drogas por modelagem molecular do alvo Trr1 do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans***. 2014. 109 f. (Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.
- CHAVES, G.M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity Characteristic of stocked and fresh yeast strains. **Brazilian Journal of Microbiologia**. v. 34, n. 3, p. 197-202, 2003.
- CHO, N. et al. Comparison of Extruded and Sonicated Vesicles for Planar Bilayer Self-assembly. **Materials**. v. 6, p. 3294-3308, 2013.
- CHORILLI, et al. Stability study of small unilamellar liposomes with caffeine by turbidity. **Revista Brasileira Farmácia**. v. 88, n. 4, p. 194-199, 2007.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida spp*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- COLOMBO, A. L. et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**, v. 40; n. 10; p. 1489-1498, 2014.
- COSTA, A. C. B. P. et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine – and LED – mediated photodynamic therapy. **Archives Of Oral Biology**. v. 56, n. 11, p. 1299-1305, 2011.
- CRAMPIN, H. et al., *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 13, p. 2935-2947, 2005.
- ‘CURIC’, A. et al. Formulation optimization of itraconazole loaded PEFylated liposomes for parenteral administration by using design of experiments. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, p. 189-197, 2013.
- DELALOYE, J.; CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulência**, v. 5; n. 1; p. 161-9, 2014.
- DEMETZOS, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Toll to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 3, p. 159-173, 2008.
- DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN J. S.; ANAISSIE E. *Candida*. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A.; editors. **Medical Mycology**. 1ª ed., Churchill Livingstone, Filadélfia, 2003, p. 195-239.
- DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic Therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**. v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.

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

DOUGLAS, L. J. *Candida albicans* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**. v. 11, n. 1, p. 30-36, 2003.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic Therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 90, n. 90, p. 889-905, 1998.

DOVIGO, L. N. et al. Photodynamic Inactivation four species of *Candida* induced Photogen®. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41; n. 1; p. 42-49, 2010.

DOVIGO, L. N. et al. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**. v. 54; n. 2; p. 123-130, 2011.

FEHR, M. K. et al. Structural and functional effects of endometrial photodynamic therapy in a rat model. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 175, n. 1, p. 115-121, 1996.

FEUSER, P. E. **Encapsulamento Simultâneo de Nanopartículas Magnéticas (NPMS) Com Ftalocianina de Zinco (ZNPC) via Polimerização em Miniemulsão**. 2012. 120f. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC, 2012.

FLATTERY-O'BRIEN, J. A.; DAWES, I. W. Hydrogen peroxides causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G₂ in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G₁ arrest independent of RAD9 function. **Journal Biology Chemical**. v.273, n.15,p. 8564-8571, 1998.

FLOREZ, F. L. E. **Terapia Fotodinâmica em Microrganismos Cariogênicos – Estudo *in vitro***. 2012. 151 f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Estadual Paulista – Araraquara, SP, 2012.

FORCHE, A. et al. A system for studying genetic changes in *Candida albicans* during infection. **Fungal Genetics and Biology**. v. 39, n. 1, p. 38-50, 2003.

FRIEDBERG, J. S. et al. *In vitro* effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.48, n. 1, p. 105-107, 2001.

GARCÊS, B. P. **Estudo da fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando lipossomas e proteínas de *Moringa oleifera* como sistemas de entrega de fotossensibilizadores sintéticos e naturais**. 86f. 2014. (Dissertação de Mestrado em Química) - Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2014.

GAREY, K. W. et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institucional study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43; n. 1; p. 25-31, 2006.

- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatologia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.46, n. 3, p. 225-234, 2010.
- HADIAN, Z. et al. Formulation, Characterization and Optimization of Liposomes Containing Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids; A methodology Approach. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 2, p. 393-404, 2014.
- HARVEY, E. H. et al. Killing tumor cells: The effect of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorine and NS-398. **American Journal of Surgery**. v. 189, n. 3, p. 302-305, 2005.
- HEITMAN, J. et al. **Cryptococcus: from human pathogen to model yeast**. ASM – American Society for Microbiology. 1^a ed. Washington, DC., 2011, p.646.
- HOPE, M. J. et al. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 812, n. 1, p. 55-65, 1985.
- HUDSON, R.; SAVOIE, H.; BOYLE, R. W. Lipophilic cationic porphyrins as photodynamic sensitizers-synthesis and structure-activity relationships. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.2, n.3, p. 193-196, 2005.
- INDIG, G. L. et al. Effect of molecular structure on the performance of triarylmethane dyes as therapeutic agents for photochemical purging of autologous bone marrow grafts from residual tumor cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 89, n. 1, p. 88-99, 2000.
- JESORKA, A. & ORWAR O. Liposomes: Technologies and Analytical Applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**. (Palo Alto Calif.), v. 1, n. 801-32, 2008.
- KATO, I. T. et al. Antimicrobial Photodynamic Inactivation Inhibits *Candida albicans* Virulence factors and reduces *In Vivo* Pathogenecity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.57, n. 1, p. 445-451, 2013.
- KHAN, M. S. A. et al. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In: AHMAD, I.; OWAIS, M.; SHAHID, M.; A. F. **Combating Fungal Infections**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 2010. p. 21-45.
- KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a Major Human Fungal Pathogen. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.
- KHLEBTSOV, et al. Studies of phosphatidylcholine vesicles by spectroturbidimetric and dynamic light scattering methods. **Journal Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**. v. 79, n. 80, p. 825-838, 2003.
- LACAZ, Carlos da Silva et al. **Tratado de micologia médica**. São Paulo (SP): Sarvier, 2002. 1104 p.

LAIA, C. A. T.; COSTA, S. M. B.; FERREIRA, L. F. V. Electron-transfer mechanism of the triplet state quenching of aluminium tetrasulfonated phthalocyanine by cytochrome *c*. **Biophysical Chemistry**. v. 122, n. 2, p. 143-155, 2006.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n.5, p. 2026-2034, 2005.

LANGER, R. Biomaterials and Biomedical engineering. **Chemical Engineering Science**. v. 50, n. 24, p. 4109-4121, 1995.

LAPINSKI, M. M. et al. Comparison of Liposomes formed by Sonication and Extrusion: Rotational and Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. **Langmuir**. v. 23, n.23, p. 11677-11683, 2007.

LAVAN, D. A.; MCGUIRE, T.; LANGER, R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. **Nature Biotechnology**, New Haven, v. 21, n. 10, p. 1184-1191, 2003.

LI, H. J; CHANG, J. C.; HSIEH, N. N. Pheophytin a and b mediated photodynamic therapy against sensitive and multidrug-resistant breast cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 8, n. 2, p. 130, 2011.

LIM, H. J. Indocyanine Green-based photodynamic therapy with 785nm light emitting diode for oral squamous cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 8, n. 4, p. 337-342, 2011.

LOGUERCIO-LEITE, C. et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Revista Biotemas**. v. 19, n. 2, p. 17-27, 2006.

LONGO, J. P. F. **Avaliação da aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal sobre o Câncer Bucal em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro***. 2008. 92f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

LONGO, J. P. F. et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**. v. 94, n.2, p. 143-146, 2009.

LÓPEZ-JIMÉNEZ L. et al. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. **Lasers Med Sci**. v.30, n.5, p. 1519-1526, 2015.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in Molecular Medicine**. v. 8, n. 2, p. 76-81, 2002.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanisms of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicine**. v. 39, n. 12, p. 1137-1149, 2003.

MCCAUGHAN, JR., J. S. Photodynamic Therapy: a review. **Drugs & Aging**, Ohio, v. 15, n. 1, p. 49-68, 1999.

MACDONALD, R. C. et al. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1061, n. 2, p. 297-303, 1991.

MACHADO, A. E. H Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**. v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MANTAREVA, V. et al. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.15,n., p. 4829-4835, 2007.

MANTAREVA, V. et al. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 10, n.1, p. 91-102, 2011.

