



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**ENGENHARIA MECÂNICA**

**“AÇÃO FOTOTÓXICA DO LASER EM BAIXA  
INTENSIDADE E DIODO DE EMISSÃO DE LUZ (LED) NA  
VIABILIDADE DO FUNGO *Trichophyton rubrum*: ESTUDO “*IN  
VITRO*”**

**JOSÉ CLÁUDIO FARIA AMORIM**

Belo Horizonte, 04 de julho de 2007.

José Cláudio Faria Amorim

**“AÇÃO FOTOTÓXICA DO LASER EM BAIXA  
INTENSIDADE E DIODO DE EMISSÃO DE LUZ (LED)  
NA VIABILIDADE DO FUNGO *Trichophyton rubrum*:  
ESTUDO “IN VITRO”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Calor e Fluidos

Linha de Pesquisa: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa

Departamento de Engenharia Mecânica

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2007

## **COLABORADORES**

Laboratório de Bioengenharia da UFMG

Laboratório de Micologia da UFMG (Departamento de Microbiologia)

Laboratório de Física da UFMG

Centro de Lasers e suas Aplicações IPEN-SP

**A Deus, sempre presente em minha vida.**

**Ao meu pai embora longe de minha vida  
terrena sempre presente nela espiritualmente.**

**A minha mãe exemplo de fé, força e amor.**

**A minha esposa Marina e filha Sabrina pelo  
incentivo, dedicação e apoio**

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marcos Pinotti pela oportunidade de poder interagir em uma área abrangente como a Bioengenharia. As suas interpretações objetivas me fizeram desenvolver um raciocínio mais lógico das questões do dia a dia contribuindo para meu desenvolvimento profissional.

Ao Professor Dr. Roberto Márcio de Andrade pelo incentivo e amizade durante o transcorrer do curso de doutorado. Ensinou conceitos que colaboraram para o desenvolvimento e término deste trabalho.

A Betânia Maria Soares por me ajudar em todas as fases deste trabalho e compartilhar seus conhecimentos de forma simples e objetiva.

Aos colegas Gerdal Roberto de Sousa, Lívio de Barros Silveira e Marcus Vinícius Lucas Ferreira pelo engrandecimento de nossa amizade e companherismo.

Ao Reitor da Universidade de Itaúna, Dr. Faíçal David Freire Chequer, pelo incentivo e ajuda que me permitiram realizar o doutorado.

Aos colegas da Clínica Integrada da FOUJ pelo apoio dispensado em minha ausência.

Ao colega Renato Prates pela colaboração nos pilotos deste trabalho.

A Walquíria Lopes Borges no preparo dos materiais para os experimentos.

Ao Danilo Nagem e Cláudio Henrique Gerken Dias pelo auxílio nas fotografias

Ao Fabrício Carvalho, Ivan Rodrigues de Andrade Lourenço, Claysson Vimieiro e Sara Del Vecchio pelo auxílio na realização dos cálculos envolvidos no trabalho.

A Maria Cecília Berger pela ajuda na confecção das tabelas e fotos.

A ECCO FIBRAS (São Paulo-Brasil) pelo laser cedido.

A MMOPTICS (São Paulo-Brasil) pelo LED cedido.

# SUMÁRIO

Lista de Figuras	7
Lista de Quadros	9
Lista de Gráficos	10
Lista de Tabelas	11
Lista de Símbolos e Unidades	12
Resumo	14
1. Introdução	15
2. Objetivos	21
3. Revisão de Literatura	22
3.1. Base Científica da Terapia Fotodinâmica	22
3.1.1. Histórico	22
3.1.2. Mecanismos de interação	24
3.1.3. Efeitos fototóxicos da PDT	26
3.1.4. Fotossensibilizadores	28
3.1.5. Efeitos fungicidas da terapia fotodinâmica	30
3.2. Dermatofitos e dermatofitose	36
3.2.1. <i>Trichophyton rubrum</i>	37
3.2.2. Manifestações clínicas	37
3.2.3. Onicomicose	38
3.2.4. Tratamento das onicomicoses	38
3.2.5. Tratamento tópico	39
3.2.6. Tratamento sistêmico	39
3.2.7. Falhas terapêuticas	40
4. Materiais e Métodos	42
4.1 Detalhamento dos materiais	44
4.2 Detalhamento dos métodos	49
4.2.1 Preparo do inóculo	50
4.2.2 Procedimento de teste	52
4.2.3 Cálculo da área e volume de suspensão irradiada	54
4.2.4 Análise estatística	59

5. Resultados e Discussão	61
6. Conclusões	68
Abstract	69
Referências Bibliográficas	70
Anexo A	A.1
A.1 Laser	A.1
A.2 Laser de baixa intensidade	A.2
Anexo B	B.1
B.1 LED	B.1
Anexo C	C.1
C.1 Cálculo da área e do volume das imagens dos grupos 5 e 6	C.1

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1- Diagrama de Jablonski modificado de Wainwright	25
FIGURA 3.2- Estrutura molecular do Azul de Metileno e do Azul de Toluidina	29
FIGURA 4.1- Diagrama da metodologia	43
FIGURA 4.2- Equipamento laser de baixa intensidade	44
FIGURA 4.3- Equipamento LED	45
FIGURA 4.4- Unidade de Leitura de Potência Luminosa	45
FIGURA 4.5- Espectrofotômetro - MICRONAL B542	46
FIGURA 4.6- Vórtex Biomatic	46
FIGURA 4.7- Fotossensibilizador Azul de Toluidina (TBO)	47
FIGURA 4.8- Amostra de referência ATCC 40051 de <i>T. rubrum</i>	47
FIGURA 4.9- Transferência dos conídios e fragmentos de hifas para o tubo de ensaio	51
FIGURA 4.10- Microscopia óptica da absorção do corante pelas células fúngicas após a TPI	53
FIGURA 4.11- Irradiação pelas fontes de luz do fundo para a abertura do tubo	53
FIGURA 4.12- Colônias de <i>T. rubrum</i> repicadas em placas de Petri	54
FIGURA 4.13- Dados dimensionais do tubo de ensaio	55
FIGURA 4.14- Baseline da água sendo irradiada pelo LED e laser	55
FIGURA 4.15- (a) Amostra do grupo 6 sendo irradiada pelo laser e (b) Amostra do grupo 5 sendo irradiada pelo LED	56
FIGURA 4.16- (a) Conversão da imagem para tons de cinza do grupo 6 e (b) Conversão da imagem para tons de cinza do grupo 5	57
FIGURA 4.17- Imagem processada onde a área irradiada pelo laser foi de 15,1 mm <sup>2</sup> sendo que a escala de cores representa a intensidade de luz em cada região irradiada	57
FIGURA 4.18- Imagem processada onde a área irradiada pelo LED foi de 52,2 mm <sup>2</sup> sendo que a escala de cores representa a intensidade de luz em cada região irradiada	58
FIGURA 4.19- (a) Esquema do tubo de ensaio do volume irradiado pelo Laser e (b) Esquema do tubo de ensaio do volume irradiado pelo LED	58

FIGURA 4.20- Sólido gerado pela revolução da curva para o laser	59
FIGURA 4.21- Sólido gerado pela revolução da curva para o LED	59
FIGURA 5.1- Placas de Petri com colônias de <i>T.rubrun</i> dos grupos 1 (a) e 4 (b)	61
FIGURA 5.2- Placas de Petri dos grupos 2 (a) e 3(b)	61
FIGURA 5.3- Placas de Petri dos grupos 5 (a) e 6 (b)	62
FIGURA B.1- Modelo de formação de um LED	B.1
FIGURA C.1- (a) Área/laser=15,1 mm <sup>2</sup> e (b) Área/LED=52,2 mm <sup>2</sup>	C.1
FIGURA C.2- Imagens originais do tubo sendo irradiado pelo laser à esquerda (a) e pelo LED à direita (b). Em destaque a área de corte	C.2
FIGURA C.3- Esquema do procedimento para criação do sólido que forneceu o valor numérico do volume	C.3

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 3.1- Caminhos fototóxicos da PDT	27
QUADRO 3.2- Principais fotossensibilizadores utilizados em PDT com suas bandas de absorção	29
QUADRO 4.1- Grupos do experimento	52

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 4.1- Espectroscopia de absorção óptica do fotossensibilizador, Azul de Toluidina 25µg/mL No eixo Y encontra-se a absorção normalizada do corante em unidades arbitrárias e no eixo X a porção visível do espectro eletromagnético em nanômetros. 49
- GRÁFICO 4.2- Espectroscopia de absorção óptica da suspensão de *Trichophyton rubrum* em salina. No eixo Y encontra-se a absorção normalizada do corante em unidades arbitrárias e no eixo X a porção visível do espectro eletromagnético em nanômetros. 50
- GRÁFICO 4.3- Espectroscopias do fotossensibilizador Azul de Toluidina (TBO) na concentração de 25µg/ mL, de *Trichophyton rubrum* isoladamente e de *Trichophyton rubrum* associado ao Azul de Toluidina (TBO) 25µg/ mL. No eixo Y encontra-se a absorção normalizada do corante em unidades arbitrárias e no eixo X a porção visível do espectro eletromagnético em nanômetros. 51
- GRÁFICO 5.1- Avaliação descritiva da média percentual de crescimento em relação ao controle considerando-se os 3 experimentos 64

## **LISTA DE TABELAS**

- TABELA 5.1- Avaliação descritiva do percentual de colônias viáveis em relação ao controle considerando-se cada experimento 63
- TABELA 5.2- Resultado da análise de variância da influência dos fatores de interesse na avaliação do percentual de colônias viáveis em relação ao controle 64

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

LASER = amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

LED = diodo emissor de luz

TBO = azul de toluidina

MB = azul de metileno

nm = nanômetro

mW = miliwatt

mW/cm<sup>2</sup> = miliwatt por cm<sup>2</sup>

HeNe = hélio-neônio

CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono

I = intensidade

W = watt

s = segundo

J = joules

g = grama

L = litro

°C = graus celsius

J/cm<sup>2</sup> = joules por centímetro quadrado

μm = micrometro

λ = comprimento de onda

PDT = terapia fotodinâmica

EROs = espécies reativas de oxigênio

DNA = ácido desoxiribonucléico

ATP = trifosfato de adenosina

HIV = imunodeficiência adquirida

HPD = derivado de hemato-porfirina

PpIX = protoporfirina IX

FDA = administração americana de alimentos e drogas

HO = hidroxila

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

μg/mL = microgramas por mililitro

TPI = tempo de pré-irradiação

ALA = ácido 5 amino-levulínico

® = formulação comercial

$\mu\text{M}$  = micromolar

Ab-TBO = conjugado anticorpo-azul de toluidina

LPS = lipopolissacarídeos

AsGa = arseneto de gálio

AsGaAl = arseneto de gálio alumínio

p/v = por volume

CLSI = instituto de padronizações clínicas e laboratoriais

$\varnothing$  = diâmetro

d.p = desvio padrão

## RESUMO

O efeito do laser em baixa intensidade emitindo no vermelho do espectro eletromagnético com comprimento de onda de 660nm, 100mW de potência média de saída e tempo de 3 minutos foi comparado com LED em baixa intensidade emitindo no vermelho com comprimento de onda de 630nm, 100mW de potência média de saída e tempo de 3 minutos, associado ao fotossensibilizador Azul de Toluidina com uma concentração de 25µg/mL em uma amostra do fungo *Trichophyton rubrum* sendo realizado em triplicata. As espectroscopias do corante azul de toluidina (TBO), do fungo *Trichophyton rubrum*, assim como o cálculo do volume e da área de suspensão do inóculo associado ao fotossensibilizador e irradiada pelo laser e LED nos tubos de ensaio foram analisados. O corante TBO (25µg/mL) foi o escolhido devido a sua ressonância com os comprimentos de onda do laser e LED e por ser bem absorvido pelas células fúngicas mostrando-se promissor para sua utilização “*in vivo*”. Foi obtido um volume final de suspensão de 1000µL sendo analisados seis grupos: grupo 1 (controle de crescimento sem tratamento), grupo 2 (suspensão do inóculo submetida à irradiação com LED), grupo 3 (suspensão do inóculo submetida à irradiação com laser), grupo 4 (100 µL de TBO acrescentados a 900 µL do inóculo), grupo 5 (100 µL de TBO foram acrescentados a 900 µL do inóculo e realizada irradiação com LED) e grupo 6 (100 µL de TBO foram acrescentados a 900 µL do inóculo e realizada irradiação com laser). Com exceção do grupo 1, todos os outros grupos foram irradiados por três minutos sendo para os grupos 4, 5 e 6, estabelecido o tempo de pré-irradiação (TPI) de 5 minutos para absorção do corante pelas células fúngicas. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos 5 e 6 (PDT) com redução de 68,1% e 56% respectivamente, quanto ao número de colônias viáveis sendo que o LED por apresentar uma divergência maior que a luz laser, abrangeu um volume maior de suspensão do inóculo mostrando-se mais eficiente na sua ação fototóxica.

**Palavras chaves:** *Trichophyton rubrum*, PDT, LASER, LED.

# 1. INTRODUÇÃO

O *Trichophyton rubrum* é um fungo cosmopolita, sendo o mais implicado em quadros de dermatofitose humana segundo a literatura científica. Sua transmissão é principalmente inter-humana ou por fômites contaminados. Clinicamente é responsável por quase todos os tipos de infecção dermatofítica humana, estando muitas vezes correlacionados com o fato de serem refratários ao tratamento estabelecido, em razão de sua maior facilidade de burlar as defesas inatas do hospedeiro e permanecer como uma infecção residual, com exacerbações clínicas eventuais. É um fungo ubiqüitário, não havendo área ou grupo de pessoas que se encontrem totalmente isolados de tal microrganismo. Têm a capacidade de invadir tecidos ceratinizados (pele, pêlos e unhas) de homens e animais, produzindo condições patológicas (COSTA *et al.*, 2002).

A onicomicose é uma doença multifatorial. A faixa etária do paciente tem exercido importante efeito em sua ocorrência, com correlação entre o aumento da idade e da infecção. Estudos observaram que a genética é um fator que governa a epidemiologia da onicomicose e a doença causada pelo *T. rubrum* apresenta um padrão familiar. Tem sido observada a associação entre a ocorrência de onicomicose e o estilo de vida do paciente. Diabetes, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e doenças arteriais periféricas são fatores predisponentes para a instalação desta infecção fúngica. Como qualquer doença infecciosa, um diagnóstico correto e precoce é imprescindível para a escolha do tratamento adequado. Estudos revelam que as espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* estão envolvidos em mais de 90% das onicomicoses (FAERGEMANN E BARAN, 2003).

O tratamento das onicomicoses representa uma das principais dificuldades terapêuticas encontradas na prática clínica, em razão de algumas particularidades: as unhas são estruturas não-vascularizadas o que explica a pequena penetração dos medicamentos utilizados por via sistêmica e o crescimento das unhas se faz de maneira lenta (5 a 6 meses nas unhas das mãos e 12 a 18 meses nas unhas dos pés). Portanto, as dermatofitoses das unhas dos pés são mais rebeldes ao tratamento que as das mãos (SIDRIM E MOREIRA, 1999).

O tratamento tópico com amorolfina e ciclopiroxolamina produz poucos efeitos adversos sistêmicos e não faz interação com outras drogas sistêmicas utilizadas

pelo paciente, porém, em monoterapia, está indicada apenas para onicomicoses superficiais com comprometimento inferior a 50% da lâmina ungueal e para pacientes nos quais a medicação sistêmica está contra-indicada (LECHA, 2001; BALLESTÉ *et al.*, 2003).

Os antifúngicos sistêmicos classicamente empregados no tratamento das onicomicoses são a griseofulvina e o cetoconazol que apresentam efeitos adversos como: cefaléia, hipersensibilidade e eritema. Interagem com outras drogas (anticoagulantes orais e fenobarbital) acelerando seu metabolismo e diminuindo sua biodisponibilidade (LLAMBRICH E LECHA, 2002; BALLESTÉ *et al.*, 2003). Por volta de 1990 foram substituídos por itraconazol, fluconazol e terbinafina, que apresentam melhores resultados em menor tempo, maior segurança para o paciente embora apresentando ainda efeitos colaterais (BALLESTÉ *et al.*, 2003).

De acordo com Ribeiro e Zezell (2004), o tratamento fotodinâmico (PDT) é estudado pela Medicina em várias modalidades terapêuticas. Na Oncologia, o tratamento dos tumores malignos com o uso do laser tem mostrado bons resultados. As primeiras experiências com o tratamento fotodinâmico datam de aproximadamente 100 anos, relatadas por Raab, que observou que a exposição ao corante alaranjado de acridina associado à luz pode ser letal para protozoários como o paramécio. Além disso, sugeriu que este efeito era causado pela transferência de energia da luz para a substância química, similarmente ao que ocorre nas plantas, com a absorção da luz pela clorofila. Nem a luz nem o corante isoladamente tiveram qualquer efeito aparente sobre os paramécios, mas, associados, foram altamente citotóxicos. Os dois autores citados anteriormente afirmaram que outros pesquisadores tentaram destruir células tumorais, pela exposição à radiação X, associada ao corante hematoporfirina. Entretanto, esse procedimento não obteve sucesso, demonstrando que a fonte de luz deve interagir com o corante.

A PDT representa um complexo sistema de fototerapia que requer a presença de três fatores que interagem concomitantemente: corante (agente fotossensibilizador), uma fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nem o fotossensibilizador, nem a luz tem a capacidade de produzir efeito deletério ao sistema biológico alvo. O mecanismo de ação se dá por dois tipos de reações físico-químicas: Reação do tipo I e reação do tipo II (MELLO *et al.*, 2001; ALLISON *et al.*, 2004).

Segundo Konan *et al* 2002, o efeito fotodinâmico tem seu início quando a molécula do corante absorve a luz irradiada saindo do seu estado de repouso

(fundamental) assumindo um estado mais energético, porém, menos estável chamado estado singlete. Devido à grande instabilidade deste nível de energia, a molécula tem um tempo de vida muito curto (em água é cerca de 4,0 $\mu$ s, MACHADO, 2000) e tende a voltar para um nível de energia mais baixo ou mesmo retornando ao seu estado de repouso (reação do tipo I). Nesta transição, o excesso de energia pode ser transferido ao substrato de várias maneiras: por meio de fluorescência (espontâneo), onde o fotossensibilizador emite energia em forma de fótons, por conversão interna ou também pode passar a um nível intermediário (reação do tipo II), chamado estado tripleto, situado entre o estado de repouso e o estado singlete apresentando um tempo de vida um pouco mais longo. A curta meia vida do oxigênio singlete, mais uma vez, assegura a reação localizada. Os processos do tipo II são geralmente aceitos como os maiores caminhos na lesão da célula microbiana. Como na reação do tipo I discutida acima, o oxigênio singlete também reagirá com as moléculas envolvidas na manutenção e estrutura da parede da célula/membrana, tais como os fosfolipídeos, os peptídeos e os esteróis.

Como a maioria das bactérias e fungos em geral não absorvem a luz visível de alguns lasers que operam com baixa potência e LEDs (Diodos de emissão de luz), a utilização de um agente de absorção óptica que se fixe à parede celular atraindo para si a luz laser / LED no momento da irradiação é essencial para que ambos tenham ação antimicrobiana. Portanto, o fotossensibilizador funciona como um agente de absorção óptica, devendo ser ressonante com o comprimento de onda da fonte de luz utilizada bem como, não apresentar efeitos tóxicos aos tecidos (ZANIN *et al.*, 2002; ZANIN E GONÇALVES., 2003). Ao selecionar-se um determinado fotossensibilizador para uso em terapia fotodinâmica, o espectro de absorção óptica, ou seja, os comprimentos de onda nos quais este fotossensibilizador é capaz de absorver é uma das primeiras características que devem ser analisadas, pois, conforme mencionado anteriormente, é necessário que o cromóforo (qualquer substância capaz de absorver luz) absorva a energia da fonte de luz para poder então passar pelo processo de transição eletrônica que possibilita sua ação fotodinâmica. Sendo assim, conhecendo-se a faixa do espectro eletromagnético na qual este composto absorve luz, é possível escolher a fonte de ativação adequada para obtenção do efeito fotodinâmico (RIBEIRO E GROTH, 2005).

Allison *et al.* (2004) formularam as diretrizes e características ideais que o fotossensibilizador deve apresentar para maximizar o efeito fotodinâmico da terapia. Devem apresentar eficiência fotoquímica, ser biologicamente estável, provocar

toxicidade mínima aos tecidos, ser de fácil eliminação, não provocar mutagenicidade, ser de fácil ativação, administração e ter ação localizada.

Os corantes Azul de Toluidina (TBO) e Azul de Metileno (MB) associado ao laser de He-Ne apresentaram bons resultados na redução microbiana de diversas culturas de bactérias e fungos demonstrando a importância da ressonância entre os corantes e o comprimento de onda ( $\lambda$ ) emitido pela fonte de luz (DOBSON E WILSON 1992).

A concentração do corante é outro fator de relevância para o sucesso da reação fotodinâmica. Devem ser utilizadas concentrações não tóxicas, ou seja, a concentração escolhida não deverá produzir danos ao alvo antes da ativação pela fonte de luz (toxicidade no escuro). As concentrações utilizadas variam de um fotossensibilizador para outro de acordo com as características químicas de cada composto e de sua toxicidade. As concentrações típicas utilizadas em PDT antimicrobiana são da ordem de  $\mu\text{g/ml}$  (REYS, 2004).

