

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

"ESTUDO DO EFEITO DA BIOESTIMULAÇÃO E DA TERAPIA
FOTODINÂMICA EM *Candida albicans*, MONITORADA COM
ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA"

Letícia Dias Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como
complementação dos créditos necessários para obtenção
do título de Mestre em Engenharia Biomédica

São José dos Campos, SP

2004

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

"ESTUDO DO EFEITO DA BIOESTIMULAÇÃO E DA TERAPIA
FOTODINÂMICA EM *Candida albicans*, MONITORADA COM
ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA"

Letícia Dias Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como
complementação dos créditos necessários para obtenção
do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Acosta Avalos
Co-Orientadora: Prof. Dr. Maricília Silva Costa

São José dos Campos, SP

2004

L698e

Lima, Leticia Dias

Estudo do efeito da bioestimulação e da terapia fotodinâmica em *candida albicans*, monitora com espectroscopia fotoacústica / Leticia Dias Lima. São José dos Campos: UniVap, 2004. 67p.: il.; 31cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

1. Espectroscopia fotoacústica 2.Fungos 3.*Candida albicans*, 4..Terapia Fotodinâmica 5. Bioestimulação I. Avalos, Daniel Acosta, Orient. II. Costa, Maricília Silva III. Título

CDU: 615.831

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Aluna:

Data:

"ESTUDO DO EFEITO DA BIOESTIMULAÇÃO E DA TERAPIA
FOTODINÂMICA EM *Candida albicans*, MONITORADA COM
ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA"

Letícia Dias Lima

Banca Examinadora

Prof. ^a Dr. ^a Cristina Pacheco Soares	(UNIVAP)	_____
Prof. Dr. Daniel Acosta Avalos	(UNIVAP)	_____
Prof. ^a Dr. ^a Maricília Silva Costa	(UNIVAP)	_____
Prof. ^a Dr. ^a Nélia Ferreira Leite	(INPE)	_____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D

São José dos Campos,

de

de 2004

*Dedico este trabalho a meus pais, que
sempre me apoiaram incondicionalmente*

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Acosta Avalos, que foi fundamental na elaboração deste trabalho. Agradeço por ceder seu laboratório para análise dos pigmentos, pelas vezes que me acompanhou à UNICAMP e pelas medidas lá realizadas. Por ter despertado em mim o interesse pela fotoacústica, e especialmente pelo tempo e pela confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Marília Silva Costa, por ter me acolhido em seu laboratório, agradeço pela disposição e pela atenção a mim dispensados.

Ao Prof. Dr. Edson Correa da Silva, chefe do grupo de fototérmica e ressonância magnética do Instituto de Física Gleb Watagin da UNICAMP, por ceder o laboratório para realização das medidas fotoacústicas.

Ao Prof. Dr. Paulo Roxo Barja coordenador do Grupo de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos do IP&D UNIVAP, por ter me acompanhado à UNICAMP e pelas medidas lá realizadas.

À Prof^a Dr^a Cristina Pacheco Soares, responsável pelo laboratório de Biologia Celular e Tecidual do IP&D UNIVAP, e ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva coordenador do grupo Grupo de Pesquisa em Interação de Fotossensibilizantes com estruturas celulares do IP&D UNIVAP, pela colaboração e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Egberto Munin coordenador do Grupo de Pesquisa em Aplicações de Laser de Alta Potência em Bio-Engenharia do IP&D UNIVAP, por ceder o laser diodo AlGaAs para realização da TFD.

Ao Prof. Dr. Marcelo Miguel Martins Pelisson, responsável pelo laboratório de espectroscopia do grupo de pesquisa em química do IP&D UNIVAP, pela realização das medidas de absorção dos pigmentos utilizados neste trabalho.

À Prof^a Dr^a. Sônia Khouri responsável pelo Laboratório de Microbiologia da FCS UNIVAP, pela doação da cepa de *C. albicans*, e pela disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Dr. Airton Abrahão Martin coordenador do Grupo de Espectroscopia Vibracional Biomédica do IP&D UNIVAP, por ceder o LED utilizado nas análises dos pigmentos.

À Fernanda Roberta Marciano, pela essencial ajuda e pela companhia durante os longos dias de análise dos pigmentos.

Ao Prof. Dr. Luís Henrique Garcia Amoedo e à Prof^a Msc. Fujiko Yamasiro Kretchetoff, por acreditarem no meu potencial e recomendarem a esta instituição.

À minha família pelo irrestrito apoio, incentivo e compreensão. Aos colegas de pós-graduação, que sempre me acolheram com afeto e amizade.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP pelo apoio durante a elaboração deste trabalho. A todos os professores, funcionários, alunos do Mestrado e todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, dando-me força e incentivo.

A Rosângela, Rebeca, Rúbia e todos os profissionais da biblioteca desta Universidade.

E principalmente agradeço a Deus por ter me concedido esta benção e por ter colocado todas estas pessoas no meu caminho.

A todos registro minha gratidão.

Letícia

Não corra atrás das borboletas; plante uma flor em seu jardim e
todas as borboletas virão até ela.
(D. Elhers)

Resumo

Neste trabalho, foi realizado um estudo de bioestimulação e de terapia fotodinâmica (TFD), monitorando o efeito do pigmento azul de metileno nas culturas de *Candida albicans*, através do estudo dos espectros de absorção do complexo *C.albicans* + pigmento, por espectroscopia fotoacústica. Utilizou-se como fonte luminosa fotossensibilizante o laser de Diodo AlGaAs com $DE=10J/cm^2$ e comprimento de onda de 635nm. Também foi monitorado o sinal fotoacústico dos pigmentos azul de metileno e azul de Evans, diluídos em solução fisiológica, e destas mesmas soluções submetidos a estímulo luminoso. Observou-se que o azul de metileno apresenta grandes modificações no sinal fotoacústico quando irradiado, mas o azul de Evans permanece estável. No monitoramento celular os espectros foram obtidos com espectroscopia fotoacústica de transmissão, onde obteve-se a transmitância das amostras pela técnica da célula fotoacústica aberta (OPC). O estudo da curva de crescimento nas culturas de *C. albicans* permitiu observar o fenômeno da bioestimulação nestas células irradiadas e as alterações espectrais causadas pela irradiação foi observado através dos espectros de absorção. Através das análises dos espectros de absorção das culturas de *C. albicans* pode-se observar a presença de picos de absorção de citocromos e da ferredoxina. Após a irradiação o citocromo passa da forma oxidada para a forma reduzida, o mesmo acontece nas culturas tratadas com azul de metileno. Porém quando as culturas de *C. albicans* tratadas com azul de metileno são irradiadas observa-se, após um período de 12 horas, uma diminuição generalizada na altura dos picos de absorção, contudo, após 36h da irradiação o citocromo retoma sua forma reduzida, sugerindo que a interação entre o pigmento e os cromóforos intracelulares não interferem no processo de destruição celular causado pela TFD.

Palavras Chave: Espectroscopia fotoacústica, *Candida albicans*, Terapia Fotodinâmica

Abstract

In this thesis a study was done on bioestimulation and on photodynamic therapy (PDT), by the monitoring of the effects of the pigment methylene blue on *Candida albicans* cultures, through the study of the absorption spectra of the complex *C. albicans* + pigment, using photoacoustic spectroscopy. It was used as light source a diode laser AlGaAs with DE = 10 J/cm² and emission wavelength of 635 nm. It was also monitored the photoacoustic signal of both pigments, diluted at physiological serum and submitted to the luminous stimulus. It was observed that methylene blue present a photoacoustic signal that increase, as a function of time, after irradiation, but Evans blue present a photoacoustic signal stable through time. Monitoring the cellular effects of bioestimulation and PDT, spectra were obtained using the Open Photoacoustic Cell technique (OPC) for transmission photoacoustic spectroscopy. Growth curves in *C. albicans* cultures showed the bioestimulation phenomena in the irradiated cultures and molecular alterations provoked by the irradiation were observed in the absorption spectra. In the analysis of these spectra it can be observed the presence of cytochromes and ferredoxine. After irradiation, the spectra showed a redox change of these cromophores, from oxidized to reduced, and the same occurs with cultures treated with methylene blue. But when the cultures associated with methylene blue were irradiated it was observed, after a 12 h period, a generalized decrease at the high of the absorption peaks, and, after a 36 h period, the cytochrome returns to the reduced spectrum, suggesting that the interaction between pigment and intracellular cromophores do not affect the cellular killing effect of PDT.

Key-Words: Photoacoustic spectroscopy, *Candida albicans*, photodynamic therapy

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Bioestimulação	2
1.1.1. Fotoreceptores	3
1.1.2. Mecanismo de ação	3
1.1.3. Alterações no ciclo celular	6
1.1.4. Aplicações	6
1.2. Terapia fotodinâmica	7
1.2.1. Breve histórico da TFD	7
1.2.2. A Terapia Fotodinâmica	7
1.2.3. Pigmentos	9
1.2.4. Fotoquimioterapia Antimicrobiana	13
1.3. Fungos	13
1.3.1. Fungos Filamentosos	14
1.3.2. Leveduras	14
1.3.2.1. <i>Candida albicans</i>	16
1.4. Espectroscopia	18
1.4.1. Espectroscopia fotoacústica	18
1.4.2. Célula fotoacústica aberta	20
1.5. Justificativa	22
1.6. Objetivo	23
2. Material e Métodos	24
2.1. <i>Candida albicans</i>	25
2.2. Pigmentos	25

2.3. Meios de cultura	25
2.4. Preparo das amostras e contagem de UFC	26
2.5. Espectroscopia	28
2.5.1. Análise das culturas	28
2.5.2. Análise dos pigmentos	32
3. Resultados e Discussão	36
3.1. Curvas de crescimento	37
3.2. Análise dos pigmentos	42
3.2.1. Azul de Metileno	42
3.2.2. Azul de Evans	44
3.2.3. Teste de χ^2	47
3.3. Espectroscopia	50
3.3.1. <i>Candida albicans</i> e <i>Candida albicans</i> irradiada	50
3.3.2. <i>Candida albicans</i> tratada com Azul de Metileno	52
4. Conclusão	56
5. Referências	60

Lista de tabelas, figuras e gráficos

Tabela 1:	Parâmetros das curvas logísticas	41
Tabela 2:	Comportamento do sinal fotoacústico do AM controle e irradiado com LED	48
Tabela 3:	Comportamento do sinal fotoacústico do AE controle e irradiado com LED	49
Tabela 4:	Comportamento do sinal fotoacústico do AE controle e irradiado com He-Ne	49
Tabela 5:	Parâmetros espectrais dos picos de absorção da <i>C. albicans</i>	52
Tabela 6:	Parâmetros espectrais dos picos de absorção da <i>C.albicans</i> tratada com AM	55
Figura 1:	Estrutura química da porfirina	10
Figura 2:	Estrutura química da clorina	10
Figura 3:	Estrutura química da ftalocianina	11
Figura 4:	Estrutura química da forma catiônica do azul de metileno	11
Figura 5:	Estrutura química do azul de Evans	12
Figura 6:	Interior do fluxo laminar	26
Figura 7:	Laser diodo AlGaAs	27
Figura 8:	Contador manual de colônias	28
Figura 9:	Sistema fotoacústico	29
Figura 10:	Célula fotoacústica aberta	30
Figura 11:	Esquema da Transmissão	31
Figura 12:	Espectrofotômetro fotoacústico	33
Figura 13:	Célula fotoacústica	33
Figura 14:	Curva de crescimento de <i>C .albicans</i> controle e irradiada com laser AlGaAs.	37
Figura 15:	Culturas de <i>C .albicans</i> tratadas com AM	38
Figura 16:	Culturas de <i>C. albicans</i> tratadas com AE	39
Figura 17:	Curvas de crescimento controle	39

Figura 18:	Curva logística de crescimento populacional para <i>Candida</i> tratada com AM.	41
Figura 19:	Comportamento do AM irradiado e controle	42
Figura 20	Partição do calor gerado devido a absorção de radiação, Φ_o , entre a amostra, Φ_{am} , e o ar, Φ_{ar} .	43
Figura 21:	Comportamento do AE irradiado com LED e controle	45
Figura 22:	Curva de absorção do corante AM. Pico máximo de absorção em 665 nm	46
Figura 23:	Curva de absorção do AE. Pico máximo em 610 nm	46
Figura 24:	Comportamento do AE irradiado com He-NE e controle	47
Figura 25:	Curva de absorção da <i>C.albicans</i> controle	50
Figura 26:	Curva de absorção da <i>C.albicans</i> após irradiação com laser AlGaAs.	51
Figura 27:	Espectro de absorção da <i>C. albicans</i> com azul de metileno sem irradiação.	52
Figura 28:	Espectro de absorção da <i>C. albicans</i> com azul de metileno irradiada com laser AlGaAs, após 12h de incubação	53
Figura 29:	Espectro de absorção da <i>C. albicans</i> com AM irradiada com laser AlGaAs, após 36h de incubação	54

Lista de abreviaturas e símbolos

- α : nível de significancia.
- β : coeficiente de absorção óptica.
- χ^2 : chi quadrado.
- ϵ : constante dielétrica.
- κ : condutividade térmica.
- λ : comprimento de onda.
- ρ : densidade.
- σ_o : densidade de carga.
- Θ : temperatura.
- ϕ_o : fluxo de radiação.
- ϕ_{am} : fluxo de calor da amostra.
- ϕ_{ar} : fluxo de calor do ar.
- ω : frequência angular.
- μl : microlitro.
- μW : microWatts.
- a: capacidade de suporte do meio.
- ADP: Adenosina difosfato.
- AE: Azul de Evans.
- AM: Azul de Metileno.
- ATCC: American Type Culture Collection.
- ATP: Adenosina trifosfato.
- ATPase: Adenosina trifosfato sintetase.
- C : capacitância do microfone.
- c: calor específico do meio.
- Ca^{2+} : Cálcio.
- Cu: Cobre.
- DE: Densidade de Energia.
- DNA: Acido desoxirribonucléico.
- e_{am} : efusividade térmica do meio.

- e_{ar} : efusividade térmica do ar
- GaAlAs: Arseneto de Gálio Alumínio.
- H: Hidrogênio.
- HeNe: Hélio Neônio.
- Hz: Hertz.
- I : intensidade.
- I_o : intensidade de luz incidente sobre a amostra.
- I_l : intensidade de luz que atravessa a amostra.
- J: Joules.
- j : número imaginário $\sqrt{-1}$.
- K: Potássio.
- k: taxa específica de crescimento.
- l_b : espessura da base.
- L : espessura da amostra.
- Laser: light amplification by stimulated emission of radiation.
- l_m : espessura da membrana de eletreto.
- ln: logarítimo natural.
- l_s : espessura da amostra.
- mW: miliWatts.
- Na: Sódio.
- NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo.
- NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida.
- nm: nanômetro.
- O: Oxigênio.
- OPC: Acrônimo em inglês para Célula Fotoacústica Aberta.
- P: Potência.
- PAS: Acrônimo em inglês para Espectroscopia Fotoacústica.
- R : resistência
- RNA :Ácido Ribonucléico.
- SF: Solução Fisiológica.
- S_n : sinal normalizado.
- T_o : temperatura.

- TFD: Terapia Fotodinâmica .
- UFC: Unidade Formadora de Colônia.
- V_{OPC} : Voltagem do microfone de eletreto.
- W: Tungstênio.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Bioestimulação

A fotoirradiação produz vários tipos de respostas teciduais, dependendo da densidade de energia (DE) aplicada. Utilizando DEs de 1 a 10^5 W/cm² obtém-se efeitos fototérmicos como a fotocoagulação e fotoevaporação, porém quando a DE utilizada excede 10^6 W/cm² ocorrem efeitos fotoionizantes como a fotoablação e também efeitos fotomecânicos como a fotofragmentação. Quando a DE é menor que 1 W/cm², ou seja, irradiação de baixa potência, ocorre o fenômeno da bioestimulação, sendo observadas alterações no metabolismo celular como ativação e desativação de enzimas e mudanças na membrana celular. A irradiação com luz visível ativa funções enzimáticas mitocondriais, enquanto a irradiação infravermelha afeta a atividade enzimática da membrana celular (CIESLAR et al. 1995; KARU, 1998).