MARANHO, D. S. “Estudo da associação de complexos nitrosilos de rutênio liberadores de NO com o agente fotossensibilizador Zinco ftalocianina ZnPC em sistemas de liberação utilizados na Terapia Fotodinâmica.” 2008. 110f. (Dissertação de Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP, 2008.

MATSUZAKI, K. et al. Optical characterization of liposomes by right angle light scatterina and turbidity measurement. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 146, p. 219-226, 2000.

MENEZES, E. A. et al. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactentes do banco de leite materno humano da Universidade Federal do Ceará e teste de suscetibilidade a antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 299-305, 2004.

NACKA, et al. Physical and Chemical stability of marine lipid-based liposomes under acid conditions. **Colloid and Surfaces B**. v. 20, n. 3, p. 257-266, 2001.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE B. *Candida albicans* secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

NEGRI, L. B. **Complexos rutênio-ftalocianinas como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos**. 2015. 148f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP – Ribeirão Preto – SP, 2015.

NUNES, S. M. T. ; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminium phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, n. 2, p. 273-284, 2004.

NUNES, E. B. et al. Antifungal sensitivity profile for the *Candida* genus in a reference hospital in Northern Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

OCHSNER, M. Light scattering of human skin: a comparison between zinc(II)-phthalocyanine and Photofrin II[®]. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 32, n. (1-2), p. 3-9, 1996.

ODDS, F. C. *Candida and Candidosis: A Review and Bibliography*. In: STELZNER, a. *Journal of Basic Microbiology*. 2ª ed. Weinheim: WILEY-VVH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1988. v. 30, n. 5, p. 382-383.

OLIVEIRA, C. A. de; MACHADO, A. E. H.; PESSINI, F. B. T. Preparation of 100nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. **Chemistry Physics of Lipids**. v. 133, n. 1, p. 69-78, 2005.

OLIVEIRA, D. M. et al. Studies of zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex as a bifunctional agent for cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, n.p. 476-479, 2005.

OLIVEIRA, D. M. et al. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 6, n. 8, p. 2432-7, 2006.

OLSON, F. et al. Preparation of Liposomes of defined size distribution by extrusão through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biofisica Acta**. v. 557, n.1, p. 9-23, 1979.

ONYEWU, C. et al. Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Become Fungicidal when Combined with Calcineurin Inhibitors against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 986-964, 2003.

PAULINO, T. P. **Ação de corantes fotossensíveis em meio homogêneo e micro heterogêneo de lipossomos no controle do crescimento de *Streptococcus mutans***. 2006. 115 f. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2006.

PELCZAR, Michael Joseph; CHAN, Eddie Chin Sun; KRIEG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo (SP): Pearson, 2012, 524 p.

PRATES, R. A. et al. Light parameters influence antifungal photodynamic therapy. **Revista Brasileira de Física Médica**. v.4, n. 1, p. 53-7, 2010.

PRATES, R. A. et al. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. v. 66, n.7, p. 1525-1532, 2011.

QUEIROGA, A. S. et al. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida spp.* by different doses of low power laser light. **Photodiagnosis and Photodynamic**. v. 8, n. 4, p. 332-336, 2011.

RAEMDONCK et al. Merging the best of both worlds: hybrid lipid-enveloped matrix nanocomposites in drug delivery. **Chemical Society Review**. v. 43, n. 1, p. 444-472, 2014.

RAVANAT, J. L. et al. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 51, p. 40601-40604, 2000.

