

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM ODONTOLOGIA

BRUNA HONORIO DE QUEIROGA

**FOTOINATIVAÇÃO DE *Candida albicans* UTILIZANDO AZUL DE METILENO
COMO FOTOSSENSIBILIZADOR**

PATOS-PB

2015

BRUNA HONORIO DE QUEIROGA

**FOTOINATIVAÇÃO DE *Candida albicans* UTILIZANDO AZUL DE METILENO
COMO FOTOSENSIBILIZADOR**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Nilton Lopes de Sousa.

PATOS-PB

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

Q3f

Queiroga, Bruna Honório de

Fotoinativação de *Candida albicans* utilizando azul de metileno como fotossensibilizador / Bruna Honório de Queiroga. – Patos, 2015. 67f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. João Nilton Lopes de Sousa".

Referências.

1. Azul de metileno. 2. *Candida albicans*. 3. Terapia fotodinâmica.
I. Título.

CDU 616.311.2

BRUNA HONORIO DE QUEIROGA

**FOTOINATIVAÇÃO DE *Candida albicans* UTILIZANDO AZUL DE METILENO
COMO FOTOSSENSIBILIZADOR**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Nilton Lopes de Sousa – Orientador

Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

Prof^ª. Dr^ª. Rachel de Queiroz Ferreira Rodrigues – 1º Membro

Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

Prof. Dr. Rodrigo Alves Ribeiro – 2º Membro

Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

Dedico este trabalho ao meu pai José Honorio e a minha mãe Maria Natércia, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui, que sempre se dedicaram e estiveram ao meu lado, me dando apoio, incentivo, amor e carinho, para que conseguíssemos juntos essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar a vida, por sempre me guiar e me sustentar em todos os caminhos, por me dar força e coragem para enfrentar os percalços e por me amparar nos momentos de aflição. Obrigada Senhor, por todas as vitórias e os aprendizados.

Aos meus pais Maria Natércia e José Honorio, por toda a educação que me deram, por todo amor, toda a dedicação e por me darem força para não desistir. Devo a vocês todas as minhas conquistas e tudo o que sou hoje. Obrigada por estarem sempre presentes em todos os momentos, eu amo vocês.

À minha irmã, Joyce, fonte de amor e carinho, obrigada pela sua companhia, dedicação e por todos os conselhos e momentos que vivemos juntas, você é a melhor amiga que eu poderia ter.

À minha Avó querida, Maria Nazarete, que sempre se fez presente na minha vida, por me dar conselhos tão sábios, por tanto amor e carinho.

Ao meu noivo, Airton Júnior, por todo o amor, paciência e companheirismo ao longo desses anos. Obrigada por sempre me compreender em todos os momentos que não pude estar presente, obrigada por me fazer tão bem, você consegue me acalmar e me tranquilizar em qualquer situação, não teria conseguido sem sua força. Te amo!

À minha dupla, Alzira Egina, uma amiga, que além da faculdade, passamos a dividir a mesma morada, que partilhou comigo muitos momentos de alegria e também tristeza, obrigada por toda a paciência e conselhos durante esses anos.

As minhas grandes amigas, Karina Gomes, Bruna de Siqueira, Berthiene Medeiros, Nelmara Sousa e Thamires Simões, por todos os momentos vividos, vocês foram a minha família durante esses anos, que fizeram dos meus dias em Patos menos sofridos, obrigada pelo companheirismo de todas.

Ao meu orientador Prof. Drº. João Nilton, por toda a dedicação, atenção, empenho e paciência na elaboração deste trabalho, por todos os ensinamentos e pela disponibilidade de ajudar sempre. Obrigada por todo o apoio e a confiança em mim.

Ao Prof. Julierme Ferreira, por toda atenção, apoio e incentivo, pelos seus conhecimentos transmitidos e pela dedicação a todos nós alunos.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte desta jornada, muito obrigada pela dedicação e pelo grande desempenho na transmissão dos conhecimentos.

A todos os funcionários da UFCG, em especial, Damião, Neuma, Poliana e Patrícia que sempre foram tão atenciosos e carinhosos, cuidando sempre para que tivéssemos tudo ao nosso alcance.

Agradeço, enfim a todos que de alguma forma me ajudaram a alcançar meu objetivo, e que acreditaram e depositaram sua confiança em mim. Meu muito obrigada!

“Lembra da minha ordem: Seja firme e corajoso! Não tenha medo e não se acovarde, porque Eu, o Senhor, seu Deus está com você aonde quer que você vá.”

Josué 1:9

“Eu sou a videira, e vocês são os ramos. Quem fica unido a mim, e Eu a ele, dará muito fruto, por que sem mim não podeis realizar obra alguma.”

João 15:5

RESUMO

A *Candida albicans* é um grande desafio a saúde pública devido à quantidade de espécies resistentes aos tratamentos convencionais. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da terapia fotodinâmica na inativação de células planctônicas de *Candida albicans* (ATCC10231), empregando azul de metileno, 150 µg/mL, como fotossensibilizador. Alíquotas de 100 µg/mL da suspensão do fungo na concentração de 10⁶ células/mL foram semeadas em placas de microtitulação com 96 poços, onde foi depositado o mesmo volume de azul de metileno, permanecendo em um período de pré-irradiação de 5 min. Em seguida, aplicou-se luz laser de baixa potência (comprimento de onda: 660 nm, potência: 100 mW e dose: 426 J/cm²) por 128s, utilizando um Laser semiconductor portátil (Laser DUO[®], GaAlAs, InGaAlP, MM OPTICS LTDA, São Carlos, SP- Brasil). Experimentos controles foram realizados, sem iluminação e na ausência de azul de metileno, outro na presença de azul de metileno sem iluminação, e com iluminação, substituindo o fotossensibilizador por solução salina. De cada condição experimental, diluições em série (10⁻¹ a 10⁻³) foram obtidas e alíquotas de 25 µL foram plaqueadas em duplicata em Agar Sabouraud Dextrose. Após este período, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi determinado e os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Kruskal Wallis (p <0,05). Na concentração de 150 µg/mL e tempo de 5 minutos de incubação, pode-se constatar que a redução foi significativa (p<0,05), e que na ausência de irradiação, o azul de metileno não produziu redução de UFC/mL. Conclui-se que a Terapia Fotodinâmica apresentou efeito antifúngico contra *Candida albicans*, podendo ser utilizada como coadjuvante ao tratamento convencional.

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

ABSTRACT

Introduction: *Candida albicans* is a major challenge to public health because of to the amount of resistant species. **Objective:** To evaluate the effect of photodynamic therapy in the inactivation of *Candida albicans* planktonic cells (ATCC10231), using methylene blue, 150 mg / mL, as a photosensitizer. **Method:** Aliquots of 100 ug / ml of the fungal suspension in a 10^6 cells / ml concentration were seeded in microtiter plates with 96 wells, which was deposited with the same volume of methylene blue, remained at a 5 min pre-irradiation. Then, it was applied low power laser light (wavelength: 660 nm, power: 100 mW and dose: 426 J / cm²) for 128s using a portable semiconductor laser (Laser DUO®, GaAlAs, InGaAlP, MM OPTICS LTDA, São Carlos, SP Brazil). Control experiments were performed without illumination, in the absence and presence of methylene blue and with illumination replacing the photosensitizer by saline. In each experimental condition, serial dilutions (10⁻¹ to 10⁻³) were obtained and 25 uL aliquots were seeded in Sabouraud Dextrose Agar duplicate . After this period, the number of colony forming units per milliliter (CFU / mL) was determined and the data were submitted to variance analysis and Kruskal Wallis test (p <0.05). **Results:** At the concentration of 150 ug / ml, and time of 5 min incubation, the reduction was significant (P0.05) in the absence of irradiation, methylene blue produced no reduction in CFU / mL. **Conclusion:** Photodynamic Therapy presented antifungal effect against *Candida albicans* and can be used as an adjunct to conventional treatment.

Keywords: *Candida albicans*; Photodynamic therapy; Methylene blue.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comparação da média e desvio padrão do \log_{10} UFC/ml entre os grupos no tempo de pré- irradiação de 5 min.	58
TABELA 2 – Comparação da média e desvio padrão do \log_{10} UFC/ml para os grupos controle no tempo de incubação de 5 min.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AM	Azul de metileno
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
CCT	Coleção de culturas tropicais
FS	Fotossensibilizador
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LASER	Light Amplification by Stimulated of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LED	Light Emitting Diode (diodo emissor de luz)
PDT	Terapia Fotodinâmica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TBO	Azul de toluidina
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetro
Min	Minutos
%	Por cento
mL	Mililitro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
mW/cm^2	Miliwatts por centímetro quadrado
J/cm^2	Joules por centímetro quadrado
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^1\text{S}^*$	Fotossensibilizador no estado singleto
^0S	Fotossensibilizador no estado fundamental
$^3\text{S}^*$	Fotossensibilizador no estado tripleto
O_2	Oxigênio molecular
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
OH^-	Íon hidroxila
Kcal	Quilocaloria
s	Segundos
Cm	Centímetro
J	Joule
mW	Miliwatts
mg/mL	Miligrama por mililitro
$^\circ\text{C}$	Grau Celsius

h	Hora
W	Watts
®	Marca registrada
InGaAlP	Índio Gálio Alumínio Fósforo
μM	Micromolar
μL	Microlitros
L	Litro
NaCl	Cloreto de sódio
GaAlAs	Arceneto de gálio e alumínio
Cm^2	Centímetro quadrado
Log	Logaritmo
$^3\Delta_g^-$	Estado tripleto
$^1\Delta_g^-$	Estado singlete
g	Grama (peso)
mm	Milímetros
μg	Micrograma
\cong	Aproximadamente
<	Menor que
>	Maior que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)	16
2.2 PAPEL DOS AGENTES FOTOSSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA	18
2.3 ETIOLOGIA E ETIOPATOGENIA DA CANDIDÍASE	24
2.4 INATIVAÇÃO DE <i>Candida albicans</i> POR TERAPIA FOTODINÂMICA	27
REFERÊNCIAS	36
3 ARTIGO	40
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	60

1 INTRODUÇÃO

Fungos oportunistas podem provocar infecções superficiais ou invasivas graves, em pacientes aparentemente saudáveis e especialmente em pacientes debilitados ou imunocomprometidos. Devido a dificuldades no diagnóstico e a disponibilidade limitada de drogas antifúngicas eficazes, representam uma ameaça crescente para a saúde humana, podendo resultar em alta mortalidade atribuível (DAI, et al., 2011).

A *Candida albicans* é um fungo oportunista, que para o desenvolvimento da infecção necessita de alguns fatores predisponentes sistêmicos e locais, que segundo Naglik et al. (2008) são, por exemplo, os agentes imunossupressores, antibióticos, estrogênios, xerostomia, uso de prótese e higiene bucal deficiente. Em pacientes imunodeprimidos, como os indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a candidose bucal é a manifestação fúngica mais comum constituindo um indicador da progressão da infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Segundo Lam et al. (2011) as infecções causadas por fungos, como por *Candida*, representam um sério desafio à saúde pública, com elevada importância socioeconômica principalmente devido às espécies resistentes aos antifúngicos tradicionais, tais como os azóis e polienos (por exemplo, fluconazol e anfotericina B, respectivamente). Sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas científicas que busquem ampliar as formas de tratamento das lesões de *Candida*, possibilitando um tratamento alternativo efetivo dos casos de insucesso e melhorando o bem estar dos pacientes acometidos por esta doença.

A Terapia Fotodinâmica (PDT), segundo Kato et al. (2013), é um tratamento já utilizado em várias outras especialidades como a dermatologia, oncologia e oftalmologia e está sendo investigado como terapia antimicrobiana. É uma terapia a base de luz, que consiste na administração de um corante ou um fármaco não tóxico, definido como agente fotossensibilizante (FS), que pode ser aplicado sistemicamente, localmente ou por via tópica, seguida de iluminação da lesão, com luz visível (geralmente com longo comprimento de onda de luz vermelha), a qual, na presença de oxigênio, leva à formação de espécies citotóxicas, tais como o oxigênio singleto e de radicais livres. Essas espécies químicas reativas são em sua maioria tóxicas e podem causar: destruição de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros

componentes celulares, resultando na destruição das células microbianas (KONOPKA; GOLINSKI, 2007).

No tratamento de candidíase, a terapia fotodinâmica, utilizando azul de metileno (AM) como fotossensibilizador (FS), apresenta algumas vantagens em relação à terapia medicamentosa tradicional, tais como: os mecanismos de ação são diferentes das drogas antifúngicas, o que atenua os casos de desenvolvimento de resistência ao medicamento, e o custo, pois diferentemente da terapia antifúngica convencional, possui valor mais acessível. Podendo ser uma alternativa terapêutica eficaz contra cepas já resistente de *C. albicans* (TEICHERT, et al., 2002).

Devido o fato do uso dos medicamentos antifúngicos terem apenas uma melhora transitória, com um grande número de recidivas, apresentando efeitos colaterais em alguns pacientes, e por ter um número reduzido de drogas no mercado e ainda desenvolverem resistência microbiana, tornou-se de grande importância a pesquisa de tratamentos alternativos eficazes contra as doenças fúngicas. Os estudos já mostram que o emprego de azul de metileno como fotossensibilizador se mostra eficaz na inativação da *Candida albicans* e que a utilização da terapia fotodinâmica tem se apresentado como uma alternativa satisfatória para o tratamento antifúngico, no entanto ainda há necessidade de que seja estabelecido um protocolo adequado quando ao tempo de pré-irradiação ou de incubação, necessitando que alguns aspectos ainda sejam esclarecidos para que seja recomendado para terapia clínica, como a concentração de azul de metileno que apresente melhor custo-benefício com relação à inativação da *Candida albicans*, sem apresentar efeitos tóxicos para as células do organismo.

Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, os efeitos da fotossensibilização em *Candida albicans* com radiação laser, utilizando o azul de metileno como fotossensibilizador.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

A aplicação da luz com função antimicrobiana foi descoberta há mais de 100 anos devido à capacidade de alguns corantes eliminarem vários microrganismos quando ativados pela luz na presença de oxigênio. No entanto, apenas no passado relativamente recente, a PDT tem sido estudada com a finalidade de tratar diversas infecções. Este interesse crescente, em parte, é motivado pelo aumento exagerado de resistência a drogas antimicrobianas entre as bactérias e outros patógenos (KHARKWAL et al., 2011).

A sua aplicação no campo das doenças infecciosas sofreu um grande revés com a descoberta dos antibióticos na década de 1940. Esta descoberta revolucionou o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias patogênicas e, no devido curso, surgiram e tornaram-se disponíveis os antifúngicos, antiprotozoários, anti-helmíntico e os compostos antimalária. Assim, apesar de 100 anos de descobrimento, o avanço da PDT antimicrobiana tem sido bastante lenta. Mas com o recente aumento da resistência aos antibióticos em todo o mundo, tem havido um interesse renovado por terapias antimicrobianas alternativas (KHARKWAL et al., 2011).