O tempo de pré-irradiação (TPI), que significa o tempo decorrido entre a aplicação do corante no alvo e sua ativação pela fonte de luz, varia de acordo com a interação desejada. A morfologia microbiana pode variar com as espécies levando as diferenças na localização do fotossensibilizador. Além disso, o tempo necessário para a absorção do corante antes da iluminação pode ser importante (WAINWRIGHT, 1998). Para a PDT anti-neoplásica, o fotossensibilizador é aplicado por via endovenosa e o tempo de pré-irradiação pode chegar a 48 horas. Nas aplicações tópicas da PDT, principalmente a antimicrobiana, espera-se que o corante una-se ao microorganismo ou mesmo chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular, localizando-se no citoplasma da célula num tempo de 1 a 10 minutos. Espera-se também que durante esse período, antes da ativação pela fonte de luz, que o fotossensibilizador não sofra degradação (RIBEIRO E GROTH, 2005).

O fato de a fotossensibilização ser localizada é vantajoso em um aspecto: é possível matar bactérias e fungos presentes numa infecção mista. No entanto, as bactérias comensais e os tecidos do hospedeiro podem ser afetados. Algumas receitas terapêuticas usadas para infecções orais (antibióticos sistêmicos) eliminam tanto os microorganismos patogênicos quanto os comensais indiscriminadamente rompendo o ecossistema natural da cavidade oral. Portanto, é importante desenvolver um tratamento que possa especificamente atingir o microorganismo patogênico sem provocar qualquer efeito colateral no tecido do hospedeiro (BHATTI *et al.*, 2000). De acordo com Chan e

Lai (2003), a PDT é aplicada clinicamente apenas em áreas teciduais com doença porque a ação fotodinâmica se dá apenas onde o corante foi aplicado juntamente com a incidência da irradiação luminosa, portanto, tendo o seu efeito bem localizado evitando-se desta maneira, as super dosagens e também a probabilidade dos efeitos colaterais associados à administração sistêmica de agentes antimicrobianos.

As primeiras fontes de energia utilizadas na PDT eram lâmpadas convencionais emitindo luz não coerente e policromática (luz branca) nas quais podiam ser acoplados filtros coloridos para obtenção de determinados comprimentos de onda. As lâmpadas convencionais apresentam um forte componente térmico associado e devido às características de luz não coerente, o cálculo da dose era difícil tendo como maior vantagem o baixo custo das lâmpadas. Com o advento dos lasers de diodo de baixa intensidade (anexo A), estes passaram a ser utilizados devido às suas próprias características como a monocromaticidade e a coerência, facilitando a associação com um corante de banda de absorção ressonante ao comprimento de onda emitido pelo laser. Por emitirem em baixas intensidades de potência, esses lasers não apresentam componente térmico mensurável associado. A dose de radiação é facilmente calculada, a área de irradiação pode ser bem controlada focalizando o tratamento. A luz pode ser transmitida por fibra óptica e estas fibras podem receber adaptações para melhor acessar a área alvo, como microlentes e difusores (ACKROYD *et al.*, 2001; GARCEZ, 2006; RIBEIRO E ZECELL, 2004).

Diversos tipos de lasers com diferentes meios ativos como o de argônio, de corantes, de vapores de metais, hélio-neônio e os de diodos semi-condutores foram utilizados ao longo dos anos. O importante na terapia fotodinâmica é a capacidade de excitar o fotossensibilizador em seu alvo com um foto-efeito mínimo sobre o tecido adjacente. Na PDT é utilizado o laser e o LED em baixa intensidade emitindo no espectro do vermelho por serem bem absorvidos pelos tecidos biológicos do que lasers em alta intensidade. A fotodestruição microbiana é mais alcançada com potências da ordem de  $W/cm^2$ , do que por dezenas de watts. Vale destacar que os efeitos obtidos por esta terapia não são por incrementos de temperatura, e sim por reações fotoquímicas entre fotossensibilizador, luz e o substrato. Mantendo-se a mesma dose (fluência –  $J/cm^2$ ), pode-se variar a densidade de potência ( $W/cm^2$ ) ou o tempo de exposição (s), no entanto, uma potência alta sobre um curto período de tempo (s) pode oferecer resultados diferentes em termos de destruição microbiana, do que com potência baixa aplicado por

um período mais longo, embora a dosagem de luz ( $J/cm^2$ ) tenha sido a mesma em cada caso (KONIG *et al.*, 2000; RIBEIRO E GROTH, 2005).

Uma fonte de luz alternativa para a PDT são os LEDs (Anexo B), que também podem ser utilizados com sucesso como fontes de ativação em terapia fotodinâmica, apresentando um baixo componente térmico e luz monocromática, com banda estreita de comprimentos de onda (WALSH, 2003). LEDs são diodos especiais que emitem luz quando conectados a um circuito. A diferença básica entre laser e LED é que nestes predomina o mecanismo da emissão espontânea de radiação e nos lasers, a emissão estimulada. Dessa distinção básica decorrem as diferenças estruturais entre os dois dispositivos e que nem sempre são acentuadas, decorrendo diferenças funcionais que dão aos lasers um desempenho geralmente superior, porém, mais caro. Os lasers precisam de grande quantidade de energia para sua geração, enquanto os LEDs necessitam de pouca energia para a geração de luz. Entre os dispositivos utilizados como fonte de luz, os LEDs são os mais simples. Apresentam um largo espectro de luz não coerente e apresentam uma divergência maior, diferentemente dos lasers. Embora seja uma fonte de luz divergente e não coerente semelhante à luz halógena, apresentam um espectro de emissão bem mais estreito, tendo um aproveitamento bem melhor que à luz halógena (STHAL *et al.*, 2000).

Fatores tais como: interações farmacológicas, resistência fúngica e a não adesão do paciente ao tratamento das onicomicoses também são razões que podem explicar as possíveis falhas terapêuticas utilizando drogas antifúngicas (SIDRIM E MOREIRA, 1999). Portanto, os estudos relacionados à terapia fotodinâmica devem ser incentivados devido à extrema importância do estabelecimento de novos métodos que possam reduzir o número de pessoas acometidas por onicomicose, representando melhora à saúde pública e à qualidade de vida destes pacientes.

## 2. OBJETIVOS

1. Analisar a susceptibilidade “*in vitro*” do *Trichophyton rubrum* frente à terapia fotodinâmica (PDT).
2. Comparar os resultados obtidos pela PDT utilizando-se laser em baixa intensidade emitindo no vermelho do espectro eletromagnético com comprimento de onda de 660nm, 100mW de potência média de saída e tempo de 3 minutos, com LED em baixa intensidade emitindo no vermelho com comprimento de onda de 630nm, 100mW de potência média de saída e tempo de 3 minutos.
3. Avaliar, por meio de espectroscopia, se a banda de absorção do Azul de Toluidina (25µg/mL), do fungo *Trichophyton rubrum* e da suspensão do fungo associada ao corante Azul de Toluidina são ressonantes com o comprimento de onda dos equipamentos utilizados na pesquisa.
4. Calcular a área e o volume de suspensão irradiada pelo laser e LED nos tubos de ensaio referentes aos grupos da PDT.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Base científica da terapia fotodinâmica

Por ser ainda uma terapia não muito conhecida, é oportuno esclarecer aos leitores sobre o seu complexo mecanismo de interação com os microorganismos. Deve-se ressaltar que a PDT moderna teve início em 1970 para tratamento de neoplasias. A partir da década de 90 os estudos em bactérias começaram a se intensificar principalmente com Dobson e Wilson (1992) e mais recentemente trabalhos em fungos começaram a ser realizados.

#### 3.1.1 Histórico

O uso da luz como agente terapêutico vem desde a antiguidade. Ela foi usada no Egito, Índia e China para tratar doenças da pele, como psoríase, vitiligo e o câncer com a exposição do paciente ao sol. Os gregos antigos empregavam a exposição total do corpo ao sol para a restauração da saúde, terapia essa denominada pelo filósofo grego Heródoto como Helioterapia (ACKROYD *et al.*, 2001).

As primeiras experiências com a terapia fotodinâmica datam de aproximadamente, 100 anos atrás, sendo o primeiro artigo científico publicado por Marcacci em 1888, mas ainda com poucos dados de observação. Já no ano de 1900, Oscar Raab e Von Tappeiner estudaram a ação do corante acridina sobre culturas de paramécios. Eles verificaram o aumento da toxicidade deste corante laranja no paramécio provocado pelo aumento da intensidade luminosa durante uma tempestade de raios, levando-os a concluir que as condições de luz no ambiente durante os experimentos poderiam alterar o resultado das pesquisas. Eles postularam que este efeito era causado pela transferência da energia luminosa dos raios para a substância química (corante), similar ao que ocorre nas plantas com a absorção da luz pela clorofila (ACKROYD *et al.*, 2001; SCHABERLE, 2002).

O primeiro relato da administração sistêmica de fotossensibilizadores em humanos foi realizado em 1900, por Prime, um neurologista francês, que usou oralmente a eosina utilizada no tratamento de epilepsia induzindo à dermatite nas áreas

da pele expostas ao sol. Esta descoberta levou à primeira aplicação tópica da eosina com exposição à luz branca para tratar tumores cutâneos, realizada por Von Tappeiner e o dermatologista Jesionek. O prêmio Nobel de 1903 foi designado ao físico dinamarquês Niels Finsen, devido ao seu trabalho de fototerapia. Finsen descobriu que o tratamento com luz poderia controlar manifestações de tuberculose cutânea, uma doença muito comum na ocasião. Obteve, também, sucesso no tratamento da varíola, usando a luz vermelha, o que preveniu a supuração das pústulas (ACKROYD *et al.*, 2001; ALLISON *et al.*, 2004).

Em 1907, Von Tappeiner juntamente com Jodlbauer, demonstraram a necessidade do oxigênio nas reações fotossensibilizantes, introduzindo o termo “ação fotodinâmica” para descrever este fenômeno (ACKROYD *et al.*, 2001). Também, na virada do século XX, após décadas de experimentações sobre os efeitos da pigmentação dos corantes de anilina sobre células animais e microbianas, Paul Ehrlich formulou o princípio da seletividade, trabalho no qual estabeleceu os fundamentos da quimioterapia moderna (WAINWRIGHT, 1998).

Estes estudos continuaram a partir da metade do século XX quando Schwartz, Winkelman e Lipson publicaram uma série de artigos demonstrando que fotossensibilizadores derivados de hematoporfirinas (HPD) poderiam ser usados para detectar tumores por fluorescência. A PDT moderna iniciou em meados de 1970 tendo como grande nome o cientista Thomas J. Dougherty, que descobriu o potencial das hematoporfirinas para tratamento de neoplasias (SCHABERLE, 2002).

Em 1972, Lancet e Diamond tentaram destruir células tumorais com associação de hematoporfirinas com o raio X, entretanto, o uso do raio X como fonte de energia para ativação não foi capaz de provocar nenhum efeito deletério sobre as células tumorais, demonstrando que a fonte de luz deve ser ressonante com a absorção do corante (ACKROYD *et al.*, 2001).

Em 1976, Weishaupt e colaboradores postularam que o oxigênio singlete, gerado a partir da transferência de energia do agente fototerapêutico no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular no estado fundamental, era o agente citotóxico responsável pela desativação de células tumorais. Embora a PDT tenha sido originalmente desenvolvida visando a terapia do câncer em suas diversas formas é claro seu grande potencial no que concerne a outras moléstias. Nesse contexto incluem-se a psoríase, onde se tem atingido resultados bastante promissores, degeneração macular da retina, condições autoimunes, arteriosclerose, remoção de verrugas na laringe,

tratamento de micoses fungóides e destruição de bactérias resistentes a tratamentos tradicionais à base de antibióticos (MACHADO, 2000).

Nas últimas décadas, diversos autores se voltaram para o primeiro estudo de Raab, investigando a eliminação de microorganismos pela terapia fotodinâmica. A PDT com finalidade antimicrobiana encontra-se bem estabelecida na literatura, com sua ação sobre diferentes bactérias e vírus, principalmente em casos de infecções localizadas (RIBEIRO E GROTH, 2005).

### 3.1.2 Mecanismos de interação

A PDT representa um complexo sistema de fototerapia que requer a presença de três fatores que interagem concomitantemente: corante (agente fotossensibilizador), uma fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nem o fotossensibilizador, nem a luz, tem a capacidade de produzir efeito deletério ao sistema biológico alvo. O mecanismo de ação se dá por dois tipos de reações físico-químicas: Reação do tipo I e reação do tipo II (MELLO *et al.*, 2001; ALLISON *et al.*, 2004).

- Reação do tipo I:

Nesta reação, o fotossensibilizador sofre degradação, levando-o a uma transformação química, que resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs – Peróxido de hidrogênio, íons hidroxila, radicais hidroxila, ânion superóxido entre outros), que são tóxicas ao microorganismo.

Segundo Konan *et al* 2002, o efeito fotodinâmico tem seu início quando a molécula do corante absorve a luz irradiada saindo do seu estado de repouso (fundamental), assumindo um estado mais energético, porém menos estável chamado estado singleto. Devido a grande instabilidade deste nível de energia, a molécula tem um tempo de vida muito curto e tende a voltar para um nível de energia mais baixo ou mesmo retornando ao seu estado de repouso (reação do tipo I). Nesta transição, o excesso de energia pode ser transferido ao substrato por meio de fluorescência (espontâneo), onde o fotossensibilizador emite energia em forma de fótons. Pode-se passar também a um nível intermediário (reação do tipo II), chamado estado tripleto, situado entre o estado de repouso e o estado singleto, apresentando um tempo de vida um pouco mais longo (fosforecência) (FIG. 1).

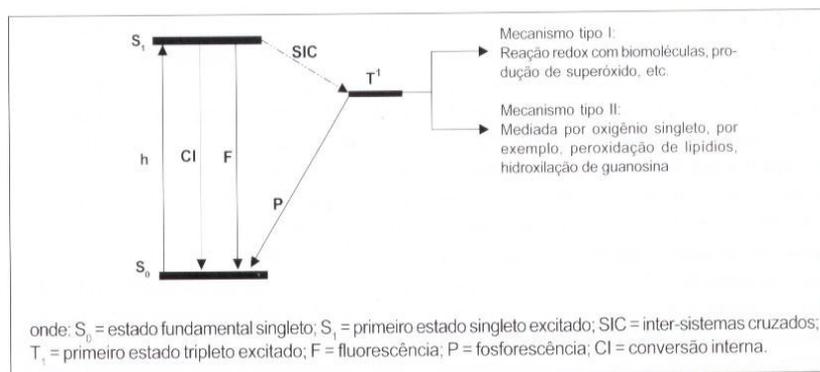


FIGURA 3.1 - Diagrama de Jablonski modificado de Wainwright.

FONTE - RIBEIRO E ZECELL, 2004.

Para fotossensibilizadores, é importante que o estado tripleto seja bem povoado (presença de muitos elétrons/fótons) e relativamente de longa duração. Se isto ocorrer, o corante excitado tem tempo de reagir com o seu ambiente (por transferência eletrônica/reações redox) ou transferir sua energia de excitação a uma molécula de oxigênio do meio e produzir o altamente reativo oxigênio singleto. Se estas reações são iniciadas no meio biológico, por exemplo, dentro de um tumor ou na parede celular bacteriana e fúngica provocará efeito deletério celular e biológico (REYS, 2004). Alguns estudos demonstram que a maioria das bactérias e fungos, apresentam uma membrana celular / parede especial e resistente à terapia fotodinâmica. Esforços têm sido feitos para se desenvolver fotossensibilizadores que aumentem a permeabilidade da membrana celular microbiana, facilitando sua lise (PFITZNER *et al.*, 2004).

De acordo com Meisel e Kocher (2005), o mecanismo da terapia fotodinâmica obedece a três princípios fotobiológicos:

1. A lei GROTTIUS - DRAPER: a luz usada deve ter um comprimento de onda adequado (ressonante) ao fotossensibilizador, uma vez que apenas a luz absorvida pode desencadear uma reação fotoquímica.
2. A lei STARK - EINSTEIN: cada molécula do fotossensibilizador envolvida na reação induzida pela luz, absorve um quantum da irradiação eletromagnética emitida.

3. A lei de BUNSEN – ROSCOE: o efeito fotoquímico é uma função do produto da intensidade da luz e do tempo de exposição (dosagem da luz).

Segundo Ribeiro e Zezell (2004) a eficácia da terapia fotodinâmica é, essencialmente, dependente de três fatores:

1. Biológicos

Seletividade e retenção do fotossensibilizador na área alvo.

2. Físicos

Intensidade da radiação eletromagnética que chega à região de tratamento (propriedades ópticas do tecido).

Eficiência da absorção dos fótons ativadores.

Eficiência da transferência de energia de excitação da molécula fotossensibilizadora para o substrato.

3. Químicos

Efeito oxidante na molécula.

Tempos de vida razoavelmente longo dos estados excitados para permitir a transferência de energia.

### 3.1.3 Efeitos fototóxicos da PDT

A morte da célula bacteriana induzida pela ação fotodinâmica no nível molecular é, em alguns casos, bem estabelecida. A ação fototóxica provocada pela reação do tipo I com a água em meio microbiano pode elevar os radicais de hidroxila (HO), que podem também reagir ou combinar com as biomoléculas para proporcionar a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) *in situ* com resultados citotóxicos, levando por exemplo, a remoção do hidrogênio da membrana citoplasmática bacteriana. Pode causar também, possível inativação das enzimas das membranas e dos receptores. Na reação do tipo II, o fotossensibilizador em estado tripleto transfere sua energia para o oxigênio molecular (do meio), formando oxigênio singleto que reage, rapidamente, com os constituintes celulares (parede celular, os ácidos nucléicos, os peptídeos, dentre outros). A curta meia vida do oxigênio singleto mais uma vez assegura a reação localizada. Como na reação do tipo I discutida acima, o oxigênio singleto também reagirá com as moléculas envolvidas na manutenção e estrutura da parede da

célula/membrana, tais como os fosfolípidos, os peptídeos e os esteróis (WAINWRIGHT, 1998), conforme QUA. 3.1).

QUADRO 3.1  
Caminhos fototóxicos da PDT

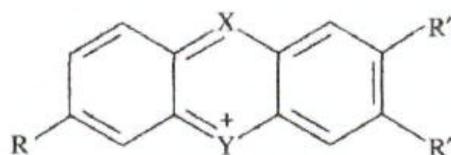
<b>Lugar de ação</b>	<b>Ação</b>	<b>Resultado</b>	<b>Consequência</b>	<b>Evento Citotóxico</b>
Água	Redução de H <sup>+</sup>	Formação de radical hidroxila (HO)	Formação de peróxido de hidrogênio, superóxido (O <sub>2</sub> )	Posterior processos oxidativos
Parede celular/membrana lipídios insaturados/ esteróis	Peroxidação	Peroxidação	Formação de hidroperóxido	Aumentada permeabilidade a íons (passagem de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )
Peptídeos	Redução de hidrogênio	Ligação cruzada nos peptídeos	Inativação de enzimas	Perda da facilidade de reparação; lise
Camada de proteína viral	Oxidação de resíduos de aminoácidos	Degradação de proteínas		Perda de infectividade viral
Cadeia respiratória	Reações redox			Inibição da respiração
Enzimas citoplasmáticas/enzimas virais	Oxidação ou ligações cruzadas			Inibição do corpo de ribossomos; Inibição de replicação/infectividade
Resíduos de ácidos nucléicos (tipicamente guanósina)	Oxidação da base ou açúcar	8-hidroxi-guanósina	Degradação de nucleotídeos; Degradação de açúcar/quebra	Substituição de base; Quebra de fitas; Mutações; Inibição de replicação

FONTE - WAINWRIGHT, 1998; Adaptado por Ribeiro e Zezell, 2004.

### 3.1.4 Fotossensibilizadores

Entre as características importantes do fotossensibilizador estão sua banda de absorção de energia e a intensidade de absorção, bem como sua eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio. Tem sido enfatizada também a importância do meio em que o fotossensibilizador é empregado, bem como as diferentes formulações possíveis. A aplicação tópica, principalmente para o tratamento de infecções superficiais, tem forte apelo por se tratar de uma terapia não invasiva, sem complicações sistêmicas, porém, a estabilidade do agente fotossensibilizador deve ser mantida até a sua ativação pela fonte de luz, bem como a penetração através da pele e mucosa deve ocorrer de forma eficiente. Além destes fatores, é de grande importância a remoção do fotossensibilizador do local de ação após a sua aplicação. No caso da odontologia e infecções de pele, o manchamento da superfície torna inviável o uso de certos agentes corantes. O corante azul (TBO) do grupo das fenotiazinas utilizado neste estudo, em baixas concentrações não produz ação citotóxica e a dose necessária para a morte bacteriana é menor que a dose necessária para provocar danos à célula do hospedeiro (queratinócitos e fibroblastos) (WAINWRIGHT, 1998). Os determinantes da eficácia fototerapêutica são o alto coeficiente de absorção do corante, o tempo de pré-irradiação, a concentração do corante no alvo e o fluxo de energia da luz incidente. Os corantes azuis (FIG 2) têm uma especificidade restrita, podendo provocar danos às proteínas plasmáticas. *Candida albicans*, o agente causador da candidíase, em sua forma de levedura ou hifa, também é sensível a PDT com os corantes azuis. Os corantes azuis absorvem luz entre  $\lambda = 620 \text{ nm}$  a  $700 \text{ nm}$ , conforme QUA. 3.2. Sua principal aplicação é na PDT antimicrobiana (RIBEIRO E GROTH, 2005; PRATES *et al.*, 2006).