- RAVANAT, J. L. et al. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, n. 1, p. 23-30, 2004.
- RIBEIRO, A. P. D. et al. Photodynamic Inactivation of Planktonic Cultures and Biofilms of *Candida albicans* Mediated by Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Entrapped in Nanoemulsions. **Photochemistry and Photobiology**. v.; 89, n. 1, 111-119, 2013.
- RIBEIRO, J. **Fotofísica e Determinação de Parâmetros Fotodinâmicos da Ftalocianina de Zinco em meios Homogêneo e Microheterôgeneo**. 2003. 119f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG, 2003.
- RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, A. H. Defying death after DNA damage. **Nature**. v. 407, n. 407, p. 777-783, 2000.
- RIOS, A. et al. Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light-emitting Diode Lamp against *Enterococcus faecalis* in Extracted Human Teeth. **Journal of endodontics**, v. 37, n. 6, p. 856-859, 2011.
- ROSSONI, R. D. et al. Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. **Laser Med Sci**. v. 29, n. 5 p.1679-1684, 2014.
- SALAS, I.; GARCIA, J.; MIRANDA, K. Factores de virulência em cepas *Candida albicans*. **Revista Costarricense de Ciencias Médicas**. v.21, n. 1-2, p. 43, 2000.
- SALES, L. M. B. G. **Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy, using methylene blue as a photosensitizing drug on the *Candida albicans* growth**. 2006. 43f. (Dissertação - Engenharia Biomédica). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP. 2006.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada á Experimentação Animal**. 3. Ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p.
- SAMARANAYAKE, L. P. et al. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. **Journal of oral Pathology**. v. 15, n.5 ,p. 251-254, 1986.
- SASNAUSKIENE et al. Apoptosis, autophagy and cell arrest following photodamage to mitochondrial interior. **Apoptosis**. v. 14, n.3, p. 276-286, 2009.
- SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v.66, n. 5, p. 701-707, 2003.
- SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. **European Journal of Pharmaceutical Science**. v. 23, n. 2, p. 131-138, 2004.
- SIMÕES, C.C., ARAÚJO, D. B. de, ARAÚJO, R. P. C. de “Study, *in vitro* and *ex vivo*, of the action of different concentrations of própolis extracts against microorganisms present in human saliva” **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n.1, p. 84-89, 2008.

- SIVAKUMAR, P. A.; RAO, K. P. Polymerized (ethylene glycol) dimethacrylate-cholesteryl methacrylate liposomes: preparation and stability studies. **Reactive & Functional Polymers**. v. 49, n. 3, p. 179-187, 2001.
- SNYDER, J. W. et al. Subcellular, time-resolved studies of singlet oxygen in single cells. **Journal of the American Chemical Society**. v. 127, n. 42, p. 14558-14559, 2005.
- SOARES, B. M. et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 94, n. p. 65-70, 2009.
- SOLL, D. R.; LOCKHART, S. R.; ZHAO, R. Mating and virulence of *Candida albicans*. **Cambridge University**. v. 17, n. 2, p. 64-69, 2003.
- SOUSA, C. T. de **Avaliação do Efeito de Alguns Fármacos Na Fluidez Da Membrana Celular**. 2006. 88f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Lisboa, 2006.
- SOUZA, R. C. et al. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Laser in Medical Science**. São José dos Campos, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2010.
- SOUZA, E. B. de **Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares *in vivo***. 2011. 73 f. (Tese de Doutorado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.
- SPESIA, M. B. et al. Mechanistic insight of the photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by a tetracationic zinc(II) phthalocyanine. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 6, n. 1, p. 52-61, 2009.
- STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based Photosensitizers for Used in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**. v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.
- SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. v.12, n. 7, p. 317-324, 2004.
- SUDBERY, P.E. Growth of *Candida albicans*. **Nature Reviews – Microbiology**. v.9, p. 737-748, 2011.
- SUZUKI, L. C. **Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica**. 2009. 49f. (Dissertação) Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares – Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.
- TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

TEMPLE, M. D.; PERRONE, G.G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends Cellular Biology**. v. 15, p, 319-326, 2005.

THONG, P. S. –P. et al. Hypericin-photodynamic therapy (PDT) using an alternative treatment regime suitable for multi-fraction PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 82, n. 1, p. 1-8, 2006.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Ateneu, 2008. 760p.

TYRREL, J.; CAMPBELL, S.; CURNOW, A. Protoporphyrin IX photobleaching during the light irradiation phase of standard dermatological methyl-aminolevulinate photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.7, n.4, p. 232-238, 2010.