O tratamento antimicrobiano por meio de luz e corante foi descrito pela primeira vez, em 1890, por Oscar Raab quando observou a toxicidade do alaranjado de acridina, que é dependente de luz, contra *Paramecium caudatum* (RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010). No entanto, apenas recentemente, com o início da busca por tratamentos alternativos contra agentes patogênicos resistentes aos antibióticos, a PDT tem sido investigada mais profundamente (DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008). Na Odontologia, o LASER (Light Amplification by Stimulated of Radiation ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) tem sido empregado em diversas situações clínicas, como em antisepsia de feridas, em preparos cavitários, na redução de populações bacterianas de canais radiculares e em bolsas periodontais (CADASTRO et al., 2008).

No contexto das aplicações clínicas da PDT no combate as infecções, Kharkwal et al. (2011) realizaram uma busca na literatura dos artigos publicados sobre este tema, compreendendo o período entre os anos de 1960 e 2011. Ao finalizar a leitura de todas as fontes de informação científica, Kharkwal et al. observaram que, no campo do controle e

tratamento de infecções, a PDT tem uma vasta aplicação clínica. Entre as indicações podem ser citadas as aplicações clínicas com o seu efeito antimicrobiano para infecções virais localizadas, tais como: as provocadas pelo herpes simples e papiloma vírus, e infecções dermatológicas não virais, como as causadas por acne e outras leveduras, fungos e infecções bacterianas da pele. A PDT também tem sido utilizada para o tratamento de infecções bacterianas em abscessos cerebrais e úlceras que não cicatrizam, para o tratamento da leishmaniose cutânea e infecções gástricas causadas por *Helicobacter pylori*. Na Odontologia, tem sido estudado como coadjuvante no tratamento de várias infecções dentárias, incluindo a periodontite e infecções endodônticas. Com estes disponíveis na literatura, é possível avaliar a terapia fotodinâmica como uma aliada promissora no tratamento de infecções nas áreas odontológicas e médicas, apesar da maioria dos estudos mostrarem resultados promissores *in vitro* e de ainda existir uma carência de protocolos e estudos clínicos controlados.

A PDT também tem sido utilizada para tratar a periodontite, como uma das alternativas para eliminar espécies bacterianas subgingivais resistentes à terapia antimicrobiana convencional. A capacidade da PDT de reduzir o número de bactérias no biofilme e na forma planctônica foi testada por Fontana et al. (2009). Coletaram amostras de biofilme dental de dez indivíduos com periodontite crônica com curetas Gracey. Em seguida, suspensões (10^9 células/mL) de microrganismos do biofilme de cinco sujeitos foram sensibilizadas com azul de metileno (25 $\mu\text{g/mL}$) durante 5 min, em seguida, expostos a luz vermelha de laser de argônio, com densidade de potência de 100 mW/cm^2 e fluência de energia de 30 J/cm^2 . Em seguida, cada amostra (indivíduos 1-5) foi dividida em duas partes. A primeira parte, em suspensão, foi exposta a PDT e a segunda parte foi utilizada para o desenvolvimento de biofilme e, em seguida, também exposta a PDT com AM na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$. A PDT eliminou aproximadamente 63% das bactérias presentes na suspensão. Entretanto, nos biofilmes, a PDT foi menos eficiente, com uma de inibição de apenas 32% das bactérias no biofilme. As bactérias presentes nos biofilmes orais foram menos susceptíveis a PDT quando comparadas a bactérias na sua forma planctônica.

Como a cavidade bucal é particularmente acessível e adequada à iluminação, a PDT também tem representado uma nova abordagem terapêutica no controle de biofilmes orais. Nesta linha de pesquisa, os estudos estão voltados para desenvolvimento ou descoberta de fotossensibilizantes mais seletivos (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). A utilização de FS e doses de luz adequadas podem erradicar a praticamente todos os microrganismos na região. No entanto, na cavidade bucal, onde existe um equilíbrio com microflora nativa, isto é um

problema em potencial, pois pode conduzir à proliferação de organismos oportunistas. Este inconveniente pode ser superado utilizando um FS ligado a um anticorpo que reconhece apenas os organismos alvo (KOMERIK; MACROBERT, 2006). Com o desenvolvimento de novos FSs mais seletivos e da fibra óptica, para melhorar o acesso da entrega de energia de excitação, o tratamento de infecções causadas por fungos, por meio da terapia fotodinâmica, pode tornar-se uma nova abordagem terapêutica (BLISS et al., 2004).

2.2 PAPEL DOS AGENTES FOTOSSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Os fotossensibilizadores são geralmente compostos macrocíclicos que exibem nenhuma ou mínima toxicidade inerente, mas resultam na geração de moléculas reativas de oxigênio citotóxico quando ocorre excitação com luz de comprimento de onda adequado (PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012). Para se fazer uma escolha racional entre os milhares de FSs e fontes de luz disponíveis, é necessário entender um pouco dos aspectos mecânicos de como o FS se comporta com a iluminação e o que acontece quando é colocado em contato com células de mamíferos em cultura de tecidos. A forma exata como a PDT influencia nas vias celulares, é fortemente regulada pela localização do FS na célula, que depende de sua natureza química, tais como: peso molecular, lipofilicidade, anfifilicidade, carga iônica e características de ligação às proteínas; a concentração do FS, o tempo de incubação, a concentração de soro e o fenótipo da célula alvo (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Através da Microscopia confocal, Lam et al. (2011) observou que os FSs podem localizar-se nas mitocôndrias, bem como em outras membranas intracelulares.

O efeito fotodinâmico da substância fotossensível específica é atribuído à sua capacidade de penetrar nos microrganismos susceptíveis, para absorver a luz de determinado comprimento de onda, e para gerar produtos reativos de oxigênio citotóxico (RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010). Os FS absorvem energia diretamente de uma fonte de luz e pode, em seguida, transferir esta energia para a molécula de oxigênio para criar uma forma ativada de oxigênio, chamado de oxigênio singleto (1O_2). O 1O_2 é extremamente electrófilo e pode oxidar diretamente ligações saturadas nas moléculas e macromoléculas biológicas, sendo o principal agente citotóxico relacionado com a PDT (OCHSNER, 1997).

Quando estes FSs são irradiados com luz ultravioleta ou visível em determinados comprimentos de onda, absorvem energia e passam a um estado excitado singleto ($^1S^*$). Este estado $^1S^*$ pode decair para o estado fundamental (0S) com emissão de fluorescência, ou

cruzar para um estado tripleto excitado ($^3S^*$) por inversão espontânea do spin do elétron excitado. Uma vez formado, esta espécie de $^3S^*$ pode participar em várias reações: pode decair ao estado 0S com emissão de fosforescência, ou reagir por mecanismos fotoquímicos do tipo I ou II. Na reação do tipo I, o $^3S^*$ pode reagir com um substrato orgânico ou uma segunda molécula fotossensibilizadora, por transferência de elétrons ou hidrogênio. No tipo II, o fotossensibilizador $^3S^*$ pode transferir energia para o oxigênio molecular, gerando 0S e 1O_2 . Estes processos podem ocorrer simultaneamente e a importância de cada um depende da molécula alvo, da eficiência da transferência de energia do sensibilizador para o O_2 , do solvente e da concentração de O_2 (RONSEIN et al., 2006; DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008; LYON et al., 2011).

Geração de moléculas reativas de oxigênio (ROS) pode seguir dois caminhos alternativos após ativação da luz por um dado FS. Após a absorção de um fóton, o FS sai do estado fundamental e um estado animado do FS é formado. O estado animado é de curta duração e pode ser submetido a cruzamento intersistema para o estado tripleto de vida longa, ou, alternativamente, pode voltar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou de calor, ou ambos. Geralmente, o estado tripleto atua como um mediador das reações Tipo I e Tipo II no processo de fotossensibilização. Tipo I: Geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^\cdot) e ânion superóxido ($O_2^\cdot^-$) pela transferência de carga do FS no estado animado. Tipo II: O estado tripleto do FS pode sofrer diretamente a troca de energia com o oxigênio no estado fundamental, conduzindo à formação de oxigênio singleto, 1O_2 . O ROS gerado reage rapidamente com o seu ambiente dependendo da localização do FS: paredes de microrganismos, membranas lipídicas, peptídeos, e ácidos nucléicos.

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais p de mesma energia, chamados de degenerados, caracterizando, portanto, um estado tripleto ($^3\Delta_g^-$). Conseqüentemente, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin. Uma forma mais reativa de oxigênio, conhecida como oxigênio singleto, pode ser gerada por um acréscimo de energia. Nela, a restrição da regra de conservação do spin é removida. Sendo assim, o oxigênio singleto é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental. Existem dois estados singleto do oxigênio: o primeiro estado excitado, $^1\Delta_g$, tem dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, possui uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental e tempo de meia vida em solvente aquoso de aproximadamente 10^{-6} s; o segundo estado excitado, $^1\Delta_g^-$, tem um elétron em cada orbital degenerado, com spins opostos, e possui

uma energia de 37,5 kcal acima do estado fundamental. O estado $^1\Delta_g^-$ tem um tempo de vida muito curto (10^{-11} s) em meio aquoso, sendo rapidamente desativado para o estado $^1\Delta_g$. Portanto, apenas o primeiro estado apresenta interesse em sistemas biológicos e será denotado por 1O_2 (RONSEIN et al., 2006).

Os FS têm estruturas moleculares que são tipificadas por ligações duplas conjugadas que contêm um sistema deslocalizado de π -elétrons. No estado neutro (singleto), estes elétrons são emparelhados em orbitais de spin de baixa energia. Após a aplicação da luz correspondente ao pico de absorção do FS, o elétron que ocupa o orbital molecular de maior energia do FS fica animado e salta para o orbital molecular desocupado, excitando o FS a um estado singleto animado, instável e de vida curta. O mais importante para o processo da PDT é a inversão do spin do elétron animado, conhecido como cruzamento intersistema para originar o estado tripleto do FS. Este estado tripleto é menos enérgico do que o estado singleto animado, mas tem uma vida útil muito mais longa (microsegundos). O elétron animado, agora com um spin paralelo, ao contrário da sua antiga forma (elétron emparelhado), pode não reverter imediatamente para um nível mais baixo de energia, de acordo com o Princípio de Exclusão de Pauli. Assim, o elétron animado no estado tripleto do FS pode mudar sua orientação de spin (um processo relativamente lento) e emitir sua energia como fosforescência, ou, alternativamente, o FS pode interagir imediatamente com moléculas em seu ambiente, tais como o oxigênio molecular (DAI et al., 2012).

O FS, por si só, não tem ou apresenta um insignificante efeito antimicrobiano. No entanto, após a irradiação com luz visível de comprimento de onda apropriado, a substância em estado de repouso inicial torna-se instável. Durante este processo, fótons (energia) são absorvidos pelo FS. Produtos citotóxicos altamente reativos podem ser produzidos quando houver a presença de oxigênio. O resultado da reação do FS com o oxigênio molecular é a produção de radicais Hidroxila (OH^\cdot) e superóxidos, radicais de oxigênio ou oxigênio singleto (1O_2). O oxigênio molecular no estado primário contém 6 elétrons na última camada de energia, sendo dois desemparelhados. A transferência de energia pelo FS promove a inversão do spin de um dos elétrons da molécula de oxigênio transformando-a do estado tripleto para singleto. O oxigênio Singleto tem um período de meia vida muito curto (nanossegundos) e sua difusão limita-se a uma distância de até 100 nm. Por isso, sua atividade citotóxica é confinada somente ao local onde é produzido. Em consequência disto, para que fotoativação tenha sucesso, é necessário um período de pré-irradiação, após a aplicação, para que o FS possa acumular-se na célula-alvo (RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010).

Em laboratório, o $^1\text{O}_2$ é frequentemente gerado por reações de fotossensibilização. Nestas reações, são utilizadas moléculas conhecidas como Fotossensibilizadores, tais como: derivados de fenotiazinas (azul de toluidina e azul de metileno); porfirinas (hematoporfirina, ácido delta-aminolevulínica), xantinas (rosa bengala), clorinas (de clorina (e6)); ftalocianinas (disulphonated ftalocianina de alumínio, ftalocianinas catiónicas de zinco, disulphonated ftalocianina de zinco) (RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010). O tetrapirrol, como porfirina, *clorinas* e *bacterioclorinas*, é uma classe de FS que apresenta características promissoras para ser utilizada na terapia fotodinâmica antimicrobiana (HUANG et al., 2010).

Para que a PDT seja realizada com sucesso, *in vivo*, é necessário assegurar que uma quantidade suficiente de luz atinja todo o tecido doente. Isto envolve a compreensão de como a luz se propaga dentro dos tecidos e dos efeitos relativos à absorção e dispersão da luz. O fato de a maioria dos FSs serem tanto fluorescentes, quanto fotoquimicamente ativo, permite que várias estratégias e protocolos possam ser combinados na terapia fotodinâmica. O fator mais importante que regula os resultados da PDT é forma como o FS interage com as células no tecido ou lesão alvo, e o aspecto chave desta interação está relacionado à localização intracelular do FS. Existem exemplos de FSs que se localizam nas mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e membranas plasmáticas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Para a que as substâncias fotossensíveis possam ser ativadas é necessário que sejam expostas a luz visível com um determinado comprimento de onda. A maioria destas substâncias é ativada pela luz entre 630-700 nm. Isto corresponde ao feixe de luz que penetra no tecido em até 0,5-1,5 cm, e, ao mesmo tempo, representa o limite para efeito terapêutico da PDT (RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010).

Vários estudos mostraram a utilização de FSs e luz visível para destruir fungos. No entanto, as propriedades físico-químicas necessárias para tornar mais efetiva à terapia fotodinâmica têm sido pouco estudadas (DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008). Segundo Castano; Demidova; Hamblin, (2004), as características ideais dos FSs são:

- Devem ter baixos níveis de toxicidade para os seres humanos e animais experimentais no escuro e baixa incidência de toxicidade de funcionamento durante a irradiação;
- Devem absorver a luz em comprimentos de onda no vermelho ou entre a luz vermelha e infra-vermelha, que tem a finalidade de penetrar nos tecidos;

- Eles devem ter faixas de absorção relativamente elevadas ($> 20.000\text{-}30.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para minimizar a dose do FS necessária para alcançar o efeito desejado. A síntese do FS deve ser relativamente fácil e a matéria-prima disponível para sua produção deve ser viável em larga escala.
- Devem ser um composto puro com uma composição constante, prazo de validade estável e ser solúvel em água ou em uma mistura de solventes aquosos inofensivos.
- Não devem agregar indevidamente em ambientes biológicos, pois isso reduz sua eficiência fotoquímica.
- A eliminação farmacocinética do paciente deve ser rápida, ou seja, deve ser menor que um dia para que não seja necessária a proteção pós-tratamento à exposição prolongada da luz com a pele.
- Deve apresentar um intervalo de tempo curto entre a aplicação e a eliminação para facilitar o tratamento ambulatorial que é mais agradável para o paciente e de baixo custo.
- Não trazer dor ao paciente, já que a terapia fotodinâmica, normalmente, não requer anestesia ou sedação profunda.