O comprimento de onda é fator determinante na interação luz-tecido, ele corresponde à distância percorrida pela onda em uma oscilação completa. O comprimento de onda pode variar de microondas até os raios cósmicos. A radiação pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada (scattering) pela célula. Cada comprimento de onda, portanto, tem um tipo diferente de interação com a célula alvo devido à absorção seletiva por parte dos cromóforos presentes na célula.

A célula possui um limiar de sobrevivência que depende do tecido onde ela está localizada e do seu estado fisiológico. Quando é oferecida uma baixa intensidade de energia, esta será utilizada pela célula de maneira a estimular a membrana ou as mitocôndrias, ocorrendo a bioestimulação. Assim, a bioestimulação é a ação da luz de baixa potência sobre processos bioquímicos e moleculares que normalmente ocorrem nos tecidos, como por exemplo altera reações que ocorrem na cadeia respiratória levando a uma maior síntese de ATP (adenosina trifosfato).

A cadeia respiratória é a via de convergência de todo o metabolismo aeróbico da célula. Ela é formada por uma sequência de compostos transportadores de elétrons localizados na membrana mitocondrial interna, e dirige um fluxo de pares de elétrons das coenzimas captadoras - NADH, FADH₂ – ao oxigênio molecular, com grande liberação de energia. O oxigênio, que é o aceptor final de elétrons da cadeia respiratória,

se reduz a água ao receber um par de elétrons, e a energia liberada nesta reação é dirigida para a síntese do ATP, em um processo acoplado ao transporte de elétrons denominado fosforilação oxidativa.

1.1.1 - Fotorreceptores

Grande parte das células procariontes e eucariontes apresentam respostas similares a fotoirradiação com luz monocromática visível, o que sugere que estas células possuam fotorreceptores comuns (KARU, 1987a). No meio intracelular existem fotorreceptores não especializados, como as flavoproteínas, citocromos, porfirinas, proteínas com Cu, tirosinas, citocromo oxidases, e superóxido dismutase entre outros; que são sensíveis a um determinado comprimento de onda, especialmente aqueles situados na região do espectro visível. Os fotorreceptores não dependem de energia luminosa para desempenhar suas atividades, porém quando a energia luminosa incide sobre eles com comprimento de onda adequado, eles são capazes de alterar o metabolismo celular. O número de receptores primários não específicos distribuídos nas células é muito grande, por isso muitas reações podem ser fotoinduzidas.

1.1.2 - Mecanismo de ação

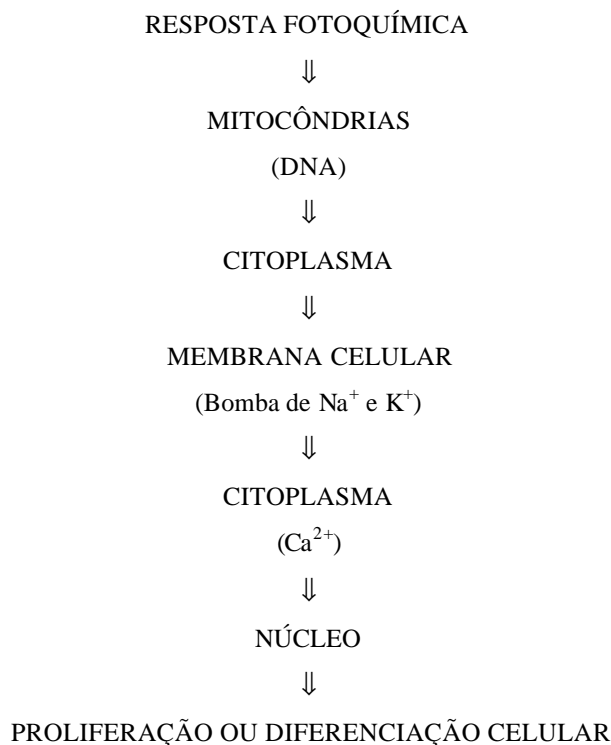
A absorção de fótons por biomoléculas intracelulares específicas produz estimulação das atividades enzimáticas e de reações fotoquímicas. Após a absorção da luz a molécula assume um estado eletrônico excitado, o que provoca efeitos biológicos mensuráveis, devido à ação fotobiorreguladora exercida pelos fotorreceptores presentes na molécula. Por exemplo, em cultura de bactérias a irradiação com luz de baixa potência promove aceleração da divisão celular e diminuição do período de latência da fase de crescimento, o que se reflete em um aumento da atividade metabólica (KARU, 1988).

Medidas fotoacústicas (PASSARELLA et al. 1983) revelaram que a irradiação em mitocôndrias isoladas, com luz monocromática em 635nm provoca mudanças nas propriedades ópticas destas mitocôndrias. Este fato se deve ao aumento de adenosina-trifosfato (ATP), sintetizado a partir do consumo de O₂.

A irradiação provoca aumento no potencial de membrana mitocondrial, causando assim, algumas modificações como: alteração na taxa de ADP/ATP, aumento na taxa de DNA e de RNA, ativação de rearranjos de nucleotídeos e cromatina e aumento da síntese de proteínas na mitocôndria (MANTEIFEL, 1996; KARU, 1999).

A irradiação gera novas conformações mitocondriais, e pode acarretar no aparecimento de mitocôndrias gigantes, fato que se atribui à possível junção de mitocôndrias menores em uma só unidade. A absorção da irradiação pela mitocôndria ocorre devido as suas propriedades ópticas (MANTEIFEL, 1996).

A ação fotoquímica da irradiação com luz visível na cadeia redox da mitocôndria, e a ação fotofísica da luz infravermelha na membrana celular, desencadeiam uma resposta celular que gera uma cascata bioquímica de reações (KARU, 1999). Esta cascata pode ser observada abaixo:



A membrana celular participa da transdução da amplificação dos fotosinais entre a mitocôndria e o núcleo. As integrinas participam bidirecionalmente na transdução destes sinais, pois elas podem transmitir sinais da matriz extracelular para o interior da célula e os eventos intracelulares podem influenciar na afinidade das integrinas por seus receptores. Sob iluminação a respiração é ativada aumentando o fluxo de elétrons e a

utilização de oxigênio provocando maior oxidação da coenzima Q (que é responsável pelo transporte de elétrons), aumentando assim a produção de superóxidos. Um terço do total de O_2 produzido ao longo da cadeia respiratória ocorre ao nível de NADH-desidrogenase, enquanto dois terços ocorrem ao nível de ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductase (KARU et al, 2001)

Existem dois mecanismos para a bioestimulação: os mecanismos primários e os secundários. Os mecanismos primários consistem na interação da luz com o fotorreceptor e estes ocorrem provavelmente na cadeia respiratória. Essas alterações acontecem em segundos ou em poucos minutos após a irradiação. Um exemplo das alterações primárias é o aumento da síntese de ATP. Entretanto, os mecanismos secundários consistem em reações bioquímicas que podem ocorrer depois de horas e até mesmo dias após a irradiação, sendo elas reações biológicas tardias. Entre as alterações secundárias estão a síntese de DNA e RNA, ativação da cadeia respiratória, declínio da atividade da superóxido dismutase e da fosfatase ácida (KARU, 1988). Porém, estudos *in vitro* mostram que a magnitude das respostas dos fotorreceptores dependem do estado fisiológico da célula, das condições de irradiação, dos nutrientes do meio e da idade da cultura (KARU, 1987a).

Segundo Karu (1999) os fotorreceptores envolvidos na bioestimulação são considerados componentes da cadeia respiratória. A citocromo *c* oxidase é a enzima terminal da cadeia respiratória em células eucarióticas, e medeia a transferência de elétrons do citocromo *c* para o oxigênio molecular, ou seja, o ferrocitocromo *c* é oxidado e o O_2 é reduzido para que prótons sejam impulsionados vetorialmente para a matriz mitocondrial. A energia livre resultante das reações redutoras é convertida em potencial eletroquímico, que atravessa a membrana mitocondrial interna tendo como resultado a produção de ATP. Desta forma a citocromo *c* oxidase desempenha um importante papel na bioenergética celular.

Para explicar o efeito da bioestimulação, foi proposto por Karu (1988) um modelo no qual a luz é absorvida por componentes da cadeia respiratória, causando desta forma a ativação da cadeia respiratória e redução do NAD^+ , ocorrendo mudanças no estado redox da mitocôndria e do citoplasma. Isto causa alterações na permeabilidade da membrana, como mudanças na proporção de Na^+/H^+ e aumento da atividade da Na^+/K^+ ATPase, o que causa alterações no fluxo de Ca^{2+} . O fluxo de Ca^{2+}

por sua vez afeta os níveis de nucleotídeos e a síntese de DNA e RNA, aumentando assim a proliferação celular.

1.1.3 - Alterações no ciclo celular

O ciclo celular normal compreende essencialmente dois períodos: a interfase (crescimento) e a divisão (proliferação) celular. Existem 4 fases no ciclo celular: G1, S, G2 e M. A fase G1 é caracterizada pela expressão de genes e síntese de proteínas. Isto permite à célula crescer e produzir todas as proteínas necessárias para a síntese de DNA, permitindo à célula entrar na fase S (síntese), na qual ela replica seu DNA. Durante a fase G2, a célula novamente cresce e sintetiza proteínas permitindo a ela o processo de divisão. Completada esta fase, a célula finalmente entra na quarta fase do ciclo celular: a fase final M. Durante a fase M, a célula passa por um processo denominado citocinese, originando duas células filhas. Completando o ciclo celular as novas células podem começar outro ciclo entrando na fase G1 ou podem tornar-se quiescentes entrando numa fase intermediária conhecida como G0. A duração do ciclo celular varia consideravelmente de um tipo de célula a outro. Para uma célula de mamífero crescendo em cultura com um tempo de geração de 16 horas, o tempo dos diferentes períodos seriam: G1 = 5 horas, S = 7 horas, G2 = 3 horas e M = 1 hora.

A irradiação, com luz monocromática vermelha, causa mudanças neste ciclo celular, aumentando a proliferação celular na fase G1, o que causará aumento no número de células na fase S, provocando consequentemente um aumento na replicação de DNA. Desta forma ocorre um aumento da proliferação e da biomassa celular (KARU et al, 1984; KARU, 1987b; KARU, 1989).

1.1.4- Aplicações

A bioestimulação é utilizada em reparo tecidual, cicatrização, atenuação da dor e proliferação celular, pois a ação da luz é capaz de aumentar a vascularização dos tecidos, provocando a formação de novos capilares. Ela estimula a produção de colágeno e a atividade fibroblástica, aumenta a atividade do sistema linfático, estimula a síntese de DNA e RNA, aumenta a produção de ATP e reduz a excitabilidade dos tecidos nervosos.

Por exemplo, a aplicação de luz com comprimento de onda de 634 nm emitida pelo laser He-Ne promove alterações acrossômicas e diminuição da taxa de mortalidade das células espermáticas (OCAÑA-QUERO et al. 1997). Em fígado de rato ela provoca aumento da proliferação hepatocelular, devido à elevação da taxa mitótica do órgão (LIMA et al. 2000). Este tipo de luz também é utilizado em vários campos da medicina e odontologia atenuando a dor, diminuindo reações inflamatórias, acelerando o tempo de cicatrização de feridas e fraturas e melhorando a qualidade da mesma.

1.2 - Terapia Fotodinâmica

1.2.1 – Breve histórico da TFD

A terapia fotodinâmica já era conhecida desde o início do século passado. Raab em 1900 observou a morte de microorganismos quando expostos à luz solar e ao ar, na presença de certos corantes. Nesta data ele reportou o princípio de uma nova terapêutica para o tratamento do câncer, a terapia fotodinâmica. Em 1901 Finsen apontou o uso da radiação solar como tratamento de *Lupus vulgaris*. No mesmo ano, Von Tappeiner demonstrou o papel do oxigênio singleto como fundamental na ação do TFD (MACDONALD et al. 2001). Meyer-Betz em 1913 demonstrou que a hematoporfirina causa fotossensibilidade quando ocorre exposição à luz solar. Esta descoberta foi feita através de uma auto aplicação de 200mg de hematoporfirina (MACDONALD et al. 2001).

Os mecanismos envolvidos na terapia fotodinâmica tem sido estudados, a fim de melhorar cada vez mais a resposta a este tipo de terapia. A técnica foi aperfeiçoada com a introdução da luz monocromática e o desenvolvimento dos fotossensibilizadores de segunda geração.

1.2.2 – A Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste na administração local ou sistêmica de uma substância inerte, que pode ser um pigmento ou uma droga, porém que tenha um

efeito citotóxico quando fotoativado em determinado comprimento de onda. Desta forma, obtém-se um efeito fotoquímico, que consiste na estimulação dos cromóforos presentes nos pigmentos que foram anteriormente absorvidos pela célula, através da energia transmitida por fótons de uma fonte luminosa. Assim, devido à absorção de energia, os cromóforos passam de um estado basal a um nível excitado (MACHADO, 2000; LEDO et al. 2000; SIBATA et al. 2000; MACDONALD et al. 2001; SIMPLICIO et al. 2002).

A substância aplicada pode ser administrada, no tratamento de uma lesão, por via endovenosa ou tópica. Após o tempo necessário de interação entre a célula alvo e a dada substância, o que pode variar entre 48-72h *in vivo* (MACHADO, 2000), é incidida sobre o local da lesão luz em um comprimento de onda apropriado à substância utilizada. O fotossensibilizador é ativado pela luz e gera formas tóxicas de oxigênio que levam à morte celular (SIMPLICIO et al. 2002). Esse processo é iniciado quando o fotossensibilizador absorve um fóton, ocorrendo um decaimento simultâneo ou uma sequência de decaimentos que resultam em uma sequência de reações por transferência de energia (MACHADO, 2000; LEDO et al. 2000; SIBATA et al. 2000; MACDONALD et al. 2001; SIMPLICIO et al. 2002).

O comprimento de onda não deve ser muito baixo, porque pode ocorrer com mais intensidade o fenômeno da refletância, devido as propriedades ópticas da célula) diminuindo assim a ação do TFD (SIMPLICIO et al. 2002). Geralmente as fontes empregadas são lasers, porém quando são utilizadas lâmpadas, elas requerem o uso de filtros adequados com intuito de selecionar o melhor comprimento de onda para o fotossensibilizador (LEDO et al. 2000; MACHADO, 2000).

A ação da TFD ocorre devido à transformação do oxigênio do seu estado tripleto para o seu estado singleto, o que acontece primeiramente pela excitação do corante pela luz, e é seguida de dois mecanismos principais de reação, a partir do seu estado excitado: transferência de elétrons e transferência de energia.

A maioria das reações é do tipo I, e elas envolvem a transferência de um átomo de hidrogênio ou de um elétron entre o fotossensibilizador e alguma outra molécula. Este processo é mais propenso pelo aumento de complexos não covalentes entre o pigmento e as moléculas aceptoras formadas antes da iluminação. A maioria dos radicais produzidos nestas reações interagem com o oxigênio molecular gerando

espécies ativas de oxigênio como por exemplo OH , HO₂, O₂ e H₂O₂. Já o processo tipo II, envolve a transferência de energia entre o fotossensibilizador e o oxigênio. Como resultado deste segundo processo, obtém-se o corante no estado fundamental e o oxigênio em seu estado excitado mais baixo. Estas reações ocorrem mais facilmente em meio hidrofóbico (SOBOLEV et al. 2000).

As reações tipo I são favorecidas por alta concentração de substrato e baixa concentração de oxigênio, enquanto as reações do tipo II são favorecidas por uma situação contrária, ou seja, baixa concentração de substrato e alta concentração de oxigênio. Existem também as reações do tipo III que não envolvem oxigênio. É importante observar que o mecanismo de ação pode trocar do tipo I ao tipo II devido a mudanças da oxigenação do tecido durante o TFD (SOBOLEV et al. 2000).

1.2.3- Pigmentos

Os pigmentos estão diretamente relacionados a comprimentos de onda específicos pois, os compostos orgânicos absorvem radiação eletromagnética. Entretanto, somente compostos com várias duplas ligações conjugadas na sua estrutura química é que são capazes de absorver radiação na faixa da luz visível. Estruturalmente, um dos aspectos mais relevantes, comum à maioria dos corantes, é a presença de um ou mais anéis benzênicos e por isso, estes compostos são também chamados de benzenóides (SOBOLEV et al. 2000).