UCHOA-FERNANDES, F. **Síntese, caracterização e Fotoatividade de Fotossensibilizadores Derivados de Protoporfirina IX e de Clorofila**. 2007. 111f. (Doutorado de Química). - Instituto de Química da Universidade de São Paulo - São Paulo, 2007.

VARGAS, L. O. et al. Salivary pH and culture determinations in HIV infected and non-HIV infected patients with oral candidosis. *Revista Iberoamericana de Micologia* v. 19,p. 155-160, 2002.

VIRIATO, A. Terpenoids with antifungal activity for *Candida Berkout* species, causing hospital infections. **O mundo da Saúde**. v. 38, n. 1, p. 40-50, 2014.

VYLKOVA, S. et al. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. **MBIO**. v.2, n. 3, p. 1-11, 2011.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**. v. 61, p. 529-553, 2007.

YUAN, L. H. et al. Comparison of photodynamic therapy and pulsed dye laser in patients with port wine stain birthmarks: a retrospective analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 5, n. 1, p. 50-57, 2008.

ANEXO A – Equipamentos e Materiais

Todos os equipamentos e materiais utilizados nesta pesquisa encontram-se em perfeitas condições de uso e pertencem ao Laboratório de Pesquisa do Cefores – Centro de Educação Profissional da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) sendo descritos abaixo:

- Autoclave vertical CS – Primatec;
- Aquecedor com termômetro – Diag Tech – DT 3120H;
- Balança analítica Acculab Sartorius Group;
- Cabine de Segurança Biológica - Filterflux – Equipamentos para laboratórios Ltda.;
- Centrífuga – Biofuge – Primo R;
- Cilindro de nitrogênio com válvula específica;
- Dessecador a vácuo;
- Equipamento de aquecimento a seco – Nova Ética Ltda.;
- Espectrofotômetro – UV – 1600 - Angstrom Advanced;
- Estufa Microbiológica – Revco Thermo Electron Corporation;
- Laser Coherent Cube – 660nm;
- Microscópio de Luz - Zeiss – com sistema de captura de imagens;
- Mini-extrusora Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA;
- pHmetro – Geaka;
- Sistema Deonizador – Reverse Osmosis, Water Quality Association;
- Vórtex QL 901 – Biomix.

Os demais materiais não mencionados foram adquiridos no mercado nacional e são de alto grau analítico (PA).

ANEXO B – Meios de cultura, Material microbiológico e Soluções

• Meios de Cultura

Para a realização dos ensaios, foram utilizados os meios de culturas Agar Sabouraud Dextrose – ASD (HiMedia) e Infusão Cérebro e Coração - BHI (Sigma-Aldrich). Seguem abaixo a forma descrita de cada preparação conforme a exigência do fabricante:

❖ Agar Sabouraud Dextrose - (ASD) – HiMedia laboratories, Mumbai, India.

- Suspender 65,0 gramas de pó em 1000 mL de água destilada,
- Aquecer até a ebulição para dissolver completamente o meio,
- Esterilizar em autoclave a 15 £ de pressão (121°) durante 15 minutos.

❖ Infusão Cérebro e Coração – (BHI) – Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO USA.

- Suspender 37,0 gramas de pó em 1000 mL de água destilada,
- Aquecer até a ebulição para dissolver completamente o meio,
- Esterilizar em autoclave a 15 £ de pressão (121°) durante 15 minutos.

• Material Microbiológico

❖ Obtenção da Cepa de *Candida albicans*:

A cepa CEC 1293 de *Candida albicans* foi cedida pelo Prof^o. Dr^o. Christophe d'Enfert do Unité Biologie et Pathogenicité Fongigues do Instituto Pasteur, Paris, França. Encontra-se congelada no meio líquido infusão cérebro coração (BHI) com glicerol 40% v/v até o momento de uso a -20° C.

• Soluções

❖ Solução estoque do Zinco Ftalocianina (ZnPc):

Uma quantidade conhecida de Zinco Ftalocianina (ZnPc) (Sigma-Aldrich Inc., EUA) - (25mM) foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) (10 mL) obtendo-se uma solução estoque na concentração de $3,87 \times 10^{-4}$ mol/L, mantida em temperatura ambiente.