Dobson e Wilson (1992), Wilson (1993), Sarkar e Wilson (1993) utilizaram os fotossensibilizadores Azul de Metileno (MB) e Azul de Toluidina (TBO), associado ao laser He-Ne (632,8 nm) com tempos de 30" e 80" e com diferentes concentrações de TBO e MB. Foram testadas as bactérias presentes em amostras de placa subgingival da cavidade oral, formada pelas espécies *S. sanguis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* em placas de Petri. Os autores concluíram que os corantes derivados de fenotiazinas (MB – TBO) foram eficientes em eliminar as quatro espécies bacterianas. Os autores sugerem que a técnica de terapia fotodinâmica pode ser efetiva em eliminar bactérias patogênicas encontradas na inflamação gengival.



	R	R''	R'	X	Y
Methylene blue	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	N	S
Toluidine blue O	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	N	S

FIGURA 3.2 - Estrutura molecular do Azul de metileno e do Azul de toluidina.

FONTE - WAINWRIGHT, 1998.

### QUADRO 3.2

Principais fotossensibilizadores utilizados em PDT com suas respectivas bandas de absorção.

Fotossensibilizador	Banda de Absorção
Derivados da Hematoporfirina (HpD)	620 – 650 nm
Ftalocianinas	660 – 700 nm
Fenotiazinas (TBO e MB)	620 – 700 nm
Fitoterápicos (Azuleno)	550 – 700 nm
Verde Malaquita	400 – 700 nm

Soukos *et al.* (1996), estudaram “*in vitro*”, a ação fotodinâmica da irradiação da luz vermelha de um laser associada ao corante Azul de Toluidina (TBO) sobre queratinócitos, fibroblastos e o *Streptococcus sanguis*. Os autores concluíram que o uso de baixa concentração do corante TBO e da baixa densidade de energia do laser, provocava somente a morte da bactéria não afetando as células orais humanas.

Wilson *et al.* (1995), Zampieri *et al.* (2003) e Matevski *et al.* (2003), em estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” obtiveram êxito na redução das bactérias, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces* utilizando um laser de He-Ne ( $\lambda = 632,8$  nm), dois de diodo semi-condutor AsGaAl ( $\lambda = 680$  nm e 670 nm) e uma fonte de luz convencional com lâmpada de xenônio associada a filtros na região do vermelho e com cinco diferentes densidades de energia: 1,31 J/cm<sup>2</sup>, 2,2 J/cm<sup>2</sup>, 3 J/cm<sup>2</sup>, 6 J/cm<sup>2</sup> e 9 J/cm<sup>2</sup>. Foram coradas pelo Azul de Toluidina na concentração de 75 µg/mL e 50 µg/mL. O percentual maior de morte bacteriana foi

obtido utilizando-se o laser de He-Ne para a espécie *S. sanguis* e *Porphyromonas gingivalis* alcançado com a fluência de 3 J/cm<sup>2</sup>, enquanto que para a espécie *S. mitis* e *Actinomyces* foi obtida com a fluência de 6 J/cm<sup>2</sup>. Isso provavelmente ocorreu devido ao comprimento de onda do laser de He-Ne ser coincidente com o pico máximo de absorção de energia do corante TBO, que é em torno de 632 nm.

Rovaldi *et al.* (2000) e Lauro *et al.* (2002) conjugaram a porfirina com uma substância fotoreativa catiônica, chamada pentalisina (polilisina), o que facilitou a aglutinação desse conjugado-fotossensibilizador à membrana celular bacteriana gram-negativa, aumentando o espectro de atividade contra essas bactérias, mantendo um forte efeito destruidor. Nesse estudo “*in vitro*”, foram testados o fotossensibilizador puro (porfirina), e o conjugado pentalisina-porfirina. Enquanto a porfirina pura apresentou alguma atividade apenas contra bactérias gram-positivas e também contra células eucarióticas, a molécula conjugada pentalisina-porfirina destruiu consistentemente tanto as gram-negativas e gram-positivas, demonstrando pouca atividade contra células eucarióticas. Apenas 20% do corante aglutinado foram preservados na superfície das células sobreviventes, demonstrando aparente falta de indução de resistência à PDT.

Walsh (1997) e Walsh (2003) relataram que a PDT mostrou-se eficaz na destruição de bactérias em placas bacterianas orais, que são resistentes à ação de agentes antimicrobianos, portanto, tendo sua ação eficaz em bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de ser ativa contra fungos e vírus. Os autores afirmam também que a ação fotodinâmica é uma terapia mais segura e sem efeitos colaterais, devido às espécies de oxigênio reativas residuais serem rapidamente conduzidas pela catalase enzimática, presente em todos os tecidos e na circulação periférica. Concluíram também que a PDT não provoca aumento de temperatura mensurável.

### 3.1.5 Efeitos fungicidas da terapia fotodinâmica

Jackson *et al.* (1999) estudaram três parâmetros: a concentração do fotossensibilizador, a dose de luz do laser e o tempo de pré-irradiação. O fotossensibilizador utilizado foi o Azul de Toluidina (TBO), testado nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O laser utilizado foi o de Hélio-Neônio (He-Ne) com potência de 35 mW e área do spot com 2 mm<sup>2</sup>. Ambas as formas de *Candida albicans* (pseudohifas e leveduras) foram expostas a 4,2; 10,5; 21 e 42 J/cm<sup>2</sup>. Antes da irradiação, ambos os morfotipos foram incubados durante vários períodos de tempo

(TPI). O resultado com relação à concentração do TBO, a mais eficaz para a forma de levedura foi a 25 µg/mL, e para a forma de *hifa* foi a de 12,5 µg/mL. O tempo de pré-irradiação considerado ótimo para as *leveduras* foi de 5 minutos, enquanto que a morte das *hifas* não foi afetada pelo TPI. Com relação à fluência, verificou-se que com o aumento da dosagem de energia da luz aumentava-se o índice de morte dos dois morfotipos, sendo a fluência de 42 J/cm<sup>2</sup> a mais eficaz. Os resultados deste estudo indicam que ambas as formas de *Candida albicans* são susceptíveis a terapia fotodinâmica, sugerindo que essa abordagem poderá ser útil na eliminação dos fungos das lesões “*in vivo*”.

Friedberg *et al* (2001) utilizaram o fotosensibilizador Green 2W sobre isolados de *Aspergillus fumigatus*, fungo presente no ar, mas que pode produzir graves infecções em pacientes imunossuprimidos. Observaram uma atividade fungicida ao utilizarem 5 W de luz com  $\lambda = 630$  nm, fluência variável (5 – 440 J/ cm<sup>2</sup>), por um intervalo de 12 h. O Green 2W demonstrou ser um agente bem tolerado, após aplicação intravenosa.

Zeina *et al* (2001) observaram que isolados de *Candida albicans* foram susceptíveis à PDT “*in vitro*” utilizando o azul de metileno, apesar de apresentarem uma boa resistência ao tratamento. Foi utilizada uma fonte de luz policromática produzida por uma lâmpada de 250 W com filtros para obter  $\lambda = 400 - 700$ nm e intensidade de 1,6 – 4,2 W/ cm<sup>2</sup>.

Teichert *et al* (2002) realizaram um estudo “*in vivo*” num modelo animal, que foram induzidos à imunodeficiência e inoculados com o fungo da *Candida albicans* com o intuito de reproduzirem a candidíase oral relacionada à Aids em seres humanos. Foi utilizado como fotossensibilizador o Azul de Metileno (MB) nas seguintes concentrações: 250, 275, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/ml. O tempo de pré-irradiação (TPI) foi de 10 minutos. A fonte de ativação empregada foi um laser diodo com 664 nm de comprimento de onda, potência de 400 mW e dose de 275 J/cm<sup>2</sup> por um difusor cilíndrico com 1 cm de diâmetro, durante 687,5s. Após a PDT, as amostras dos animais foram coletadas para determinar as unidades formadoras de colônias (UFC) e os animais sacrificados para avaliação histopatológica. Os resultados indicaram um efeito letal dependente da concentração do fotossensibilizador, que foi maior à medida que aumentava a concentração do corante MB, sendo o índice 100% letal a 450 e 500 µg/ml. Os autores concluíram que a PDT é uma alternativa em potencial de tratamento à terapia

com drogas anti-fúngicas tradicionais (fluconazol, cetoconazol) que estão tornando-se ineficazes devido a crescente resistência adquirida pelos fungos.

Bliss *et al* (2004) avaliaram “*in vitro*” a ação fotodinâmica sobre três espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Os autores utilizaram um derivado da hematoporfirina, o Photofrin<sup>®</sup> como fotossensibilizador nas seguintes concentrações: 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 µg/ml, ativada por uma luz azul com 450 nm de comprimento de onda, 15 mW de potência distribuindo 9 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia. O percentual de morte foi crescente de acordo com o aumento da concentração do fotossensibilizador observado nas espécies *C. albicans* e *C. krusei* respectivamente. Já a espécie *C. glabrata* foi resistente à PDT, provavelmente, devido à baixa adesão do Photofrin<sup>®</sup> à sua parede celular. Os resultados indicam que a PDT poderá ser uma abordagem alternativa para as atuais modalidades terapêuticas anti-candida no estabelecimento da resistência aos anti-fúngicos convencionais.

Smijs *et al* (2004) utilizaram uma luz policromática produzida por uma lâmpada de 500W - 230 V e filtros, capazes de absorver o infravermelho e obter a parte vermelha do espectro, para testar amostras de porfirinas (Sylsens B, DPmme e QDD) em isolados de *Trichophyton rubrum* “*in vitro*”. Utilizaram um tempo de irradiação por uma hora a 30 W/ cm<sup>2</sup>. A PDT foi realizada em hifas e microconídios de *T. rubrum*. A importância dos experimentos utilizando microconídias é devido à sua maior resistência ao tratamento que as hifas. Utilizando luz vermelha com o fotossensibilizador Sylsens B foi obtida completa inibição do crescimento a partir de uma concentração de 10 µM. Para o DPmme houve inibição do crescimento a partir de uma concentração de 40 µM. O QDD apresentou-se fungistático em todas as concentrações testadas (0 – 50 µM).

Calvazara-Pinton *et al* (2004a) utilizaram o ácido aminolevulinico-5 (ALA) como agente fotossensibilizador em creme nas lesões cutâneas de nove pacientes com evidência clínica e microbiológica de micose interdigital dos pés. Após quatro horas (TPI), as lesões foram irradiadas com 75 J/cm<sup>2</sup> de luz vermelha aplicada com um aparato Penta-PTL (Teclas, Sorengo, Suíça), consistindo de uma lâmpada de halógeno (Osram 250 V-Osram, Munique, Alemanha) equipada com um filtro vermelho (Filtro R61, Teclas) e um dispositivo de fibra óptica. As lesões interdigitais de um dos pés foi tratada com PDT e a do outro pé serviram de controle (tratadas apenas com luz ou apenas com ALA). Quatro semanas após o último tratamento, os pacientes passaram por um acompanhamento clínico e um exame laboratorial. A recuperação clínica e

microbiológica foi observada em seis dos nove pacientes. Porém, após 4 semanas, foi observada recorrência em quatro pacientes. No total, a tolerância foi sempre boa. Durante e logo após as exposições, foram observados eritema localizado e edema. Sete pacientes experimentaram um desconforto brando (ameno) e dois pacientes apresentaram dor que foi controlada com um fracionamento do tempo de irradiação e a redução dela. Foi observada descamação após 3-5 dias. Nas condições empregadas neste estudo, a ALA-PDT apresentou bons efeitos terapêuticos sobre micoses interdigitais dos pés. Porém, as recorrências foram rápidas. Em condições ambientais “*in vivo*”, exemplo, a temperatura, umidade e pH da pele interdigital, podem induzir uma fraca captação celular de ALA e a uma biossíntese deficiente da fotossensibilização da protoporfirina IX.

Szpringer *et al* (2004) enfoca a terapia fotodinâmica (PDT) como uma nova modalidade de tratamento para uma ampla variedade de malignidades e displasias pré-malignas, assim como para algumas indicações não cancerosas. A reação terapêutica a PDT é obtida por meio da ativação de fotossensibilizador não-tóxico localizado dentro do tecido neoplásico, usando uma luz visível focalizada numa banda de absorção apropriada da molécula fotossensibilizadora. Isto produz radical livre citotóxico como oxigênio singleto, que resulta numa foto-oxidação local, danos celulares e destruição das células do tumor. A administração sistêmica de fotossensibilizadores foi usada com exposição da luz endoscópica para tratar uma variedade de malignidades internas. A distribuição de uma droga tópica é usada no tratamento de doenças cutâneas. A distribuição seletiva da fotossensibilização no tecido alvo é o fundamento do processo da PDT. A fotossensibilização específica do tecido e a conservação do tecido normal resultam numa boa cicatrização e em bons resultados estéticos. A PDT pode ser usada para o tratamento de várias lesões cutâneas como: micoses fúngicas, eritroplasia de Queyrat, Síndrome de Gorin, queratose actínica, tumores gastrointestinais dentre outras, assim como indicações não oncológicas como: pele, líquen plano, psoríase, vitiligo e verrugas.

Segundo Calvazara-Pinton P. G *et al* (2004b) até os dias de hoje existem poucas publicações com relação à aplicação da PDT em fungos, provavelmente devido ao fato das pesquisas serem direcionadas principalmente para a desinfecção sanguínea e esses patógenos apresentarem um baixo risco de transmissão por transfusão. No entanto, os achados preliminares demonstraram que os fungos podem ser efetivamente sensibilizados “*in vitro*” administrando-se fotossensibilizadores que pertencem

principalmente a quatro grupos químicos: corantes à base de fenotiazinas, porfirinas e ftalocianinas, assim como ácido aminolevulínico que, enquanto não é um fotossensibilizador propriamente dito, é efetivamente metabolizado dentro da protoporfirina IX. Além da eficácia, a PDT demonstrou outros benefícios. Primeiro, os sensibilizadores usados são altamente seletivos demonstrando que alguns fungos podem ser mortos em combinações de droga e dosagens de luz muito menores do que as necessárias para o efeito semelhante sobre os queratinócitos. Esses fotossensibilizadores investigados não apresentaram atividade mutagênica e o risco da seleção de cepas fúngicas resistentes à droga nunca foi relatado. Deve-se, portanto, incentivar estudos de PDT em micoses cutâneas por apresentarem a vantagem de ser altamente seletiva evitando a ocorrência de cepas resistentes à droga.

Kamp *et al* (2005) avaliaram “*in vitro*” se o fungo *Trichophyton rubrum* causador da onicomicose pode ser efetivamente inativado pela terapia fotodinâmica, já que pela terapia convencional com antimicóticos tradicionais o fungo é altamente persistente. Os autores inocularam o *T. Rubrum* em meio de cultura líquido na presença de 0 (controle); 0,1; 1; 5; 10 e 100  $\mu\text{M}$  de ALA (ácido-5 aminolevulínico). Somente entre o 10º e o 14º dia após o início do estudo, o *Trichophyton rubrum* conseguiu metabolizar o ALA para a protoporfirina IX (PpIX), devido ao crescimento lento deste fungo “*in vitro*”. Após esse tempo (TPI), as placas foram irradiadas por uma lâmpada halógena não filtrada emitindo luz branca com uma intensidade de 36,8  $\text{W}/\text{cm}^2$ , através de fibra óptica distante 5 cm. As placas com *T. rubrum* foram expostas durante 60 minutos correspondendo a 128  $\text{J}/\text{cm}^2$  de densidade de energia. A PDT reduziu tanto o número quanto o diâmetro das colônias em aproximadamente 50%, comparada ao controle correspondente, sendo verificado nas concentrações de 1 a 10  $\mu\text{M}$  ficando o melhor resultado para a concentração de 10  $\mu\text{M}$ . O ALA na concentração mais forte (100  $\mu\text{M}$ ) levou a um índice de crescimento significativamente reduzido e a ausência da formação de PpIX devido às condições altamente ácidas. Os autores concluíram que apesar do índice de inativação do fungo não ter alcançado 100%, a PDT com ALA deve ser uma abordagem promissora na redução da colonização de *T. rubrum* em onicomicoses.

Jori G (2006) salienta a importância do uso dos fotossensibilizadores que absorvem luz como agentes antimicrobianos fotodinâmicos. Devem possuir características favoráveis dentre elas: (a) o amplo espectro de ação antimicrobiana em

bactérias gram-negativas, fungos, e parasitas devendo seguir um protocolo fototerapêutico e condições favoráveis de irradiação; (b) as porfirinas, ftalocianinas e as fenotiazinas não devem exibir toxicidade no escuro em dosagens ativadas fotoquimicamente; (c) a morte da célula microbiana é uma consequência da fotodestruição da membrana através de um processo típico de múltiplos alvos que minimiza o risco tanto do início dos processos mutagênicos quanto da seleção de células fotorresistentes; (d) esses fotossensibilizadores são considerados eficientes enquanto não forem observados patógenos microbianos fotorresistentes; (e) é possível a combinação da terapia fotodinâmica com a antibiótica. Eles concluem que a terapia fotodinâmica (PDT) está se tornando, com o passar dos tempos, um tratamento alternativo eficiente para as infecções microbianas, um problema atualmente agravado pela crescente difusão das cepas microbianas resistentes a antibióticos.

Souza *et al.* (2006) avaliaram os efeitos da irradiação laser em baixa intensidade com comprimento de onda de 685nm, 28 J/cm<sup>2</sup> associado com fotossensibilizadores na viabilidade de diferentes espécies de *Candida*. Suspensões de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, contendo 10<sup>6</sup> células viáveis por mililitros foram obtidas. De cada espécie, 10 amostras da suspensão de célula foram irradiadas na presença de Azul de Metileno (0,1 mg/mL), 10 amostras foram somente tratadas com azul de Metileno, 10 amostras foram irradiadas com laser na ausência do Azul de Metileno. De cada amostra, uma série de diluições com 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> foram obtidas e concentrações de 0,1 mL de cada diluição foram plaqueadas em duplicata em agar Sabouraud dextrose. A irradiação com laser na presença de Azul de Metileno reduziu o número de UFC/mL em 88.6% para *C. albicans*, 84.8% para *C. dubliniensis*, 91.6% para *C. krusei* e 82.3% para *C. tropicalis*. Pode-se concluir que a fotoativação do Azul de Metileno pelo laser com 685nm apresentou um efeito fungicida nas espécies de *Candida* estudadas.

### 3.2 Dermatófitos e dermatofitose

Dermatófitos são um grupo de fungos relacionados capazes de invadirem tecidos queratinizados (pele, pêlos e unhas) de homens e animais, para produzir infecção (dermatofitose). Esta infecção é geralmente cutânea e restrita ao extrato córneo não vascularizado, devido à inabilidade desses fungos de penetrar em tecidos mais profundos e órgãos de um hospedeiro imunocompetente (WEITZMAN E SUMMERBELL, 1995).

Apresentam uma predileção ecológica, no que diz respeito à sua adaptação ao meio ambiente. Assim, os dermatófitos podem ser divididos em três grupos, em relação ao seu habitat: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos. Os geofílicos apresentam como característica primária a habilidade de manter sua viabilidade em solos geralmente ricos em resíduos de queratina e podem causar infecções em humanos e animais. Os zoofílicos são adaptados às condições de parasitismo em espécies de animais (caninos, felinos, bovinos, eqüinos, suínos, aves, dentre outros) mas, ocasionalmente causam infecções humanas. Muitas infecções por dermatófitos zoofílicos são adquiridas indiretamente de materiais ceratinosos provenientes de animais em decomposição no solo. Os antropofílicos estão primariamente associados a infecções humanas e raramente infectam animais. Os grupos dos dermatófitos zoofílicos e geofílicos, em geral, tendem a provocar, no homem, a formação de lesões com características inflamatórias mais pronunciadas do que aquelas causadas por dermatófitos antropofílicos (WEITZMAN E SUMMERBELL, 1995; SIDRIM E MOREIRA, 1999).

Os agentes etiológicos das dermatofitoses estão classificados em três gêneros: *Trichophyton* spp. *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* spp (WEITZMAN E SUMMERBELL, 1995).

Quanto à distribuição geográfica, os dermatófitos são ubiqüitários, não havendo área ou grupo de pessoas que se encontrem isoladas destes fungos (COSTA *et al.*, 2002).

### 3.2.1 Trichophyton rubrum

De crescimento intermediário, as colônias do *T. rubrum*, em ágar Sabouraud, mostram características de maturação de 12 a 16 dias após a sementeira primária. Estas colônias caracterizam-se por uma textura algodoadosa com pregas radiais, formando uma pequena saliência no centro. Essa morfologia, que com frequência se confunde com as colônias de *T. tonsurans* apresenta ainda tonalidade branca que com o passar do tempo, pode ficar avermelhada. Esta coloração pode ser observada também no bordo da colônia (SIDRIM E MOREIRA, 1999, LACAZ *et al.*, 2002).