Na TFD utiliza-se pigmentos que possuem ação fotossensibilizante, pois na presença de luz desencadeiam determinadas reações físico-químicas em processos intracelulares. Estes pigmentos são absorvidos pela célula se concentrando no citoplasma, membrana plasmática, mitocôndria e, em alguns casos, nos lisossomos. A luz emitida sobre eles no comprimento de onda adequado, irá provocar reações do tipo I e do tipo II que irão gerar espécies reativas de oxigênio, causando dano celular e afetando, desta forma, a viabilidade e a capacidade de divisão da célula (SOBOLEV et al. 2000).

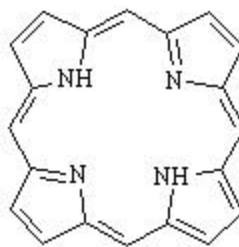


Figura 1 Estrutura Química da Porfirina.

Os pigmentos denominados fotossensibilizadores atualmente dividem-se em duas classes: os de 1ª e de 2ª geração. Os de 1ª geração são derivados das porfirinas, que são tetrapirróis cíclicos (Figura 1). Possuem propriedades foto-ópticas, que lhes permitem serem degradadas ou modificadas pela luz, emitindo uma intensa fluorescência vermelha, o que as capacita para a ação fotodinâmica (BONNET, 1998; MACHADO, 2000; SIBATA et al. 2000).

Os fotossensibilizadores de segunda geração, que derivam das clorinas (Figura 2) e das ftalocianinas (Figura 3), são substâncias com sensibilidade à luz na região de 600-850 nm, onde os cromóforos biológicos normalmente não absorvem a luz, característica esta que os difere dos fotossensibilizadores de 1ª geração que geralmente causam fotossensibilidade cutânea (BONNET, 1998; MACHADO, 2000).

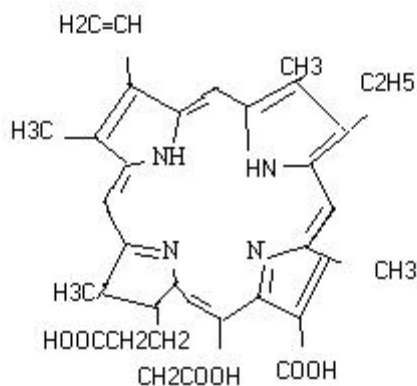


Figura 2 Estrutura Química da Clorina

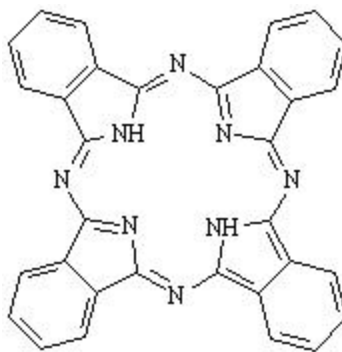


Figura 3 Estrutura Química da Ftalocianina

Porém, existem ainda outros fotossensibilizadores que não pertencem às classificações citadas acima, entre eles as cianinas, hipericinas, esquarinas, fenotiazinas, e xantinas. Também são utilizados fotossensibilizadores conjugados e corantes Azóicos (BONNET, 1998).

Dentre as fenotiazinas, um dos pigmentos mais utilizados na TFD é o azul de metileno (AM), que é um corante catiônico solúvel em água ou em álcool, de fórmula molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S$ e massa molar 319,8513 g/mol. Possui rendimento quântico da ordem de 0,5 e baixo potencial de redução. Sua estrutura química está representada abaixo na figura 4.

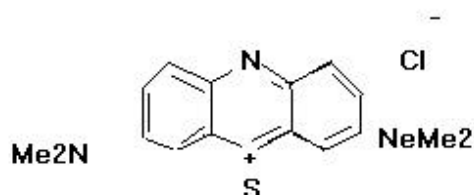


Figura 4 Estrutura Química da forma catiônica do Azul de Metileno

Em sua forma oxidada apresenta coloração azul, porém quando se encontra na forma reduzida não apresenta coloração. Em concentrações de até 8 μg predomina a forma monomérica, que favorece as reações do tipo II. Sob estimulação o azul de

Metileno provoca formação de resíduos provenientes da oxidação da guanina, como o 8-hidroxyguanosina, que intermedia a formação de oxigênio singlete (WAINWRIGHT et al. 1997; FALJONI-ALÁRIO, 2003; GABRIELLI et al. 2003; SEVERINO et al,2003).

É um pigmento de caráter hidrofílico, porém quando sofre constantes metilações apresenta lipofilicidade. Possui tendência a formar agregados devido a planaridade de sua estrutura química e pela presença de agentes agregadores como polieletrólitos e membranas. Contudo a agregação altera a eficiência da fotossensibilização pois altera a quantidade de oxigênio singlete gerada na presença de um estímulo luminoso (WAINWRIGHT et al. 1997; FALJONI-ALÁRIO, 2003; GABRIELLI et al. 2003; SEVERINO et al.2003).

O Azul de Metileno liga-se na mitocôndria, entretanto esta ligação depende do potencial de membrana e da concentração de mitocôndrias disponíveis. O metabolismo do Azul de Metileno ocorre pela redução causada pelo NADH, que aumenta com o aumento do Azul de Metileno intramitocondrial, formando leuco-AM (forma neutra do Azul de Metileno) (WAINWRIGHT et al. 1997; FALJONI-ALÁRIO, 2003; GABRIELLI et al. 2003; SEVERINO et al. 2003).

Os Azo corantes caracterizam-se pela presença do grupo $-N=N-$. Um exemplo desta classe de pigmentos é o Azul de Evans (Figura 5) que vem sendo utilizado na TFD. O Azul de Evans apresenta a forma molecular $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$ e solubilidade em água e álcool. Possui coloração azul porém quando submetido a um pH em torno de 11 apresenta coloração violeta, isto se deve à desprotonação da *o*-hidroxila.

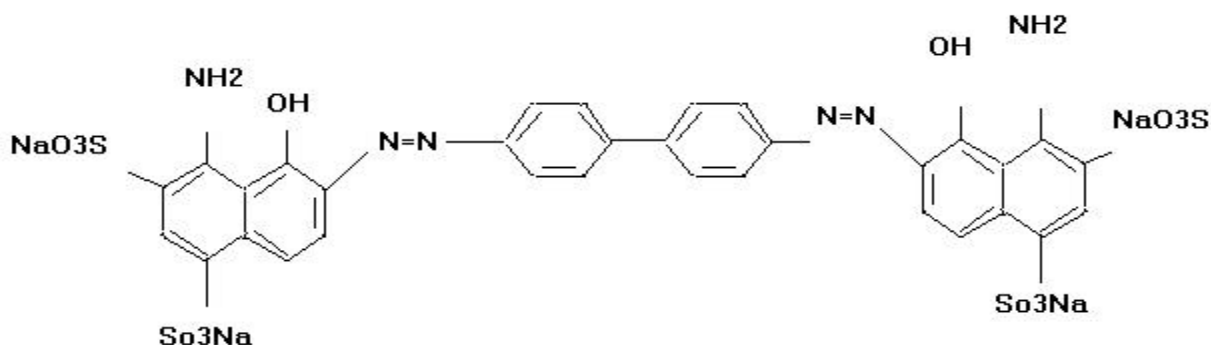


Figura 5 Estrutura Química do Azul de Evans.

Os diazo corantes são compostos por duas unidades monoazicas idênticas com simetria planar no centro da molécula. Estes pigmentos possuem estabilidade fotoquímica e fototérmica, fato que é atribuído à formação de hidrogênio intramolecular, ao grande número de grupos sulfonados, e à agregação do corante. A estabilidade também está relacionada ao número de grupos azo destes pigmentos, assim a estabilidade aumenta quanto maior o número de grupamentos azo (ISAK et al. 2000).

1.2.4 – Fotoquimioterapia Antimicrobiana

A TFD vem sendo recentemente usada como agente antimicrobiano, embora o princípio da técnica seja a aplicação em tumores. Vários estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, já vem sendo desenvolvidos utilizando-a como uma eficiente alternativa de tratamento em infecções microbianas tópicas, sejam elas bacterianas, fúngicas ou virais (WILSON et al. 1993; BERTOLONI et al. 1999; CARRÉ et al. 1999; ZEINA et al. 2001; ZEINA et al. 2002).

O mecanismo de ação envolvido na terapia fotodinâmica antimicrobiana é o mesmo do TFD, que consiste na estimulação luminosa de cromóforos que irão desempenhar sua ação através de processos químicos já citados anteriormente, que resultarão em dano, morte ou inviabilização celular (WILSON et al. 1993; BERTOLONI et al. 1999; CARRÉ et al. 1999; ZEINA et al. 2001; ZEINA et al. 2002).

1.3– Fungos

Os fungos pertencem ao Reino Fungi, que compreende cerca de 200.000 espécies, das quais 200 são agentes infecciosos. São organismos eucarióticos, assim, possuem DNA delimitado por dupla membrana, cujos núcleos são dispersos em um micélio (conjunto de hifas) contínuo ou septado. São predominantemente filamentosos, mas algumas espécies são leveduriformes. Não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos e sua nutrição é obtida por absorção. Geralmente possuem quitina em sua parede celular e suas células apresentam mais de 1µm de diâmetro. São seres aeróbios ou microaerófilos que necessitam geralmente de fontes de carbono e nitrogênio para sobreviver. Podem ser saprófitas ou patogênicos, isto depende dos substratos e condições em que se encontram (HENRY, 1999).

Todas as espécies de fungos possuem parede celular rígida, a qual determina sua forma e são compostas em grande parte de camadas de carboidratos, lipídeos, glicoproteínas e grandes cadeias de polissacarídeos. Estes componentes auxiliam na fixação do fungo nas células hospedeiras (PELCZAR et al. 1980). Os fungos se dividem em dois grupos: as leveduras e fungos filamentosos.

1.3.1-Fungos filamentosos

Os bolores são fungos filamentosos multicelulares. A natureza filamentosa dos bolores confere às colônias uma aparência algodoadas, algumas vezes pontuada por um aspecto granular ou em pó que é produzido pela formação de estruturas assexuadas, em outros casos a colônia pode ter uma aparência lisa.

São encontrados na natureza principalmente sob a forma de mofo e ferrugem, são microorganismos resistentes e se adaptam facilmente a situações adversas como por exemplo podem crescer em altas concentrações de ácidos, resistem a mudanças bruscas de pH e são capazes de sobreviverem ambientes desidratados. A maioria dos bolores é estritamente aeróbia e seu crescimento é estimulado pelo fornecimento abundante de oxigênio. Sob condições adequadas, podem converter carboidratos em álcoois e ácidos orgânicos e sintetizar substâncias carbonadas (PELCZAR et al. 1980; HENRY, 1999).

1.3.2- Leveduras

As leveduras são predominantemente organismos unicelulares e se reproduzem por gemulação. As características morfológicas correspondem a dos organismos eucarióticos. Algumas espécies possuem cápsulas, ou seja, são cobertas por um material extracelular limoso, viscoso e aderente que geralmente possui composição polissacarídica, incluindo heteropolissacarídeos e substâncias semelhantes ao amido. Possuem parede celular fina em células jovens, porém esta se torna espessa com o passar do tempo e é constituída principalmente por proteínas, apresentando também quitina, glicosamina e outros componentes que variam de acordo com a espécie.

A membrana citoplasmática das leveduras apresenta estrutura e funções similares às das membranas das células de mamíferos, sendo constituída por uma camada dupla de fosfolipídios e um arranjo de proteínas na bicamada lipídica, com

proteínas de superfície fracamente ligadas à membrana e pequenas quantidades de carboidratos, lipídeos, proteínas e sacarídeos; possuem espessura de aproximadamente 8µm formada por duas camadas elétron-densas. Ela difere das membranas animais por apresentar o esterol não-polar ergosterol e por também apresentar zimogênio, ao invés de colesterol, como esterol principal. Os esteróis da membrana conferem estrutura, modulação da fluidez e, possivelmente, controlam alguns eventos fisiológicos (PELCZAR et al. 1980).

As leveduras apresentam citoplasma na forma de um material semifluído, finamente granular. Possuem ribossomos ricos em RNA e organelas membrano-limitadas. O retículo endoplasmático constitui o sistema membranoso do citoplasma e pode estar ligado com a membrana nuclear externa ou com a membrana citoplasmática. O núcleo é bem definido nas leveduras, sendo circundado por uma membrana nuclear semipermeável possuindo funções metabólicas e reprodutivas. Os fungos são organismos tipicamente haplóides e seus cromossomos ocorrem como filamentos lineares constituídos de DNA e proteínas associadas apresentando a estrutura característica da cromatina eucariótica e se condensam durante a divisão nuclear. O número de cromossomos varia de acordo com a espécie do fungo. De 80 a 99% do material genético ocorre nos cromossomos e aproximadamente de 1 a 20% nas mitocôndrias e a maioria do DNA é encontrada em plasmídeos nucleares.

A transcrição do DNA e a síntese de proteínas ocorrem de forma semelhante a outras células eucarióticas. As mitocôndrias apresentam diâmetro de 0,3 a 1µm e comprimento de até 3µm. São envolvidas por duas membranas, sendo que a interna forma poucas cristas que se estendem para dentro. São constituídas por lipoproteínas e uma porção pequena de DNA e RNA (PELCZAR et al. 1980).

Todas as leveduras apresentam um ou mais vacúolos no citoplasma. Na fase exponencial de crescimento, o saco vacuolar não contém elementos estruturais. Porém a partir da fase estacionária passam a conter quantidade crescente de material granular, que pode ser formado por metafosfato, polifosfatos ou lipídeos. A substância vacuolar isolada exibe alta atividade de várias enzimas hidrolíticas, como esterases, ribonucleases e proteases. Os microtúbulos dos fungos são longos cilindros ocos de aproximadamente 25nm de diâmetro que ocorrem no citoplasma como componentes de estruturas envolvidas no movimento de organelas, cromossomos, núcleos e vesículas do complexo

de Golgi contendo precursores da parede celular. Os microtúbulos são os principais componentes dos fusos mitóticos e meióticos, que auxiliam o movimento dos cromossomos durante a mitose e a meiose. Agentes que interferem na polimerização dos microtúbulos paralisam o movimento de núcleos, mitocôndrias, vacúolos e de vesículas apicais (PELCZAR et al. 1980).

Contudo, as células velhas de leveduras, que apresentam paredes espessas, são resistentes às condições desfavoráveis como: calor, dessecação, luz e agentes químicos. E algumas espécies armazenam grandes quantidades de gordura, carboidratos e proteínas. Algumas espécies apresentam pigmentos que podem conferir colorações a culturas velhas com cerca de 3 semanas. Estes pigmentos são carotenóides e também pigmentos biologicamente ativos como os citocromos, flavinas, entre outros (PELCZAR et al. 1980).

Algumas características fisiológicas são comuns às espécies de leveduras, sendo a mais importante a desassimilação de açúcares, como a glicose que pode ocorrer de forma anaeróbia, quando ocorre fermentação alcoólica, ou pode ocorrer por via aeróbia, respiração. O processo mais comum é a desassimilação anaeróbia tendo como produtos finais o álcool etílico e o dióxido de carbono. Já a desassimilação aeróbia envolve a utilização do oxigênio atmosférico, sendo que a completa oxidação da glicose fornece dióxido de carbono e água. O ciclo dos ácidos tricarboxílicos é uma das mais importantes vias oxidativas (PELCZAR et al. 1980).

1.3.2.1- *Candida albicans*

As espécies do gênero *Candida* são leveduras que se apresentam como blastomicetos arredondados ou ovalados, apresentando brotamento e alguns se alongam tornando-se pseudo-hifas. Em caso de invasão tecidual a *C. albicans* pode formar tubos germinativos, que se transformam em brotamentos micelânicos septados. Os tubos germinativos derivam de hifas verdadeiras que atraem o citoplasma celular deixando entre eles extensos vacúolos. Desenvolve-se em até 72 horas quando incubadas a uma temperatura de 37° C e formam colônias cujo aspecto é cremoso ou pastoso de coloração branca ou creme (FERRER, 2000).