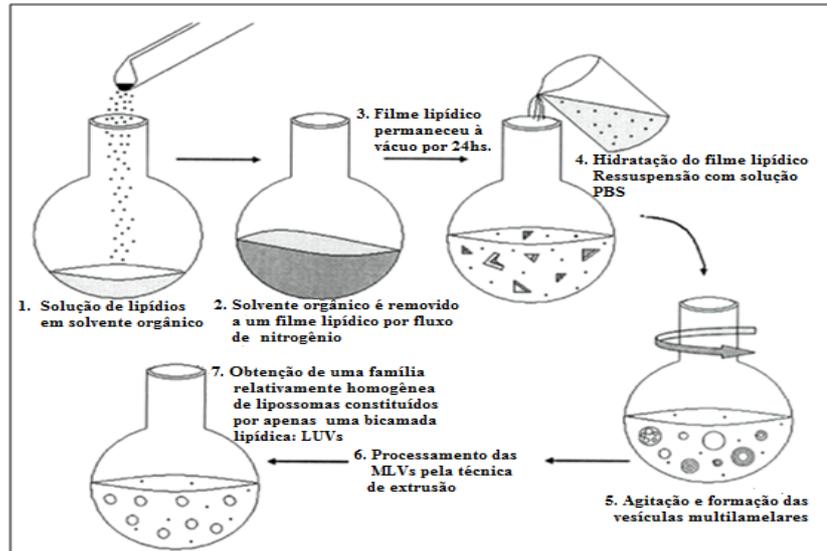
❖ Solução tampão fosfato-salino (PBS):

- 0,24 g de KH_2PO_4 (Fosfato de Potássio Monobásico),
- 1,44 g de Na_2HPO_4 (Fosfato de Sódio Dibásico),
- 8,0 g de NaCl (Cloreto de Sódio) e
- 0,2 g de KCl (Cloreto de Potássio).

Após completa dissolução, o volume final da solução foi de 1000 mL, adicionando-se água destilada. O pH da solução chega a 7,4. Esta solução foi distribuída em recipientes fechados e posteriormente esterilizada em autoclave durante 20 minutos a 120°C . Após o resfriamento à temperatura ambiente os frascos foram armazenados em geladeira a 4°C .

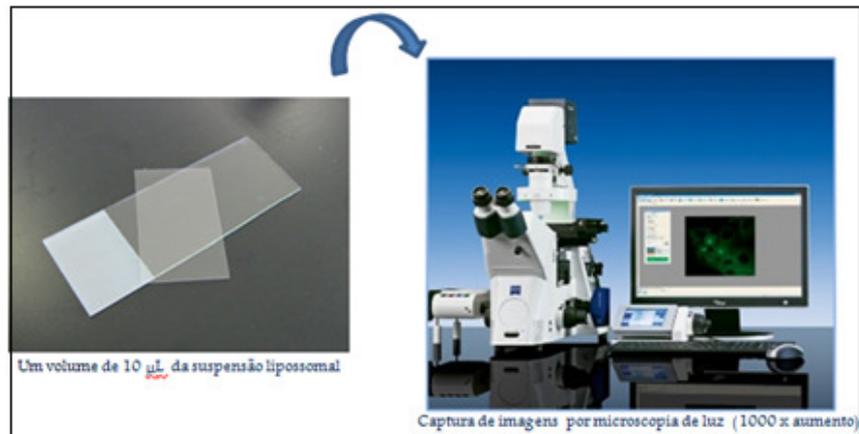
ANEXO C – Roteiro das práticas experimentais