A microscopia óptica revela uma grande quantidade de microconídios clavados com 2-3 µm por 3-5µm de tamanho, dispostos ao longo das hifas ou em cachos. Os macroconídios, quando presentes, podem apresentar - se como clavadas alongadas, quase com um aspecto cilíndrico e com duas a nove septações (LACAZ *et al.*, 2002).

Na maioria dos laboratórios de rotina, a simples evidência de algumas estruturas não é diagnóstico definitivo para micologistas mais experientes, necessitando-se nessas situações lançar mão de testes complementares para o correto diagnóstico (SIDRIM E MOREIRA, 1999).

### 3.2.2 Manifestações clínicas

Tradicionalmente, as dermatofitoses ou *tineas*, são denominadas de acordo com sua localização anatômica. Exemplo: *Tinea pedis* corresponde à dermatofitose dos pés (WEITZMAN E SUMMERBELL, 1995). Já a corrente francesa classifica como *tineas* as lesões dermatofíticas que acometem o couro cabeludo e/ ou região de barba e bigode, como epidermofítides as lesões dermatofíticas encontradas na região de pele glabra, como onicomicoses dermatofíticas as lesões encontradas nas unhas e dermatofitoses subcutâneas e profundas às lesões que acometem o espaço celular subcutâneo ou outros órgãos profundos, sendo geralmente relacionadas a pacientes imunocomprometidos. Os aspectos clínicos das lesões dermatofíticas são bastante variados e resultam da combinação de destruição da queratina associada a uma resposta inflamatória, mais ou menos intensa, na dependência do binômio microrganismo/ hospedeiro. A variação clínica da lesão, portanto, está correlacionada a três fatores: a

espécie de dermatófito envolvida no processo infeccioso, o sítio anatômico acometido e o *status* imunológico do hospedeiro (SIDRIM E MOREIRA, 1999).

### 3.2.3 Onicomicose

Esta infecção é a doença ungueal mais comumente encontrada, sendo responsável por mais de 50% dos acometimentos das unhas.

A etiologia destas micoses apresenta uma grande variabilidade nas diferentes regiões do Brasil. As constantes correntes migratórias que ocorrem no país têm sido citadas como uma das principais causas para a alteração desta etiologia (COSTA *et al.*, 2002).

A distribuição de diferentes patógenos não é uniforme e depende de vários fatores como o clima, a geografia e a migração. Porém, estudos revelam que as espécies *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* estão envolvidas em mais de 90% das onicomicoses (FAERGEMANN E BARAN, 2003).

Santos *et al.* (1997) observaram em um estudo, em janeiro/ 1995 a novembro/ 1996, a predominância de *T. rubrum* sobre outros dermatófitos, e sugeriram que este fungo é provavelmente o principal agente etiológico das dermatofitoses em Florianópolis (SC).

Lopes *et al.* (1999) avaliaram em um estudo epidemiológico de 1988 a 1997, na região central do Rio Grande do Sul, a presença de fungos em 2.664 casos de micoses superficiais. Os autores isolaram com maior frequência *T. rubrum*, que foi o fungo predominante nas lesões das unhas.

Costa *et al.* (2002) observaram em seu estudo epidemiológico, de janeiro a dezembro de 1999, na região de Goiânia (GO.) que de 1.955 amostras coletadas de pacientes com suspeita de infecção fúngica, o *T. rubrum* foi responsável pelo maior número de lesões nas unhas dos pés, perfazendo um total de 60,2% (47/78 casos) e fazendo-se a correlação do agente etiológico com a faixa etária, verificou-se que *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* prevaleceram na fase adulta.

### 3.2.4 Tratamento das onicomicoses

O tratamento das onicomicoses dermatofíticas representa uma das principais dificuldades terapêuticas encontradas na prática clínica, em razão de algumas

particularidades: as unhas são estruturas não-vascularizadas o que explica a pequena penetração dos medicamentos utilizados por via sistêmica. Portanto, as dermatofitoses das unhas dos pés são mais rebeldes ao tratamento que as das mãos (SIDRIM E MOREIRA, 1999).

O tratamento das onicomicoses ocorre a partir de três medidas conjuntas: 1- Tratamento sistêmico, que pode durar de 4 a 8 meses; 2- Excisão química com uréia a 40% e 3- Tratamento tópico.

Em muitos casos a excisão cirúrgica total da unha é uma medida severa, mas, necessária (SIDRIM E MOREIRA, 1999).

### 3.2.5 Tratamento tópico

Esta terapia produz poucos efeitos adversos sistêmicos e não faz interação com outras drogas sistêmicas utilizadas pelo paciente, porém, em monoterapia está indicada apenas para onicomicoses superficiais com comprometimento inferior a 50% da lâmina ungueal e para pacientes cuja medicação sistêmica está contra-indicada.

Amorolfina – antifúngico de amplo espectro da classe das morfolinas, veiculado em verniz a 5% devendo ser aplicado de uma a duas vezes por semana durante seis meses para as onicomicoses das mãos e nove a doze meses para as onicomicoses dos pés.

Ciclopiroxolamina – antifúngico hidroxipiridímico de amplo espectro veiculado em verniz a 8%. Deve ser aplicado a cada 48 h durante o primeiro mês, diminuir as aplicações para duas vezes por semana no segundo mês, e posteriormente, uma vez por semana, devendo ser aplicado por um período mínimo de 6 meses (LECHA, 2002; BALLESTÉ *et al.*, 2003).

### 3.2.6 Tratamento Sistêmico

Os antifúngicos sistêmicos classicamente empregados no tratamento das onicomicoses são a griseofulvina e o cetoconazol. Por volta de 1990, foram substituídos por itraconazol, fluconazol e terbinafina que apresentam melhores resultados em menor tempo e maior segurança para o paciente (BALLESTÉ *et al.*, 2003).

Itraconazol – sua administração é realizada exclusivamente por via oral sendo lipofílico e queratinofílico, o que confere grande afinidade por tecidos

superficiais como: pele, mucosas e unhas alcançando nestes tecidos níveis superiores aos plasmáticos. Os níveis cutâneos alcançados permanecem em concentrações altas após sua administração (pele e pêlos – 3 a 4 semanas e unhas – 4 a 6 meses). Esta farmacocinética permite seu uso em terapias de pulsos mensais, mantendo sua eficácia e diminuindo os efeitos colaterais. Seus efeitos adversos são leves e interage farmacologicamente com antihistamínicos, fenitoína, anticoagulantes cumarínicos, hipoglicemiantes orais, digoxina, quinina e ciclosporina (BALLESTÉ *et al.*, 2003).

Fluconazol – apresenta-se mais hidrofílico que os azólicos anteriores e se une menos à queratina que o itraconazol. Pode ser administrado tanto por via oral como parenteral, alcançando bons níveis em pele e unhas. Penetra rapidamente nos tecidos e é eliminado lentamente, o que permite uma administração com menor frequência e doses mais alta. Possui interações medicamentosas como o aumento o tempo de vida das sulfonilureas causando hipoglicemias quando administrado com varfarina, aumentando o tempo de protrombina (BALLESTÉ *et al.*, 2003).

Terbinafina – antifúngico da classe das alilaminas cujas concentrações nas unhas são similares às do plasma, chegando por difusão através da derme. Permanece depositada nas unhas por meses após o tratamento, sendo esta característica considerada uma proteção contra recidivas. Os efeitos colaterais são geralmente gastrointestinais e excepcionalmente cutâneos apresentando escassas interações medicamentosas. O tratamento utilizando a associação de antifúngicos orais e tópicos têm demonstrado melhores resultados que o emprego das drogas em monoterapia (BALLESTÉ *et al.*, 2003).

### 3.2.7 Falhas terapêuticas

O tratamento das onicomicoses apresenta geralmente taxas de fracasso terapêutico próximas de 25% em experimentos e 10% a mais na prática clínica. Santos e Hamdamm (2007) analisaram trinta e dois isolados clínicos de *Trichophyton rubrum* resistentes a fluconazol [concentrações inibitórias mínimas (MIC)  $\geq$  64  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>], que foram selecionados para testar a atividade antifúngica de cetoconazol, itraconazol, griseofulvina e terbinafina. Foram seguidas as diretrizes do National Committee for Clinical Laboratory Standards para testar fungos filamentosos. Foram incluídas para controle de qualidade, cepas de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida krusei* (ATCC 6258); *T. rubrum* (ATCC 40051) e *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC

40004). As placas com microdiluições foram incubadas a 28° C e lidas visualmente após 7 dias de incubação. As variações de MIC para os quatro antifúngicos foram: 0.0625-2 mug ml(-1) para cetoconazol; 0.25-2.0 mug ml(-1) para griseofulvina;  $\leq 0.031$ -1.0 mug ml (-1) para itraconazol e  $\leq 0.031$  mug ml(-1) para terbinafina (para todos os isolados testados). *In vitro*, a Terbinafina foi a droga mais potente contra *T. rubrum*, seguida por itraconazol, cetoconazol e griseofulvina. Ainda são necessários muitos estudos para correlacionar os MICs dessas drogas aos resultados clínicos para desenvolver a interpretação dos limites de resistência do *T. rubrum* e outros dermatófitos.

As razões das falhas terapêuticas podem ser (LLAMBRICH E LECHA, 2002):

- Baixo índice de cooperação no tratamento por parte do paciente, aproximadamente 52%;
- Farmacocinética inadequada dos fármacos para alcançar a massa ungueal afetada. Os medicamentos orais chegam com dificuldade às bordas laterais das unhas e a maior parte das drogas tópicas dificilmente difunde até as camadas mais profundas da lâmina ungueal. Para o tratamento tópico, é importante estabelecer um veículo adequado para a droga antifúngica e sua capacidade de difusão na lâmina ungueal. Quanto aos antifúngicos orais, estudos têm demonstrado a penetração e depósito na lâmina ungueal para o itraconazol, fluconazol e terbinafina, porém, existem diferenças entre estes fármacos que obrigam a realização de regimes de administração diferentes (intermitente ou contínuo) e uma variação quanto à duração do tratamento.

Em condições “*in vitro*”, várias amostras fúngicas, inclusive leveduras, puderam ser inativadas através de irradiação com comprimentos de onda de luz visível, na presença de soluções fotosensibilizantes tais como, compostos porfirínicos e ftalocianinas. Na verdade, a PDT pode representar uma abordagem de tratamento útil para essas infecções “*in vivo*” uma vez que os tratamentos convencionais com drogas são prolongados e dispendiosos sendo o surgimento de isolados resistentes a medicamentos mais frequentes hoje em dia (CALVAZARA-PINTON, P.G et al 2004a).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho, foi observado a redução do número de UFC/mL\* de *Trichophyton rubrum* após o tratamento de suspensões do inóculo com TBO a 25 µg/mL, laser e LED. O cálculo da área e do volume de suspensão do inóculo submetido à PDT e irradiados pelo laser e pelo LED nos tubos de ensaio foram também realizados. Os controles dos experimentos foram realizados através da exposição do fungo ao TBO, do fungo ao laser e LED na ausência do corante e do fungo sem exposição à luz e corante.

Para os experimentos uma amostra de referência (ATCC-40051) de *T.rubrum* foi utilizada e incubada a 28°C durante 7 dias. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de ensaio esterilizado e em seguida homogeneizada em vórtex. A densidade da suspensão foi analisada em espectrofotômetro levando a uma concentração de  $1-5 \times 10^6$  células/mL. Essa suspensão obtida foi transferida para seis tubos formando-se seis grupos:

Grupo 1- Inóculo sem nenhum tratamento (controle);

Grupo 2- Suspensão do inóculo submetida à irradiação com LED por 3 minutos;

Grupo 3- Suspensão do inóculo submetida à irradiação com laser por 3 minutos;

Grupo 4- 100 µL de TBO acrescentados a 900 µL da suspensão do inóculo sem a presença de luz;

Grupo 5- 100 µL de TBO acrescentados a 900 µL da suspensão do inóculo submetida à irradiação com LED por 3 minutos. PDT-LED;

Grupo 6- 100 µL de TBO acrescentados a 900 µL da suspensão do inóculo submetida à irradiação com Laser por 3 minutos. PDT-laser.

Para os grupos 4, 5 e 6 foi estabelecido o tempo de pré-irradiação (TPI) de 5 minutos para absorção do corante pelas células fúngicas.

Posteriormente, cada grupo sofreu diluição do inóculo para 10 UFC/mL e repiques em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas e após

---

\* UFC/ml – Unidades formadoras de colônia por mL – número de unidades celulares com capacidade de reprodução por ml.

o período de incubação foram realizadas as contagens das colônias por método visual (FIG.4.1). Para garantir a reprodutibilidade dos dados, este experimento foi realizado em triplicata.

### Metodologia PDT *T. Rubrum*:

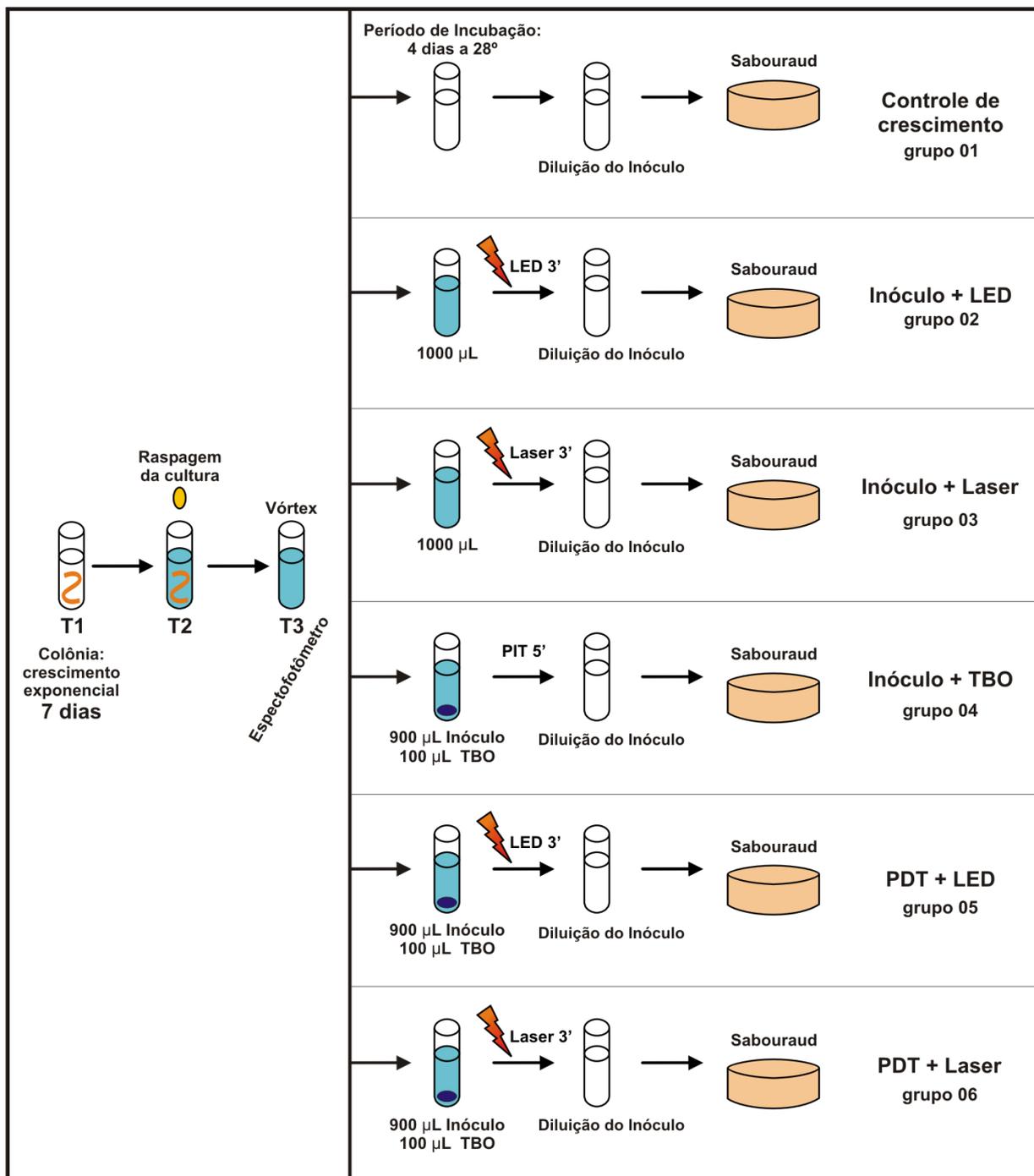


FIGURA 4.1- Diagrama da metodologia.

#### 4.1 Detalhamento dos materiais

1 - Máquina fotográfica Canon EOS - Digital Rebel Resolução 3072 x 2048 pixels - Tipo de sensor CMOS - Sistema de cor RGB - Distância da máquina aos tubos de ensaio= 70 cm - Lente 105 mm - Câmara com fator de multiplicação focal= 1.6 - Abertura 18 -Total 6.3 mega pixels - Tempo de exposição 1/4 segundos - Fabricante: Canon Inc. - Japão

2 - Estativa (fixação do laser e LED para irradiação)

3 –Equipamentos:

(a)- Laser de baixa intensidade modelo QTUMOOB (Quantum) da Ecco Fibras (Brasil), com diodo de arsênio, gálio e alumínio (AsGaAl), emitindo no vermelho com  $\lambda = 660\text{nm}$ , emissão contínua, 100mW de potência média de saída, tempo de 3 minutos, intensidade de  $2\text{ W/cm}^2$ , diâmetro do spot de 8mm e dose de  $360\text{J/cm}^2$  (FIG. 6.2).



FIGURA 4.2.- Equipamento laser de baixa intensidade

(b) Diodo de Emissão de Luz (LED): modelo Fisioted da MMoptics (São Paulo-Brasil) com emissão de luz a  $\lambda = 630\text{nm}$  ( $\pm 10\text{nm}$ ), 100mW de potência média de saída, tempo de 3 minutos, intensidade de  $0,5\text{ W/cm}^2$ , dose de  $90\text{J/cm}^2$ , diâmetro do

spot de 15,6 mm, em meio ativo de índio, gálio, alumínio e fósforo (InGaAlP) (FIG. 6.3).



FIGURA 4.3- Equipamento LED

As potências dos aparelhos de laser e LED foram aferidas pela unidade de leitura modelo NOVA- Analogic Performance Report, Laser Power/Energy Monitor. Fabricante: OPHIR OPTRONICS- Science Based Industry Park, Jerusalém- Israel (FIG. 6.4).



FIGURA 4.4- Unidade de Leitura de Potência Luminosa

4-Espectrofotômetro: modelo - MICRONAL B542 (Micronal S/A-São Paulo-Brasil), com resolução de leitura de 1nm, na região espectral de 325 a 1000nm, com faixa de medição fotométrica de 0~200%T, e -0,3~3ABS. Exatidão fotométrica de  $\pm 0,018$ ABS com filtros padrões. Lâmpada Halógena de 6V x 10W com frequência de 60Hz e voltagem de 117 a 227V (FIG. 6.5)



FIGURA 4.5- Espectrofotômetro - MICRONAL B542.

5- Vórtex - Biomatic-Porto Alegre- Brasil (FIG. 6.6)



FIGURA 4.6- Vórtex

6- Fotossensibilizador: O fotossensibilizador azul de toluidina foi submetido à espectroscopia e suas bandas de absorção determinadas entre os comprimentos de onda de 400 a 900nm. Foi utilizado o azul de toluidina (TBO) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (FIG. 6.7) na concentração final de 25 $\mu$ g/mL diluído em água.

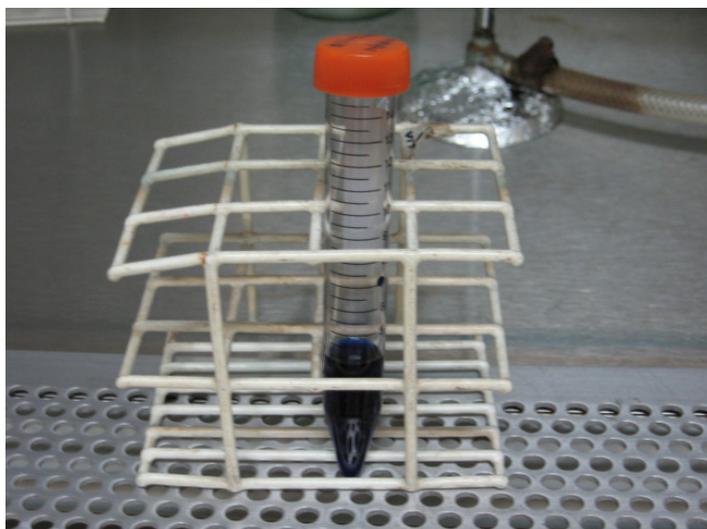


FIGURA 4.7– Fotossensibilizador Azul de Toluidina (TBO)

7-Microorganismo: Neste estudo foi utilizada uma amostra de referência (ATCC-40051) de *T. rubrum* obtida da coleção de culturas da Universidade da Geórgia (Atlanta, GA, EUA), gentilmente cedida pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG (FIG. 6.8).