Em uma revisão da literatura, que revisou os artigos publicados durante 51 anos (1960-2011), sobre as aplicações clínicas da PDT no combate as infecções, Kharkwal et al. (2011) verificaram que vários corantes mostraram-se ser muito eficazes *in vitro* e *in vivo* em modelos de infecção em animais, mas a maioria destes FSs ainda está sendo testada em ensaios clínicos. Os FS que têm sido utilizados em estudos clínicos são restritos, entre eles podem ser citados os corantes Phenothiazinium (azul de metileno, azul de toluidina, e PP904 phenothiazinium); as porfirinas, incluindo ALA-PPIX e derivados de hematoporfirina; vermelho neutro e polyethylenimine clorina conjugado (e6).

Para que uma molécula possa atuar como um eficiente FS, deve possuir a capacidade de absorver a luz visível, passando para um estado excitado e transferindo esta energia para o oxigênio molecular. Moléculas que possuem tais características são tipicamente estruturas planares rígidas possuindo um alto grau de conjugação. Os FSs mais empregados na PDT incluem as phenothiazinium, porphyrin e phthalocyanine que apresentam estruturas planas, simples e tricíclicas, tipicamente de natureza catiônica. Os compostos mais amplamente usados são o azul de metileno e azul de toluidina (AT). Ambos são eficientes na produção de oxigênio singleto e apresentam absorção máxima de luz com comprimento de onda de 656 nm, para AM, e 625, para TBO (DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008).

Desde que foi sintetizado pela primeira vez em 1876, o azul de metileno (AM) tem sido utilizado em diferentes áreas da medicina clínica, que vão desde a quimioterapia do cancro à desinfecção do sangue. Além disso, o AM formou a base da quimioterapia antimicrobiana, em particular na zona dos antimaláricos. Mais recentemente, o potencial efeito fotossensibilizante do AM e de seus congêneres foi reconhecido, fazendo com que fossem aplicados em associação com a luz com intuito de produzir efeito antimicrobiano, especialmente na desinfecção do sangue. A vasta utilização do AM, como agente FS, está relacionada à combinação da sua estrutura química simples com facilidade de produzir reações de oxidação-redução *in situ* (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002).

O AM tem uma forte absorção da luz em comprimentos de onda maiores do que 620 nm, em que a penetração de luz no tecido é a ideal. Características como baixa toxicidade, forte potencial antimicrobiano fotoativo e utilização e aceitação no campo da Medicina, faz do AM um FS ideal para ser utilizado na terapia fotodinâmica contra fungos (TEICHERT et al., 2002).

O AM é uma molécula, de baixa toxicidade e efeitos colaterais reduzidos, que tem sido utilizada com diferentes finalidades na microbiologia e farmacologia há bastante tempo. Entre suas indicações tradicionais, pode-se utilizar para corar organismos vivos e para tratar a metemoglobinemia, doença caracterizada pela quantidade anormal no sangue de metemoglobina, que é a forma oxidada da hemoglobina. Ultimamente, tem sido utilizada na PDT como droga fotossensibilizante em associação com uma fonte de luz contínua. Suas principais indicações incluem o tratamento de carcinoma de células basais, sarcoma de Kaposi, melanoma, infecções virais e fungicas. Tem características interessantes que conferem a esta molécula um grande potencial de aplicação em PDT. Ele absorve luz intensa na janela terapêutica e desencadeia os mecanismos tipo I e tipo II, que danifica biomoléculas e induz a morte em vários locais nas células alvo, tecidos e organismos. Portanto, como a irradiação, pode ser utilizada para tratar uma variedade de doenças cancerosas e não cancerosas (TARDIVO et al., 2005).

A eficácia da seletividade do FS para os microrganismos, mas não para os tecidos, também é uma preocupação importante para evitar efeitos tóxicos e danos aos tecidos do hospedeiro na área da infecção. Com relação aos FSs, existem vários fatores que ainda precisam ser bem definidos, incluindo as propriedades físico-químicas dos mesmos, a dose de aplicação, a taxa de absorção da droga, a sua estabilidade e facilidade de aplicação e remoção

após o uso. O efeito da PDT sobre o sistema imune do hospedeiro é caminho que requer muitas investigações científicas e pode ser um elo para o tratamento de infecções sistêmicas com esta modalidade de tratamento. Outro aspecto importante que necessita ser estudado é a capacidade da PDT em destruir fatores de virulência segregados, como lipopolissacarídeos e outras proteínas que podem ser altamente vulneráveis a oxidação por radicais reativos de oxigênio gerados durante a PDT (KHARKWAL et al., 2011).

2.3 ETIOLOGIA E ETIOPATOGENIA DA CANDIDÍASE

A PDT antifúngica é uma área de crescente interesse. As pesquisas avançam no sentido de identificar os mecanismos fotoquímicos e fotofísicos envolvidos na fotoinativação; de desenvolver fotossensibilizantes potentes e clinicamente compatíveis; de entender como a fotoinativação é afetada por elementos-chaves microbianos como fenotípicos resistentes, sistemas de efluxo multidroga, formação de biofilmes, virulência e determinantes patogênicos; de explorar novas plataformas de distribuição de FS e de identificar aplicações da fotoinativação além do ambiente clínico, tais como desinfetantes ambientais (DAI et al., 2012; VERA et al., 2012). Em muitos casos, os resultados são promissores, mas ainda preliminares, necessitando de uma investigação mais aprofundada (VERA et al., 2012).

Candida albicans é o principal tipo de fungo capaz de causar infecções superficiais da pele e mucosas, bem como infecções profundas, especialmente em pacientes imunocomprometidos (PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012). A baixa contagem de linfócitos T CD₄⁺ (menor que 200 células/mL) tem sido tradicionalmente citada como o maior fator de risco para o desenvolvimento de candidíase orofaríngea. O surgimento gradativo de outras espécies, além da *Candida albicans*, causa preocupação, principalmente aquelas resistentes a azólicos e outros agentes antifúngicos (ANWAR; MALIK; SUBHAN, 2012).

A candidíase, cuja etiologia está relacionada à *Candida ssp.*, que colonizam geralmente as superfícies epiteliais do corpo, é muito mais prevalente em indivíduos imunocomprometidos, como portadores de câncer, HIV/AIDS, diabetes, lactentes prematuros e pacientes internados em UTI, em comparação com os pacientes saudáveis (CHABRIER-ROSELLÓ et al., 2010). Embora a PDT tenha sido desenvolvida principalmente para combater as lesões cancerosas, esta terapia pode ser empregada para o tratamento de várias condições, incluindo doenças infecciosas. Um grande número de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, protozoários e fungos, apresenta

susceptibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana, fazendo desta modalidade de tratamento uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas (RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010).

Candida albicans é a espécie de levedura patogênica mais comum, representando cerca de 60% de todas as leveduras isoladas em amostras clínicas (PRATES et al., 2011). Como exemplo dessa escassez de drogas antifúngicas pode-se citar o caso da anfotericina B. Esta droga, que foi descoberta em 1950, ainda tem sido o medicamento de escolha para pacientes imunocomprometidos afetados por infecções fúngicas. O fluconazol, introduzida em 1988, tem sido amplamente utilizado para o tratamento de infecções causadas por leveduras; no entanto, a resistência a este fármaco pode limitar o seu uso no futuro (PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012).

Em 2012, Anwar; Malik; Subhan realizaram estudo prospectivo durante um período de 2 anos (2010-2011) para verificar a presença de infecção por *Candida* em pacientes acometidos por AIDS. Após os exames clínicos completos, foram coletadas amostras para verificar a presença de *Candida*. As espécies foram isoladas e testes de sensibilidade antifúngica foram realizados. As contagens de células CD4⁺ de todos os pacientes foram correlacionadas com a presença (ou ausência) de candidíase. De um total 165 pacientes com HIV positivo examinados, 80 (48,8 %) dos pacientes tiveram diagnóstico definitivo de candidíase. *Candida albicans* foi a espécie mais comum de levedura isolada. Os pacientes com candidíase tinham contagem de CD4 inferior a 200 células/mm³. A resistência máxima foi observada com fluconazol, enquanto nenhuma resistência foi vista com voriconazol.

A alta prevalência de resistência a drogas requer o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos contra infecções causadas por fungos patogênicos oportunistas, tais como *Candida albicans* (DOVIGO et al., 2011; LAM et al., 2011). O uso descontrolado de antifúngicos azólicos, como fluconazol, itraconazol, cetoconazol e voriconazol, para o tratamento de infecções de mucosa e sistêmica de *Candida ssp.* pode resultar na seleção e/ou aparecimento de cepas resistentes. Apesar da natureza multifatorial da resistência à azólicos, acredita-se que pode está relacionada alterações nos genes do fungo, que codificam a enzima alvo do azol e o papel da regulação positiva de bombas de efluxo (SANGUINETTI, 2005). Várias abordagens têm sido propostas para superar a resistência antifúngica mediada por efluxo da droga, tais como: utilização de antifúngico alternativo que não apresente substrato para bomba de efluxo (como equinocandinas, uma nova classe de antifúngico); bloqueio do

fornecimento de energia ao fungo e inibição farmacológica direta das bombas de efluxo (PRATES et al., 2011).

Há uma necessidade urgente de buscar e implantar novas e eficazes medidas antifúngicas alternativas. A PDT foi estabelecida como uma modalidade de sucesso no tratamento das patologias citadas acima, mas a inativação fotodinâmica só recentemente foi intensamente investigada como uma descoberta antimicrobiana alternativa (DAI et al., 2012). O conceito de inativação fotodinâmica requer exposição de células à energia da luz, normalmente com comprimentos de onda na região visível que faz com que haja excitação de moléculas de FS, exógenas ou endógenas, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os ROS produzem inativação e morte celular através da modificação de componentes intracelulares. As características versáteis da PDT levaram a sua investigação como uma descoberta para o tratamento anti-infeccioso (VERA et al., 2012).

O desenvolvimento de candidíase depende do sistema de defesa do hospedeiro e é considerado um preditor, independente de imunodeficiência, em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (MANG; MIKULSKI; SALA, 2010). Também pode estar associada a dispositivos médicos de longa permanência (por exemplo, implantes dentários, cateteres, válvulas cardíacas, enxertos vasculares, lentes oculares, articulações artificiais e derivações do sistema nervoso central), que podem atuar como substratos para o crescimento do biofilme (LAM, et al., 2011).

A parede celular fúngica é constituída por uma camada espessa de betaglucano e quitina e também proporciona uma barreira à permeabilidade do agente FS (KHARKWAL et al., 2011). Os fungos apresentam uma estrutura celular muito mais complexa que as bactérias. As leveduras constituem um grande grupo de microrganismos eucariontes, que são envolvidas por uma parede celular externa composta por glucano, quitina e lipoproteínas e é separada da membrana plasmática por um espaço periplasmático. A absorção de substâncias exógenas por fungos é geralmente afetada pela lipofilicidade e pela hidrofiliabilidade do seu revestimento celular. Após a captação, o FS é direcionado a alvos intracelulares. A presença do agente nestes alvos é importante, pois o oxigênio singlete é altamente reativo e apresenta um tempo de vida curto após a sua produção quando é irradiado. Assim que o oxigênio singlete é formado pela excitação da luz no FS, apresenta efeito oxidante contra as enzimas do fungo, tais como superóxidos dismutase e catalase, que são uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio. Isto explica o fato de não existir diferença na

susceptibilidade à PDT entre organismos resistentes aos antifúngicos convencionais e os não resistentes estudados (DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008).

2.4 INATIVAÇÃO DE *Candida albicans* POR TERAPIA FOTODINÂMICA

Teichert et al. (2002) avaliaram a eficiência da terapia fotodinâmica, utilizando o AM nas concentrações 250, 275, 300, 350, 400, 450, ou 500 $\mu\text{g/ml}$, no tratamento da candidíase oral induzida em ratos imunodeficientes. Setenta e cinco animais foram incubados, por via oral, com *Candida albicans* coletadas de pacientes HIV - positivos três vezes ao dia por 4 semanas. Para o tratamento, foi realizada uma administração tópica de 0,05 mL de uma solução de AM nas concentrações já citadas. Após 10 minutos, as lesões de candidíase, do grupo experimental, foram submetidas à terapia fotodinâmica com 664 nm de luz laser de diodo a 275 J/cm^2 e 400 mW durante um tempo de 687,5 segundos. Decorrida a terapia fotodinâmica, realizou-se uma cultura das lesões e exame histopatológico do tecido da área afetada. Os resultados indicaram que o efeito foi diretamente proporcional à concentração do agente FS, quando nas concentrações ente 250 e 400 $\mu\text{g/ml}$, reduziu o crescimento do fungo, mas não eliminou totalmente a *Candida albicans*. Já nas concentrações de 450 e 500 $\mu\text{g/ml}$ de AM, a *C. albicans* foi totalmente erradicada da cavidade bucal. Para os autores deste estudo, a terapia fotodinâmica mediada por AM pode ser usada potencialmente para o tratamento de candidíase oral em pacientes imunodeficientes.

A demonstração científica da susceptibilidade de *Candida ssp.* à PDT, usando um corante ou FS que já está sendo utilizado na clínica médica, é um passo importante para que esta modalidade de tratamento se torne uma nova estratégia terapêutica com potencial para tratar a infecção fúngica. Claramente, seletividade destes agentes é uma questão importante, pois as células humanas saudáveis podem ser suscetíveis a danos causados por eles. A aplicação tópica do FS e da luz, apenas nas áreas afetadas por candidíase mucocutânea, faz com que essas infecções possam ser tratadas com PDT com o mínimo de efeitos colaterais locais (BLISS et al., 2004).

Souza et al. (2006) estudaram os efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de diferentes espécies de *Candida*. Foram preparadas suspensões de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, contendo 10^6 células/mL. De cada uma das espécies, 10 amostras da suspensão de células foram irradiadas com laser de diodo ($\lambda = 685$ nm e densidade de energia de 28 J/cm^2) na presença de AM (0,1 mg/mL) por 5 minutos; 10 amostras foram apenas tratadas com AM (0,1 mg/ml por 5 min), sem exposição à luz laser; 10

amostras foram irradiadas com o laser na ausência do corante e 10 amostras não foram expostas luz de laser, nem ao corante AM. De cada amostra, uma série de diluições de 10^{-2} e 10^{-3} foram obtidos e alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram plaqueadas em duplicata em ágar dextrose Sabouraud. Após incubação a 37°C por 48 horas, o número de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) foi obtido e os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os pesquisadores observaram que a fotoativação do AM na concentração de 0,1mg/mL reduziu o número de UFC/ml em 88 *Candida krusei* e 82,3% para a *Candida tropicalis*. A radiação laser ou AM sozinho não reduziu significativamente o número de UFC/mL em todas as amostras de *Candida*, com exceção de *Candida tropicalis*, que foi a única espécie apresentou susceptibilidade à luz laser na ausência do FS. Neste estudo a PDT apresentou efeito fungicida em todas as espécies de *Candida* pesquisadas.