As espécies de *Candida* constituem parte da flora normal da pele, boca e trato gastrointestinal, e são a causa mais freqüente de infecção fúngica. A espécie mais comum é a *C. albicans*. As leveduras de *C. albicans* causam infecções que acometem principalmente a pele, unhas, mucosas, trato intestinal, urinário, entre outros. A transmissão se dá por via endógena, podendo haver transmissão por contato inter-humano e fomites (roupas e toalhas). Os principais fatores predisponentes são a imunossupressão, o uso prolongado de corticosteróides, gravidez, diabetes, queimaduras graves, maceração das dobras da pele, sudorese intensa e umidade constante (OLIVEIRA et al. 2001). As infecções por *Candida* são limitadas em extensão e gravidade se o hospedeiro for normal. Contudo, a terapia antibacteriana de largo espectro atrapalha o equilíbrio da flora colonizadora, especialmente nas mucosas da cavidade oral e do trato gastrointestinal, através da eliminação da flora bacteriana predominantemente competitiva, o que favorece a proliferação de *C. albicans*.

Esta espécie apresenta em sua superfície moléculas que medeiam sua aderência ao tecido hospedeiro. Inclui um receptor homólogo a integrina CR3 humana, uma lectina que se liga aos açúcares nas células epiteliais e proteínas contendo manose que se ligam às moléculas semelhantes à lectina das células epiteliais (CONTRAN et al. 1996).

Alguns fatores estão associados com a virulência da *C. albicans*, entre eles a secreção de aspartil proteinase, que pode estar ligada ao processo de invasão tecidual através da degradação de proteínas da matriz extracelular, e também, da secreção de uma adenosina que bloqueia a degranulação e produção de radicais de oxigênio dos neutrófilos (CONTRAN et al. 1996).

Alguns estudos vêm sendo realizados com TFD em *Candida*. Wilson (1993) realizou um trabalho com três espécies de *Candida*, entre elas a *C. albicans*, obtendo redução estatisticamente significativa na viabilidade de culturas de *C. albicans* tratadas com azul de metileno e irradiadas com laser de diodo AlGaAs. Zeina (2001), também obteve redução da taxa de crescimento de *C. albicans* de 5.5 Log10 UFC/ml para 2 Log10 UFC/ml, quando submetidas à TFD utilizando azul de metileno. Teichert et al (2002), obteve erradicação total de *C. albicans in vivo* (cavidade oral) utilizando azul de metileno nas concentrações de 450 e 500µl/ml irradiadas com laser de diodo emitindo em 664nm.

1.4- Espectroscopia

A espectroscopia pode ser definida como sendo o estudo da interação da radiação eletromagnética associada aos átomos ou moléculas nos estados sólido, líquido ou gasoso. Pode ser usada para identificar componentes desconhecidos devido ao fato de cada elemento existente na natureza possuir seu próprio espectro de absorção. Os primeiros cientistas a descobrirem este fato foram Gustav Robert Kirchhoff e Robert Wilhelm Bunsen, em 1859 (FLEMING, 2002).

Para análises espectrais são utilizados aparelhos denominados espectrômetros que são instrumentos que possuem uma fonte de radiação que emite continuamente na região de frequências eletromagnéticas onde se realiza o experimento. A radiação emitida por esta fonte dirige-se para a amostra que se encontra colocada numa célula adequada às condições do experimento. Antes ou após atravessar a amostra, os componentes de diferentes frequências da radiação são separados espacialmente pelo monocromador. Esta unidade dispersa a radiação e seleciona cada componente através de uma fenda, obtendo-se assim radiação monocromática. Esta é dirigida para o sistema de detecção onde é medida, a cada frequência, a intensidade da radiação transmitida ou absorvida pela amostra que é então registrada por um sistema específico.

Atualmente, existem inúmeras técnicas de espectroscopia, entre elas a espectroscopia óptica, molecular, fotoacústica, Raman, de impedância, e de fluorescência entre outras.

1.4.1- Espectroscopia Fotoacústica

A espectroscopia fotoacústica (PAS), que está baseada no efeito fotoacústico (descoberto por Alexander Graham Bell em 1880) foi elaborada experimentalmente e teoricamente como uma técnica de diagnóstico para materiais sólidos por A. Rosencwaig e A. Gersho na década de 70. Este efeito consiste na geração de ondas de pressão numa câmara fechada após absorção de luz pulsada. A energia que é absorvida pela amostra gera pulsos de calor, que causam uma flutuação periódica de temperatura na camada de gás (ar) adjacente à amostra, com a mesma frequência de modulação que a do feixe de luz incidente.

Este fenômeno ocorre quando a amostra absorve energia luminosa pulsada gerando som pela conversão da energia luminosa em energia térmica através de decaimentos não radiativos no objeto absorvedor. A flutuação de temperatura causa a expansão e compressão do gás (ar) dentro da câmara, originando, desta forma, ondas de pressão no interior da mesma, e essas ondas são detectadas por um microfone. Assim, o sinal do microfone irá depender da forma com que a luz é absorvida pela amostra, ou seja, dependerá do coeficiente de absorção da amostra e das condições de geração e transmissão de calor. Estas propriedades permitem que o efeito fotoacústico seja usado no estudo de várias reações fotoativadas, como a fotossíntese e a polimerização de fotoreinas, dentre outros. Este método permite a obtenção de espectros de absorção óptica de sólidos, semi-sólidos, líquidos e gases, permitindo também a análise de amostras tanto opticamente opacas quanto transparentes. Na maioria dos casos, não exige uma preparação rigorosa da amostra e, por ser uma técnica não destrutiva, permite o acompanhamento da mesma amostra quando submetida a diversos tratamentos químicos, térmicos e físicos, entre outros (ROSENCWAIG, 1980; BALASUBRAMANIAN et al. 1984; BRASLAVSKY, 1986).

Os espectros de absorção fotoacústicos fornecem elementos importantes no estudo das bandas de absorção óptica de um dado elemento, uma vez que permite a atribuição das transições eletrônicas envolvidas no processo de absorção da luz. Podem oferecer algumas informações sobre o estado de coordenação de um dado íon alojado em uma matriz bem como de seu estado de oxidação. A PAS é empregada também na caracterização das propriedades térmicas da matéria, particularmente, na medida de difusividade térmica, efusividade térmica e do tempo de relaxação não radiativo, ou seja, o tempo da transferência de energia das moléculas excitadas para as não excitadas por colisões (ROSENCWAIG, 1980; BALASUBRAMANIAN et al. 1984; BRASLAVSKY, 1986).

A PAS vem sendo usada como técnica de diagnóstico e possui várias aplicações como a determinação de parâmetros térmicos, o monitoramento de misturas gasosas, e no estudo de moléculas biológicas. Assim como, na caracterização de organelas celulares, mudanças morfológicas durante a diferenciação celular, reações bioquímicas, processos de fotossíntese, análises bromatológicas, caracterização de microorganismos de interesse médico como o *Plasmodium* e a *Leishmania* entre outras

(BALASUBRAMANIAN et al. 1984; BRASLAVSKY, 1986; BERGEVIN et al. 1995; ARGUELLO et al. 1999; DÓKA et al. 2000; IRUDAYARAJ et al. 2000).

1.4.2- Célula fotoacústica aberta

Uma das técnicas utilizadas em espectroscopia é a da célula fotoacústica aberta, através da qual obtém-se a transmitância das amostras. Nesta técnica o próprio microfone de eletreto é utilizado como célula fotoacústica, que consiste de uma membrana de eletreto e uma placa de metal com um furo separado por uma camada de ar. Sobre a placa de metal é acoplado um vidro sobre o qual a amostra é acondicionada.

Sobre a amostra é incidido um feixe de luz monocromática, modulada a uma frequência $\omega = 2\pi f$, com intensidade $I_0 e^{j\omega t}$, coeficiente de absorção óptica b . Supondo que haja duas fontes principais de calor, uma devida a absorção de radiação pela amostra e outra devida a absorção da radiação transmitida pelo diafragma do microfone, a oscilação de temperatura (T_g) obedecera à equação 1:

$$T_g = Q_m + Q_s \quad (1)$$

Onde Q_m e Q_s representam respectivamente as contribuições da membrana e da amostra para a oscilação da temperatura na câmara fotoacústica. Segundo Marquezine et al. (1991) a voltagem do microfone de eletreto está relacionada com o efeito fotoacústico da seguinte forma:

$$V_{OPC} = V_0 \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \frac{\Theta_m + \Theta_s}{T_0} e^{j\omega t} \quad (2)$$

Sendo:

$$V_0 = l_b l_m S_0 / (l_b \epsilon + l_m \epsilon_0) \quad (3)$$

Onde S_0 é a densidade da carga do eletreto, l_m é a espessura da membrana de eletreto, l_b é a espessura da base e ϵ a constante dielétrica. C é a capacitância do microfone e R a resistência. j é o número imaginário $\sqrt{-1}$. T_0 é a temperatura ambiente e ω é a velocidade angular dos pulsos de luz.

No caso de uma amostra opticamente transparente, para obter a transmitância desta amostra pode-se usar algum objeto que feche a câmara fotoacústica com uma transmitância de cerca de 100% para o espectro visível. Se utilizando neste caso um suporte de vidro BK7 com espessura de 1mm a transmitância será cerca de 91%, o que não interferirá na análise da amostra. Assim, neste caso, a expressão para V_{OPC} será (formula 4):

$$\sqrt{V_{OPC}} = K b(l) I_0(l) = \sqrt{V_{OPC}}_{REF} \quad (4)$$

Onde K depende dos parâmetros térmicos da membrana e do gás, mas neste caso ela permanece como uma constante.

Ao colocar sobre este suporte uma amostra opticamente transparente, a magnitude do sinal será (Marquezini et al., 1991):

$$\sqrt{V_{OPC}} = K b(l) I_0(l) e^{-b(l)l_s} \quad (5)$$

onde l_s corresponde com a espessura da amostra.

Se definirmos o sinal normalizado S_n como o cociente entre o sinal da transmissão do material em estudo $\sqrt{V_{OPC}}$ e o sinal de referência $\sqrt{V_{OPC}}_{REF}$ temos

que:

$$S_N = \frac{|V_{OPC}|}{|V_{OPC}|_{REF}} = e^{-b(l)l_s} \quad (6)$$

Esta expressão permite determinar a quantidade de radiação transmitida através da amostra, ou seja a transmitância. A partir desta expressão pode-se conhecer o valor para b (formula 7):

$$b(l) = -\ln(S_n) / l_s \quad (7)$$

1.5- Justificativa

Na literatura existem vários trabalhos sobre bioestimulação e terapia fotodinâmica, o que reflete a crescente importância deste assunto. Porém, alguns pontos ainda são obscuros no que se refere a bioestimulação e à terapia fotodinâmica. Como estes fenômenos estão relacionados com a absorção de luz, então alguns eventos envolvidos nestes processos podem ser estudados através da obtenção dos espectros de absorção de um sistema vivo envolvido em ambos processos: bioestimulação e terapia fotodinâmica.

Análises espectrais podem ser realizadas pelo fato dos espectros de absorção estarem relacionados com os cromóforos intracelulares, podendo assim fornecer informações importantes sobre a interação destes com os pigmentos utilizados na TFD, bem como fornecer informações sobre a relação dos cromóforos intracelulares com as reações envolvidas na bioestimulação.

Dentre os inúmeros modelos celulares a *C. albicans*, nos pareceu mais adequada, por se tratar de um microorganismo de interesse médico, e de fácil manutenção no laboratório. Outro motivo da escolha deste microorganismo é por apresentar estrutura eucarionte, o que permitira comparar os resultados obtidos com os modelos existentes sobre os efeitos da irradiação com luz visível em organismos deste tipo.

1.6 - Objetivo

Este estudo tem como objetivo principal estudar o espectro de absorção óptico após a terapia fotodinâmica em culturas de *Candida albicans*, usando os pigmentos azul de Evans e azul de Metileno, assim como após a bioestimulação das mesmas culturas irradiadas com luz de 635 nm.

Os objetivos secundários são:

- Estudar o comportamento dos pigmentos Azul de Evans e Azul de Metileno, após irradiação com luz de 635 nm, através de técnicas fotoacústicas.
- Estudar o espectro de absorção de culturas de *C. albicans* na região espectral dos 380 até 700 nm.
- Estudar as mudanças espectrais devido à interação pigmento-célula do fungo e devido à irradiação com luz visível, através da espectroscopia fotoacústica na região espectral dos 380 até 700 nm.

Material e Métodos

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- *Candida albicans*

Neste trabalho foi utilizada a cepa de *C. albicans* ATCC 10-231 origem FIOCRUZ, doada pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde da UNIVAP. A cepa foi conservada em placa de Petri contendo Ágar Sabouraud, sendo trocado semanalmente (HENRY, 1999). Após cada repique ela era incubada por 48h em estufa a 37°C, e após este período era transferida para câmara fria à temperatura de -4°C.

2.2 – Pigmentos

Neste estudo foram utilizados dois pigmentos distintos: azul de Evans e azul de metileno, que tiveram seus espectros de absorção determinados em espectrofotômetro convencional (Carry 50[®] - Bio Varian). A partir destes espectros foi definido o laser a ser utilizado para irradiação na TFD e na bioestimulação: diodo laser AlGaAs, com comprimento de onda de emissão de 635nm.

Os corantes foram diluídos em solução fisiológica (SF), para que não houvesse interferência na isotonia celular. A concentração dos corantes utilizados foi de 0,5mg/ml (WILSON et al. 1993; MARDEGAN et al. 2002).

Os pigmentos utilizados apresentavam-se na forma de pó. Para preparação das soluções as alíquotas de pigmento foram pesadas em balança analítica (OHAUS[®] - BP630). Os pigmentos foram diluídos em SF a 0,9% estéril, para obter-se uma solução com concentração de 0,5mg/ml.

2.3 – Meios de Culturas

O meio de cultura escolhido foi o Ágar Sabouraud Dextrose, por ser um meio relativamente pobre em nutrientes, atenuando o risco de contaminação por bactérias sendo, portanto, um meio apropriado para o cultivo de fungos.

O meio foi preparado com Ágar Sabouraud Dextrose em pó diluído em água bidestilada. O meio foi autoclavado a 120°C e 1atm de pressão por 15min. Após resfriar naturalmente até uma temperatura de aproximadamente 40°C, foi distribuído em placas de Petri previamente esterilizadas dentro do fluxo laminar em campo estéril pela chama do bico de Bunsen. Foram adicionados 20ml de meio de cultura em cada placa de 10cm de diâmetro. Após o meio de cultura solidificar, as placas foram posicionadas com a tampa para baixo, afim de não juntar água no meio devido à condensação da mesma sobre a tampa, e foram acondicionadas em sacos hermeticamente fechados e colocadas na câmara fria cuja temperatura era de -4°C.

2.4– Preparo das amostras e contagem de UFC

Todas as etapas dos procedimentos foram realizadas em fluxo laminar, e em campo estéril pela chama do bico de Bunsen (figura 6). Todo material utilizado foi previamente esterilizado em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 15 minutos.

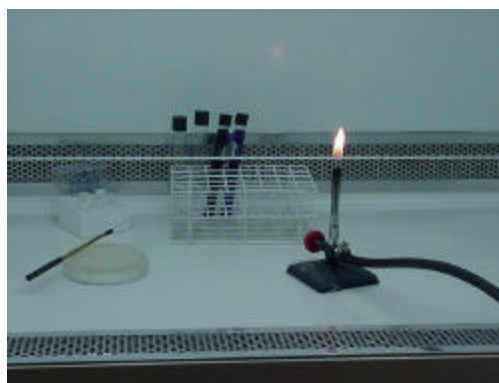


Figura 6 Interior do fluxo laminar.

A partir do repique da cepa de *C. albicans* foi retirada uma alíquota com alça de platina em anel e diluída em SF até que atingisse a turvação da escala 1 de Mac Farland (Silva, 1999). Em tubos de ensaio foram adicionados 50µl da solução de *C. albicans* preparada como descrito acima e 50µl de corante na concentração de 0,5mg/ml. A mistura preparada foi incubada por 30min em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, retirou-se uma alíquota de 10µl com pipeta automática e esta foi dispensada no centro da placa de Petri com meio de cultura Ágar Sabouraud, e foi semeado por

esgotamento com alça de platina em anel. O mesmo procedimento foi realizado para cada corante. No controle substituiu-se o corante por 50µl de SF.