1. Construção dos lipossomas vazios e contendo o zinco ftalocianina



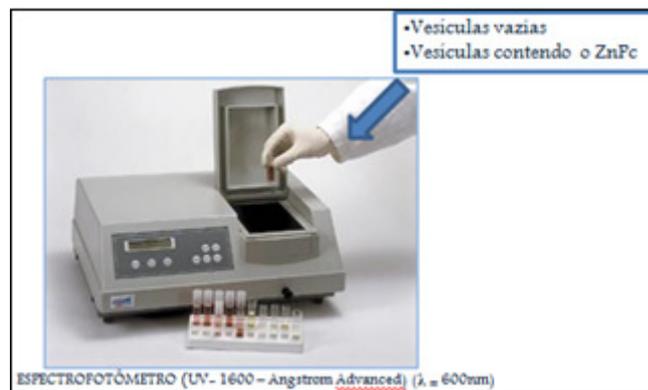
Fonte – Elaborado pelos autores, 2015

2. Caracterização dos lipossomas



Fonte – Elaborado pelos Autores, 2015

3. Estabilidade lipossomal



Fonte – Elaborado pelos Autores, 2015

4. Procedimentos experimentais para avaliar a efetividade da TFD



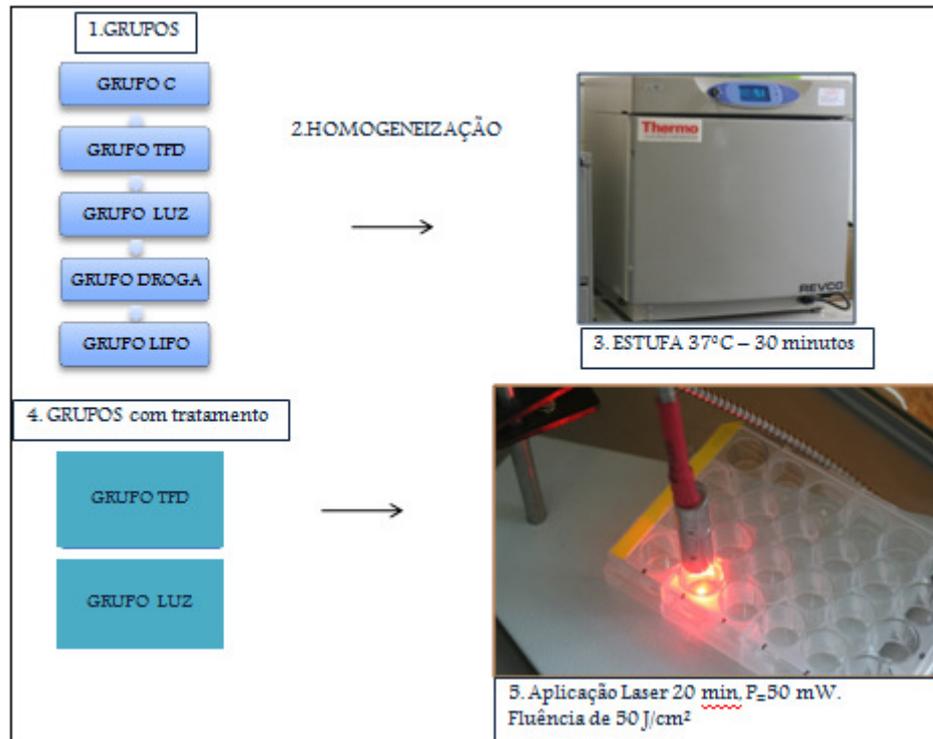
Fonte – Elaborado pelos Autores, 2015

5. Obtenção das células de *C. albicans*



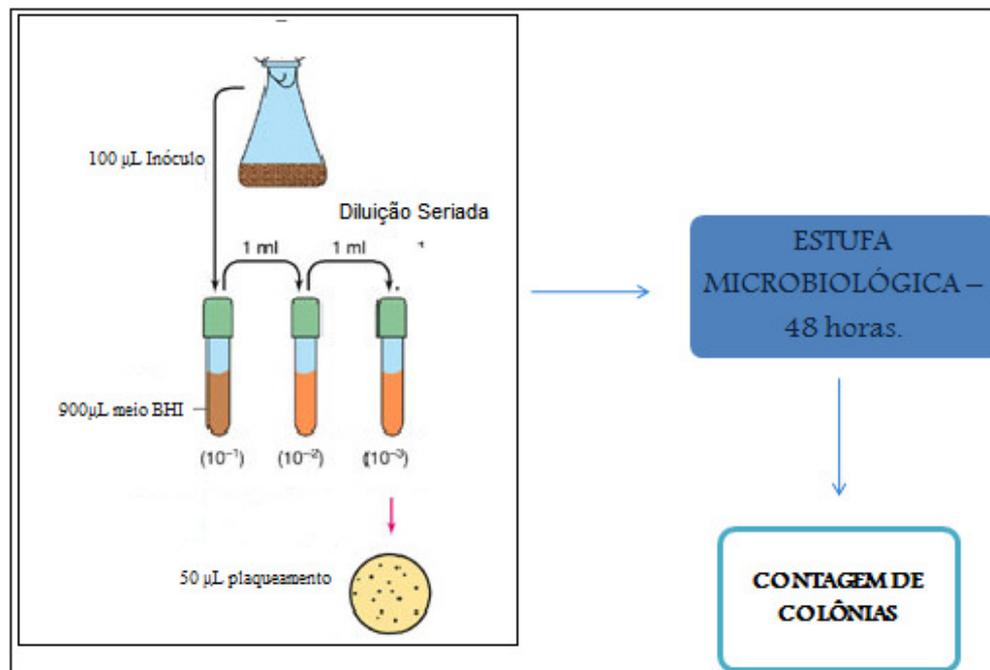