Munin et al. (2007) estudaram o efeito da PDT na inibição da formação de tubo germinativo por *Candida albicans*, que é um estado de transição entre células e brotamento de hifas e representa uma etapa essencial para a virulência do fungo. As culturas de *Candida albicans* foram semeadas em Ágar Dextrose Sabouraud e incubadas a 37°C por 48 h. Após a incubação, amostra de colônias foi removido da superfície do ágar e preparadas suspensões de solução fisiológica estéril (0,85 %) com densidade células viáveis de $1-5 \times 10^7$. A suspensão de *Candida* foi semeada em placas de microtitulação com 96 poços, nos quais foi adicionado AM com concentrações que variaram entre 0, 027 a 13,37 mM. Após um período de incubação de 5 min as placas foram iluminadas com laser de diodo com área do feixe de $0,38\text{ cm}^2$, potência de 0, 035 W, comprimento de onda de 683 nm e densidade de energia de 28 J/cm^2 . Alíquotas dos poços foram diluídas 100 vezes com solução fisiológica estéril e uniformemente espalhada em uma placa de Petri, que formam novamente incubadas (37°C por 48 h). Após este período, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi determinado. O aumento da concentração de AM de 0, 027 a 0,27 mM reduziu drasticamente o número de UFC/mL após a irradiação. Concentrações de AM superiores a 0,27 mM diminuíram progressivamente o efeito do laser. Na ausência de irradiação com laser, o AM não produziu redução de UFC/mL nas concentrações variando entre 0, 027 a 13,37 mM. As células tratadas com AM (0,013mM) associada com a irradiação com luz Laser apresentaram mínima ou nenhuma formação de tubo germinativo.

Chabrier-Roselló et al. (2010) avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica sobre *Candida albicans* e *Candida glabrata*, que apresentavam deficiência respiratória e, portanto um padrão de resistência a família antifúngicos azólicos, peptídeos antimicrobianos,

histamina salivares e a outros tipos de estresse tóxico. Utilizaram o Photofrin® como FS. Em contraste com este padrão de resistência, ambas as espécies de *Candida albicans* e a *Candida glabrata* foram significativamente mais sensíveis à PDT em comparação com as espécies não resistentes. Estes dados sugerem que a função mitocondrial normal pode fornecer um nível basal de defesa anti-oxidante contra a fototoxicidade induzida pela PDT.

Cadastro et al. (2008) tratou um paciente leucoderma, do sexo feminino, com 56 anos de idade e com diagnóstico de lesões orais recidivantes localizadas nas comissuras labiais. Na anamnese, o paciente relatou possuir *diabetes mellitus*, hipertensão controlada, que as lesões recidivavam frequentemente há mais de dois anos e que já tinha realizado diversas manobras terapêuticas que resultaram em insucesso, como aplicação tópica de miconazol três vezes ao dia por um longo período, e por vezes associado de forma sistêmica. Ao exame clínico intra e extra bucal observou-se lesões acometendo bilateralmente a região de comissura labial, com úlceras fissurais, leito hiperêmico, hemorrágico e halo eritematoso com presença de descamação e ruptura do epitélio, seguido de intensa dor. O diagnóstico das alterações foi baseado nas características clínicas, confirmados por exame citológico. Foi realizado o teste para avaliação do fluxo salivar, que resultou em valor moderado, confirmando presença de xerostomia leve. Como conduta de tratamento, aplicou-se com swab estéril, com leves toques, o agente azul de metileno a 0,1 mg/ml em toda extensão da lesão seguido da aplicação única do laser de baixa intensidade de potência (Arseneto de Gálio e Alumínio – GaAlAs) – a 790nm e 30 mW de potência, durante 2 minutos e 20 segundos, de forma pontual até contemplar toda área da lesão clínica, gerando uma densidade de energia de 4 J/cm². A paciente foi avaliada no 3º e no 7º dia e após uma proservação de mais de seis meses não houve a presença de recidivas. Concluíram que o tratamento da queilite angular, utilizando a terapia fotodinâmica, evidenciou ausência de lesões clínicas e citológicas, reforçando fácil aplicabilidade, sem a presença de efeitos colaterais adversos, tornando-se um método alternativo de tratamento efetivo e recomendado.

Diferentes membros da mesma classe de microrganismo parecem ter diferentes padrões de suscetibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana devido a determinantes metabólicos intrínsecos, tais como: defesa enzimática contra moléculas reativas de oxigênio e bombas de efluxo que reconhecem as moléculas do FS (PRATES et al., 2011). A PDT, com AM, aumenta a permeabilidade da membrana celular em *Candida albicans*, o que poderia reduzir a resistência deste microrganismo contra outras drogas. Desta forma, a PDT pode

também ser empregada como um coadjuvante da quimioterapia antifúngica convencional (LYON et al., 2011).

Estudando os mecanismos pelos quais a PDT produzem efeito antimicrobiano contra *Candida albicans*, Giroldo et al. (2009) utilizaram suspensão de *Candida albicans* (ATCC 10-231), com uma densidade $1-5 \times 10^7$ células viáveis/mL, que foram semeadas em placas de microtitulação com 96 poços. Em seguida, foi adicionado às suspensões AM nas concentrações entre 0,01 mg/mL e 0,5 mg/mL, resultando em um volume final de 0,2 ml por cada poço. Após um período de incubação de 5 min, foi aplicada a luz de um laser de diodo, com potência de 35 mW de saída e comprimento de onda de 684 nm. A área iluminada pelo feixe de laser foi de $0,38 \text{ cm}^2$, resultando em uma dose de energia de 28 J/cm^2 . Alíquotas de 50 μL foram retiradas antes e após a iluminação para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). O aumento da concentração do AM aumentou o efeito da PDT no crescimento de *Candida albicans*, mas este resultado não foi observado na ausência de irradiação. Na presença de AM a 0,05 mg/mL, houve uma redução de 50% da UFC/mL. No entanto, em concentrações superiores a 0,05 mg/mL, ocorreu uma redução progressiva na inibição do crescimento do fungo. A inativação do crescimento foi associada ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática, o que sugere que após a irradiação, AM pode levar à produção de oxigênio singleto e outras moléculas reativas de oxigênio, que podem danificar a membrana da célula e, por conseguinte, promover a morte celular.

Mang; Mikulski; Sala (2010) testaram o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) sobre espécies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*) resistentes e sensíveis ao fluconazol e a anfotericina B, que foram isoladas de pacientes adultos com AIDS. Utilizaram o Photofrin (25 $\mu\text{g/mL}$), como FS, e luz laser KTP: YAG (comprimento de onda = 630 nm, densidade de potência = 150 mW/cm^2 e doses de = 45, 90, 135 J/cm^2). Os resultados mostraram uma significativa redução na viabilidade de *Candida* em todas as doses de luz. Este estudo demonstrou que a PDT, induzida por Photofrin, pode eliminar espécies de *Candida* com eficiência significativa. As cepas, que tinham demonstrado resistência antifúngica a fluconazol e anfotericina B, isoladas de pacientes com AIDS, apresentaram sensibilidade equivalente à PDT, assim como os controles formados por cepas ATCC, não resistentes, da mesma espécie. Os controles foram formados pelas culturas que não foram tratadas com PDT, que foram apenas irradiadas, sem o Photofrin, e por as que foram tratadas apenas com o FS.

Em um estudo que utilizou Fotogem®, como FS, e diodo emissor de luz (LED), como luz visível ($\lambda \cong 455 \text{ nm}$ e $12,5 \text{ mW/cm}^2$), Dovigo et al. (2010) avaliaram o efeito da PDT na susceptibilidade, *in vitro*, de quatro espécies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*). Suspensões de cada espécie (10^6 UFC/mL) foram tratadas, no escuro, com três concentrações diferentes de FS (10, 25 e 50 mg/L) durante 30 minutos. Em seguida, foram irradiadas com três fluências ou doses de luz: 18,0; 25,5 e $37,5 \text{ J/cm}^2$ de luz LED, que corresponde aos tempos de 50, 34 e 24 minutos. As suspensões controles foram tratadas apenas com FS, apenas expostas à luz ou nem expostas luz, nem ao FS. Dezesesseis condições experimentais foram obtidas e cada condição foi realizada em triplicata. De cada exemplo, diluições em série foram obtidas e as alíquotas foram plaqueadas em Agar Sabouraud Dextrose. Depois a incubação das placas ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas), as colônias foram contadas (UFC/mL). Foi observada a eliminação completa de *Candida albicans* com uma dose de luz de $18,0 \text{ J/cm}^2$, em associação com 50 mg/L de FS. *C. dubliniensis* foram inativadas após $18,0 \text{ J/cm}^2$, utilizando 25 mg/L do FS. A inativação de *Candida tropicalis*, foi observada após a fotossensibilização com 25 mg/L e subsequente iluminação de $25,5 \text{ J/cm}^2$. Para *Candida krusei*, nenhuma das associações entre FS e luz resultou em completa inativação desta espécie. A PDT se mostrou eficaz para a inativação de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis* e redução significativamente a viabilidade celular de *Candida krusei*.

Em 2011, Pupo et al. avaliaram a susceptibilidade de *Candida albicans* à terapia fotodinâmica e, paulatinamente, comparou a eficácia dos agentes fotossensibilizantes azul de metileno e azul de toluidina, ambos na concentração de $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Como fonte de luz, foi utilizado o laser índio-gálio-alumínio (InGaAl) com densidade de energia de 53 J/cm^2 . Foram preparadas suspensões de 10^8 células/mL de *Candida albicans* e colocadas em placas de microtitulação de 96 poços, nas quais foram adicionados os corantes. Em seguida, foi aplicada a luz laser por 5 minutos e as placas foram incubadas por 48 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados foram obtidos pelo número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Os resultados mostraram que o número de células viáveis de *Candida albicans* reduziu significativamente após a aplicação da luz laser associada ao azul de metileno e azul de toluidina.

No estudo de Dai et al. (2011), infecções cutâneas por *Candida albicans* em camundongos foram tratadas com PDT, utilizando os FSs: o azul de toluidina a 82% (TBO), o azul de metileno a 85% (AM) e um novo azul de metileno (NAM) a 70%, que foram ativados

com luz vermelha emitida não-coerente (LumaCare, Newport Beach, CA), com espectro de luz visível de $635 \pm 15\text{nm}$ para TBO-NAM, $660 \pm 15\text{nm}$ para AM. Para a inativação fotodinâmica de *Candida albicans*, *in vitro*, foram adicionados às suspensões de *Candida albicans* (10^7 UFC/mL) os FS na concentração de $20 \mu\text{M}$ e, em seguida, foi realizada a irradiação com luz visível ($32,5 \text{ mW/cm}^2$) nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, e 5 min, que correspondem respectivamente as doses de luz de 0 ; 1,95; 3,90, 5,85, 7,80 , e $9,75 \text{ J/cm}^2$. Os resultados, *in vitro*, da PDT produziu uma inativação de $4,43 \log_{10}$ UFC de *Candida albicans* quando foi utilizado o NAM como FS na uma dose de luz de $9,75 \text{ J/cm}^2$. Nas condições equivalentes, o AM e TBO apresentaram uma inativação modesta. As feridas produzidas por abrasão da pele foram inoculadas com uma gota ($40 \mu\text{L}$) da suspensão de cultura preparada, contendo 10^6 ou 10^7 UFC/mL de *Candida albicans*. A PDT, *in vivo*, foi iniciada entre 30 min e 24 h após a inoculação do fungo. Foi aplicada uma dose de luz de 78 J/cm^2 (30 min após a infecção) ou 120 J/cm^2 (24 h pós-infecção). Os resultados mostraram que o NAM foi superior a TBO e AM como a FS na inativação fotodinâmica de *Candida albicans in vitro*. A eficácia da PDT foi diretamente proporcional a concentração de FS e a densidade de células fungicas. Estes dados sugerem que a PDT é uma abordagem viável para a profilaxia e tratamento de infecções cutâneas de *Candida albicans*.

O estudo de Mima et al. (2011) provou que a terapia fotodinâmica pode reduzir a carga de fungos em dentaduras, podendo ser usada como um tratamento coadjuvante da estomatite protética. Para a realização desta pesquisa utilizaram: o FS (Fotogem®), que foi iluminado com luz LED, e diferentes espécies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis* e *Candida krusei*) em próteses totais superiores. 34 próteses, confeccionadas para o estudo e esterilizadas com óxido de etileno, foram inoculadas individualmente com uma das espécies de *Candida* e incubadas a 37°C por 24h. As dentaduras submetidos a PDT (FS+L+) foram pulverizadas individualmente com 50 mg/L de FS e, após 30 min, iluminadas por uma luz de LED por 26 min ($37,5 \text{ J/cm}^2$). Próteses adicionais foram tratados apenas com o FS (FS+ L-) ou LED (FS- L+) ou não tratadas (FS- L-). As amostras das diluições em série foram espalhados em agar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C durante 48 h. As colônias foram contadas e os valores de \log (UFC/mL) foram analisados. Com resultados encontrados, foi possível observar que todas as espécies de *Candida* tratadas com PDT apresentaram redução significativa que variou entre 1,73 a $3,99 \log_{10}$ nos valores de UFC/mL em comparação com o grupo que não recebeu o tratamento. Reduções significativas ($p < 0,05$) também foram observadas nos grupos tratados

apenas com o FS (FS+ L-) ou somente com Luz (FS -L+) em comparação o grupo sem tratamento (FS-L-). Esta investigação demonstrou que a PDT, através da aplicação tópica de Photogem® seguido pela iluminação de com luz LED azul, aplicada às dentaduras, promoveu uma redução significativa na viabilidade das diferentes espécies de *Candida* comumente encontradas em próteses dentárias.

Um FS natural, que é considerado uma droga da nova geração para PDT, denominado de Hipericina, foi utilizado por Rezusta et al. (2012) para avaliar os efeitos da PDT contra várias espécies de *Candida*. Para determinar possíveis efeitos colaterais do FS, avaliaram sua fototoxicidade aos queratinócitos (HaCaT) e aos fibroblastos dérmicos (hNDF). Um efeito fungicida 3 log₁₀ foi observado para duas espécies de *Cândida albicans*, *Cândida parapsilosis* e *Cândida krusei* nas concentrações de hipericina de 0,625, 1,25, 2,5 e 40 µM, respectivamente, a uma fluência de 18 J/cm² (lâmpada LED emitindo em 602 ± 10 nm). Para conseguir uma redução de 6 log₁₀, foi necessário uma dose de luz de 37 J/cm² e concentrações de hipericina significativamente mais elevados, tais como: 5 µM para *Candida albicans*; 320µM para *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Os queratinócitos e fibroblastos podem ser preservados, mantendo a concentração de hipericina abaixo de 1 µM e a dose de luz inferior a 37 J/cm².

Após concluir uma revisão dos artigos publicados sobre Inativação fotodinâmica antimicrobiana para controlar infecções por *Candida albicans* tanto na forma planctônica quanto de biofilme, Pereira Gonzales; Maisch (2012) concluíram que o aumento mundial de resistência aos antimicrobianos tem resultado na busca por terapias antimicrobianas alternativas, tal como a terapia fotodinâmica antimicrobiana para o tratamento de infecções por *Candida albicans* susceptíveis ao tratamento tópico. Segundo os autores, a ausência de genotoxicidade e mutagenicidade de fungos ou células humanas favorece a segurança da terapia em longo prazo. Observaram ainda que os estudos demonstram que nem o FS, nem as subsequentes reações localizadas, em virtude da fotoativação, podem causar danos aos tecidos circundantes ou perturbar a flora residual do tecido. As indicações promissoras desta terapia seria para erradicar infecções orais em uma única sessão principalmente em pacientes mais susceptíveis e particularmente propensos a desenvolver resistência, como HIV positivos ou doentes submetidos à quimioterapia. O desenvolvimento da resistência microbiana a fotossensibilização ainda está em debate. Se os microrganismos podem desenvolver resistência aos radicais de oxigênio, como por exemplo, o oxigênio singlete, é questionável,

uma vez que o processo fotodinâmico é tipicamente multialvo e o mecanismo de ação é diferente do da maioria dos medicamentos antimicrobianos.