As placas preparadas, conforme o procedimento acima descrito, foram incubadas em estufa a 37°C por 48h. Após o tempo de incubação as placas foram retiradas da estufa e selecionou-se uma Unidade Formadora de Colônias (UFC) isolada em cada placa, com área de 3mm. A UFC selecionada foi irradiada com laser de diodo AlGaAs (Unidade Thera Laser® – DMC) (figura 7) por 20s, com $\lambda = 635\text{nm}$, potência de 35mW, e $\text{DE} = 10\text{J}/\text{cm}^2$. Após a irradiação as placas foram incubadas em estufa á 37°C, porém as placas controles foram incubadas logo após serem semeadas, formando assim um total de 6 grupos, sendo eles:

- A- Placa controle (*Candida albicans*)
- B- Placa controle azul de Evans (*Candida albicans* + azul de Evans)
- C- Placa controle azul de metileno (*Candida albicans* + azul de metileno)
- D- Placa controle irradiado (*Candida albicans* + irradiação)
- E- Placa experimento azul de Evans (*Candida albicans* + azul de Evans + irradiação)
- F- Placa experimento azul de metileno (*Candida albicans* + azul de metileno + irradiação)



Figura 7 Laser diodo AlGaAs.

Preparou-se um inóculo de cada grupo em SF até atingir a escala 1 de Mac Farland. Deste inóculo foi retirada uma alíquota de 10µl, com pipeta automática, e dispensada no centro da placa de Petri, com meio de cultura Ágar Sabouraud, e foi semeada uniformemente com alça de Drigalsky. Incubou-se as placas a 37°C por 72h,

entretanto foi realizada contagem das UFC, em contador de colônias manual (CP600[®] - Phoenix) (figura 8), em intervalos de 12h.



Figura 8

Contador Manual de colônias.

Após o término do procedimento todo o material foi descontaminado em autoclave a 120° C por 30 minutos (SILVA, 1999).

2.5 - Espectroscopia

2.5.1- Análise das Culturas

Para análise das culturas de *C. albicans* coletou-se amostras dos grupos A, C, D e F para espectroscopia diretamente da placa de Petri com auxílio de uma alça de platina em anel. As amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf devidamente identificados. Procedeu-se ao congelamento *in natura*, e foram devidamente transportadas até o laboratório de Fotoacústica do Instituto de Física Gleb Watagin da UNICAMP, onde foram realizados os espectros de absorção.

As amostras obtidas de cada grupo possuíam volumes reduzidos, devido à própria natureza da amostra, fato que foi agravado nas amostras submetidas à TFD. Assim, com quantidade reduzida de amostra não foi possível utilizar o método

convencional, com a célula fotoacústica fechada. Optou-se por utilizar a técnica da célula fotoacústica aberta, que permite a obtenção do espectro de transmissão e que requer de uma quantidade mínima de amostra.

Para este estudo utilizou-se um espectrofotômetro fotoacústico no laboratório do grupo de fotoacústica chefiado pelo Dr. Edson Corrêa da Silva, que é colaborador permanente do grupo de fotoacústica do IP&D-UNIVAP.

O espectrofotômetro fotoacústico utilizado consiste das seguintes partes: uma lâmpada de Xenônio de 1000 W como fonte emissora de luz, um modulador mecânico para pulsar a luz emitida pela fonte, um monocromador para separar a luz da fonte em seus comprimentos de onda, filtros passa banda para eliminar o efeito do segundo harmônico das grades de difração no monocromador, lentes de vidro para focar a luz da fonte na câmara fotoacústica, uma célula fotoacústica aberta que consiste num microfone de eletreto, um amplificador Lock-In que permite detectar a amplitude e a fase do som gerado no microfone com a mesma frequência do modulador mecânico, e um computador para armazenar os dados captados pelo Lock-In. Este sistema pode ser visualizado na figura 9.

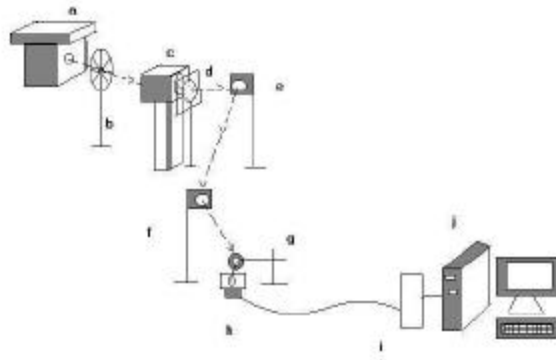


Figura 9 Sistema Fotoacústico. (a) lâmpada de Xenônio; (b) modulador mecânico; (c) monocromador; (d) filtros passa banda; (e) espelho côncavo; (f) espelho côncavo; (g) lente; (h) célula fotoacústica; (i) lock-In; (j) microcomputador.

As amostras foram retiradas do tubo eppendorf com auxílio de uma pipeta automática e foi acondicionada uma alíquota de 10µl da amostra em uma célula fotoacústica aberta (OPC) (Figura 10). Antes do acondicionamento da amostra foi acoplada uma peça de vidro, com formato quadrado com 1cm de lado, no topo do microfone de eletreto, e então as amostras foram acondicionadas sobre este vidro. Antes de realizar as leituras das amostras, foram realizadas leituras do vidro, para que pudessem ser normalizadas as leituras das amostras, eliminando assim interferências do vidro e da lâmpada de Xenônio.

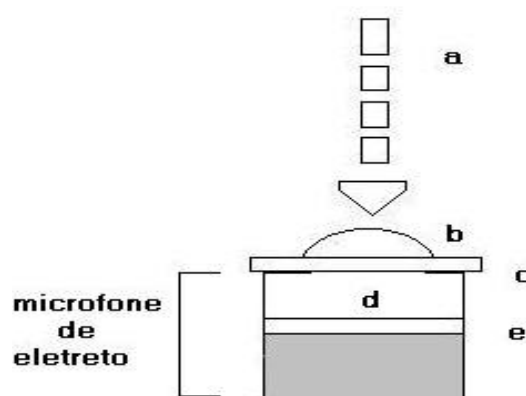
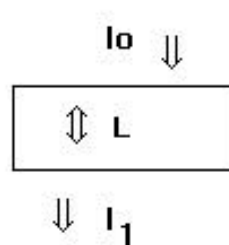


Figura 10 Célula Fotoacústica Aberta. (a) luz pulsada; (b) amostra; (c) vidro; (d) câmara fotoacústica; (e) membrana de eletreto.

Para as leituras realizadas utilizaram-se os seguintes parâmetros: Frequência do modulador mecânico de 17Hz e intervalo de tempo de 1s. A análise posterior dos espectros de absorção foi realizada através do software Microcal Origin. Foram realizadas medidas de transmitância na faixa dos 360 a 700nm. Para que se pudesse observar a absorção da amostras nos diferentes comprimentos de onda foi aplicada a função:

$$-\ln(T)$$

Onde T é a transmitância das amostras obtidas através das medidas realizadas. A transmitância pode ser definida como a porcentagem de luz que é transmitida, ou seja que atravessa a amostra (figura 11).

**Figura 11**

Esquema da Transmitância

Na figura 11 podemos observar um esquema de transmitância, onde I_0 é a intensidade de luz incidente sobre a amostra, L é a espessura da amostra e I_1 a intensidade luz que atravessa a amostra. Pela Lei de Lambert Beer, temos que:

$$I_1 = I_0 e^{-bL} \quad (8)$$

Onde b é o coeficiente de absorção da amostra. Assim podemos dizer que:

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-bL} = T \quad (9)$$

de onde temos que:

$$\ln T = -bL \quad (10)$$

Assim a absorção da amostra é proporcional a $-\ln T$.

2.5.2-Análise dos Pigmentos

A degradação dos pigmentos após absorção da luz também foi estudada. Primeiramente foram obtidos os espectros de absorção no espectrofotômetro (Carry 50-Bio Varian) do Laboratório de Química do IP&D-UNIVAP. A partir destes dados foram definidas as fontes luminosas que seriam utilizadas para irradiação destes pigmentos .

Os pigmentos foram analisados no Laboratório de Espectroscopia Fotoacústica do IP&D-UNIVAP, onde realizaram-se medidas com técnicas fotoacústicas para verificar mudanças estruturais nos pigmentos irradiados e não irradiados. Utilizou-se o sistema composto de uma lâmpada de Tungstênio (W), um modulador mecânico, uma lente de vidro para focar a luz da fonte na câmara fotoacústica, um espelho e a célula fotoacústica (que consiste de um bloco de bronze e um microfone de eletreto) ligada a um amplificador Lock-In que permite detectar a amplitude e a fase constante do som gerado no microfone, e um microcomputador para armazenar os dados captados pelo Lock-In. Utilizou-se também para irradiar as amostras, uma fonte luminosa de comprimento de onda conhecido que ficava sobre a célula fotoacústica, como pode ser observado na figura 12.

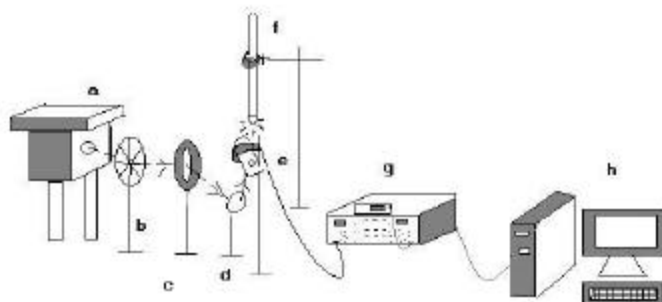


Figura 12 Espectrofotômetro Fotoacústico. (a) lâmpada de W; (b) modulador mecânico; (c) lente; (d) espelho; (e) célula fotoacústica; (f) fonte luminosa; (g) lock-In; (h) microcomputador.

Para esta análise utilizou-se sobre a célula fotoacústica (figura 13) papel alumínio contendo uma fase opaca (preta), sendo que esta face ficou do lado interno da célula, enquanto a face de alumínio ficou voltada para o exterior da célula. O alumínio exerce função tanto como suporte da amostra quanto como absorvedor da luz incidente que atravessa a janela de vidro. Foi ainda acoplado sobre o alumínio um anel plástico com diâmetro de aproximadamente 2cm. Sobre este anel foi acondicionado 100 μ l da amostra diluída a 1:1 como citado anteriormente.

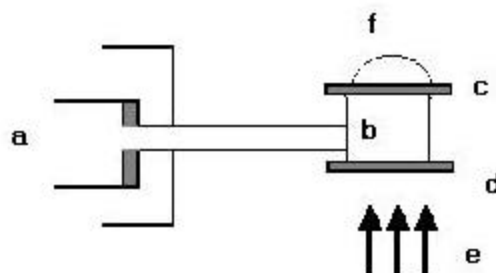


Figura 13 Célula Fotoacústica. (a) microfone de eletreto; (b) câmara fotoacústica; (c) suporte de alumínio; (d) vidro; (e) luz incidente; (f) amostra.

A radiação da lâmpada, modulada pelo modulador mecânico, atravessa a janela de vidro e incide no suporte da amostra do lado interior da câmara fotoacústica. A luz incidente é absorvida pela face preta do alumínio e se transforma em calor. Parte do calor gerado na folha de alumínio se difunde para a amostra; a outra parte se dissipa no ar interior da câmara gerando o sinal fotoacústico. Essa partição de calor depende da efusividade térmica da amostra e do ar, o que determina o sinal fotoacústico. A efusividade térmica é dada pela fórmula abaixo:

$$e = (krc)^{1/2} \quad (12)$$

Onde k é a condutividade térmica, r é a densidade e c é o calor específico do meio.

A efusividade térmica do meio é uma grandeza que representa a facilidade do calor se difundir em determinado meio. O calor gerado na superfície pela absorção de luz se difunde para os meios adjacentes proporcionalmente às respectivas efusividades térmicas, ou seja, o fluxo de radiação F_o (energia luminosa que se transforma em calor na superfície) é igual à soma do fluxo de calor para o lado da amostra F_{am} com o fluxo de calor para o lado do ar F_{ar} , assim:

$$F_{am} + F_{ar} = F_o \quad (13)$$

É importante observar que as propriedades térmicas da amostra estudada neste trabalho mudam durante o tempo e, conseqüentemente a sua efusividade térmica, o que faz que a partição de calor e o sinal fotoacústico sejam alterados, indicando mudanças estruturais após a irradiação.

Todas as amostras tiveram 500 pontos de varredura, sendo que o tempo entre cada ponto corresponde a aproximadamente 3s. A amostra foi adicionada no ponto 50. Nas amostras irradiadas foi utilizado LED ou laser de He-Ne como fonte emissora de luz e a irradiação foi realizada do ponto 100 até o ponto 120. Para estas medidas foram utilizados os seguintes parâmetros: Frequência do modulador mecânico de 17Hz, escala do sinal de 0,01V, intervalo de tempo entre as leituras 3s, sendo utilizados 500 pontos de varredura. Os resultados obtidos foram analisados com o software Microcal Origin.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Curvas de crescimento

A curva de crescimento da *C. albicans* foi obtida através da contagem das UFCs por placa e a análise dos dados foi realizada através do software Microcal Origin. Na figura 14 pode-se observar que as culturas de *C. albicans* irradiadas tiveram um crescimento maior do que as culturas de *C. albicans* controle, o que demonstra que houve bioestimulação nas culturas de *C. albicans* irradiadas. Este fenômeno, segundo Karu (1988) se deve ao fato de estruturas intracelulares como a mitocôndria absorverem a radiação, ocorrendo desta forma estimulação dos eventos celulares, que segundo Lima et al. (2000) levam a uma maior divisão mitótica aumentando assim o número de células. Observou-se também que as curvas de crescimento possuem comportamento semelhante até 24h após a irradiação, após este período as culturas que foram submetidas a irradiação apresentam um crescimento maior, isto sugere que a irradiação promoveu uma reação biológica tardia, pois este tipo de reação segundo Karu (1987a) pode ocorrer depois de horas e até mesmo dias após a irradiação.

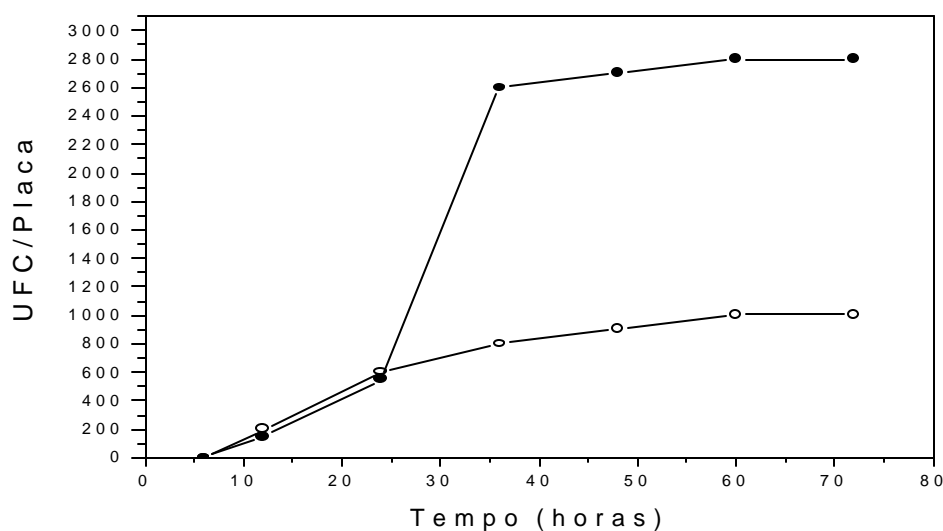


Figura 14 Curva de crescimento da *C. albicans* controle e irradiada. () *Candida* controle. () *Candida* irradiada com laser AlGaAs.

As figuras 15 e 16 mostram o efeito da TFD em culturas tratadas com os pigmentos azul de metileno e azul de Evans respectivamente. As culturas tratadas com azul de metileno após a irradiação apresentam inibição no crescimento, porém as culturas tratadas com azul de Evans apresentam menor inibição.

O pigmento azul de Evans se mostrou menos eficiente para a TFD do que o pigmento azul de metileno, o que pode ser explicado pelo fato de que a ação antimicrobiana da TFD ocorre pela formação de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies reativas são mensuráveis, pois emitem fluorescência. Wainwright et al. (1997) e Isak et al. (2000) realizaram trabalhos com azul de metileno e azul de Evans respectivamente, e nestes trabalhos foram realizadas medidas do rendimento quântico do oxigênio singlete. De acordo com estes trabalhos o azul de metileno excitado possui um rendimento quântico de 0,443 enquanto o azul de Evans excitado possui um rendimento quântico de 0,0039. Como se pode observar a produção de oxigênio singlete é menor no pigmento azul de Evans, o que pode explicar o fato do mesmo ter apresentado menor eficiência na TFD do que azul de metileno.