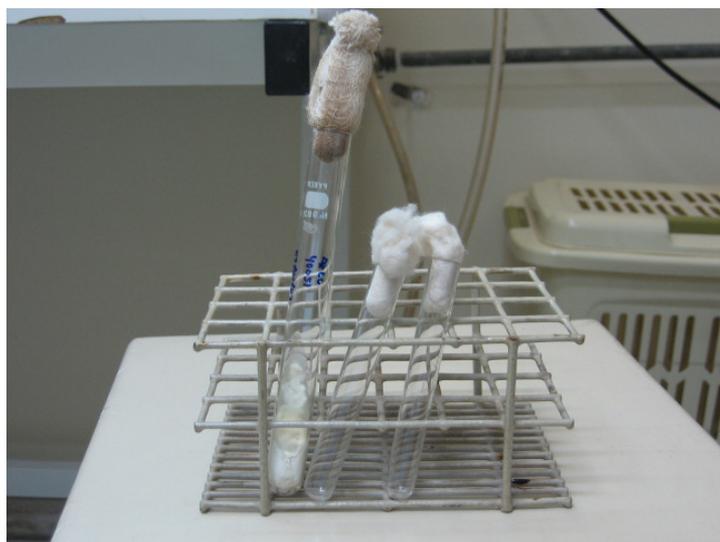


FIGURA 4.8- Amostra de referência (ATCC-40051) de *T. rubrum*

## 8- Meios de cultura

Ágar Sabouraud Dextrose:

Glicose.....	40,00 g
Peptona.....	10,00 g
Extrato de Levedura.....	5,0 g
Cloranfenicol.....	0,10 g
Ágar.....	15,00 g
Água destilada.....	1000,00 ml

O meio de cultura Sabouraud foi obtido comercialmente (GIBCO) e seu preparo procedeu de acordo com as orientações do fabricante, com o acréscimo de 3 g/L de ágar.

Ágar Batata dextrose

Infusão à base de batatas.....	200,00 g/L
Dextrose .....	20 g/L
Ágar .....	15 g/L

Para hidratar, foi suspenso 39 g em 1 L de H<sub>2</sub>O destilada e aquecido até ferver para dissolver completamente. Em seguida foi distribuído em tubos e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Foi esfriado até 45 - 50° C e os tubos inclinados para solidificação do meio de cultura.

Solução Salina

Cloreto de sódio.....	0,85 g
Água destilada.....	100,00 mL

9- Isolamento e manutenção da amostra. A amostra foi semeada e preservada em ágar Sabouraud em câmara fria a 4° C. Durante os experimentos, foram realizados repiques em ágar batata, para produção de esporos.

## 4.2 Detalhamento dos métodos

As espectroscopias do fotossensibilizador Azul de Toluidina na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  (GRA. 4.1 e 4.3), de *Trichophyton rubrum* (GRA. 4.2 e 4.3) e do TBO associado ao fungo (GRA. 4.3) foram realizadas com o objetivo de determinar se suas bandas de absorção foram ressonantes com o comprimento de onda das fontes de luz utilizadas.

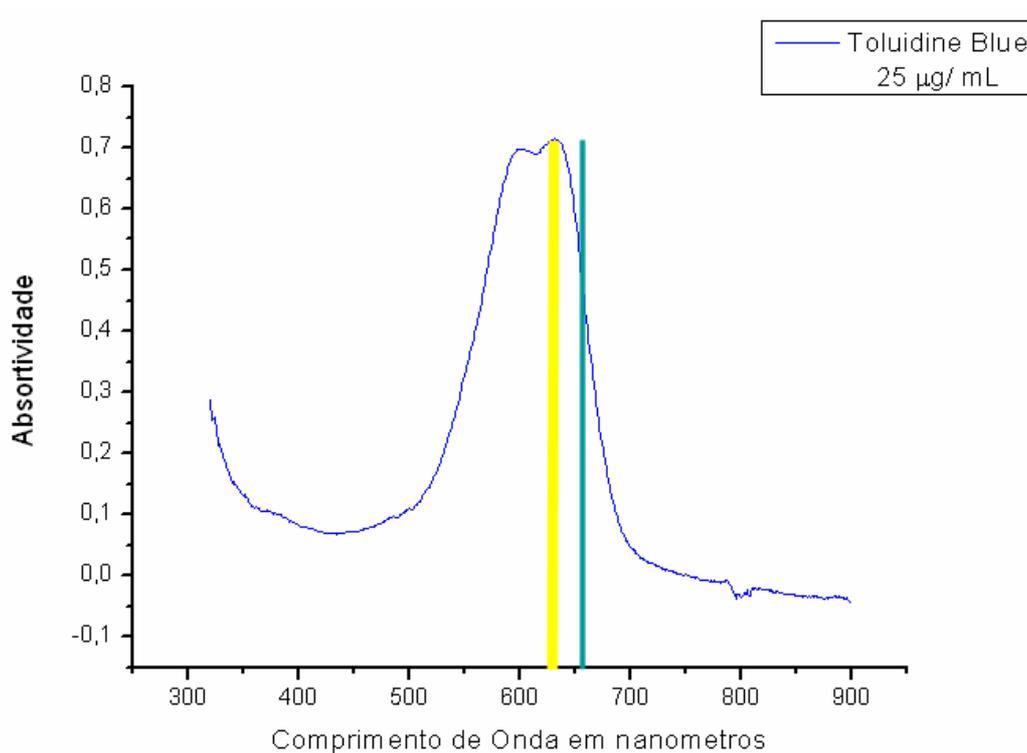


GRÁFICO 4.1-Espectroscopia de absorção óptica do fotossensibilizador, Azul de Toluidina 25 $\mu\text{g/mL}$  que foi obtida utilizando-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1mm. No eixo Y encontra-se a absorção do corante em unidades arbitrárias (u.a) e no eixo X a porção visível do espectro eletromagnético em nanômetros

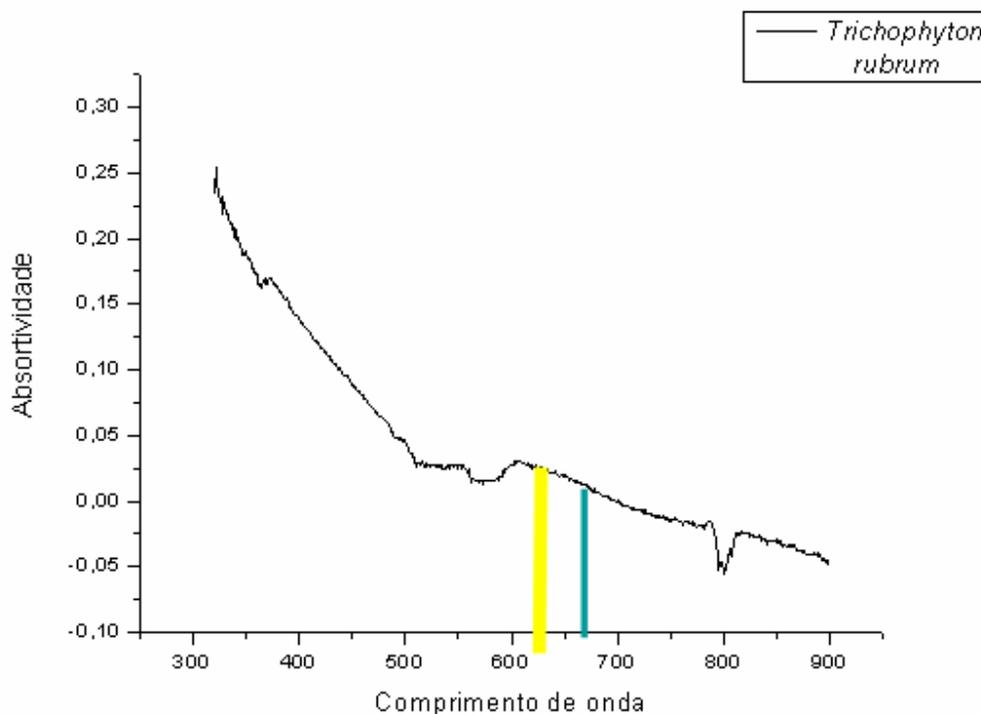


GRÁFICO 4.2- Espectroscopia de absorção óptica da suspensão de *Trichophyton rubrum* em salina. No eixo Y encontra-se a absorção da suspensão do fungo em unidades arbitrárias (u.a) e no eixo X a porção visível do espectro eletromagnético em nanômetros.

#### 4.2.1 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foi utilizado o método espectrofotométrico proposto pelo M38-A (CLSI, 2002). A amostra de *T. rubrum* foi cultivada em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose e incubada a 28° C durante 7 dias. A massa de micélio obtida foi coberta com aproximadamente 5,0 mL de salina 0,85% esterilizada e assepticamente com alça de platina foi feita uma raspagem da superfície do ágar. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de ensaio esterilizado e então deixada em repouso por 5 minutos para que as partículas mais pesadas se sedimentassem (FIG. 4.9). O sobrenadante foi coletado fazendo-se em seguida uma homogeneização em vórtex por 15 segundos. A densidade da suspensão foi analisada em espectrofotômetro e ajustada para uma densidade ótica de 0,15 a 0,17 (65 a 70% de transmitância a 530 nm), o que proporciona uma concentração de  $1-5 \times 10^6$  células/mL. Essa suspensão obtida foi transferida para seis tubos formando-se seis grupos.

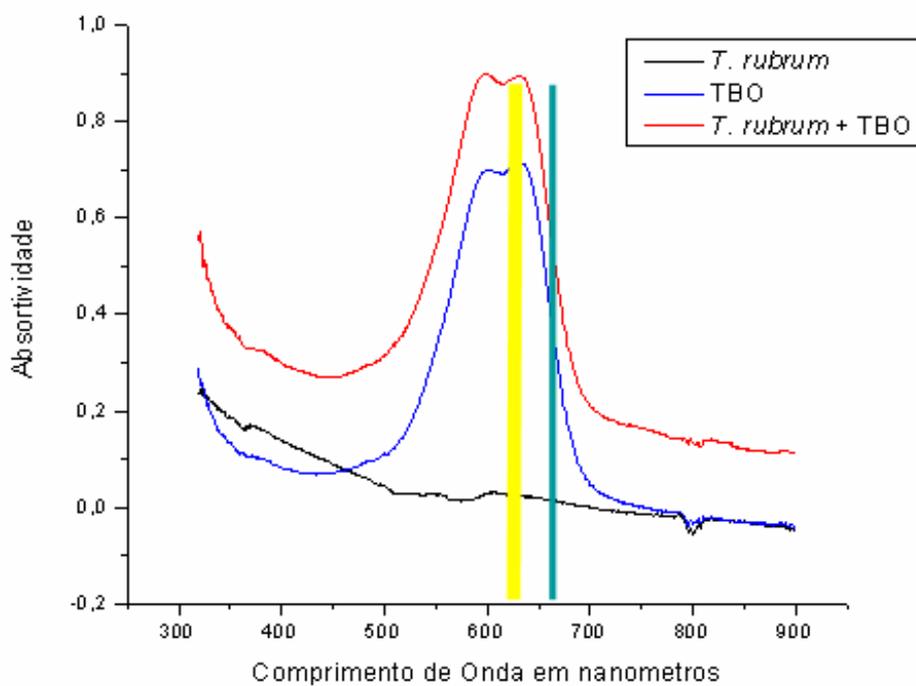


GRÁFICO 4.3- Espectroscopias do fotossensibilizador Azul de Toluidina (TBO) na concentração de 25µg/ mL, de *Trichophyton rubrum* e de *Trichophyton rubrum* associado ao Azul de Toluidina (TBO) 25µg/ mL. No eixo Y encontra-se a absorção do corante em unidades arbitrárias (u.a) e no eixo X a porção visível do espectro eletromagnético em nanômetros.

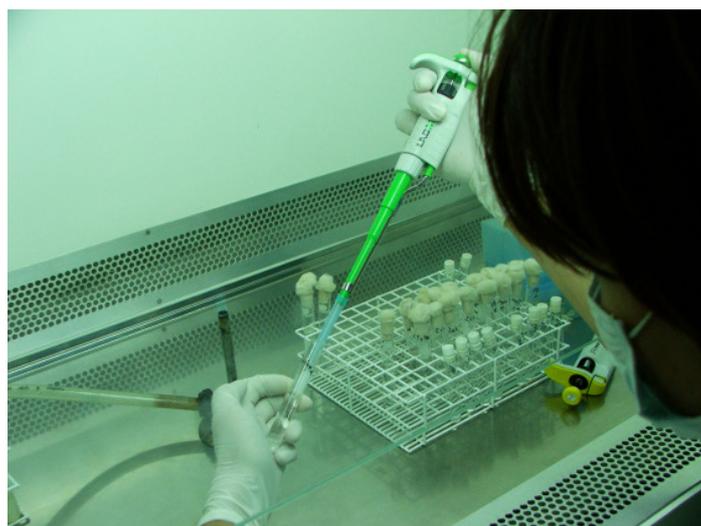


FIGURA 4.9- Transferência dos conídios e fragmentos de hifas para o tubo de ensaio

#### 4.2.2 Procedimento de teste

Foram utilizados tubos de 10 x 10 mm contendo um volume final de suspensão de 1000 µL e separados em seis grupos. No primeiro grupo, correspondente ao controle de crescimento do fungo, a suspensão de 1000 µL do inóculo não foi submetida a qualquer tratamento. No segundo grupo, a suspensão do inóculo foi submetida à irradiação com LED por 3 minutos. No terceiro grupo, a suspensão do inóculo foi submetida à irradiação com laser por 3 minutos. No quarto grupo, 100 µL de TBO foram acrescentados a 900 µL da suspensão do inóculo (diluição do fotossensibilizador de 1:10), sem a presença de luz. No quinto grupo, 100 µL de TBO foram acrescentados a 900 µL do inóculo e realizada irradiação com LED por 3 minutos. No sexto grupo, 100 µL de fotossensibilizador foram acrescentados a 900 µL do inóculo e realizada irradiação com laser por 3 minutos, QUA. 4.1.

QUADRO 4.1

Grupos do experimento

<b>Grupos</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Símbolo correspondente</b>
Grupo 1	1000 µL de suspensão do inóculo sem nenhum tratamento (controle)	G1
Grupo 2	1000 µL de suspensão do inóculo submetida à irradiação com LED por 3 minutos	G2
Grupo 3	1000 µL de suspensão do inóculo submetida à irradiação com laser por 3 minutos	G3
Grupo 4	100 µL de TBO acrescentados a 900 µL da suspensão do inóculo sem a presença de luz	G4
Grupo 5	100 µL de TBO acrescentados a 900 µL da suspensão do inóculo submetida à irradiação com LED por 3 minutos. PDT-LED	G5
Grupo 6	100 µL de TBO acrescentados a 900 µL da suspensão do inóculo submetida à irradiação com laser por 3 minutos. PDT-laser	G6

Para os grupos 4, 5 e 6, foi estabelecido o tempo de pré-irradiação (TPI) de 5 minutos para absorção do corante pelas células fúngicas (FIG. 4.10).



FIGURA 4.10- Microscopia óptica da absorção do corante pelas células fúngicas após a TPI

A irradiação pelas fontes de luz foi realizada do fundo para a abertura do tubo (FIG.4.11).



FIGURA 4.11- Irradiação pelas fontes de luz do fundo para a abertura do tubo.

Posteriormente, cada grupo sofreu uma diluição do inóculo para 10 UFC/mL repiques em placas de Petri contendo ágar Sabouraud (FIG.4.12). As placas foram incubadas a 28°C por 4 dias, de acordo com as necessidades da amostra, e após o período de incubação foram realizadas as contagens das colônias por método visual. Este experimento foi realizado em triplicata.

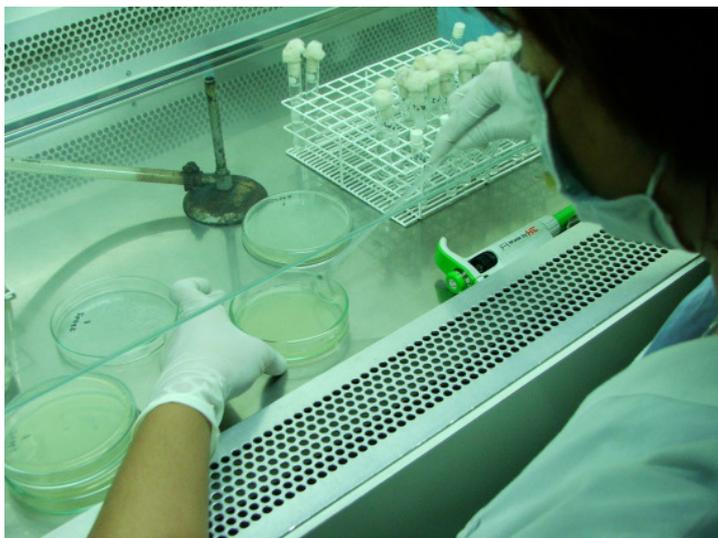


FIGURA 4.12- Colônias de *T. rubrum* repicadas em placas de Petri.

#### 4.2.3 Cálculo da área e volume de suspensão irradiada

Após as irradiações dos tubos referentes aos grupos 5 e 6 (PDT), cálculos da área e volume de suspensão do inóculo absorvidos pelas luzes (laser/LED) foram realizadas observando-se os dados dimensionais do tubo de ensaio (FIG. 4.13):

Diâmetro externo =  $12,28 \pm 0,02$  mm

Espessura do tubo =  $0,82 \pm 0,02$  mm

Diâmetro interno =  $10,64 \pm 0,02$  mm

Comprimento cilíndrico =  $69,40 \pm 0,02$  mm

Comprimento total =  $73,80 \pm 0,02$  mm

Volume da amostra irradiada =  $1000,0 \pm 3,8 \mu\text{L}$

Volume da calota esférica =  $182,0 \pm 0,4 \mu\text{L}$

Volume da parte cilíndrica =  $818,0 \pm 3,1 \mu\text{L}$

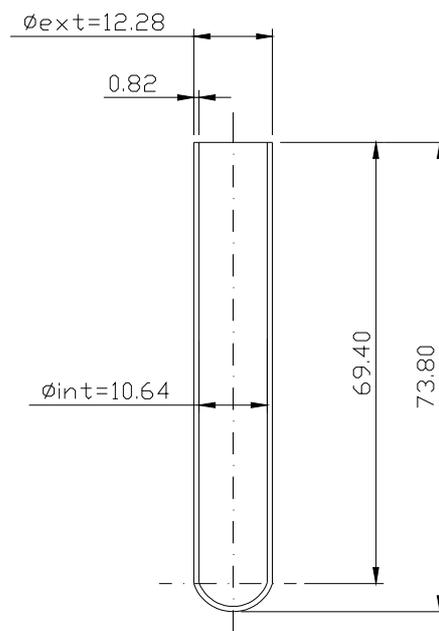


FIGURA 4.13- Dados dimensionais do tubo de ensaio

A FIG. 4.14 ilustra a transmissão da luz LED e laser através da água indicando a quase ausência de absorção (baseline).

Na FIG. 4.15a é observada a suspensão do fungo associado ao TBO sendo irradiada pelo laser (grupo 6) e na FIG. 4.15b a suspensão do fungo associado ao TBO sendo irradiada pelo LED (grupo 5).



FIGURA 4.14- Baseline da água sendo irradiada pelo LED e laser

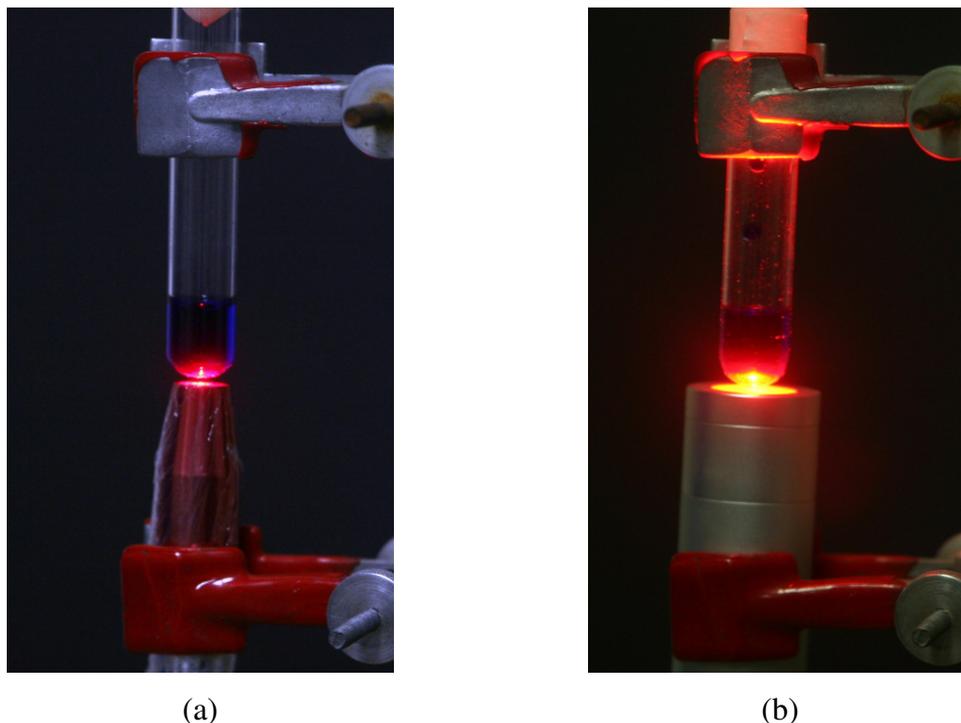


FIGURA 4.15- (a) Amostra do grupo 6 sendo irradiada pelo laser e (b) Amostra do grupo 5 sendo irradiada pelo LED.