Para Snell; Foster; Haidaris (2012), a aplicação clínica da PDT depende de estratégia para melhorar o poder inibição microbiana e minimizar os danos teciduais do hospedeiro. Para os autores supracitados, aumentar a sensibilidade dos agentes infecciosos para a PDT poderá alcançar estes objetivos, tais como interferir no metabolismo respiratório do fungo. A partir destes conceitos os pesquisadores avaliaram compostos de uso clínico para aumentar o estresse oxidativo causado pela PDT, contribuindo para formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Utilizaram o FS catiônico meso-tetra (N-metil-4-pyridyl) porphine Tetra tosilato (MP-1363) e luz visível a partir de uma caixa equipada com um banco lâmpadas fluorescente ($1,0 \text{ J/cm}^2$; 575-700 nm). Foram testados vários antifúngicos, miconazol, clotrimazol, cetoconazol, e fluconazol, para avaliar sua capacidade para aumentar a o efeito PDT *in vitro*. Apesar do miconazol e cetoconazol terem estimulados a produção de ROS, somente o miconazol potencializou a inativação das células de *Candida albicans*. Os dados sugerem que o miconazol poderia ser utilizado para aumentar a eficácia da PDT contra *Candida albicans*.

Em 2013, Kato et al. realizaram um estudo cujo o objetivo foi avaliar se a exposição a PDT pode alterar as características de patogenicidade de células de *Candida albicans*. Diferentes métodos de análise foram empregados para avaliar o efeito da PDT, mediada pelo AM, sobre a capacidade de crescimento celular, sobre a formação de tubos germinativos e sobre o potencial para causar infecção sistêmica ou patogenicidade. Também foram avaliados a susceptibilidade de *Candida albicans* ao fluconazol e sua sensibilidade a diferentes agentes indutores de stress, como dodecilsulfato de sódio (SDS), a cafeína, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), menadiona e NaCl. A *Candida albicans* foi exposta a PDT subletal usando AM como um FS (0,05 mM por 10 min), combinada com um laser de diodo GaAIAs (λ 660 nm, 75 mW/cm^2 , 9 a 27 J/cm^2). *In vitro*, avaliou-se os efeitos da PDT sobre crescimento de *Candida albicans*, formação de tubo germinativo, a sensibilidade para o estresse oxidativo e osmótico, a integridade da parede celular, e suscetibilidade fluconazol. *In vivo*, avaliou a patogenicidade de *Candida albicans* com um modelo de infecção sistêmica em rato. A sobrevivência dos animais foi avaliada diariamente. A PDT, com AM, reduziu a taxa de crescimento e a capacidade de *Candida albicans* para formar tubos germinativos em comparação com células não tratadas ($P < 0,05$). A sobrevivência de ratos infectados sistemicamente com *Candida albicans* e pré-tratados com PDT foi significativamente aumentada em comparação com

ratinhos infectados com levedura e não tratados ($P < 0,05$). PDT aumentou a sensibilidade de *Candida albicans* ao sulfato de dodecilo de sódio, cafeína, e peróxido de hidrogênio. A concentração inibitória mínima (MIC) do fluconazol para *Candida albicans* também foi reduzida após a PDT. No entanto, nenhum desses parâmetros patogênicos foi alterado nas células filhas de *Candida albicans* submetidas à PDT. Estes dados sugerem que a PDT pode inibir os fatores de virulência e reduzir *in vivo* a patogenicidade de *Candida albicans*. A ausência de alterações em células-filhas indica que os efeitos PDT são transitórios. A redução de valores de MIC para fluconazol sugere que este antifúngico pode ser combinado com PDT para o tratamento de infecções de *Candida albicans*.

Um melhor conhecimento dos mecanismos de resistência da *Candida albicans* pode proporcionar o desenvolvimento de novos tratamentos, como também a combinação da Inativação fotodinâmica antimicrobiana com outras terapias (PEREIRA GONZALES; MAISCH, 2012).

REFERÊNCIAS

- ANWAR, K. P.; MALIK, A.; SUBHAN, K. H. Profile of candidiasis in HIV infected patients. **Iran J. Microbiol**, v. 4, n. 4, p. 204-209, Dec. 2012.
- BLISS, J. M.; BIGELOW, C. E.; FOSTER, T. H.; HAIDARIS, C. G. Susceptibility of *candida* species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrob. agents chemother**, Washington, v. 48, n. 6, p. 2000-2006, Jun. 2004.
- CADASTRO, G. E.; ALLEGRETTI, C. E.; SCABAR, L. F.; BARROS, F. C.; ARMONIA, P. L.; GIOVANI, E. M. Photodynamic therapy in treatment angular cheilitis: case report. **Rev. Inst. Invest. Cienc. Salud**, Cuenca, v. 26, n. 4, p. 482-486, Oct./Dec. 2008.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one: photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis photodyn. ther**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004.
- CHABRIER- ROSELLÓ, Y.; GIESSELMAN, B. R.; DE JESÚS-ANDINO, F. J.; FOSTER, T. H.; MITRA, S.; HAIDARIS, S. G. Inhibition of electron transport chain assembly and function promotes photodynamic killing of candida. **J. photochem. photobiol. B**, Lausanne, v. 99, n. 3, p. 117-125, June 2010.
- DAI, T.; ARCE, V. J. B.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *candida albicans* infections in mice. **Antimicrob. agents chemother**, Washington, v. 55, n. 12, p. 5710-5717, Dec. 2011.
- DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; PRATES, R. A.; ASTRAKAS, C.; DENIS, T. G.; RIBEIRO, M. S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Front. Microbiol**, v. 3, n. 120, p. 1-16, Apr. 2012.
- DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Res. Microbiol**, Paris, v. 163, n. 1, p. 1-12, Nov. 2008.
- DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, D. G.; ADRIANO, C. S.; BAGNATO, V. S. Photodynamic inactivation of four *candida* species induced by Photogem®. **Braz. j. microbiol**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 42-49, Jan./Mar. 2010.
- DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; CARMELLO, J. C.; MACHADO, A. L.; BRUNETTI, I. L.; BAGNATO, V. S. Susceptibility of clinical isolates of *candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers Surg. Med**, New York, v. 43, n. 9, p. 927-934, Nov. 2011b.
- FONTANA, C. R.; ABERNETHY, A. D.; SOM, S.; RUGGIERO, K.; DOUCETTE, S.; MARCANTONIO, R. C.; SOUKOS, N. S. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque derived biofilms. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v. 44, n. 6, p. 751-759, Dec. 2009.

- GIROLDO, L. M.; FELIPE, M. P.; OLIVEIRA, M. A.; MUNIN, E.; ALVES, L. P.; COSTA, M. S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *candida albicans*. **Lasers Med. Sci**, London, v. 24, n. 1, p. 109-112, Jan. 2009.
- HUANG, L.; HUANG, Y. Y.; MROZ, P.; TEGOS, G. P.; ZHIYENTAVEV, T.; SHARMA, S. K.; LU, Z.; BALASUBRAMANIAN, T.; KTAYER, M.; RUZIE, C.; YANG, E.; KEE, H. L.; KIRMAIER, C.; DIERS, J. R.; BOCIAN, D. F.; HOLTEN, D.; LINDSEY, J. S.; HAMBLIN, M. R. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers. **Antimicrob. agents chemother**, Washington, v. 54, n. 9, p. 3834-3841, Sept. 2010.
- KATO, T.I.; PRATES, R. A.; SABINO, C. P.; FUCHS, B.B.; TEGOS, G. P.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R.; RIBEIRO, M. S. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces *in vivo* pathogenicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.57, n.1, p.445-51, Jan. 2013.
- KHARKWAL, G. B.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers surg. Med**, New York, v. 43, n. 7, p. 755-767, Sept. 2011.
- KOMERIK, N.; MACROBERT, A. J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **J. environ. pathol. toxicol. oncol**, New York, v. 25, n. 12, p. 487-504, 2006.
- KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J. dent. res**, Washington. v. 86, n. 8, p. 694-707, Nov. 2007.
- LAM, M.; JOU, P. C.; LATTIF, A. A.; LEE, Y.; MALBASA, C. L.; MUKHERJEE, P. K.; OLEINICK, N. L.; GHANNOUM, M. A.; COOPER, K. D.; BARON, E. D. Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*. **Photochem Photobiol**. v.87, n.4, p.904-9, Jul-Aug. 2011.
- LYON, J. P.; MOREIRA, L. M.; MORAES, P. C.; SANTOS, F. V.; RESENDE, M. A. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. **Mycoses**, Berlin, v. 54, n. 5, p. 265-271, Sept. 2011.
- MANG, T. S.; MIKULSKI, L.; SALA, R. E. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *candida* species. **Photodiagnosis Photodyn. Ther**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 98-105, June 2010.
- MIMA, E. G.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, D. G.; DOVIGO, L. N.; VERGANI, C. E.; BAGNATO, V. S. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *candida* spp. on dentures: in vitro study. **Photomed. laser surg**, Larchmont, v. 29, n. 12, p. 827-833, Dec. 2011.
- MUNIN, E.; GIROLDO, L. M.; ALVES, L. P.; COSTA, M. S. Study of germ tube formation by *candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. photochem. photobiol. B**, Lausanne, v. 88, n. 1, p. 16-20, July 2007.

NAGLIK, J. R.; PAUL, L. Fidel, P. L. J.; ODDS, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. **National Institutes of Health**, v.283, n. 2 p. 129-139, June, 2008.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. **J. photochem. photobiol. B**, Lausanne, v. 39, n. 1, p. 1-18, May 1997.

PEREIRA, F. G.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation to control infections caused by *Candida albicans*. **Fungal Biol.** v.116, n.1, p.1-10, Oct. 2012.

PRATES, R. A.;KATO, I. T.; RIBEIRO, M.S.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M.R. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *candida albicans*. **J. antimicrob. chemother**, London, v. 66, n. 7, p. 1525-1532, July 2011.

PUPO, Y. M.; GOMES, G. M.; SANTOS, E. B.; CHAVES, L.; MICHEL, M. D.; KOZLOWSKI, V. A.; GOMES, O. M.; GOMES, J. C. Susceptibility of *candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. **Acta odontol. latinoam**, Buenos Aires, v. 24, n. 2, p. 188-192, 2011.

REZUSTA, A.; LÓPEZ-CHICÓN, P.; PAZ-CRISTOBAL, M. P.; ALEMANY- RIBES, M.; ROYO-DIEZ, D.; AGUT, M.; SEMINO, C.; NONELI, S.; REVILLO, M. J.; ASPIROZ, C.;GILABERTE, Y. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on candida species. **Photochem. photobiol**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 613-619, May/June 2012.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; MASCIO, P. D.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

RYSKOVA, L.; BUCHTA, V.; SLEZAK, R. Photodynamic antimicrobial therapy. **Cent. Eur. J. Biol**, New York, v. 5, n. 4, p. 400-406, Aug. 2010.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **antimicrob. agents chemother**, Washington, v. 49, n. 2, p. 668-679, Feb. 2005.

SNELL, S. B.; FOSTER, T. H.; HAIDARIS, C. G. Miconazole induces fungistasis and increases killing of *candida albicans* subjected to photodynamic therapy. **Photochem. photobiol**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 596-603, May/June 2012.

SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C.Y.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. Photosensitization of different *candida* species by low power laser light. **J. photochem. photobiol. B**, Lausanne, v. 83, n. 1, p. 34-38, Apr. 2006.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.;TADA, D. B.; SEVERINO, D.;TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis photodyn. ther**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 175-191, Sept. 2005.

TEICHERT, M. C.; JONES, J. W.; USACHEYA, M. N.; BIEL, M. A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient

murine model. **Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. endod**, St. Louis, v. 93, n. 2, p.155-160, Feb. 2002.

VERA, D. M. A.; HAYNES, M. H.; BALL, A. R.;DAI,T.; ASTRAKAS, C.; KELSO, M. J.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. **Photochem. photobiol**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 499-511, May 2012.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Methylene blue-a therapeutic dye for all seasons?. **J. chemother**, Firenze, v. 14, n. 5, p. 431-443, Oct. 2002.

3 ARTIGO

FOTOINATIVAÇÃO DE *Candida albicans* UTILIZANDO AZUL DE METILENO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR

PHOTOINACTIVATION OF *Candida albicans* USING METHYLENE BLUE AS PHOTOSENSITIZER

RESUMO

Introdução: A *Candida albicans* é um desafio à saúde pública devido à quantidade de espécies resistentes. **Objetivo:** avaliar o efeito da terapia fotodinâmica na inativação de células planctônicas de *Candida albicans* (ATCC10231), empregando azul de metileno, 150 µg/mL, como fotossensibilizador. **Método:** Alíquotas de 100 µg/mL da suspensão do fungo na concentração de 10^6 células/mL foram semeadas em placas de microtitulação com 96 poços, onde foi depositado o mesmo volume de azul de metileno, permanecendo em um período de pré-irradiação de 5 min. Em seguida, aplicou-se luz laser de baixa potência (comprimento de onda: 660 nm, potência: 100 mW e dose: 426 J/cm^2) por 128s, utilizando um Laser semiconductor portátil (Laser DUO[®], GaAlAs, InGaAlP, MM OPTICS LTDA, São Carlos, SP- Brasil). Experimentos controles foram realizados, sem iluminação e na ausência de azul de metileno, outro na presença de azul de metileno sem iluminação, e com iluminação, substituindo o fotossensibilizador por solução salina. De cada condição experimental, diluições em série (10^{-1} a 10^{-3}) foram obtidas e alíquotas de 25 µL foram plaqueadas em duplicata em Agar Sabouraud Dextrose. Após este período, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi determinado e os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). **Resultados:** Na concentração de 150 µg/mL e tempo de 5 min de incubação, a redução foi significativa ($p < 0,05$), na ausência de irradiação, o azul de metileno não produziu redução de UFC/mL.

Conclusão: A Terapia Fotodinâmica apresentou efeito antifúngico contra *Candida albicans*, podendo ser utilizada como coadjuvante ao tratamento convencional.