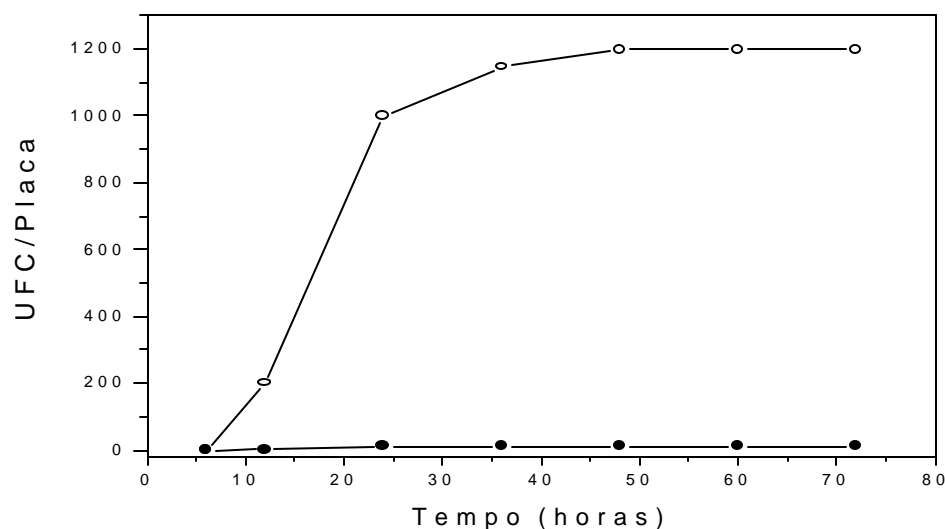


Figura 15 Curvas de crescimento para *Candida* tratada com azul de metileno
 (●) *Candida* + AM. (○) *Candida* + AM irradiada.

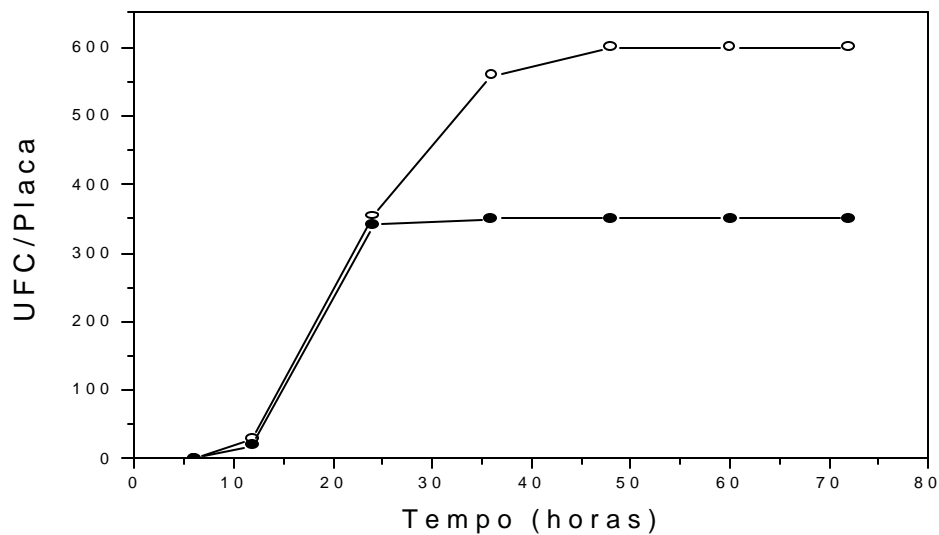


Figura 16 Curvas de crescimento para *Candida* tratada com AE. () *Candida* + AE. () *Candida* + AE irradiada com laser AlGaAs.

Na figura 17 pode-se observar a ação dos pigmentos azul de Evans e azul de metileno sobre a cultura de *C. albicans*, nota-se que as culturas tratadas com pigmentos azul de metileno ou azul de Evans, apresentam uma cinética de crescimento semelhante, embora não atinjam o mesmo patamar.

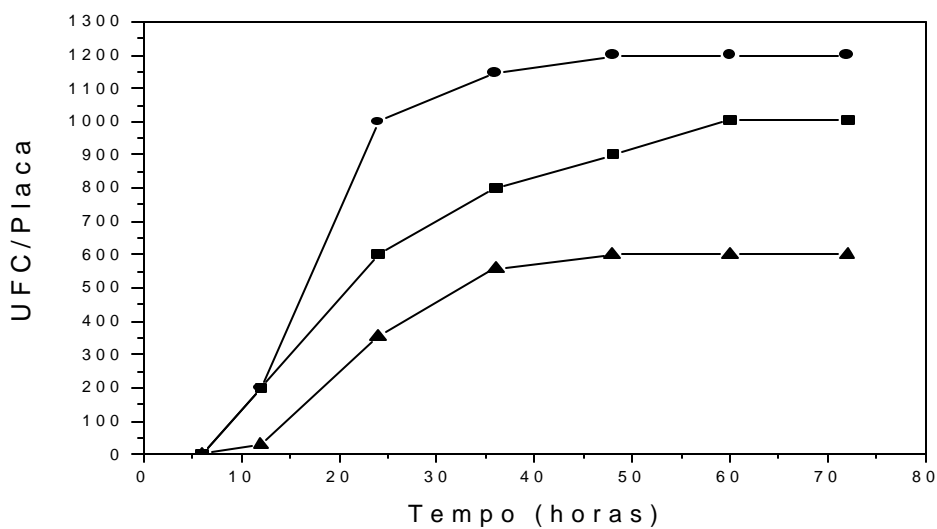


Figura 17 Curvas de crescimento para *Candida* e para *Candida* tratada com AM e AE. () *Candida* Controle. () *Candida* + AE. () *Candida* + AM.

Também pode ser observado na mesma figura que o azul de metileno estimula o crescimento da *C. albicans*, tendo um efeito bioestimulador nestas células, este comportamento segundo Karu (1988) se deve ao fato do azul de metileno alterar as concentrações de agentes redutores intracelulares, aumentando desta forma a síntese de DNA.

As curvas de crescimento obtidas neste experimento correspondem com curvas logísticas de crescimento populacional. Assim foram submetidas a um ajuste não linear através da fórmula 14

$$y = \frac{a}{1 + e^{-k(x - x_c)}} \quad (14)$$

Onde y é o número de indivíduos, x é o tempo, e a , x_c e k são parâmetros do modelo, sendo k a taxa específica de crescimento, ou potencial biótico da espécie, a é a capacidade de suporte do meio ou seja, o tamanho máximo que a população pode atingir, e x_c é a constante de integração. A taxa específica de crescimento está relacionada com o tempo necessário para que a curva de crescimento atinja sua maior taxa, e este tempo está definida como $T_0 = 1/k$. Todas as curvas obtidas neste experimento se encaixam no modelo logístico de crescimento populacional pois elas apresentam inicialmente um aumento exponencial das UFCs que se estabiliza em um dado momento, o que variou dependendo do tratamento aplicado a cada grupo. Conforme os parâmetros das curvas obtidas (Tabela 1) os valores encontrados de T_0 para os grupos: AMc e AEc foram muito próximos, sugerindo que possuam uma cinética de crescimento similar. Porém a capacidade de suporte do meio é diferente apontando capacidade de crescimento máximo para Ci e depois para o AMc, o que reflete o efeito bioestimulador do azul de metileno fagocitado pelas células de *C. albicans*. Para o grupo AMi foi observada a menor capacidade de crescimento assim como o menor T_0 o que implica que após a irradiação houve morte de várias colônias rapidamente, e aquelas que sobreviveram não conseguiram crescer mais. O AEi apresentou capacidade de crescimento e T_0 reduzidos, entretanto esta redução é nitidamente menor do que no AMi.

Tabela 1 Parâmetros das curvas logísticas de crescimento.

Parâmetros da amostra	Cc	Ci	AMc	AMi	AEc	AEi
a	967,68	2772,75	1187,45	10,5	595,04	350
xc	21,87	28,13	17,98	12,4	22,63	17,31
k	0,15	0,33	0,28	3,58	0,26	0,53
To	6,66	3,03	3,57	0,28	3,8	1,88

Nota: Cc: *Candida* controle; Ci: *Candida* irradiada; AMc: *Candida* + AM controle; AMi : *Candida* + AM irradiado; AMc: *Candida* + AM irradiado; AEc: *Candida* + AE controle; AEi: *Candida* + AE irradiado.

Como exemplo dos ajustes citados acima se pode observar na figura 18 a curva logística de crescimento populacional para *C. albicans* tratada com azul de metileno.

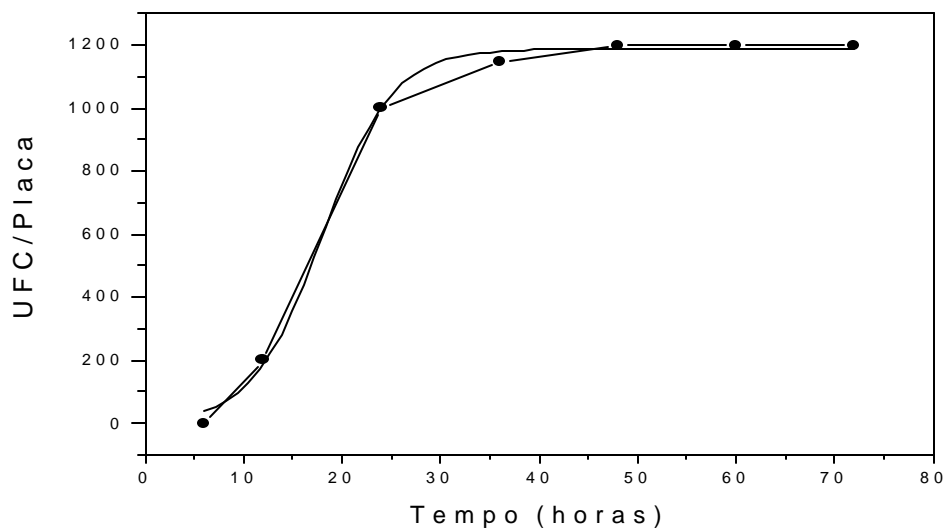


Figura 18 Curva logística de crescimento populacional para *Candida* tratada com Azul de metileno. A linha contínua representa o melhor ajuste para a curva logística de crescimento.

3.2- Análise dos pigmentos

3.2.1- Azul de metileno

A análise fotoacústica do pigmento azul de metileno pode ser observada na figura 19 que mostra que este pigmento após irradiado por um minuto com LED apresenta um aumento do sinal fotoacústico através do tempo, no esquema experimental já descrito.

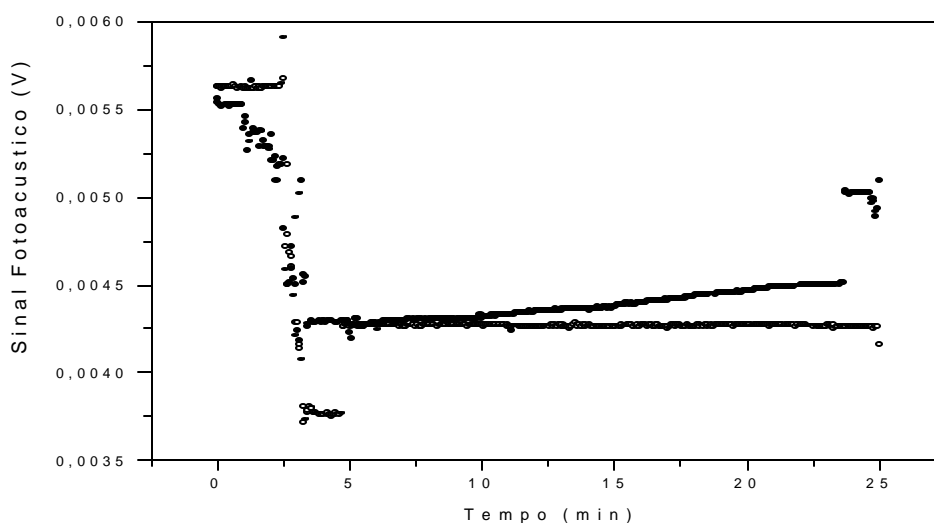


Figura 19 Comportamento do azul de metileno irradiado e controle. (○) azul de metileno controle. (●) azul de metileno irradiado com LED.

A condução térmica é um fenômeno de transporte, em que a energia devida à agitação molecular é transferida de um lugar para outro acompanhado da variação de temperatura correspondente. Assim ocorre condução térmica sempre que a temperatura da substância varia de um ponto para outro, ou seja, há condução térmica quando a energia média das moléculas é diferente em diferentes partes da substância. Essa diferença de temperatura ou de energia média dá origem a um fluxo líquido de energia (calor). O mecanismo da condução térmica é diferente nos sólidos, líquidos e gases

devido à diferença de mobilidade das moléculas nos três estados. Nos gases, e até certo ponto nos líquidos, a condução térmica resulta de colisões entre moléculas rápidas e moléculas lentas, resultando em uma transferência de energia cinética das moléculas mais rápidas para as mais lentas. Entretanto, nos sólidos não se verifica transferência de energia devido à movimentação molecular, pois o único movimento das moléculas num sólido é a vibração em torno de posições de equilíbrio. Consequentemente, o processo envolvido é, na realidade, o transporte dessa energia vibracional ao longo da rede cristalina do sólido.

No experimento realizado, o que está sendo monitorado é o sinal fotoacústico dentro da câmara fechada, que está relacionado com a quantidade de calor que foi refletida na interface alumínio-gota, seguindo uma explicação como a mostrada a seguir:

A energia luminosa ao incidir sob o alumínio é convertida em calor, que é difundido para a amostra e para o interior da câmara fotoacústica. O calor se difunde na proporção das efusividades térmicas de cada meio (amostra e ar). A figura 20 esquematiza essa situação, onde o calor gerado na superfície do alumínio pela absorção de luz se difunde para os meios adjacentes. Esta difusão é proporcional as efusividades térmicas de cada meio. Assim, o fluxo de radiação F_o , energia luminosa que se transforma em calor na superfície, é igual a soma do fluxo de calor para o lado da amostra F_{am} com o fluxo de calor para o lado do ar F_{ar} .

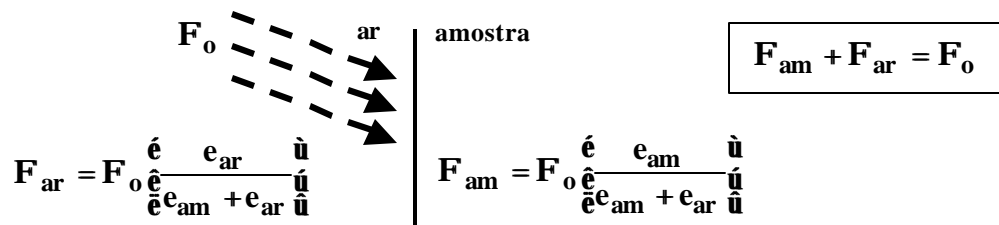


Figura 20 Partição do calor gerado devido a absorção de radiação, Φ_o , entre a amostra, Φ_{am} , e o ar, Φ_{ar} .

O aumento do sinal implica que mais calor está indo para a câmara e menos calor está indo para a mistura soro fisiológico-azul de metileno irradiado. Isto pode ocorrer por duas razões:

- Menos calor vai para a mistura porque as moléculas que se encontram nela não estão conseguindo vibrar facilmente. Isto estaria refletindo a formação de agregados entre as moléculas do azul de metileno após a irradiação, o que poderia estar relacionado também com a mudança de propriedades físico-químicas da molécula de azul de metileno, relacionado com reações fotoestimuladas entre o azul de metileno excitado e a camada superficial da folha de alumínio, já que o azul de metileno após irradiado reage facilmente com doadores de elétrons.

- Após a irradiação, são induzidas reações químicas exotérmicas que aumentam a temperatura na interface alumínio-gota, o que diminui o gradiente de temperaturas e faz com que mais calor seja refletido para a câmara fotoacústica.

Qualquer uma destas hipóteses está baseada no fato que após irradiação a molécula de azul de metileno modifica suas propriedades e altera as moléculas em sua volta.