Para facilitar a compreensão da realização dos cálculos da área e do volume irradiados pelo laser e LED (Anexo c), duas etapas foram realizadas. Na etapa 1 foram calculadas as áreas fotografadas em que houve maior absorção da luz pelo corante (região mais avermelhada) dos tubos de ensaio dos grupos 5 e 6. Na etapa 2, foram calculados os volumes de suspensão do inóculo irradiados dos tubos de ensaio dos grupos 5 e 6.

## ETAPA 1

Foi utilizado o software laser.exe para a obtenção das medidas em pixels da região dos tubos irradiados pelo laser e LED. O primeiro passo do software foi converter a escala de cores da imagem para tons de cinza (FIG 4.16a e 4.16b).

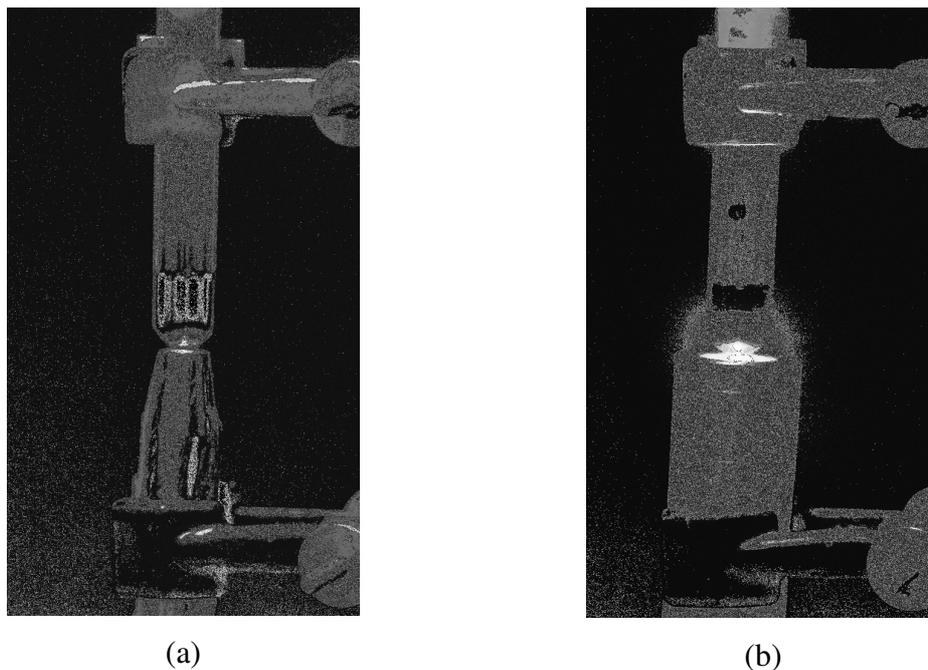


FIGURA 4.16- (a) Conversão da imagem para tons de cinza do grupo 6 e (b) Conversão da imagem para tons de cinza do grupo 5

Em seguida foi realizada a conversão das imagens em tons de cinza para em cores de acordo com a intensidade de luz (aumentando do azul para o vermelho), obtendo-se assim, as áreas irradiadas (FIG. 4.17 e 4.18).

Área Irradiada:  
T: 15,071

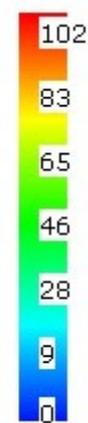
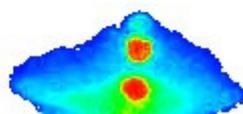


FIGURA 4.17- Imagem processada onde a área irradiada pelo laser foi de 15,1 mm<sup>2</sup> sendo que a escala de cores representa a intensidade de luz em cada região irradiada

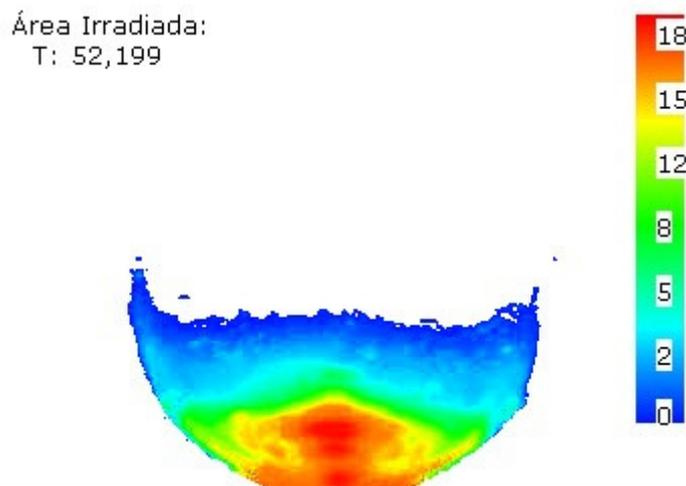


FIGURA 4.18- Imagem processada onde a área irradiada pelo LED foi de 52,2 mm<sup>2</sup> sendo que a escala de cores representa a intensidade de luz em cada região irradiada

Foi obtida a relação entre as áreas LED/laser obtendo-se um valor de 3,45.

## ETAPA 2

Foi realizado o cálculo e a comparação dos volumes irradiados pelo laser e LED (FIG. 4.19 a e FIG. 4.19b, respectivamente).

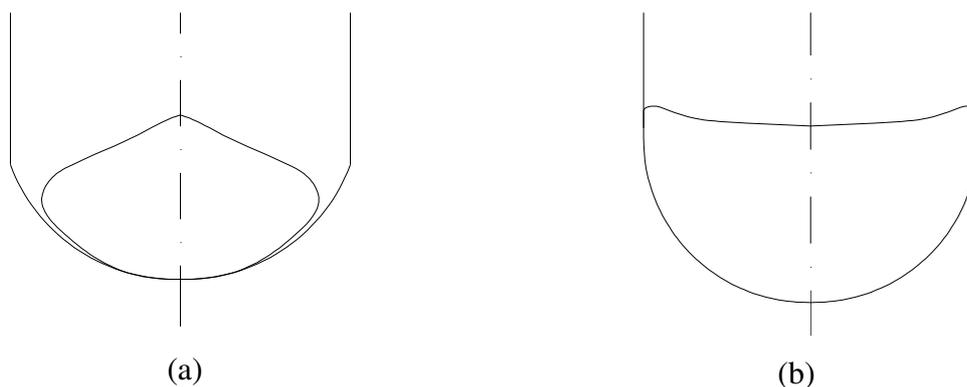


FIGURA 4.19- (a) Esquema do tubo de ensaio do volume irradiado pelo Laser e (b) Esquema do tubo de ensaio do volume irradiado pelo LED.

O cálculo dos volumes foi realizado focando a borda inferior do tubo onde há maior concentração de suspensão do inóculo e de energia do laser e LED absorvidos

pelo corante. As imagens das áreas correspondentes aos grupos 5 e 6 foram exportadas para o programa Solidworks 2006 para gerar o sólido de revolução correspondente a estas imagens (FIG. 4.20 e 4.21). O volume de suspensão irradiado pelo LED foi de 413,70 mm<sup>3</sup> (grupo 5) e pelo laser foi de 64,85 mm<sup>3</sup> (grupo 6). Foi obtida a relação entre os volumes do LED/laser  $413,70 \text{ mm}^3 / 64,85 = 6,4$ . O volume irradiado pelo LED é 6,4 vezes maior que o volume irradiado pelo laser.

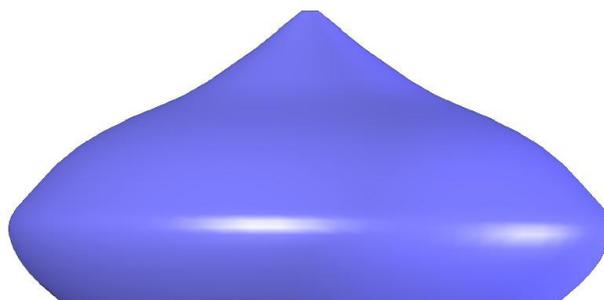


FIGURA 4.20- Sólido gerado pela revolução da curva para o laser.



FIGURA 4.21- Sólido gerado pela revolução da curva para o LED

#### 4.2.4 Análise Estatística

Este estudo teve como objetivo identificar o número de colônias viáveis do fungo frente à exposição de luz laser e LED, considerando-se 6 grupos:

- 1 Controle
- 2 ILED (Inóculo-LED)
- 3 ILASER (Inóculo-laser)

- 4 ITBO (Inóculo-TBO)
- 5 PDT-LED
- 6 PDT-LASER

O resultado avaliado foi o percentual de colônias viáveis de cada um dos grupos em relação ao comportamento do grupo controle de crescimento do fungo. As medidas descritivas são apresentadas em porcentagens e tabelas com a média, mínimo (mín), máximo (máx) e desvio padrão (d.p.). O valor de **n** refere-se ao tamanho da amostra avaliada. Com o objetivo de avaliar a influência conjunta dos fatores de interesse (experimentos e grupos), foi utilizada uma análise de variância baseado num modelo de dois fatores. Esta análise tem como objetivo avaliar a influência de cada um dos fatores, bem como a interação existente entre eles. Quando uma interação mostra-se significativa, pode-se concluir que o comportamento de um fator difere quando se considera os níveis do outro fator. Como a análise indicou uma influência significativa de um dos fatores foi utilizado o teste de comparações múltiplas de médias *LSD (Least Significant Difference)* para avaliar tal efeito. Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% ( $p < 0,05$ ), apresentando 95% de confiança nas conclusões apresentadas (MONTGOMERY, D.C 1991).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos quanto a porcentagem de colônias presentes ( $p < 0,05$ ) (FIG 5.1, 5.2 e 5.3).

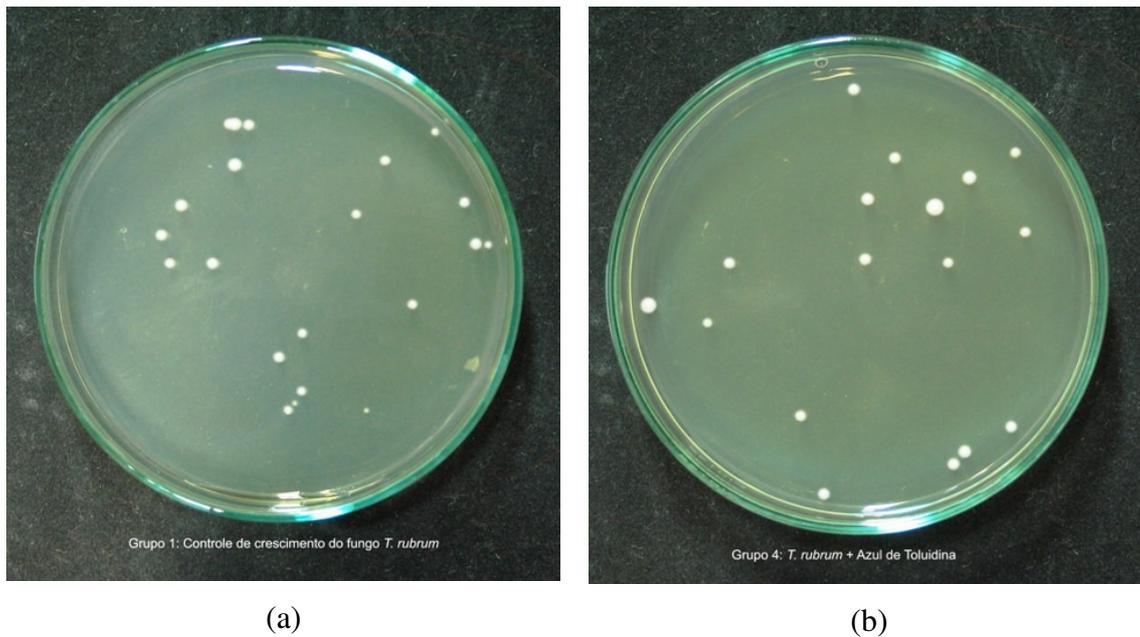


FIGURA 5.1- Placas de Petri com as colônias de *Trichophyton rubrum* dos grupos 1 (a) e 4 (b).

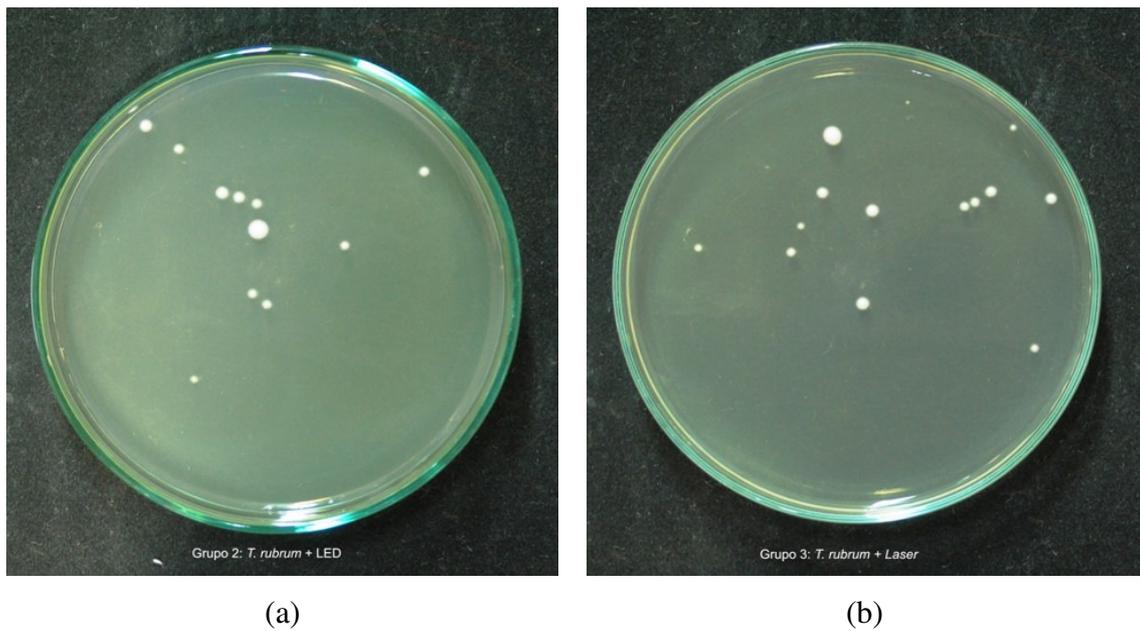


FIGURA 5.2- Placas de Petri dos grupos 2 (a) e 3 (b).

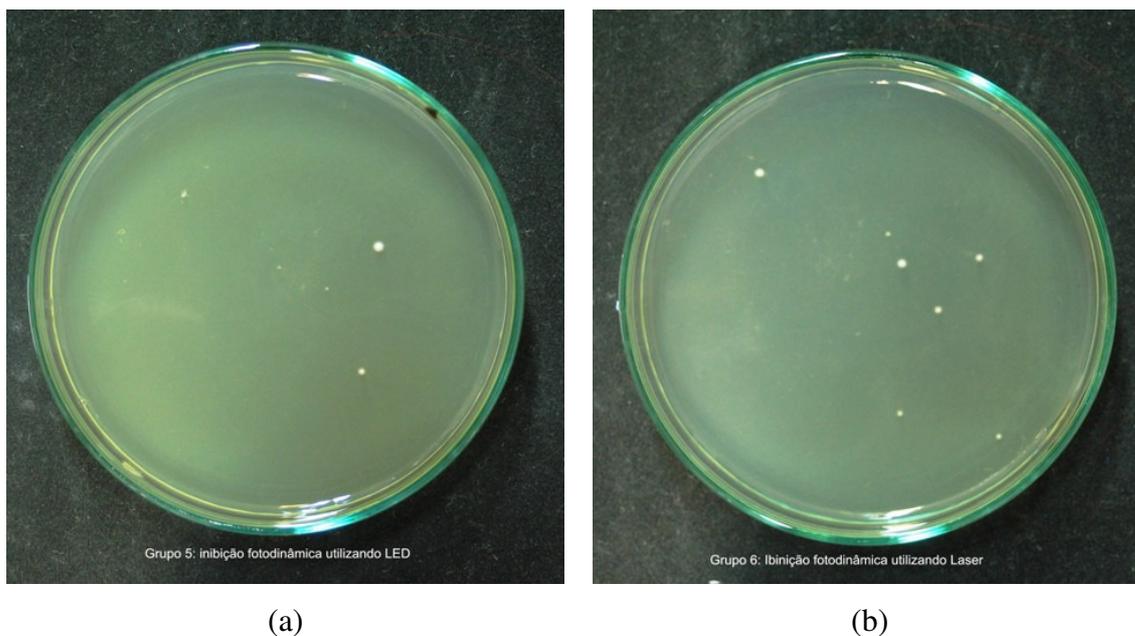


FIGURA 5.3- Placas de Petri dos grupos 5 (a) e 6 (b).

Os resultados mostraram também que não existem diferenças significativas entre os experimentos, não existindo interação entre os dois fatores: grupo e experimento (TAB. 5.1 e TAB. 5.2). O comportamento entre os grupos foi similar em todos os experimentos.

Na TAB 5.1 os grupos apresentados representam as seguintes suspensões:

- Grupo 2: suspensão do inóculo irradiada pelo LED (ILED)
- Grupo 3: suspensão do inóculo irradiada pelo laser (Ilaser)
- Grupo 4: suspensão do inóculo associada ao TBO sem irradiação
- Grupo 5: suspensão do inóculo associada ao TBO e irradiada pelo LED (PDT-LED)
- Grupo 6: suspensão do inóculo associada ao TBO e irradiada pelo laser (PDT-laser)

Os grupos 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si. O percentual de colônias viáveis quando foi utilizado PDT-LED (G-5) e PDT-laser (G-6) foi significativamente inferior ao resultado observado nos demais grupos nos três experimentos (GRA. 5.1).

TABELA 5.1

Avaliação descritiva do percentual de colônias viáveis em relação ao controle considerando-se cada experimento

Experimento	Grupos	Medidas descritivas				
		Mínimo	Máximo	Média	D.p.	CV
1	2-ILED	33,3	83,3	63,9	26,8	41,9
	3-ILASER	50,0	141,7	83,3	50,7	60,8
	4-ITBO	100,0	150,0	119,4	26,8	22,4
	5-PDTLED	17,4	30,4	24,6	6,6	27,0
	6-PDTLASER	30,4	47,8	39,1	8,7	22,2
2	2-ILED	98,1	98,1	98,1	0,0	0,0
	3-ILASER	86,5	115,4	100,0	14,5	14,5
	4-ITBO	51,9	92,3	75,0	20,8	27,7
	5-PDTLED	17,3	40,4	26,9	12,0	44,6
	6-PDTLASER	11,5	69,2	40,4	28,8	71,4
3	2-ILED	15,3	137,3	71,2	61,6	86,6
	3-ILASER	55,9	188,1	139,0	72,3	52,0
	4-ITBO	96,6	117,0	108,5	10,6	9,8
	5-PDTLED	40,7	45,8	44,1	2,9	6,7
	6-PDTLASER	25,4	76,3	52,5	25,6	48,7

Depois de realizadas as comparações entre os grupos dos três experimentos observou-se que o grupo 4 não apresentou redução na porcentagem de crescimento das colônias indicando que o corante sozinho não leva a morte fúngica. Os grupos 2 e 3 apresentaram pouca redução na porcentagem de crescimento das colônias mostrando que a ação do LED e do laser, sem a presença do corante, não foi capaz de inibir o crescimento do fungo de maneira satisfatória.