Palavras- chave: *Candida albicans*; Terapia fotodinâmica; Azul de metileno

ABSTRACT

Introduction: *Candida albicans* is a major challenge to public health because of to the amount of resistant species. **Objective:** To evaluate the effect of photodynamic therapy in the inactivation of *Candida albicans* planktonic cells (ATCC10231), using methylene blue, 150 mg / mL, as a photosensitizer. **Method:** Aliquots of 100 ug / ml of the fungal suspension in a 10⁶ cells / ml concentration were seeded in microtiter plates with 96 wells, which was deposited with the same volume of methylene blue, remained at a 5 min pre-irradiation. Then, it was applied low power laser light (wavelength: 660 nm, power: 100 mW and dose: 426 J / cm²) for 128s using a portable semiconductor laser (Laser DUO®, GaAlAs, InGaAlP, MM OPTICS LTDA, São Carlos, SP Brazil). Control experiments were performed without illumination, in the absence and presence of methylene blue and with illumination replacing the photosensitizer by saline. In each experimental condition, serial dilutions (10⁻¹ to 10⁻³) were obtained and 25 uL aliquots were seeded in Sabouraud Dextrose Agar duplicate . After this period, the number of colony forming units per milliliter (CFU / mL) was determined and the data were submitted to variance analysis and Kruskal Wallis test (p <0.05). **Results:** At the concentration of 150 ug/ml, and time of 5 min incubation, the reduction was significant (P<0.05) in the absence of irradiation, methylene blue produced no reduction in CFU/mL. **Conclusion:** Photodynamic Therapy presented antifungal effect against *Candida albicans* and can be used as an adjunct to conventional treatment.

Descriptors: *Candida albicans*; Photochemotherapy; Methylene blue.

INTRODUÇÃO

Fungos oportunistas podem provocar infecções superficiais ou invasivas graves, em pacientes aparentemente sadios e especialmente em pacientes debilitados ou imunocomprometidos. Devido a dificuldades no diagnóstico e a disponibilidade limitada de drogas antifúngicas eficazes, representam uma ameaça crescente para a saúde humana, podendo resultar em alta mortalidade atribuível.¹

A *Candida albicans* é um fungo oportunista, que para o desenvolvimento da infecção necessita de alguns fatores predisponentes sistêmicos e locais, que segundo Naglik et al.², são, por exemplo, os agentes imunossupressores, antibióticos, estrogênios, xerostomia, uso de prótese e higiene bucal deficiente. Em pacientes imunodeprimidos, como os indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a candidose bucal é a manifestação fúngica mais comum constituindo um indicador da progressão da infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Segundo Lam et al.³, as infecções causadas por fungos, como por *Candida*, representam um sério desafio à saúde pública, com elevada importância socioeconômica principalmente devido às espécies resistentes aos antifúngicos tradicionais, tais como os azóis e polienos (por exemplo, fluconazol e anfotericina B, respectivamente). Sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas científicas que busquem ampliar as formas de tratamento das lesões de *Candida*, possibilitando um tratamento alternativo efetivo dos casos de insucesso e melhorando o bem estar dos pacientes acometidos por esta doença.

A Terapia Fotodinâmica (PDT), segundo Kato et al.⁴, é um tratamento já utilizado em várias outras especialidades como a dermatologia, oncologia e oftalmologia e está sendo investigado como terapia antimicrobiana, é uma terapia a base de luz, que consiste na administração de um corante ou um fármaco não tóxico, definido como agente

fotossensibilizante (FS), que pode ser aplicado sistemicamente, localmente ou por via tópica, seguida de iluminação da lesão, com luz visível (geralmente com longo comprimento de onda de luz vermelha), a qual, na presença de oxigênio, leva à formação de espécies citotóxicas, tais como o oxigênio singleto e de radicais livres. Essas espécies químicas reativas são em sua maioria tóxicas e podem causar: destruição de proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos e outros componentes celulares, resultando na destruição das células microbianas.⁵

No tratamento de candidíase, a terapia fotodinâmica, utilizando azul de metileno (AM) como fotossensibilizador (FS), apresenta algumas vantagens em relação à terapia medicamentosa tradicional, tais como: os mecanismos de ação são diferentes das drogas antifúngicas, o que atenua os casos de desenvolvimento de resistência ao medicamento, e o custo, pois diferentemente da terapia antifúngica convencional, possui valor mais acessível. Podendo ser uma alternativa terapêutica eficaz contra cepas já resistente de *C. albicans*⁶

Devido o fato do uso dos medicamentos antifúngicos terem apenas uma melhora transitória, com um grande número de recidivas, apresentando efeitos colaterais em alguns pacientes, e por ter um número reduzido de drogas no mercado e ainda desenvolverem resistência microbiana, tornou-se de grande importância a pesquisa de tratamentos alternativos eficazes contra as doenças fungicas. Os estudos já mostram que o emprego de azul de metileno como fotossensibilizador se mostra eficaz na inativação da *Candida albicans* e que a utilização da terapia fotodinâmica tem se apresentado como uma alternativa satisfatória para o tratamento antifúngico, no entanto ainda há necessidade de que seja estabelecido um protocolo adequado quando ao tempo de pré- irradiação ou de incubação, necessitando que alguns aspectos ainda sejam esclarecidos para que seja recomendado para terapia clínica, como a concentração de azul de metileno que apresente melhor custo-benefício com relação à inativação da *Candida albicans*, sem apresentar efeitos tóxicos para as células do organismo.

Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, os efeitos da fotossensibilização em *Candida albicans* com radiação laser, utilizando o azul de metileno como fotossensibilizador.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC10231) adquiridas da coleção de culturas tropicais (CCT) da fundação André Tosello. Para a realização dos experimentos, utilizou-se o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose - ASD (União Química, São Paulo, Brasil) com 5 µg/mL cloranfenicol, conforme preconiza Pereira et al.⁷

Preparo do fotossensibilizador (FS) e tempo de incubação

O agente FS utilizado foi o azul de metileno (AM) PA (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Soluções de estoque a partir de AM PA, na concentração de 300 µg/mL foram preparadas por dissolução do pó em solução salina estéril (0,85% de Na Cl) em pH 7.⁸ Durante o experimento, em poços de placas de microtitulação, 100 µL da solução de estoque do FS, em temperatura ambiente, foi novamente diluída pelo acréscimo 100 µL de suspensão de *Candida albicans* em solução salina a 0,85%⁹, resultando em um volume final de 200 µL. Como o volume do poço é duplicado (100 µL de FS e 100 µL de suspensão celular), a concentração do FS é reduzida a metade: 150 µg/mL (concentração de trabalho). Em seguida, o corante AM ficou em contato com as células de *Candida albicans*, no escuro e a temperatura ambiente, antes da iluminação, por um período de incubação de 5 minutos (tempo de pré-irradiação). Com este propósito, as placas ficaram em um ambiente sem luminosidade e envolvidas por uma lâmina de papel alumínio.

Fonte de irradiação para a terapia fotodinâmica (PDT)

A fonte emissora de luz foi um Laser semiconductor portátil (Laser DUO[®], GaAlAs, InGaAlP, λ 880nm e λ 660nm, MM OPTICS LTDA, São Carlos, SP – Brasil). Este aparelho apresenta potência de saída constante em 100 mW e área do feixe de laser de 3 mm², a qual coincide com a área da abertura de cada um dos 96 poços de fundo em U das placas de microtitulação utilizadas neste estudo. Para o protocolo de irradiação, o equipamento foi ajustado para um comprimento de onda de 660 nm, que correspondente à faixa de absorção do AM, e para o tempo de iluminação de 128s, resultando em uma influência de energia de 426 J/cm². Antecipadamente à realização dos experimentos, o laser foi calibrado com auxílio de um dispositivo (Check MM OPTICS LTDA, São Carlos, SP – Brasil). Antes de cada irradiação, a ponteira do aparelho ficou imersa em solução de digluconato de clorexidina a 2% por 5 min para promover a sua desinfecção. Após este período, o agente antimicrobiano foi removido do dispositivo por meio de irrigação com 10 mL de solução salina (0,9%) e secada com gaze estéril. A ponteira do equipamento foi posicionada perpendicularmente a abertura dos poços e a irradiação foi efetuada com ângulo de incidência de 90°. Para evitar um possível efeito cumulativo devido ao espalhamento da irradiação, cada amostra foi irradiada e coletada individualmente.⁹

Preparo do inóculo de *Candida albicans*

As células de *Candida albicans* (ATCC 10-231) foram subcultivadas a partir de frascos estoques em Agar Sabouraud Dextrose – ASD sob condições aeróbicas a 37 °C. Após 24 h de incubação, uma amostra de colônias foi removida da superfície do Agar da placa e suspensas em solução fisiológica estéril a 0,85 % de NaCl¹⁰. Após agitação com o auxílio do aparelho Vortex (Vision[®]) durante 2 minutos, a turbidez da suspensão de células foi ajustada com auxílio de um espectrofotômetro a 530 nm para obter suspensões com densidade óptica

de 0, 284, que corresponde a uma concentração de fungos de 10^6 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).^{4, 7, 9}

Condições Experimentais

Todas as condições testadas foram realizadas no escuro à temperatura ambiente e em condições assépticas no interior de uma câmara de fluxo laminar. As placas de microtitulação foram cobertas com lâminas de papel alumínio para impedir a penetração da luz do ambiente.

Grupo Terapia fotodinâmica (Grupo PDT)

No grupo terapia fotodinâmica, grupo PDT (FS+L+), as cepas de *Candida albicans* foram sensibilizadas com o FS, azul de metileno, e expostas ao laser (L). Com agitação constante, alíquotas de 100µL da suspensão do fungo (10^6 UFC/mL) foram transferidas individualmente para um poço da placa de microtitulação com 96 poços. Em seguida, foi acrescentado o mesmo volume de AM (100µl) na concentração testada (300 µg/ml), resultando em um volume final de 200 µl por cada poço e concentração final de 150µg/ml (grupo PDT AM-150µg/ml). Posteriormente, as placas contendo as suspensões resultantes foram deixadas em repouso, no escuro, durante o tempo de incubação de 5 minutos. Após o tempo de pré-irradiação, as placas foram abertas e as células da levedura foram continuamente irradiadas, a partir do topo da placa de microtitulação, com um diodo laser (comprimento de onda de 660nm; potencia de 100 mW e dose de 426 J/cm²) por 128s. O conteúdo dos poços foi devidamente homogeneizado antes da iluminação e da amostragem.

Grupo Azul de Metileno (Grupo AM)

No grupo AM, o efeito do FS sozinho, na inativação de células de *Candida albicans*, foi testado pela aplicação da solução seguindo o mesmo protocolo estabelecido para o grupo PDT (FS+L+), principalmente com relação ao volume (100µL), a concentração testada (150

µg/ml) e tempo de incubação (5 min.) com ausência de luz, porém sem o tratamento com o laser. Neste grupo foi possível avaliar a toxicidade do AM nas células de *Candida albicans*.

Grupo Laser (Grupo L)

No grupo laser, grupo L, as cepas de *Candida albicans* foram expostas à luz laser (L), mas não foram sensibilizadas pelo FS. Com este grupo foi possível avaliar o efeito da luz laser isoladamente na inativação das células da levedura. Aliquotas de 100µL da suspensão celular foram transferidas individualmente para um dos poços de uma placa de microtitulação. Em seguida, o mesmo volume de solução salina 0,85% estéril foi transferido para o poço. O sistema de ensaio foi mantido no escuro pelo mesmo tempo de incubação dos grupos anteriores (5 min.).

Grupo solução salina (Grupo SS)

No grupo solução salina, grupo SS, as células de *Candida albicans* não receberam nenhum tratamento, ou seja, nem foram sensibilizadas pelo FS, nem foram expostas à luz. Aliquotas de 100 µL da suspensão (10^6 UFC/mL) foram transferidas para os poços da placa de microtitulação e, em seguida, o mesmo volume de solução salina a 0,85% foi depositado no poço e a placa ficou em repouso no escuro pelo mesmo tempo de incubação dos grupos anteriores (5 minutos).

Os resultados obtidos com as culturas dessa amostra foram utilizados como parâmetro para comparação com aqueles que foram obtidos com as culturas das amostras submetidas às condições experimentais.

Avaliação da viabilidade das células de *Candida albicans*

Para todas as condições avaliadas, foram realizadas diluições seriadas de 1:3 a partir das amostras contidas nos poços das placas. Para isso, uma alíquota de 100 µL foi removida

de cada poço e transferida para um tubo de ensaio contendo 900 µL de solução salina (0,85%) estéril. Este tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos (Vortex - Vision®) e uma nova alíquota de 100 µL foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 900 µL de solução salina estéril. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra e, desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram obtidas. Foram utilizadas as diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , e 10^{-3}) para a realização da semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose.

A seguir, alíquotas de 25 µL de cada diluição seriada foram pipetadas em duplicata. Adicionalmente, alíquotas de 25 µL foram removidas do poço das placas e transferidas diretamente para uma da placa de Petri, sem a realização de diluição. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura na placa. Também os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicata. Após 48 horas de incubação a 37 °C, as placas de Petri referentes às amostras das condições experimentais avaliadas foram submetidas à contagem de colônias. Para este procedimento, a quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados.

Técnica de Contagem das UFC/mL

A leitura das placas foi efetuada pela contagem padrão de colônias de *Candida albicans* (Unidade Formadora de Colônias - UFC/mL) com o auxílio de um contador de colônias.

Para a contagem, selecionaram-se placas que continham um número de colônias que se encontrava dentro do intervalo de precisão e repetibilidade de 30 a 300 colônias conforme o método de Swanson et al.¹¹ Para cada diluição (10^{-1} ; 10^{-2} e 10^{-3}), os resultados do número de colônias foi obtido pela média aritmética dos resultados das placas em duplicata e multiplicada pela diluição correspondente (10, 100 ou 1000). O resultado de cada grupo foi

encontrado por meio da média aritmética das três diluições. Em seguida, para encontrar o número UFC por mL, converteu-se o resultado de cada grupo a partir da quantidade inoculada de 25µL para 1 mL, dividindo o resultado por 0,025, obtendo o resultado final de UFCs/mL em potência de 10. Para a análise da contagem de UFC/ml de *Candida albicans*, optou-se por transformar os valores em potência de 10, utilizando-se o logaritmo decimal deste número para a análise estatística.

Nas situações em que todas as placas apresentaram menos que 30 colônias, o resultado foi expresso pelo número de colônias da placa de menor diluição. Quando todas as placas apresentaram mais de 300 colônias na maior diluição e foi possível realizar a contagem, o resultado foi encontrado multiplicando o valor do número de colônias em cada placa pelas respectivas diluições e, em seguida, calculando a média aritmética. Quando o número de colônias foi excessivamente alto para contar, escolheu-se uma porção representativa da distribuição das colônias em toda placa e estimou-se o número de colônias presentes.¹¹

Análise estatística

Os resultados dos \log_{10} (UFC/mL) para cada condição testada foram comparados utilizando teste estatístico Kruskal-Wallis e no caso de diferença significativa foram utilizadas comparações múltiplas do referido teste. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significativos. A escolha do teste Kruskal-Wallis foi devido ao número de grupos. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi a versão Trial em português. Os resultados desta pesquisa foram expressos através das medidas estatísticas: média, desvio padrão (DP) e mediana.

RESULTADOS

Conforme na Tabela 1, pode ser observado que no tempo de 5 min de incubação, os grupos irradiados com luz laser, associada à concentração de 150 µg/mL de azul de metileno

como fotossensibilizador (grupo PDT AM), apresentou uma menor média no valor de \log_{10} UFC/mL, $p = 0,019$, mostrando efeito inibitório nas células de *Candida*, em relação aos outros grupos, que não apresentaram efeito inibitório das células de *Candida Albicans*.