3.2.2 – Azul de Evans

A figura 21 mostra o comportamento do azul de Evans controle e do azul de Evans irradiado com LED. Pode-se observar que não houve diferença no comportamento do pigmento azul de Evans quando irradiado com LED.

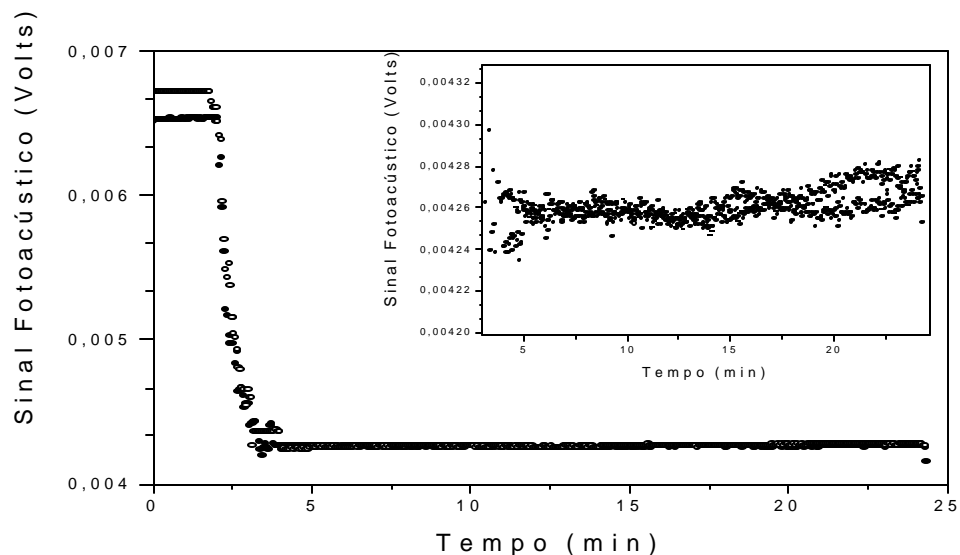


Figura 21 Comportamento do azul de Evans irradiado com LED e controle. O quadro mostra o comportamento do sinal fotoacústico do pigmento após a irradiação. (●) azul de Evans controle. (○) azul de Evans irradiado com LED.

Como se pode notar, no caso do azul de Evans não é observado o mesmo comportamento temporal observado no azul de metileno quando irradiado com a luz do LED, que emite em 650nm com potência de 12mW. Isto pode estar relacionado com o fato de que a absorção máxima dele acontece em um comprimento de onda diferente ao da emissão do LED usado, porque a absorção máxima do azul de metileno se encontra em 665nm (Figura 22) enquanto que a do azul de Evans se encontra em 610nm como pode ser observado na figura 23.

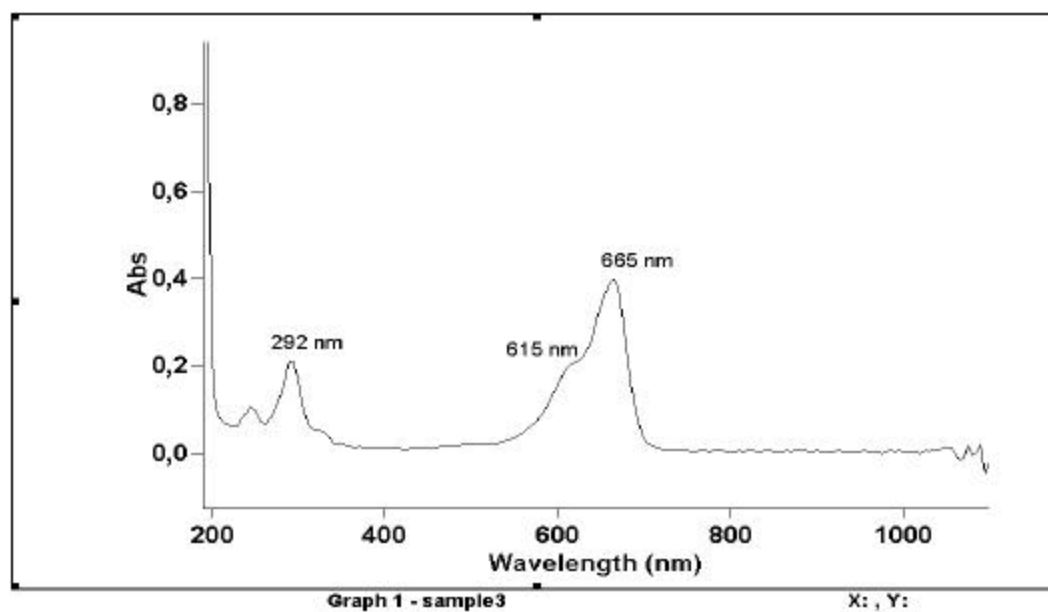


Figura 22 Curva de absorção do corante azul de metileno.

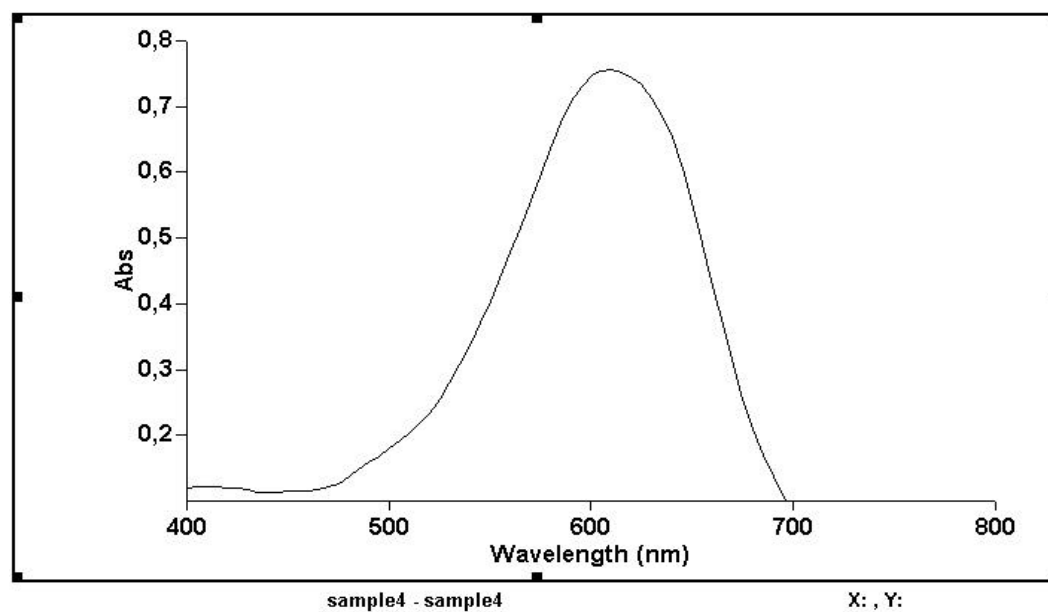


Figura 23 Curva de absorção do azul de Evans. Pico máximo em 610nm.

Então para observar o comportamento do azul de Evans sob estímulo luminoso, ele foi irradiado com outra fonte de luz, o laser He-Ne, que emite em 632.5nm com potência de 15mW (figura 24).

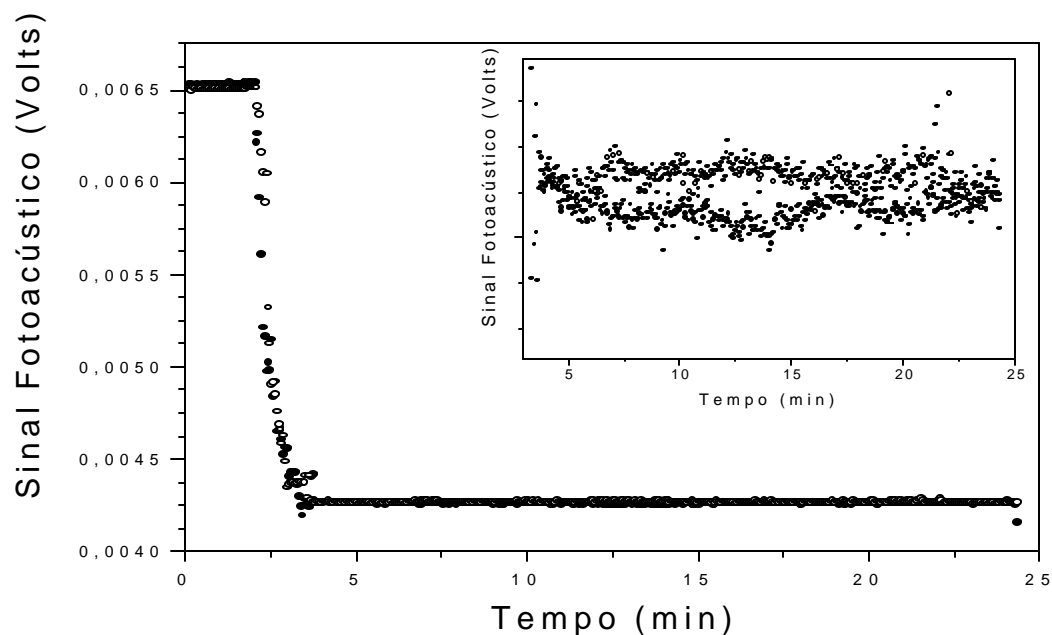


Figura 24 Comportamento do azul de Evans irradiado com He-Ne e controle. O quadro mostra o comportamento do sinal fotoacústico do pigmento após a irradiação.(●) azul de Evans controle. (○) azul de Evans irradiado com He-Ne.

Pode-se observar um aumento relativo do sinal fotoacústico, mas este não se tornou muito evidente quando se fez a média das medidas em virtude de vários comportamentos terem sido observados, então realizou-se um teste de χ^2 para saber se o comportamento nas curvas muda após a irradiação entre as duas fontes e o controle. O fato do comportamento do azul de Evans não ser igual ao do azul de metileno reflete o fato de que este último é muito reativo com moléculas doadoras de elétrons enquanto o azul de Evans é um pigmento muito mais estável em termos reativos.

3.2.3 – Teste de c^2

Nas curvas temporais do sinal fotoacústico foram observados três comportamentos: o sinal aumentava, diminuía ou ficava estável. Para comprovar se houve diferença entre o comportamento no sinal fotoacústico dos pigmentos expostos e os não expostos a radiação, foi utilizado o teste de χ^2 (qui quadrado). Este teste verifica se a frequência absoluta observada de uma variável é significativamente diferente da distribuição de frequência absoluta esperada. Ela compara a distribuição de diversos acontecimentos em diferentes amostras, a fim de avaliar se as proporções observadas destes eventos mostram ou não diferenças significativas ou se as amostras diferem significativamente quanto às proporções desses acontecimentos. Para este teste utiliza-se a seguinte formula:

$$c^2 = S [(o - e)^2 / e] \quad (15)$$

Onde **o** é a frequência observada para a classe e **e** é a frequência esperada para a classe.

A tabela 2 mostra o comportamento do azul de metileno controle e do mesmo irradiado com LED. A tabela 3 mostra o comportamento do azul de Evans controle em comparação ao do azul de Evans irradiado com LED, enquanto a tabela 4 mostra o comportamento do azul de Evans controle em relação ao azul de Evans irradiado com He-Ne.

Tabela 2 Comportamento do sinal fotoacústico do azul de metileno controle e irradiado com LED.

Amostras	Sobe	Desce	Constante
AMc	3	2	19
AMi LED	15	5	4

Tabela 3 Comportamento do sinal fotoacústico do azul de Evans controle e irradiado com LED.

Amostras	Sobe	Desce	Constante
AEc	6	6	12
AEi LED	7	5	12

Tabela 4 Comportamento do sinal fotoacústico do azul de Evans controle e irradiado com He-Ne.

Amostra	Sobe	Desce	Constante
AEc	6	6	12
AEi HeNe	11	5	8

Cada pigmento irradiado foi comparado com o seu controle e analisado individualmente da seguinte forma: AMc e AMi LED; AEc e AEi LED; AEc e AEi He-Ne, utilizando 2 graus de liberdade e α (nível de significância) de 5%.

Para AM irradiado com LED os números observados e esperados são estatisticamente diferentes ($\chi^2=19,8$), o que implica que as diferenças entre as proporções são significativas. Entretanto, para o pigmento AE irradiado com LED e He-Ne aceita-se a hipótese de igualdade estatística entre os números observados e os números esperados, ou seja, os desvios nas proporções não são significativos. Para AE irradiado com LED: $\chi^2=0,17$ e para AE irradiado com He-Ne: $\chi^2=2,8$. O valor teórico de χ^2 para que as amostras sejam consideradas diferentes neste caso é de 5,9. Mesmo

assim, a tabela 3 mostra uma pequena tendência no comportamento (sobe) do sinal do azul de Evans irradiado com He-Ne. Isto implica que uma estatística maior tem que ser feita para poder estudar o efeito da irradiação neste pigmento através das técnicas fotoacústicas. Este resultado também confirma a alta estabilidade dos diazo corantes, como descrito por Isak et al. (2000).

3.3 – Espectroscopia

3.3.1- *Candida albicans* e *Candida albicans* irradiada

Como foi observado nas curvas de crescimento, a *C. albicans* após irradiação apresenta bioestimulação, pois o número de colônias obtidas foi muito superior ao do controle. Podemos observar o comportamento da densidade óptica da *C.albicans*, que é o logaritmo da razão entre a irradiação incidente e a irradiação transmitida (HOPE et al. 1983), antes e após a irradiação nas figuras 25 e 26.

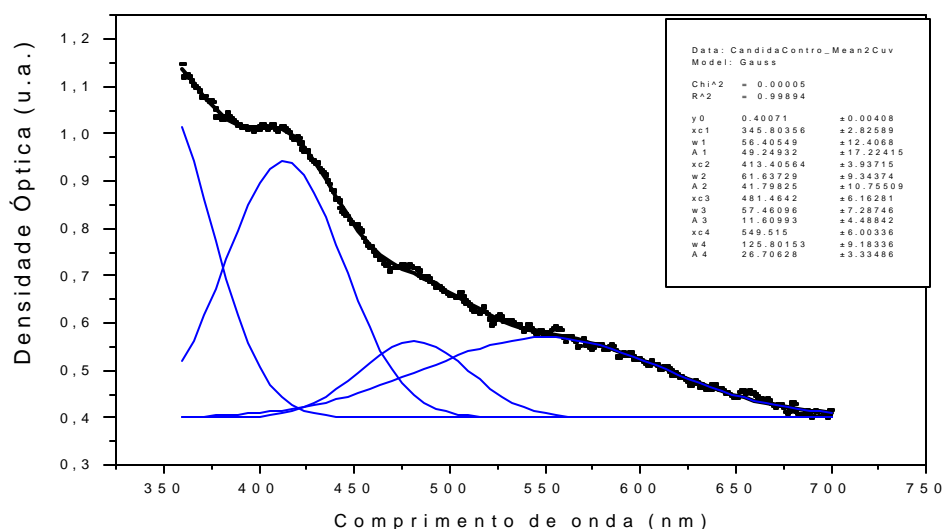


Figura 25 Curva de absorção da *C. albicans* controle.

Na figura 25 temos o espectro de absorção da *C.albicans*, pode-se observar a presença de vários picos de absorção, entre eles a banda de Soret em 413nm, que podem estar relacionados com uma soma dos espectros de absorção de citocromos e ferredoxina extraída de organismos protistas (KIRSCHENBAUM, 1972). Como pode

ser observado nesta figura, o espectro foi decomposto em varias curvas Gaussianas. Isto é comum na espectroscopia, já que as curvas de absorção têm forma Gaussiana ou Lorentziana (KARU, 2001b).

Na figura 26 observa-se o espectro de absorção da *C. albicans* após a irradiação. O mesmo tratamento foi feito com esta curva, comparando ambas as figuras, pode-se observar que a banda de Soret teve um deslocamento para comprimentos de onda maiores (observar a Tabela 5). Isto é característico do espectro de absorção em mudanças do estado redox da molécula absorvedora, no caso de oxidado para reduzido (KIRSCHENBAUM, 1972).