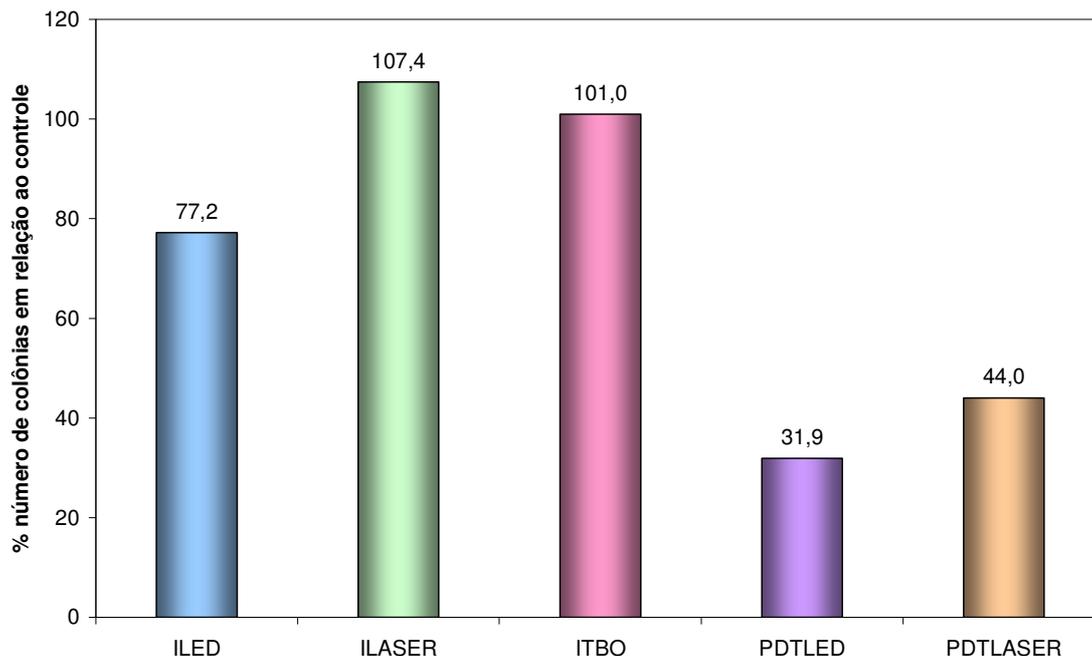


GRÁFICO 5.1- Avaliação descritiva da média percentual de crescimento em relação ao controle considerando-se os 3 experimentos

TABELA 5.2

Resultado da análise de variância da influência dos fatores de interesse na avaliação do percentual de colônias viáveis em relação ao controle

Fonte de variação	F	p
Experimento	1,24	0,3027
Grupo	9,81	0,0001
Experimento x Grupo	1,02	0,4409

Nota: F → estatística do teste da análise de variância

Diferenças significativas foram observadas entre os grupos 5 e 6 em comparação com os demais grupos testados. Ficou comprovado que a associação do LED ao corante (G5) e do laser ao corante (G6) leva a uma diminuição percentual elevada do crescimento das colônias se comparada aos demais grupos. O grupo 5 apresentou a menor porcentagem de crescimento das colônias dentre os demais grupos. Uma explicação para essa diferença é encontrada após a análise da relação entre os volumes de suspensão irradiados pelo laser (64,85 mm<sup>3</sup>) e LED (413,70 mm<sup>3</sup>), onde foi observado que o volume irradiado pelo LED é 6,4 vezes maior que o volume irradiado pelo laser.

Após a análise das áreas irradiadas pelo laser e LED ficou demonstrado que a área irradiada pelo LED é 3,5 vezes maior que a área irradiada pelo laser. O LED, diferentemente do laser, não emite radiação com coerência espacial, portanto, a radiação emitida pelo LED pode ser caracterizada como monocromática, não coerente, e espontânea. Apresenta ainda, área de spot e divergência da luz maior que o laser, abrangendo um volume maior do tubo de ensaio levando conseqüentemente, a uma maior redução do número de colônias. Além do mais, pela análise das espectroscopias, seu pico de absorção está mais próximo ao pico de absorção do TBO, mostrando-se mais ressonante que o laser. A porcentagem média nos três experimentos de colônias viáveis de *Trichophyton rubrum* foi de 31,9% para o LED e 44,0% para o laser.

Uma PDT bem sucedida sempre envolve a otimização de um grande número de parâmetros. Obviamente, a seleção de um fotossensibilizador eficaz é essencial para o sucesso da técnica. Assim, como ele não deve ser tóxico para os seres humanos, o fotossensibilizador necessita absorver o feixe do laser em comprimentos de onda compatíveis e precisa produzir uma eficiência de alta excitação (CHAN E LAI, 2003).

Uma forte relação entre absorção do corante e comprimento de onda deve ser observada na utilização da terapia fotodinâmica, pois a ação fototóxica só ocorre quando a banda de absorção do fotossensibilizador é ressonante com a radiação emitida (SZPRINGER et al., 2004; RIBEIRO E GROTH, 2005; JORI G, 2006). A constante busca por novos corantes só tende a ampliar ainda mais a eficiência e a aplicabilidade clínica da PDT. Corantes menos tóxicos, com banda de absorção ressonante ao comprimento de onda emitido pelos lasers/LEDs aumentariam a eficiência desta terapia, permitindo o combate a infecções cada vez mais profundas e sem a necessidade de múltiplas sessões de aplicação (GARCEZ et al., 2006).

O TBO na concentração de 25 µg/ml foi o escolhido por não apresentar toxicidade no escuro para o microorganismo testado, já que ele sozinho, em contato com a suspensão fúngica não produziu redução do número de unidades formadoras de colônias (UFC/ mL). Por preencher outros requisitos essenciais como: penetração na célula fúngica, banda de absorção ressonante com o comprimento de onda das luzes produzidas pelos equipamentos utilizados, em baixa concentração apresentar efeito antimicrobiano quando irradiado por uma fonte de luz e por ser bem referenciado na literatura.

A PDT direcionada a micologia está na fase inicial. Os poucos trabalhos existentes na literatura em fungos fazem relatos da PDT em espécies de *Candida* spp.,

*Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum*. Diferentes fontes de luzes foram utilizadas pelos autores tais como, lâmpadas de mercúrio, lâmpadas comuns (luz branca) acopladas à filtros coloridos para obtenção do comprimento de onda específico, lâmpadas halógenas equipadas com filtros vermelhos e brancos, laser Hélio-neon (HeNe - 632,8 nm), Arseneto de Gálio-alumínio (GaAl - 630-685 nm), Arseneto de gálio (GaAs - 904 nm), e LEDs (BHATTI et al 2000; FRIEDBERG et al 2001; ZEINA et al 2001; BLISS et al 2004; KARU (1999); CALVAZARA-PINTON, P.G et al 2004a).

Com o advento dos lasers de baixa intensidade, estes passaram a ser utilizados devido às suas próprias características como: monocromaticidade, coerência e colimação, facilitando a associação com um corante de banda de absorção ressonante ao comprimento de onda emitido pelo laser (ACKROYD et al., 2001; RIBEIRO E ZECELL, 2004).

Exposição a lasers e LEDs tem sido utilizada em várias terapias. A irradiação mais efetiva está no espectro do vermelho. A possibilidade de utilizar o espectro vermelho em PDT para dermatofitoses, deve ser considerada, pois este espectro de luz não é absorvido pela hemoglobina e pode penetrar mais profundamente nos tecidos vivos. Esta propriedade é particularmente importante no tratamento de infecções em unhas, bastante persistentes à terapia convencional (SMIJS et al, 2004).

A literatura analisada apresenta parâmetros de aplicação das fontes de luz extremamente variados, dificultando a comparação entre os estudos. Há necessidade de se padronizar o comprimento de onda, a densidade de energia, a potência, a concentração do fotossensibilizador e o modo de aplicação da fonte de luz para que se obtenha uma melhor efetividade antimicrobiana (ZANIN et al., 2003).

Em se tratando de onicomicoses, o tratamento convencional utilizando drogas antifúngicas orais, muitas vezes não é capaz de remover o fungo das unhas antes que estas sejam renovadas. Isto sugere uma possível explicação para o difícil tratamento de tal condição patológica. Apesar da escassez de trabalhos presentes na literatura, a PDT direcionada ao tratamento de dermatofitoses, com o desenvolvimento de fotossensibilizadores específicos para *Trichophyton rubrum*, representa uma opção de tratamento contra uma infecção fúngica em constante expansão.

A revisão da literatura nos mostra que a PDT antimicrobiana em estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” vem alcançando resultados positivos por sucessivos autores em maiores ou menores proporções. Em fungos poucos trabalhos foram realizados sendo que na maioria utilizou-se de amostras não patogênicas.

Uma grande vantagem da terapia fotodinâmica é sua ação local e restrita no tratamento, assegurando uma manutenção na ecologia entérica que normalmente é muito afetada pelos antibióticos. Apesar de ainda não existirem estudos conclusivos sobre resistência bacteriana à ação da terapia fotodinâmica, só o fato dela não agir indiscriminadamente no organismo do hospedeiro já constitui um benefício significativo nos complexos sistemas bacterianos e fúngicos (CHAN E LAI 2003).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a terapia fotodinâmica constitui uma alternativa de inibir “*in vitro*” o crescimento de *T. rubrum*. É necessária a realização de outros estudos, principalmente “*in vivo*”, para melhor adaptação da técnica às condições orgânicas dos pacientes. Esta técnica, aliada a um diagnóstico correto, pode possibilitar um aumento da cura desta doença, sem os efeitos colaterais produzidos pelas drogas antifúngicas e com maiores taxas de adesão ao tratamento pelos pacientes.

## 6. CONCLUSÕES

O corante TBO na concentração de 25µg/mL apresenta-se promissor para sua utilização em testes de inativação fotodinâmica devido principalmente:

- ser ressonante com os comprimentos de onda do laser e LED.
- ser bem absorvido pelo *T. rubrum*.

O *Trichophyton rubrum* corado pelo TBO apresentou redução de 68,1% e 56% do número de colônias viáveis utilizando-se respectivamente LED e laser.

O LED por apresentar uma divergência maior que a luz laser, abrangeu um volume maior de suspensão do inóculo mostrando-se mais eficiente na sua ação fototóxica.

## ABSTRACT

*Trichophyton rubrum* is the most common micro-organism infecting fungal dermatological lesions. The aim of the present work is to study the effect of low intensity light source (in the red band of the electromagnetic spectrum) on *Trichophyton rubrum* sample associated to a photosensitizer (Toluidine Blue). Two light sources were employed in the tests: diode laser (660 nm, power output of 100 mW, exposition time of 3 minutes) and LED (630 nm, power output of 100 mW, exposition time of 3 minutes). Toluidine Blue (TBO) was chosen due to its optical (maximal absorption in the wavelengths of the laser and the LED sources) and biochemical (well absorbed by fungi cells) properties. *Trichophyton rubrum* were suspended in a standard solution and six test groups were prepared with a final suspension volume of 1000 L. Group 1: growth control without treatment; Group 2: inoculum suspension exposed to LED irradiation; Group 3: inoculum suspension exposed to laser irradiation; Group 4: 100 L of TBO added to 900 L of inoculum; Group 5: 100 L of TBO added to 900 L of inoculum and exposed to LED irradiation; Group 6: 100 L of TBO added to 900 L of inoculum and exposed to laser irradiation. The irradiation time was 3 minutes for Groups 2, 3, 4, 5 and 6. For Groups 5 and 6 it was observed 5 minutes of pre-irradiation time (PIT) after the introduction of TBO and before irradiation. The results exhibited significant differences between Groups 5 and 6 with 68.1% and 56% reduction, respectively, regarding the number of viable colonies. LED source generates a non-coherent light beam, presenting bigger divergence if compared to the laser beam. As consequence, it encompassed a bigger volume of inoculum suspension, bringing, by this way, its phototoxic action to a bigger number of cells.

**Keywords:** *Trichophyton rubrum*, PDT, LASER, LED

## REFERÊNCIAS

1. ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. photobiol.*, Oxford, v.74, n.5, p.656-669, Feb. 2001.
2. AMORIM, J.C.; SOUSA, G.R.; SILVEIRA, L.B.; PRATES, R. A.; PINOTTI, M.; RIBEIRO, M.S. Clinical study of the gingiva healing after gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, Oxford, v.24, n.5, p.588-594, Aug. 2006.
3. ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag. photodyn. ther.*, Amsterdam, v.1, n.1, p.27-42, May. 2004.
4. BALLESTÉ, R.; MOUSQUÉS, N.; GEZUELE, E. Onicomycosis. Revision del tema. *Rev. Med. Uruguay*, Montevideo , v.19, n.2, p.93-106, ago. 2003.
5. BHATTI, M.; MACROBERT, A.; HENDERSON, B.; SHEPHERD, P.; CRIDLAND, J.; WILSON, M. Antibody-targeted lethal photosensitization of porphyromonas gingivalis. *Antimicrob. agents chemother.*, Washington, v.44, n.10, p.2615-2618, Oct. 2000.
6. 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, June 2004.
7. BOZKURT, A.; ONARAL, B. Safety assessment of near infrared light emitting diodes for diffuse optical measurements. *Biomed. eng. online.*, 2004. Disponível em: < <http://www.biomed.drexel.edu/fnir/J2.pdf> >. Acesso em: 30/04/2007.
8. CALVAZARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; CAPEZZERA, R.; SALA, R.; ZANE, C. Photodynamic therapy of interdental mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatol. photoimmunol. photomed.*, Copenhagen, v.20, n.3, p.144-147, June 2004 a.
9. CALVAZARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. photochem. photobiol. B*, Lausanne, v.78, n.1, p.1-6, Jan. 2004 b.

10. CHAN, Y.; LAI, C. H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers med. sci.*, London, v.18, n.1, p.51-55, Mar. 2003.
11. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2002.
12. COSTA, M.; PASSOS, X. S.; SOUSA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B.; LEMOS, J. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; SILVA, M. R. R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Rev. soc. Brasil med. trop.*, Uberaba, v.35, n.1, p.19-22, jan-fev. 2002.
13. CRUANES, J. C. *La terapia laser hoy*. Barcelona: Centro de Documentación Laser de Meditec, 1984. 164p.
14. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch. oral. biol.*, Oxford, v.37, n.11, p.883-887, Nov. 1992.
15. FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *J. dermatol.*, Tokyo, v.149, Suppl. 65, p.1-4, Sep. 2003.
16. FRIEDBERG, J. S.; SKEMA, C.; BAUM, E. D.; BURDICK, J.; VINOGRADOV, S. A.; WILSON, D. F.; HORAN, A. D.; NACHAMKIN, I. In vitro effects of photodynamic therapy in *aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, v.48, n.1, p.105-107, Jul. 2001.
17. GARCEZ, A.S.; NÚÑEZ, S. C.; LAGE-MARQUES, J. L.; JORGE, A. O. C.; RIBEIRO, M. S. Efficiency of NAOCL and laser assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Patholog Oral Radiol Endod* 2006; 102: e93-e98.
18. JACKSON, Z.; MEGHJI, S.; MacROBERT, A.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Killing of the yeast and hyphal forms of *candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers med. sci.*, London, v.14, n.2, p.150-157, June 1999.
19. JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J. environ. pathol. toxicol. oncol.*, Illinois, v.25, n.1-2, p.505-520, Jan-Jul. 2006.

20. KAMP, H.; TIETZ, H. J.; LUTZ, M.; PIAZENA, H.; SOWYRDA, P.; LADERMANN, J.; BLUME-PEYTON, U. Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. *Mycoses*, Berlin, v.48, n.2, p.101-107, Mar. 2005.
21. KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near - IR radiation on cells. *J. photochem. photobiol B*, Lausanne, v.49, n.1, p.1-17, Mar. 1999.
22. KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. photochem. photobiol. B*, Lausanne, v.66, n.2, p.89-106, Mar 2002.
23. KÖNIG, K. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell. mol. biol.*, Elmsford, v.46, n.7, p.1297-1303, Nov. 2000
24. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Micoses superficiais. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de micologia médica*. 9.ed. São Paulo: Sarvier; 2002. Cap. 10, p. 252-340.
25. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. Testes de susceptibilidade. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de micologia médica*. 9.ed. São Paulo: Sarvier, Cap. 36, p. 830-863. 2002.
26. LAURO, F. M.; PRETTO, P.; COVOLO, L.; JORI, G.; BERTOLONI, G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *Photochem. photobiol. sci.*, Cambridge, v.1, n.7, p.468-470, Jul. 2002.
27. LECHA, M. Amorolfine and itraconazole combination for severe toenail onychomycosis; results of an open randomized trial in Spain. *Br. j. dermatol.*, London, v.145, (Suppl. 60), p.21-26, Oct. 2001.
28. LIAMBRICH, A.; LECHA M. Tratamiento actual de las onicomicosis. *Rev. iberoam. micol.*, Barcelona, v.19, n. 3, p.127-129, Sep. 2002.
29. LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; MARI, C. R.; OLIVEIRA, L. T.; BRUM, L. M.; WESTPHALEN, J. B.; FURIAN, F. W.; ALTERMANN, M. J. A ten-year survey of *tinea pedis* in the central region o the Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, São Paulo, v.41, n.2, p.75-77, mar-abr. 1999.
30. LOPES, R. F. F. Sinalização celular. In: COOPER, G.M. *A célula: uma abordagem molecular*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. Cap. 13, p. 547-594.

31. MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím. Nova*, São Paulo, v.23, n.2, p.237-243, mar-abr. 2000.
32. MATEVSKI, D.; WEERSINK, R.; TENENBAUM, H. C.; WILSON, B.; ELLEN, R. P.; LÉPINE, G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered xenon lamp in vitro. *J. periodontal. res.*, Copenhagen, v.38, n.4, p.428-435, Aug. 2003.
33. MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J. photochem. photobiol. B*, Lausanne, v.79, n.2, p.159-170, May. 2005.
34. MELLO, J. B.; MELLO, G. P. S.; MELLO, L. S. Laser de baixa potência. In: MELLO, J. B.; MELLO, G. P. S. *Laser em odontologia*. São Paulo: Santos. 2001. Cap.7, p.73- 85.
35. MONTGOMERY, DOUGLAS C., Design and Analysis of Experiments. New York: John Wiley & Sons, 1991, 649p.
36. PFITZNER, A.; SIGUSCH, W.; ALBRECHT, V.; GLOCKMANN, E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J. periodontol.*, Indianapolis, v.75, n.10, p.1343-1349, Oct. 2004.
37. PRATES, R. A.; YAMADA, A. M.; SUZUKI, L. C.; EIKO HASHIMOTO, M. C.; CAI, S.; GOUW-SOARES, S.; GOMES, L.; RIBEIRO, M. S. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Photochem. Photobiol. B*, Lausanne, v.86, n.1, p.70-76, Jan. 2006.
38. REIS, E. R. Glândula harderiana de ratos wistar como modelo para o estudo de efeitos fotodinâmicos. 2004. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
39. RIBEIRO, M. S; GROTH, E. B. Terapia fotodinâmica antimicrobiana: aplicações na odontologia. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ODONTOLOGIA DE SÃO PAULO, 23, 2005, São Paulo. *Livro Virtual do 23º CIOSP*. São Paulo: Netodonto, 2005. cap. 8, p. 1 - 49. Disponível em: <<http://www.netodonto.com.br/ciosp/index.php#>>. Acesso em: 01 maio 2007.
40. RIBEIRO, M. S.; ZECELL, D. M. Laser de baixa intensidade. In: GUTKNECHT, N.; EDUARDO, C. P. *A odontologia e o laser*; atuação do laser

- na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence, 2004. Cap. 05, p.217-240.
41. ROVALDI, C. R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N. A.; FRIDEN, P. M.; ROTHSTEIN, D. M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. *Antimicrob. agents chemother.*, Washington , v. 44, n.12, p.3363-3367, Dec. 2000.
  42. SANTOS, J. I.; NEGRI, C. M.; WAGNER, D. C.; PHILIPPI, R.; NAPPI, B. P.; COELHO, M. P. Some aspects of dermatophytes seen at University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.39, n.3, p.137-140, mai-jun. 1997.
  43. SANTOS, D. A.; HAMDANN, J. S. *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. *Mycoses*, 50(4):296-9, Jul., 2007
  44. SARKAR, S.; WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J. periodontol. res.*, Copenhagen, v.28, n.3, p.204-210, May. 1993.
  45. SCHABERLE, F. A. *Breve histórico da terapia fotodinâmica*. Departamento de física e matemática. USP. São Paulo. 2002.
  46. SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Dermatofitose. In: \_\_\_\_\_. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 10, p.107-131.
  47. SILVA, A. R. *Análise das propriedades fotossensibilizantes do in (III) – mesotetrafenilporfirina para uso em terapia fotodinâmica*. 2003. 98f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
  48. SILVA GARCEZ, A.; NÚÑEZ, S. C.; LAGE-MARQUES, J. L.; JORGE, A. O.; RIBEIRO, M. S. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.*, St. Louis, v.102, n.4, p.e93-98, Oct. 2006.
  49. SMIJS, TG.; VAN DER HAAS, N.; LUGTENBURG, J.; LUI, Y.; JONG, R L.; SCHUITMAKER, H. G. Photodynamic treatment of the dermatophyte *trichophyton rubrum* and micronidia with porphyrin photosensitizers. *Photochem. photobiol.*, Oxford, v.80, n.2, p.197-202, Sep-Oct. 2004.