Na tabela 2, apresentam-se as estatísticas do logaritmo decimal (\log_{10}) do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para cada grupo controle em relação ao tempo de incubação. Ao comparar os resultados da contagem de UFC/ml entre os grupos que avaliaram a toxicidade no escuro do azul de metileno (Grupo AM) e da luz na dose empregada (Grupo laser) com o grupo que não recebeu nenhum tratamento (Grupo solução salina), observou-se que somente o AM ou somente a luz não exerceu efeito inibitório contra as células de *Candida albicans*.

DISCUSSÃO

Os estudos das propriedades terapêuticas da luz com finalidade antimicrobiana são motivados principalmente pelos casos de resistência aos antimicrobianos convencionais.^{3,6,12,13,14,15} A necessidade de superar essas deficiências provocou a exploração de tratamentos alternativos e abordagens não convencionais para o controle de infecções microbianas.¹⁵

Atualmente, o tratamento antimicrobiano a base de luz é denominado de terapia fotodinâmica.^{4,5,16} Os três componentes principais da PDT são a luz visível, o FS e oxigênio.¹⁷ Em função do fato de absorverem luz com elevada eficiência, em alguma região do espectro visível, alguns dos FSs são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas e produzir moléculas reativas de oxigênio.^{5,15,18,19}

Vários trabalhos, que avaliaram espécies de *Candida* resistentes azólicos, observaram que estas cepas eram sensíveis a PDT.^{12,13,20,21} A aplicação do fotossensibilizador e da luz especificamente no local afetado pela candidíase reduz drasticamente os efeitos colaterais

locais e sistêmicos, fazendo com que a terapia fotodinâmica possa ser vista como um tratamento promissor contra *Candida albicans*.²²

As fontes de luz utilizadas com mais frequência na PDT contra *Candida albicans* foram o LED¹³ e o laser de baixa intensidade, destacando-se o laser de diodo.^{6,8,9,10,23} Nesta pesquisa foi utilizado laser de diodo da MM OPTICS (Laser DUO[®]) que, por ser portátil e possuir bateria, apresenta uma maior vantagem em relação ao manuseio sem dependência de fonte de energia, podendo ser aplicado à pacientes em diversos ambientes: doméstico, ambulatorial, unidades de saúde da família ou em unidades de terapia intensiva.

O azul de metileno foi o fotossensibilizador utilizado neste estudo porque é um corante de baixa toxicidade com forte absorção da luz visível em comprimentos de onda maiores do que 620 nm.⁶ É utilizado com diferentes finalidades na microbiologia e farmacologia há bastante tempo e, ultimamente, tem sido aplicado na PDT como droga fotossensibilizante em associação com uma fonte de luz contínua. Para que o fotossensibilizador possa ser fotoativado pelo laser é necessário que a luz aplicada apresente um comprimento de onda específico.^{6,21} Utilizou-se neste estudo a luz vermelha com comprimento de onda de 660 nm, que corresponde ao espectro de absorção do azul de metileno, que foi ajustada no aparelho antes da iluminação.

Os estudos de Dai et al.¹, Kato et al.⁴, Teichert et al.⁶, Pereira et al.⁷, Souza et al.⁸, Queiroga et al.⁹, Munin et al.¹⁰, Silva Martins et al.¹⁸, Giroldo et al.²⁴ e Souza et al.²⁴, estudaram os efeitos da terapia fotodinâmica sobre a viabilidade de *Candida albicans* utilizando o azul de metileno, como fotossensibilizador. Os resultados destes estudos comprovaram o efeito antifúngico desta modalidade de tratamento. No entanto, alguns aspectos ainda precisavam ser mais bem esclarecidos, antes de recomendá-la para terapia clínica. Há necessidade de determinar protocolos com parâmetros bem definidos, como a

dosimetria adequada do FS e da luz e o tempo em que o corante deve permanecer em contato com o microrganismo.¹⁴

Com o objetivo de potencializar o efeito da PDT em um menor tempo de trabalho sem prejuízo na qualidade do tratamento, foi testado um tempo de incubação e uma concentração de azul de metileno. A hipótese era descobrir se eles apresentavam um custo-benefício adequado para PDT em relação à concentração do azul de metileno e o tempo em que esta substância necessitaria ficar em contato com as células de *Candida albicans* para produzir um efeito antimicrobiano satisfatório.

O modelo experimental escolhido foi placas de microtitulação com 96 poços de fundo em U. Esta metodologia tem sido bastante utilizada nas pesquisas que avaliaram o efeito antimicrobiano da PDT sobre microrganismo na forma planctônica a partir de uma suspensão celular.^{9,10,23,24}

O efeito fotodinâmico depende da concentração do FS empregado, combinado com os parâmetros de irradiação que ativam o corante.^{4,16} Os estudos que avaliaram o efeito da PDT sobre *Candida albicans*, utilizaram diferentes concentrações de azul de metileno, desde 10 µg/mL²³ a 500 µg/mL⁶ e o tempo de incubação mais utilizado foi 5 min.^{7,8,9} Assim, para responder a hipótese de que concentração e tempo de incubação potencializariam o efeito da PDT, utilizou-se neste estudo a concentração de 150 µg/mL e o tempo de incubação de 5 min.

O fato de a maioria dos FSs serem tanto fluorescente, quanto fotoquimicamente ativo, permite que várias estratégias e protocolos possam ser combinados na terapia fotodinâmica. O fator mais importante que regula os resultados da PDT é forma como o FS interage com as células no tecido ou lesão alvo, e o aspecto chave desta interação está relacionado à localização intracelular do FS. O tempo de incubação é necessário para permitir que a droga possa ser absorvida pelo microrganismo e acumular-se nas estruturas celulares,²¹ como

mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e membrana plasmática.³ Durante a irradiação é necessário que o FS já esteja localizado no interior da célula, pois o oxigênio singlete, formado após a aplicação da luz, apresenta difusão mínima (100nm) e efeito citotóxico apenas no local onde é produzido.¹⁶

Assim como foi observado nos estudos de Souza et al.⁸, Queiroga et al.⁹ e Souza et al.²⁴, a irradiação com luz laser de *Candida albicans*, na ausência de AM, não apresentou influência sobre a viabilidade dos microrganismos. Já na ausência de luz, o azul de metileno não apresentou efeito citotóxico sobre as células de *Candida albicans*, corroborando com os estudos citados acima. Tanto o fotossensibilizador, quanto a luz, são relativamente inofensivos por si só, mas quando combinados, na presença de oxigênio, causam destruição seletiva na área afetada^{17,23}. Segundo Pereira Gonzales, Maisch¹⁵ e Ryskova et al.¹⁶ os agentes fotossensibilizadores exibem nenhuma ou mínima toxicidade inerente e o efeito citotóxico somente ocorre após a sua iluminação com luz de comprimento de onda específico.

Na concentração de 150 µg/mL, a redução das UFC/mL foi significativa no tempo de 5 min de incubação, em comparação aos grupos controle, afirmando que a terapia fotodinâmica apresentou efeito sobre as células.

Assim, de acordo com os parâmetros deste estudo e com a relação do custo-benefício em relação à concentração da droga e o tempo clínico do procedimento, o protocolo da PDT se mostrou eficaz quando utilizado o tempo de incubação de 5 min e a concentração de azul de metileno de 150 µg/ml. Como nos estudos de Sousa²⁵, que avaliou a PDT em células de *C. albicans*, com diferentes concentrações de azul de metileno e em tempos de incubação de 1, 5, 10 e 20 min, ele observou que a mesma relação custo- benefício, foi mais eficaz nas concentrações de 75µg/ml e 150 µg/ml utilizando o tempo de pré- irradiação de 5 min.

Utilizando um tempo de incubação de 5 min e concentrações de azul de metileno de 100µg/ml, 150µg/ml e 50 µg/ml, Pereira et al. ⁷, Queiroga et al. ⁹ e Giroldo et al. ²³, respectivamente observaram redução significativa na viabilidade celular de espécies de *Candida albicans*.

Ao avaliar os estudos que aplicaram o azul de metileno como fotossensibilizador, observou-se uma grande carência de estudos clínicos controlados e randomizados, utilizando o tratamento antifúngico contra *Candida albicans* por meio da terapia fotodinâmica o que, apesar dos estudos em animais e *in vitro* serem muito promissores, impossibilita a indicação clínica desta terapia com base na Odontologia baseada em evidência científica. Assim, a terapia fotodinâmica ainda necessita de que estudos clínicos sejam desenvolvidos para dar-lhe uma sustentação e aplicabilidade terapêutica.

A limitação deste estudo foi o fato de utilizarmos apenas uma única espécie de *Candida* e apenas uma concentração de azul de metileno. No entanto, esta metodologia atendeu aos objetivos iniciais para o experimento. Outros trabalhos poderão ser desenvolvidos utilizando este método para avaliar o efeito da PDT contra todas as espécies de *Candida* ou em estudo clínico testando diferentes concentrações de azul de metileno e diferentes tempos de incubação.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o fotossensibilizador azul de metileno não apresentou citotoxicidade no escuro sobre *Candida albicans*, assim como a luz laser também não alterou a viabilidade celular do microorganismo, na ausência do fotossensibilizador. E que a terapia fotodinâmica diminuiu o número de UFC/ml de *Candida albicans*, apresentando efeito antifúngico satisfatório contra este microorganismo. O tempo de incubação de 5 min apresentou resultados eficazes na redução no número de log₁₀UFC/ml.

REFERÊNCIAS

- 1- Dai T, Arce VJB, Tegós GP, Hamblin MR. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrob. agents chemother.* 2011 Dec; 55 (12): 5710-5717.
2. Naglik JR, Paul L, Fidel PLJ, Odds FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. *National Institutes of Health.* 2008 June; 283 (2): 129-139.
3. Lam M, Jou PC, Lattif AA, Lee Y, Malbasa CL, Mukherjee PK, Oleinick NL, Ghannoum MA, Cooper KD, Baron ED. Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011 Jul-Aug; 87 (4): 904-9.
4. Kato TI, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegós GP, Mylonakis E, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces *in vivo* pathogenicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2013 Jan; 57 (1): 445-51.
5. Kopnopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J. dent. Res.* 2007 Nov; 86 (8):694-707.
6. Teichert MC, Jones JW, Usacheya MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. Endod.* 2002 Feb; 93 (2):155-160.
7. Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, staphylococcus aureus, and streptococcus mutans biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med. Sci.* 2011 May; 26 (3): 341-348.
8. Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-ito CY, Munin E, Jorge A. O. Photosensitization of different *candida* species by low power laser light. *J. photochem. photobiol. B.* 2006 Apr; 83 (1): 34-38.

9. Queiroga AS, Trajano VN, Lima EO, Ferreira AF, Limeira FA. J. *In vitro* photodynamic inactivation of *candida* spp. by different doses of low power laser light. Photodiagnosis photodyn. Ther. 2011 Dec; 8 (4): 332-336.
10. Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J. photochem. photobiol. B. 2007 July; 88 (1): 16-20.
11. Swanson KMJ, Petran RL, Hanlin JH. Culture methods for enumeration of microorganisms In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association; 2001. 53-62.
12. Donnely RF, Mccarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Res. Microbiol. 2008 Nov; 163 (1): 1-12.
13. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *candida* to photodynamic effects of curcumin. Lasers Surg. Med. 2011b Nov; 43 (9): 927-934.
14. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. Lasers surg. Med. 2011 Sept; 43 (7): 755-767.
15. Pereira FG, Maisch T. Photodynamic inactivation to control infections caused by *Candida albicans*. Fungal Biol. 2012 Oct; 116 (1): 1-10.
16. Ryskova L, Buchta V, Slezak R. Photodynamic antimicrobial therapy. Cent. Eur. J. Biol. 2010 Aug; 5 (4): 400-406.
17. Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, Denis TG, Ribeiro MS, Mylonakis E, Hamblin MR, Tegos GP. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. Front. Microbiol. 2012 Apr; 3 (120): 1-16.

18. Silva Martins J, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CED, Jorge AOC. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *candida albicans*. Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. Endod. 2011 Jan; 111 (1): 71-77.
19. Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyebtayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. Lasers surg. Med. 2012 Aug; 44 (6): 490-499.
20. Mang TS, Mikulski L, Sala RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *candida* species. Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2010 June; 7 (2): 98-105.
21. Lyon JP, Moreira LM, Moraes PC, Santos FV, Resende MA. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. Mycoses. 2011 Sept; 54 (5): 265-271.
22. Chien HF, Chen CP, Chen YC, Chang PH, Tsai T, Chen CY. The use of chitosan to enhance photodynamic inactivation against *candida albicans* and its drug-resistant clinical isolates. Int J Mol. Sei. 2013 Apr; 14 (4): 7.445-7.456.
23. Giroldo LM, Felipe MP, Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *candida albicans*. Lasers Med. Sci. 2009 Jan; 24 (1): 109-112.
24. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AO. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *candida albicans*. Lasers Med. Sci. 2010 May; 25 (3): 385-389.
25. Sousa, JNL. Inativação de células planctônicas de *candida albicans* empregando terapia fotodinâmica. 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Odontologia)-Universidade Cruzeiro do Sul.

Tabela 1- Comparação da média e desvio padrão do \log_{10} UFC/ml entre os grupos no tempo de pré- irradiação de 5 min.

GRUPOS	Média \pm DP (Mediana) do \log_{10} UFC/ml
Solução salina	5,51 \pm 0,67 (5,60) ^(A)
Laser	5,57 \pm 0,71 (5,69) ^(A)
AM 150 μg/ml	5,64 \pm 0,77 (5,76) ^(A)
PDT - AM 150 μg/ml	2,10 \pm 2,42 (2,04) ^(B)
Valor de p	p⁽¹⁾ = 0,019*

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Kruskal Wallis com comparações múltiplas do referido teste.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre concentrações correspondentes.

Tabela 2- Comparação da média e desvio padrão do \log_{10} UFC/mL para os grupos controles no tempo de incubação de 5 min.

TEMPO DE INCUBAÇÃO 5 MIN	
GRUPO	Média \pm DP (Mediana)
Solução Salina	5,51 \pm 0,67 (5,60) ^(A)
Laser	5,57 \pm 0,71 (5,69) ^(A)
AM	5,58 \pm 0,64 (5,69) ^(A)
Valor de p	p⁽¹⁾ >0,05

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Kruskal Wallis.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses não são iguais, comprova-se que não houve diferença significativa entre as avaliações correspondentes pelas comparações pareadas do referido teste.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização da pesquisa, foi possível observar que a terapia fotodinâmica, utilizando o azul de metileno 150µg/ml como fotossensibilizador e com um tempo de 5 minutos de pré – irradiação possui efeito antifúngico contra as células de *Candida albicans*, podendo ser um aliado eficaz no tratamento de infecções fúngicas, sendo de grande importância, principalmente para as formas resistentes de *Candida* e para os pacientes imunocomprometidos. Foi possível avaliar também que apenas o azul de metileno ou apenas o laser, não possuem nenhum efeito sobre essas células. Desta forma, a terapia fotodinâmica vem se tornando um tratamento promissor contra as diversas afecções causadas por *Candida albicans*.