Fonte – Elaborado pelos Autores, 2015

6. Determinação do número das unidades formadoras de colônias UFC's



Fonte – Elaborado pelos Autores, 2015

7. Contagem de colônias



Fonte – Elaborado pelos Autores, 2015

8. Curva de crescimento celular

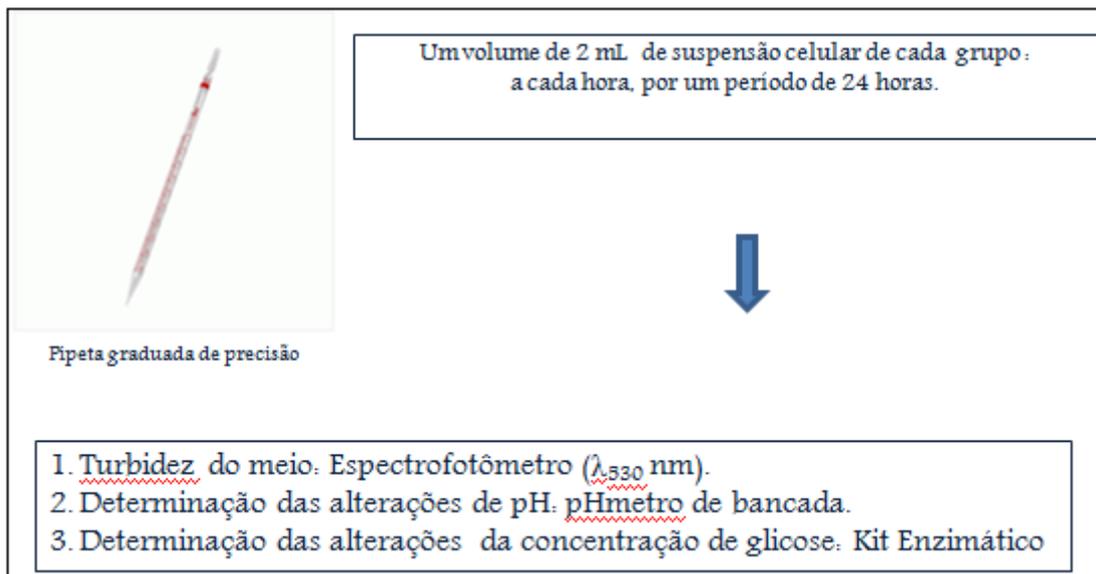
Avaliação do pH do meio de cultivo

Consumo de glicose



Fonte – Elaborado pelos Autores, 2015

9. Procedimentos finais de avaliação da efetividade da terapia



Fonte – Elaborado pelos Autores, 2015