50. SMITH, K. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. *Laser ther.*, New York, v.3, n.1, p.19-24, Jan-Mar. 1991.
51. SOUKOS, N. S.; WILSON, M.; BURNS, T.; SPEIGHT, P. M. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and streptococcus sanguis evaluated in vitro. *Lasers surg. med.*, New York, v.18, n.3, p.253-259, Jul-Sep. 1996.
52. SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALCUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. C. Photosensitization of different candida species by low power laser light. *J. Photochem. Photobiol. B.*, Lausanne, v.83, n.1, p.34-38, Jan. 2006.
53. STHAL, F.; ASHWORTH, S. H.; JANDT, K.D.; MILLS, R. W. Light-emitting diode (LED) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. *Biomaterials*, Guildford, v.21, n.13, p.1379-1385, July 2000.
54. SZPRINGER, E.; LUTNICKI, K.; MARCINIAK, A. Photodynamic therapy; mechanism and employment. *Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska [Med]*, Lublin, v.59, n.2, p.498-502, Apr-Jun. 2004.
55. TEICHERT, M. C.; JONES, J. W.; USACHEVA, 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. 2000.
56. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. antimicrob. chemother.*, London, v.42, n.1, p.13-28, Jul. 1998.
57. WALSH, L. J. The current status of laser applications in dentistry. *Aust. dent. j.*, Sydney, v.48, n.3, p.146-155, Sep. 2003.
58. WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust. dent. J.*, Sydney, v. 42, n.5, p.302-306, Oct. 1997.
59. WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clin. microbiol. rev.*, Washington, v.8, n.2, p. 240-259, Apr. 1995.
60. WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J. appl. bacteriol.*, London, v.75, n.4, p.299- 306, Oct. 1993.
61. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON G. J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the

- presence of a photosensitizer. *J. appl. bacteriol.*, London, v.78, n.5, p.569-574, May. 1995.
62. ZAMPIERI, M. J. P.; COGO, J. C.; GENOVESE, W. J.; BARBOSA, A. D. Ação bactericida da terapia fotodinâmica (AsGaAl) sobre bactérias *St mitis* *St sanguis*. “in vitro”. *Rev. bras. implant.*, Rio de Janeiro, v.9, n.2, p.16 -17, abr.-jun. 2003.
63. ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA, JR. A.; GONÇALVES, R. B. Aplicação da terapia fotodinâmica na descontaminação bacteriana. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, São Paulo, v.56, supl. p. 07-11, jun. 2002.
64. ZANIN, I. C. J.; GONÇALVES, R. B. Novas perspectivas do uso do laser terapêutico In: BRUGNERA JÚNIOR, A.; SANTOS, A. E. C.; BOLOGNA, E. D.; LADALARDO, T. C. C. G. *Laserterapia aplicada à clínica odontológica*. São Paulo: Santos; 2003. Cap.6, p.99-102.
65. ZEINA, B.; GREENMANN, J.; PURCELL, W. M. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br. j. dermatol.*, Tokyo, v.144, n.2, p.274-278, Feb. 2001.

## ANEXO A

### A.1 LASER

A presença do laser já é notada em várias atividades como em telefonia, “shows”, hospitais, dentre outras. Em numerosas fábricas e indústrias de diversas atividades, os lasers executam uma série de tarefas com mais rapidez e precisão que os métodos tradicionais. Sua importância cresce à medida que novos avanços são obtidos no domínio da tecnologia de sua construção, de novos meios laser, regimes de operação, tratamento do feixe e do conhecimento da interação da radiação com a matéria. Suas características peculiares possibilitam a execução de tarefas que seriam muito difíceis, ou até impossíveis, através de outros métodos. Um feixe laser pode atingir pontos pequenos, com intensidade extremamente alta em lugares de difícil acesso ou de ambiente agressivo. Logo após o desenvolvimento do primeiro laser de rubi, em 1960, a utilização do laser em medicina, foi dirigida por uma curiosidade científica natural com a esperança de que estes equipamentos pudessem se tornar uma nova opção de tratamento. Os primeiros sistemas lasers eram caros e raramente dedicados para uma tarefa médica particular.

Atualmente, os lasers perderam seu mistério e devem demonstrar sua eficiência em comparação a técnicas convencionais ou novos instrumentos competitivos. Já se tornaram instrumentos bem estabelecidos na oftalmologia, ortopedia, dermatologia, odontologia, em cirurgia geral entre tantas outras aplicações. A palavra laser é formada pelas iniciais de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* que significa Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. A emissão estimulada foi descrita pela primeira vez em 1917, por Einstein, de forma teórica. Em 1951, Charles Townes, da Universidade de Colúmbia (EUA) desenvolveu o MASER (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). Em 1958, Townes e Schawlow, do Bell Telephone Laboratories, EUA, propuseram estender os princípios do MASER para as regiões do infravermelho e visível do espectro eletromagnético. Idéias similares ao MASER tiveram lugar em Moscou (Basov e Prokhorov) em 1954. Entretanto, apenas em 1960 foi demonstrada a primeira ação laser pulsada, baseada em um cristal de rubi, por Maiman, da *Hughes Aircraft*, EUA. Logo

após, em 1961, foi demonstrada a emissão laser contínua em He-Ne por Javan, da Bell Labs, EUA. Gordon desenvolveu em 1964 os lasers de argônio, criptônio e xenônio e Patel introduziu o laser de CO<sub>2</sub> em 1965. Goldman, em 1964, assim como Stern and Sognaes, realizaram pesquisas com o laser de rubi para preparos cavitários de dentes. No início dos anos 80, os lasers já eram usados em campos como a dermatologia, otorrinolaringologia, ginecologia, cirurgia geral, neurocirurgia e urologia. O desenvolvimento de materiais levou à obtenção de fibras ópticas e a miniaturização levou ao desenvolvimento de fibroscópios que permitiram, a partir do início da década de 80, um crescimento nas aplicações de laser em todas as áreas de saúde (AMORIM *et al.*, 2006).

## A.2 Laser de baixa intensidade

Os comprimentos de onda associados aos efeitos obtidos com estes lasers situam-se dentro do espectro eletromagnético, na porção do visível ao infravermelho próximo. Os comprimentos de onda mais utilizados nas áreas biomédicas estão entre 600nm e 980nm apresentando boa penetração na pele e nas mucosas. Os lasers mais utilizados em aplicações clínicas são os de He-Ne e semicondutor. Os de He-Ne são lasers compostos por uma mistura de gases nobres com predomínio do Hélio (90%) e de neônio (10%), operando no visível. Os lasers de diodo (semicondutores) consistem de um sanduíche p-n, sendo a radiação emitida pelas laterais entre as camadas do sanduíche. Se as suas faces laterais forem polidas precisamente perpendiculares ao sanduíche elas podem servir de espelhos da cavidade ressonante. Neste caso não há a necessidade de espelhos ou de nenhuma outra estrutura em todo o laser exceto a fonte de alimentação, tornando-se um sistema extremamente compacto. A junção p-n de arseneto de gálio é essencialmente um diodo emissor de luz, o qual é levado à emissão laser pela passagem de uma corrente excessivamente alta (AMORIM *et al.*, 2006).

Na utilização dos lasers é de fundamental importância conhecer duas medidas físicas: intensidade e densidade de energia.

**Intensidade (I)** é a quantidade de potência,  $P$ , em Watts (W), sobre a área,  $A$ , a ser depositada, em cm<sup>2</sup>, dada pela EQ.A.1:

$$I = \frac{P}{A} \tag{A.1}$$

Como existe uma variedade enorme de lasers utilizados nas áreas biomédicas, com potências diferentes, esta relação entre as grandezas pode modificar o efeito desejado sobre os tecidos biológicos.

**Densidade de energia ou fluência** é a potência,  $P$ , em Watt, multiplicada pelo tempo,  $T$ , em segundos, sobre a área,  $A$ , em  $\text{cm}^2$ , dada pela seguinte expressão matemática (AMORIM *et al.*, 2006), EQ. A.2:

$$F = \frac{P * T}{A} \quad \text{A.2}$$

Os lasers que emitem em baixas intensidades não causam efeitos térmicos, mas sim, fotoquímicos, fotofísicos e/ ou fotobiológicos, quando interagem com células ou tecidos. Os tecidos biológicos possuem cromóforos (substâncias que absorvem luz) como a melanina, hemoglobina, hemomoléculas, porfirinas, citocromo-oxidase dentre outras, que ao absorverem a luz laser, produzem estimulação ou inibição de atividades enzimáticas e reações fotoquímicas. Estas ações determinam uma cascata de reações metabólicas com efeitos terapêuticos (CRUANES, 1984).

De acordo com (KARU, 1999) as mitocôndrias são os primeiros cromóforos absorvedores pelos lasers de luz visível e as membranas celulares pelos lasers de emissão infravermelha. Esta seria uma proposta para explicar as diferentes ações desses lasers de baixa intensidade sobre os tecidos. Esses lasers são amplamente utilizados na medicina e odontologia, principalmente, devido às ações de aliviar a dor, reduzir edema, atuar em parestesias, paralisias faciais e mais recentemente em PDT.

## ANEXO B

### B.1 LED “Light Emitting Diodes”

LEDs são diodos especiais que emitem luz quando conectados a um circuito. Apresentam dois fios (positivo e negativo) ligados a um bulbo. A parte negativa pode ser indicada pelo lado mais plano e através do fio menor. O LED opera em voltagens relativamente baixas, um a quatro volts, e correntes entre 10 e 40 miliamperes (FIG. B.1).

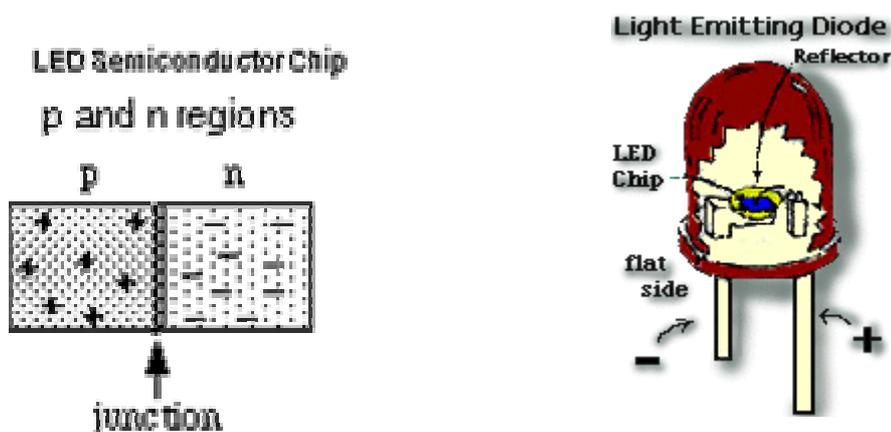


FIGURA B.1- Modelo de formação de um LED

A parte mais importante de um LED é o “chip” semicondutor localizado no centro do bulbo. O semicondutor possui duas regiões “p” e “n” separadas por uma junção “p-n”. A região “p” é dominada por cargas positivas e a “n” por cargas negativas. A junção age como uma barreira através da qual os elétrons circulam. Apenas quando uma voltagem suficiente é aplicada ao “chip” semicondutor, a corrente elétrica pode circular e os elétrons atravessam a junção para a região “p”. Cada elétron que recombina com uma carga positiva forma uma energia elétrica potencial que é convertida em energia eletromagnética. Um quantum dessa energia é emitido na forma de um fóton de luz com a frequência característica do material semicondutor (geralmente uma combinação de elementos químicos: gálio, arsênio e fósforo). Somente fótons com frequências pequenas podem ser emitidos através de qualquer material. Os LEDs que emitem diferentes cores são feitos de diferentes materiais semi-condutores e requerem

diferentes energias para produção de luz. Além de policromática, a luz produzida por um LED é despolarizada, ao contrário daquela produzida por um laser. A energia elétrica é proporcional à voltagem necessária para causar a circulação dos elétrons na junção “p-n”. A energia (E) da luz emitida através do LED está relacionada à carga elétrica (q) de um elétron e à voltagem (V) requerida, através da equação:  $E = qV$ , onde q (constante de Coulomb) =  $- 1,6 \times 10^{-19}$ . A frequência da luz está inversamente relacionada ao seu comprimento de onda, em um único meio. Através de um espectrômetro, a luz emitida pelo LED pode ser examinada obtendo-se o pico do comprimento de onda (BOZKURT, A. E ONARAL, B, 2004).

O LED apresenta várias vantagens como: alta durabilidade, fácil adaptação aos circuitos elétricos, pode ser facilmente transportado para qualquer lugar, altamente eficiente, não há produção elevada de calor já que a maior porcentagem da energia elétrica utilizada é direcionada para a produção de luz.

Nos 20 anos de história das comunicações ópticas, assistimos a uma notável evolução na tecnologia das fibras, dos lasers, dos LEDs e fotodetectores que permitem aos sistemas ópticos, não apenas substituir os elétricos com vantagens operacionais, mas também realizar funções que eram antes impossíveis. Existem várias fontes ópticas que podem ser utilizadas em odontologia como os lasers e os LEDs (Light Emitting Diode). A diferença básica entre eles é que nos LEDs predomina o mecanismo da emissão espontânea de radiação e nos lasers a emissão estimulada de luz. Dessa distinção básica decorrem as diferenças estruturais entre os dois dispositivos que nem sempre são acentuadas, decorrendo diferenças funcionais que dão aos lasers um desempenho geralmente superior, porém, bem mais complexo. Os lasers precisam de grande quantidade de energia para sua geração, enquanto os LEDs necessitam de pouca energia para a geração de luz. Entre os dispositivos utilizados como fonte de luz em odontologia, os LEDs são os mais simples e baratos. Apresentam um largo espectro de luz sendo mais utilizados em sistemas de transmissão de menor capacidade. Embora seja uma fonte de luz divergente e não coerente semelhante a luz halógena, apresentam um espectro de emissão bem mais estreito tendo um aproveitamento bem melhor que a luz halógena (STHAL *et al.*, 2000).

## ANEXO C

### C.1 Cálculo da área e do volume das imagens dos grupos 5 e 6

Para realizar o cálculo da área e do volume das imagens dos grupos 5 e 6 foi feito o seguinte procedimento:

1- As fotos foram tiradas posicionando-se o LED e o laser exatamente abaixo do fundo do tubo de ensaio.

2- Foi utilizada uma máquina fotográfica Canon EOS - Digital Rebel Resolução 3072 x 2048 pixels - Tipo de sensor CMOS - Sistema de cor RGB - Distância da máquina aos tubos de ensaio foi de 70 cm - Lente 105 mm - Câmara com fator de multiplicação focal= 1.6 - Abertura 18 -Total 6.3 mega pixels - Tempo de exposição 1/4 segundos - Fabricante: Canon Inc. - Japão

3- Cada foto foi tratada, a fim de criar uma falsa escala de cores, que relaciona as propriedades da região do tubo de ensaio fotografada com as cores dessa escala.

4- A partir da imagem tratada, foi usado um software LASER.EXE (cuja rotina foi desenvolvida no Labbio) que, a partir da informação que relaciona número de pixels com o tamanho real da imagem, retornou como resultado a área da imagem (FIG C.1a e FIG C.1b).

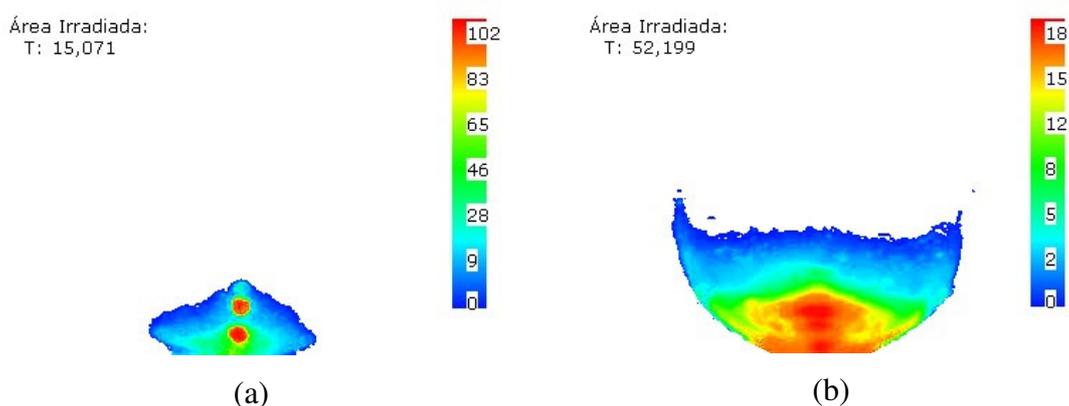


FIGURA C.1- (a) Área/laser=15,1mm<sup>2</sup> e (b) Área/ LED= 52,2mm<sup>2</sup>

É possível ver nas imagens acima que o fundo das mesmas é reto e horizontal, ao contrário do restante do contorno, o que nos causa a impressão que a

imagem foi “cortada”. No entanto, ao observar as fotos originais e compará-las com as imagens obtidas, é fácil perceber que o fundo da imagem foi apenas aproximado para a reta, perdendo uma quantidade muito pequena de imagem. Além disso, os softwares disponíveis para o tratamento das fotos não oferecem uma resolução que seja capaz de identificar o contorno inferior das imagens. Outro fator de relevância que sustenta a hipótese de aproximar esse contorno a uma linha reta é estarmos trabalhando com um método de aproximação para o cálculo da área e posteriormente do volume. Ou seja, o erro devido ao contorno é desprezível quando comparado aos erros dos softwares e do operador para o cálculo da área e volume. É sabido também que, os valores numéricos obtidos da área e do volume, serão usados como razões, a fim de se obter números adimensionais. Dessa maneira, todas as imagens possuem o mesmo erro, o que nos dá mais segurança para compará-las. Por fim, é importante ressaltar, que todos os argumentos, apesar de serem qualitativos e não quantitativos, nos dão segurança suficiente para fazer tal aproximação. A FIG. C.2 identifica as fotos originais com um quadrante em destaque mostrando onde a imagem foi cortada.

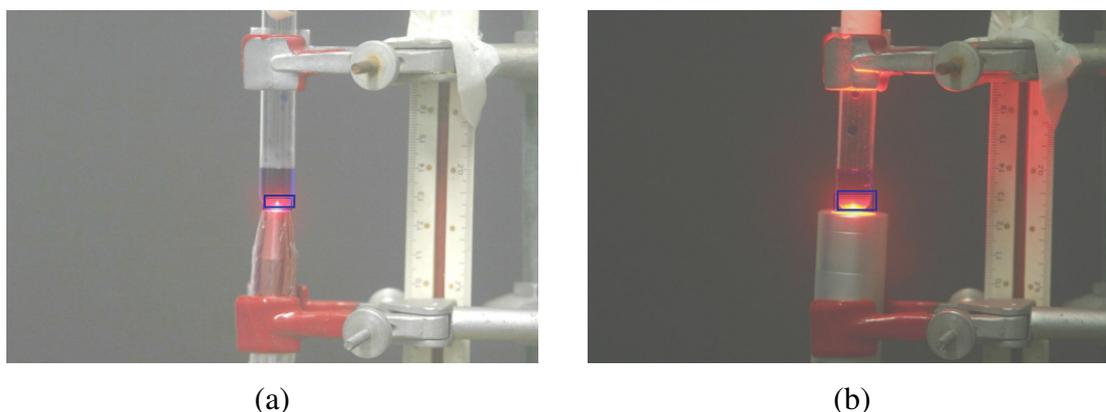


FIGURA C.2- Imagens originais do tubo sendo irradiado pelo laser à esquerda (a) e pelo LED à direita (b). Em destaque a área de corte

5- Especificamente, para o cálculo do volume, foi utilizado um software comercial de engenharia SolidWorks 2006. Para cada uma das imagens, pegou-se um número de pontos da borda e traçou-se uma linha reta horizontal até a outra borda. Cada uma dessas retas foi revolucionada a partir de um eixo central, perpendicular às mesmas. Novamente utilizando as informações que relacionam o número de pixels com o tamanho real da imagem, foi possível, através desse software, criar um número de planos circulares próximos um do outro que estariam contidos no sólido que se deseja

calcular o volume. Com as ferramentas disponíveis no SolidWorks, esses planos foram aproximados e um sólido foi criado. O volume desse sólido (que numericamente é dado pelo próprio software SolidWorks) é a aproximação do volume que se desejava calcular. A FIG. C.3 esquematiza como foi feito esse procedimento descrito.

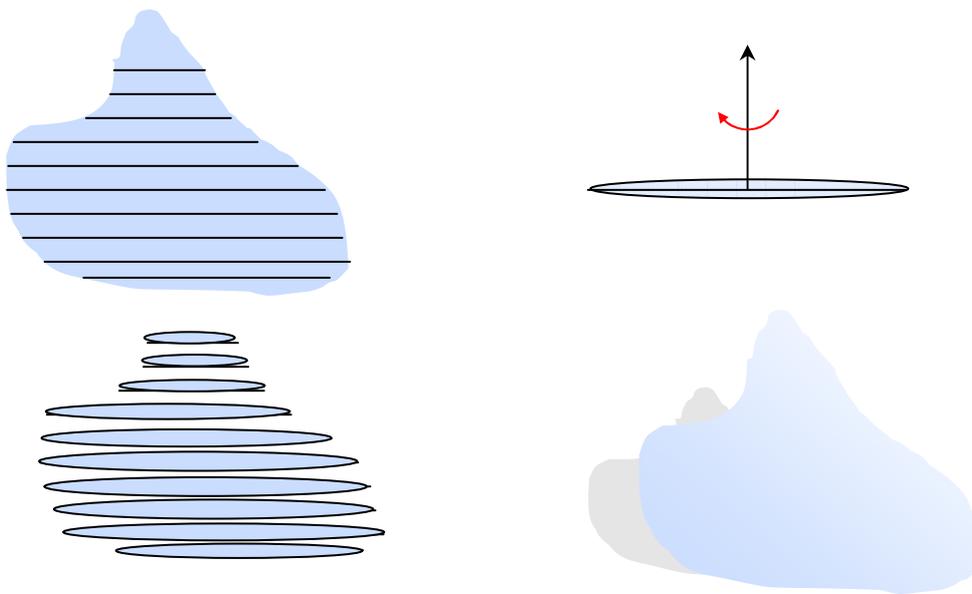


FIGURA C.3- Esquema do procedimento para a criação do sólido que forneceu o valor numérico do volume