ANEXO A – Normas para publicação

REVISTA DE ODONTOLOGIA DA UNESP

Instruções aos Autores

ESCOPO E POLÍTICA

A Revista de Odontologia da UNESP tem como missão publicar artigos científicos inéditos de pesquisa básica e aplicada que constituam avanços do conhecimento científico na área de Odontologia, respeitando os indicadores de qualidade.

ITENS EXIGIDOS PARA A APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

- Os artigos enviados para publicação devem ser inéditos e não ter sido submetidos simultaneamente a outro periódico. A Revista de Odontologia da UNESP reserva-se todo o direito autoral dos trabalhos publicados, inclusive tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição com a devida citação da fonte.

- Podem ser submetidos artigos escritos em português ou inglês. O texto em inglês, após aceito para publicação, deverá ser submetido a uma revisão gramatical do idioma por empresa reconhecida pela Revista.

- A Revista de Odontologia da UNESP tem publicação bimestral e tem o direito de submeter todos os artigos a um corpo de revisores, totalmente autorizados para decidir pela aceitação, ou para devolvê-los aos autores com sugestões e modificações no texto, e/ou para adaptação às regras editoriais da revista.

- Os conceitos afirmados nos trabalhos publicados são de inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do Editor Científico ou do Corpo Editorial.

- As datas do recebimento do artigo, bem como sua aprovação, devem constar na publicação.

CRITÉRIOS DE ANÁLISE DOS ARTIGOS

- Os artigos são avaliados primeiramente quanto ao cumprimento das normas de publicação e analisados em programa específico quanto a ocorrência de plágio.

- Os artigos que estiverem de acordo com as normas são avaliados por um Editor de Área, que o encaminha ao Editor Científico para uma análise quanto à adequação ao escopo e quanto a critérios mínimos de qualidade científica e de redação. Depois da análise, o Editor Científico pode recusar os artigos, com base na avaliação do Editor de Área, ou encaminhá-los para avaliação por pares.

- Os artigos aprovados para avaliação pelos pares são submetidos à análise quanto ao mérito e método científico por, no mínimo, dois revisores; mantendo-se sigilo total das identidades dos autores.

- Quando necessária revisão, o artigo é devolvido ao autor correspondente para as alterações, mantendo-se sigilo total das identidades dos revisores. A versão revisada é ressubmetida, pelos autores, acompanhada por uma carta resposta (*cover letter*), explicando cada uma das alterações realizadas no artigo a pedido dos revisores. As sugestões que não forem aceitas devem vir acompanhadas de justificativas convincentes. As alterações devem ser destacadas no texto do

artigo em negrito ou em outra cor. Quando as sugestões e/ou correções forem feitas diretamente no texto, recomendam-se modificações nas configurações do Word, para que a identidade do autor seja preservada. O artigo revisado e a carta resposta são, inicialmente, avaliados pelo Editor Científico, que os envia aos revisores, quando solicitado.

- Nos casos de inadequação da língua portuguesa ou inglesa, uma revisão técnica por um especialista é solicitada aos autores.

- Nos casos em que o artigo for rejeitado por um dos dois revisores, o Editor Científico decide sobre seu envio para a análise de um terceiro revisor.

- Nos casos de dúvida sobre a análise estatística, esta é avaliada pelo estatístico consultor da revista.

CORREÇÃO DAS PROVAS DOS ARTIGOS

- A prova final dos artigos é enviada ao autor correspondente através de *e-mail* com um *link* para baixar o artigo diagramado em PDF para aprovação final.

- O autor dispõe de um prazo de 72 horas para correção e devolução do original devidamente revisado, se necessário.

- Se não houver retorno da prova em 72 horas, o Editor Científico considera como final a versão sem alterações, e não são mais permitidas maiores modificações. Apenas pequenas modificações, como correções de ortografia e verificação das ilustrações, são aceitas. Modificações extensas implicam a reapreciação pelos revisores e atraso na publicação do artigo.

- A inclusão de novos autores não é permitida nessa fase do processo de publicação.

FORMA E PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS

Todos os manuscritos devem vir, obrigatoriamente, acompanhados da **Carta de Submissão**, do **Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição**, como também da **Declaração de Responsabilidade**, da **Transferência de Direitos Autorais** e da **Declaração de Conflito de Interesse** (documento explicitando presença ou não de conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade do trabalho científico) assinada pelo(s) autor(es) (modelos anexos). O manuscrito deve ser enviado em dois arquivos: um deles deve conter somente o título do trabalho e respectivos autores; o outro, o artigo completo sem a identificação dos autores.

PREPARAÇÃO DO ARTIGO

Deverão ser encaminhados a revista os arquivos:

1. página de identificação
2. artigo
3. ilustrações
4. carta de submissão
5. cópia do certificado da aprovação em Comitê de Ética, **Declaração de Responsabilidade**, **Transferência de Direitos Autorais** e **Declaração de Conflito de Interesse**

Página de identificação

A página de identificação deve conter as seguintes informações:

- títulos em português e em inglês devem ser concisos e refletir o objetivo do estudo.

- nomes por extenso dos autores (sem abreviatura), com destaque para o sobrenome (em negrito ou em maiúsculo) e na ordem a ser publicado; nomes da instituição aos quais são afiliados (somente uma instituição), com a respectiva sigla da instituição (UNESP, USP, UNICAMP, etc.); cidade, estado (sigla) e país (Exemplo: Faculdade de Odontologia, UNESP Univ - Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil). Os autores deverão ser de no máximo 5 (cinco). Quando o estudo for desenvolvido por um número maior que 5 pesquisadores, deverá ser enviada justificativa, em folha separada, com a descrição da participação de todos os autores. A revista irá analisar a justificativa baseada nas diretrizes do "International Committee of Medical Journal Editors", disponíveis em http://www.icmje.org/ethical_1author.html.
- endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências devem ser endereçadas, incluindo telefone, fax e *e-mail*;
- *e-mail* de todos os autores.

Artigo

O texto, incluindo resumo, *abstract*, tabelas, figuras e referências, deve estar digitado no formato *.doc*, preparado em *Microsoft Word 2007 ou posterior*, fonte *Times New Roman*, tamanho 12, espaço duplo, margens laterais de 3 cm, superior e inferior com 2,5 cm, e conter um total de 20 laudas. Todas as páginas devem estar numeradas a partir da página de identificação.

Resumo e Abstract

O artigo deve conter RESUMO e ABSTRACT precedendo o texto, com o máximo de 250 palavras, estruturado em seções: introdução; objetivo; material e método; resultado; e conclusão. Nenhuma abreviação ou referência (citação de autores) deve estar presente.

Descritores/Descriptors

Indicar os Descritores/Descriptors com números de 3 a 6, identificando o conteúdo do artigo, e mencioná-los logo após o RESUMO e o ABSTRACT.

Para a seleção dos Descritores/Descriptors, os autores devem consultar a lista de assuntos do *MeSH Data Base* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>) e os Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (<http://decs.bvs.br/>).

Deve-se utilizar ponto e vírgula para separar os descritores/descriptors, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula.

Exemplos: Descritores: Resinas compostas; dureza.

Descriptors: *Photoelasticity; passive fit*.

Introdução

Explicar precisamente o problema, utilizando literatura pertinente, identificando alguma lacuna que justifique a proposição do estudo. No final da introdução, estabelecer a hipótese a ser avaliada.

Material e método

Apresentar com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações e possibilitar sua reprodução. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes, depois da primeira citação dos produtos, instrumentos, reagentes ou equipamentos.

Métodos já publicados devem ser referenciados, exceto se modificações tiverem sido feitas. No final do capítulo, descrever os métodos estatísticos utilizados.

Resultado

Os resultados devem ser apresentados seguindo a sequência do Material e método, com tabelas, ilustrações, etc. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e de ilustrações possível.

Discussão

Discutir os resultados em relação à hipótese testada e à literatura (concordando ou discordando de outros estudos, explicando os resultados diferentes). Destacar os achados do estudo e não repetir dados ou informações citados na introdução ou nos resultados. Relatar as limitações do estudo e sugerir estudos futuros.

Conclusão

A(s) conclusão(ões) deve(m) ser coerentes com o(s) objetivo(s), extraídas do estudo, não repetindo simplesmente os resultados.

Agradecimentos

Agradecimentos às pessoas que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo e agências de fomento devem ser realizadas neste momento. Para o(s) auxílio(s) financeiro(s) deve(m) ser citado o(s) nome(s) da(s) organização(ões) de apoio de fomento e o(s) número(s) do(s) processo(s).

Ilustrações e tabelas

As ilustrações, tabelas e quadros são limitadas no máximo de 4 (quatro). As ilustrações (figuras, gráficos, desenhos, etc.), são consideradas no texto como figuras.

Devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto e indicadas ao longo do Texto do Manuscrito, logo após sua primeira citação com as respectivas legendas. As figuras devem estar em cores originais, digitalizadas em formato tif, gif ou jpg, com no mínimo 300dpi de resolução, 86 mm (tamanho da coluna) ou 180 mm (tamanho da página inteira).

As legendas correspondentes devem ser claras, e concisas. As tabelas e quadros devem ser organizadas e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto e indicadas ao longo do Texto do Manuscrito, logo após sua primeira citação com as respectivas legendas. A legenda deve ser colocada na parte superior. As notas de rodapé devem ser indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Citação de autores no texto

Os autores devem ser citados no texto em ordem ascendente

A citação dos autores no texto pode ser feita de duas formas:

Numérica : as referências devem ser citadas de forma sobrescrita.

Exemplo: Radiograficamente, é comum observar o padrão de “escada”, caracterizado por uma radiolucidez entre os ápices dos dentes e a borda inferior da mandíbula.^{6,10,11,13}

Alfanumérica

- um autor: Ginnan⁴
- dois autores: separados por vírgula - Tunga, Bodrumlu¹³

- três autores ou mais de três autores: o primeiro autor seguido da expressão et al. - Shipper et al.²
Exemplo: As técnicas de obturação utilizadas nos estudos abordados não demonstraram ter tido influência sobre os resultados obtidos, segundo Shipper et al.² e Biggs et al.⁵ Shipper et al.², Tunga, Bodrumlu¹³ e Wedding et al.¹⁸, [...]

Referências

Todas as referências devem ser citadas no texto; devem também ser ordenadas e numeradas na mesma sequência em que aparecem no texto. Citar no máximo 25 referências.

As Referências devem seguir os requisitos da *National Library of Medicine* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>).

Os títulos dos periódicos devem ser referidos de forma abreviada, sem negrito, itálico ou grifo, de acordo com o *Journals Data Base* (PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), e, para os periódicos nacionais, verificar o Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde da Bireme (<http://portal.revistas.bvs.br/?lang=pt>).

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo. Citar apenas as referências relevantes ao estudo.

Referências à comunicação pessoal, trabalhos em andamento, artigos *in press*, resumos, capítulos de livros, dissertações e teses não devem constar da listagem de referências. Quando essenciais, essas citações devem ser registradas por asteriscos- no rodapé da página do texto em que são mencionadas.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

ARTIGOS DE PERIÓDICOS

Duane B. Conservative periodontal surgery for treatment of intrabony defects is associated with improvements in clinical parameters. *Evid Based Dent.* 2012;13(4):115-6.

Litonjua LA, Cabanilla LL, Abbott LJ. Plaque formation and marginal gingivitis associated with restorative materials. *Compend Contin Educ Dent.* 2012 Jan;33(1):E6-E10.

Sutej I, Peros K, Benutic A, Capak K, Basic K, Rosin-Grget K. Salivary calcium concentration and periodontal health of young adults in relation to tobacco smoking. *Oral Health Prev Dent.* 2012;10(4):397-403.

Tawil G, Akl FA, Dagher MF, Karam W, Abdallah Hajj Hussein I, Leone A, et al. Prevalence of IL-1beta+3954 and IL-1alpha-889 polymorphisms in the Lebanese population and its association with the severity of adult chronic periodontitis. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012 Oct-Dec;26(4):597-606.

Goyal CR, Klukowska M, Grender JM, Cunningham P, Qaqish J. Evaluation of a new multi-directional power toothbrush versus a marketed sonic toothbrush on plaque and gingivitis efficacy. *Am J Dent.* 2012 Sep;25 Spec No A(A):21A-26A.

Caraivan O, Manolea H, Corlan Puşcu D, Fronie A, Bunget A, Mogoantă L. Microscopic aspects of pulpal changes in patients with chronic marginal periodontitis. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(3 Suppl):725-9.

LIVROS

Domitti SS. Prótese total articulada com prótese parcial removível. São Paulo: Santos; 2001.

Todescan R, Silva EEB, Silva OJ. Prótese parcial removível : manual de aulas práticas disciplina I. São Paulo: Santos ; 2001.

Gold MR, Siegal JE, Russell LB, Weintein MC, editors. Cost-effectiveness in health and medicine. Oxford: Oxford University Press; 1997.

PRINCÍPIOS ÉTICOS E REGISTRO DE ENSAIOS CLÍNICOS

- Procedimentos experimentais em animais e em humanos

Estudo em Humanos: Todos os trabalhos que relatam experimentos com humanos, ou que utilizem partes do corpo ou órgãos humanos (como dentes, sangue, fragmentos de biópsia, saliva, etc.), devem seguir os princípios éticos estabelecidos e ter documento que comprove sua aprovação (protocolo e relatório final) por um Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (registrado na CONEP) da Instituição do autor ou da Instituição em que os sujeitos da pesquisa foram recrutados, conforme Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Estudo em animais: Em pesquisas envolvendo experimentação animal, é necessário que o protocolo e seu relatório final tenham sido aprovados pelo Comitê de Pesquisa em Animais da Instituição do autor ou da Instituição em que os animais foram obtidos e realizado o experimento.

O Editor Científico e o Conselho Editorial se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem evidência clara de que esses princípios foram seguidos ou que, ao seu julgamento, os métodos empregados não foram apropriados para o uso de humanos ou de animais nos trabalhos submetidos a este periódico.

Ética na Pesquisa: a Revista de Odontologia da UNESP preza durante todo o processo de avaliação dos artigos pelo mais alto padrão ético. Todos os Autores, Editores e Revisores são encorajados a estudarem e seguirem as orientações do Committee on Publication Ethics - COPE (<http://publicationethics.org>, http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011.pdf, http://publicationethics.org/files/International%20standard_editors_for%20website_11_Nov_2011.pdf) em todas as etapas do processo. Nos casos de suspeita de má conduta ética, está será analisada pelo Editor chefe que tomará providências para que seja esclarecido. Quando necessário a revista poderá publicar correções, retratações e esclarecimentos.

Casos omissos nestas normas são resolvidos pelo Editor Científico e pela Comissão Editorial.

ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES DE MEDIDA

Para unidades de medida, devem ser utilizadas as unidades legais do Sistema Internacional de Medidas.

MEDICAMENTOS E MATERIAIS

Nomes de medicamentos e de materiais registrados, bem como produtos comerciais, devem aparecer entre parênteses, após a citação do material, e somente uma vez (na primeira).

Editor Chefe

Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

E-mail: adriana@foar.unesp.br

O artigo para publicação deve ser enviado exclusivamente pelo link de submissão online:
<http://www.scielo.br/rounosp>