Como mencionado por Karu (1999), a irradiação esta possivelmente envolvida nas reações de transferência de elétrons na cadeia respiratória devido a mudanças provocadas nas propriedades redox da cadeia respiratória. A radiação é absorvida na cadeia respiratória pela citocromo *c* oxidase que medeia a transferencia de elétrons do citocromo *c* para o oxigênio molecular, oxidando o ferrocitocromo e reduzindo a molécula de oxigênio. A energia livre resultante é convertida em potencial eletroquímico que atravessa a membrana mitocondrial com conseqüente produção de ATP, pois a irradiação causa acréscimo no potencial de membrana mitocôndrial e no gradiente de prótons, causando mudanças nas propriedades ópticas da mitocôndria e modificando algumas reações dependentes da NADH-desidrogenase, e também aumentando a taxa de ADP/ATP, assim como de RNA, DNA e de síntese protéica na mitocôndria.

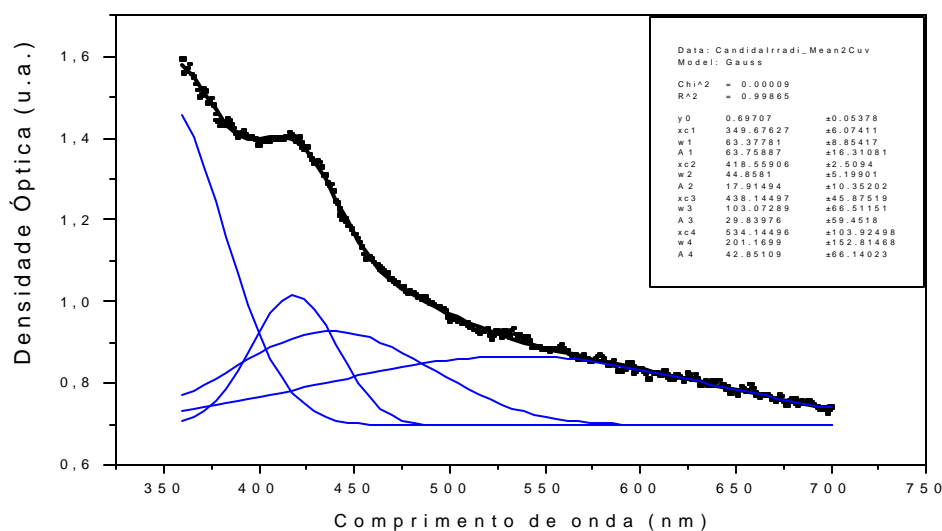


Figura 26 Curva de absorção da *C.albicans* após irradiação com laser diodo AlGaAs.

Na tabela 5, pode-se observar os parâmetros espectrais da *C. albicans* antes e após irradiação com laser diodo AlGaAs.

Tabela 5 Parâmetros espectrais dos picos de absorção da *C. albicans* controle e irradiada com laser diodo AlGaAs.

<i>C. albicans</i> <i>Candida albicans</i> controle					<i>Candida albicans</i> irradiada			
Pico	Posição (nm)	Largura (nm)	Area	Altura Relativa*	Posição (nm)	Largura (nm)	Area	Altura Relativa*
1	345,8	56,4	49,2	----	349,7	63,4	63,8	----
2	413,4	61,6	41,8	1,22	418,5	44,9	17,9	0,64
3	481,5	57,5	11,6	0,49	438,1	103,1	29,8	0,58
4	549,5	128,8	26,7	0,49	534,1	201,2	42,8	0,55

* Altura relativa ao ponto inicial da curva.

3.3.2- *Candida albicans* tratada com azul de metileno

Na figura 27 pode-se observar o espectro de absorção da *C. albicans* com azul de metileno sem irradiação.

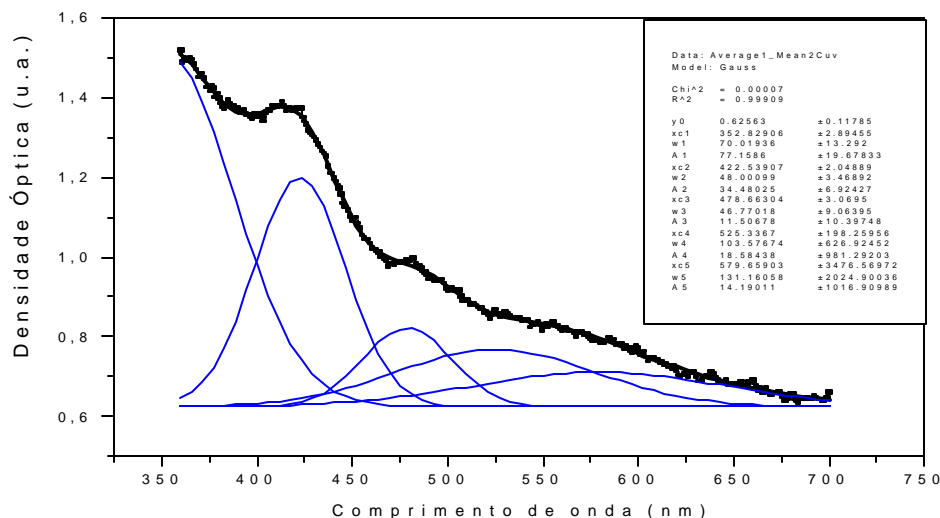


Figura 27 Espectro de absorção da *C. albicans* com azul de metileno sem irradiação.

Neste caso, a diferença do ajuste feito com a *C. albicans* pura, teve que ser usado um conjunto de 5 curvas Gaussianas, onde temos os mesmos picos de absorção e um novo pico após 600nm, que pode ser associado ao azul de metileno endocitado pelas células. A banda de Soret encontra-se em volta de 420nm, ou seja, o citocromo estaria numa forma reduzida, de forma semelhante ao que acontece durante a bioestimulação. Isto está de acordo ao observado na curva de crescimento da *C. albicans* tratada com azul de metileno (figura 15), onde se observa que ela atinge um patamar maior que a curva de crescimento da *C. albicans* controle (figura 17). Este resultado também está de acordo ao comentado por Karu (1998), onde cita que o azul de metileno causa aumento da síntese de DNA pela célula, provavelmente por alterar a concentração de agentes redutores intracelulares.

Na figura 28 observamos o espectro da *C. albicans* irradiada após 12 horas de incubação.

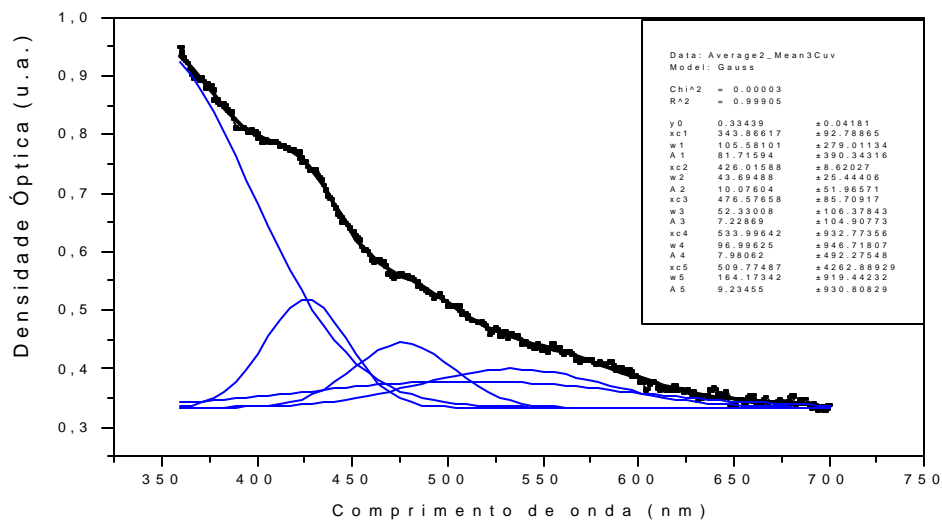


Figura 28 Espectro de absorção, da *C. albicans* com azul de metileno irradiada com laser AlGaAs, após 12h de incubação.

Aqui se os picos estão localizados mais para a esquerda, o que pode estar representando que o citocromo seja afetado após a irradiação junto com o azul de metileno, porém a localização e o centro da banda de Soret não muda de posição.

Por último, a figura 29 mostra o espectro da *C.albicans* irradiada, após 36 horas de incubação.

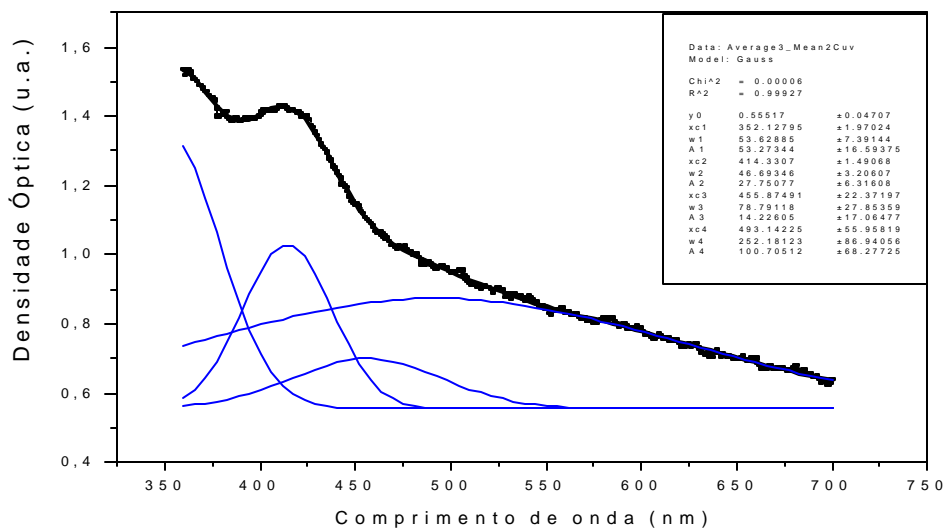


Figura 29 Espectro de absorção, da *C. albicans* com azul de metileno irradiada com laser AlGaAs, após 36h de incubação.

Neste caso, não é mais necessário o uso de 5 curvas Gaussianas para fazer o ajuste da curva toda. Podemos ver que o pico de absorção não mais existe após 600 nm sumiu, o que pode implicar que as células que sobreviveram neste tempo representam as células filhas daquelas que sobreviveram após a irradiação do azul de metileno. Observamos também que o centro da banda de Soret passou de 420 nm para 413 nm, o que implica que o citocromo estaria mudando de reduzido para oxidado novamente, ou seja, estaria fazendo o caminho contrario da bioestimulação.

Através da tabela 6, pode-se observar os parâmetros espectrais da *C.albicans* tratada com azul de metileno sem irradiação e após 12 e 36h da irradiação com laser diodo AlGaAs.

Tabela 6 Parâmetros espectrais dos picos de absorção da *C.albicans* tratada com azul de metileno.

<i>Candida albicans</i> + AM					<i>Candida albicans</i> + AM irr. (12h)				<i>Candida albicans</i> + AM irr.(36h)			
Pico	Posição (nm)	Largura (nm)	Area	Altura*	Posição (nm)	Largura (nm)	Area	Altura	Posição (nm)	Largura (nm)	Area	Altura*
1	352,8	70	77,5	----	343,9	105,5	81,7	----	352,1	53,6	53,3	----
2	422,5	48	34,5	0,78	426	43,7	10,8	0,55	414,3	46,7	27,7	0,66
3	478,6	46,8	11,3	0,54	476,6	52,3	7,2	0,47	455,9	78,8	14,2	0,46
4	525,3	103,5	18,6	0,50	533,9	96,9	7,9	0,39	493,1	252	100,7	0,59
5	579,6	131,1	14,2	0,46	509,8	164,1	9,2	0,43	----	----	----	----

* Altura relativa ao ponto inicial da curva.

CONCLUSÃO

4- CONCLUSÃO

Neste trabalho foram analisados diferentes pigmentos comumente utilizados na TFD: azul de Evans e azul de metileno, utilizando como modelo celular experimental *Candida albicans*. Nas culturas de *Candida albicans*, as quais foram irradiadas com a luz do laser AlGaAs que emite no comprimento de onda de 635nm e potência de 35mW, foi observado o efeito da bioestimulação, pois estas culturas apresentaram maior número de UFC do que as culturas de controle. Nas culturas de *C. albicans* tratadas com azul de metileno também ocorreu o fenômeno da bioestimulação, isto porque o azul de metileno reage facilmente com doadores de elétrons, reduzindo então os cromóforos da célula da mesma forma que a irradiação fez. Contudo, o número de UFC no caso de *C. albicans* com azul de metileno, apesar de ser maior do que nas culturas controle não atingiu a metade do número de UFC do que nas culturas de *C. albicans* irradiadas. Os espectros de absorção obtidos neste estudo, sugerem que estas alterações ocorram nas moléculas dos citocromos e de ferredoxina, pois, após a irradiação os espectros obtidos passaram da forma oxidada para a forma reduzida, o que iniciaria a cascata de reações que provocam as alterações metabólicas que levam a bioestimulação.

Nas culturas tratadas com azul de metileno, foi observado que o mesmo estimula o crescimento celular. Porém quando irradiadas com a luz do laser AlGaAs o crescimento de *C. albicans* foi inibido quase totalmente, comprovando a eficiência antimicrobiana da TFD utilizando este pigmento. Nos espectros de absorção das culturas de *C. albicans* tratadas com azul de metileno, incubadas por 12h, observou-se que o pico de absorção referente ao citocromo sugere que este esteja em sua forma reduzida, o que confirma a ação oxidante do azul de metileno que causa a estimulação celular.

Nas culturas tratadas com o azul de metileno e submetidas à irradiação ocorre diminuição dos picos de absorção, o que reflete a diminuição da atividade metabólica e inibição do crescimento da *C. albicans*. Contudo, nas culturas sob estas mesmas condições, porém com um tempo maior de incubação (36h), os espectros sugerem que o

citocromo esteja voltando a sua forma oxidada, e que esteja ocorrendo uma retomada da atividade metabólica natural da célula.

O pigmento azul de metileno foi estudado isoladamente, utilizando técnicas fotoacústicas, e os resultados obtidos pelas medidas realizadas neste estudo revelam que ocorrem alterações significativas no comportamento deste pigmento quando irradiado com luz emitida pelo LED em 650 nm. Nestas condições ele apresenta aumento do sinal fotoacústico, o que indica que há degradação de suas moléculas após um minuto de irradiação. Isto deve estar relacionado com a interação do azul de metileno no estado excitado com a superfície da folha alumínio, onde o óxido de alumínio existe para proteger o interior da folha da oxidação. Isto indica que o sinal observado não está relacionado com a fotodestruição da molécula de azul de metileno. Para futuros estudos deste processo é necessário substituir a folha de alumínio por um suporte inerte, como aço inoxidável ou vidro.

O sinal observado para o pigmento azul de Evans não apresenta alterações significativas quando irradiado com luz emitida pelo LED em 650nm. Então foi submetido a irradiação com nova fonte luminosa, que emite em um comprimento de onda mais próximo de seu pico de absorção, laser He-Ne emitindo em 632.5nm. Apesar da proximidade do espectro de emissão do laser He-Ne e do pico máximo de absorção do pigmento azul de Evans (610 nm), não ocorreram alterações significativas no comportamento do sinal fotoacústico deste pigmento, o que vem afirmar a alta estabilidade da sua classe, os diazo corantes.

Apesar da estabilidade do azul de Evans, como observado neste estudo, ele é capaz de produzir efeitos inibitórios nas culturas de *C. albicans*, apresentando um baixo efeito citotóxico. Porém, quando estas culturas tratadas com azul de Evans são irradiadas com laser AlGaAs a inibição do crescimento celular se torna mais pronunciada, embora a taxa de inibição não seja satisfatória. As culturas tratadas com o pigmento azul de Evans, não foram submetidas a análises espectrais devido à falta de tempo hábil para realização destas medidas. Desta forma permanece esta lacuna aberta para possíveis estudos posteriores.

Este estudo traz informações importantes que colaboram para a compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de bioestimulação, intensamente discutidos por Tiina Karu e outros pesquisadores como V. Manteifel e J. M.Ocaña-Quero, entre outros.

A alteração dos espectros de absorção das culturas de *C. albicans* após a irradiação revelam de maneira indireta as mudanças ocorridas na célula, como a alteração do estado redox do citocromo, levando-o do estado oxidado ao reduzido. O azul de metileno, que também possui uma ação bioestimuladora, provoca a mesma alteração no estado redox do citocromo, confirmando assim o envolvimento do citocromo nas reações que levam a bioestimulação.

Contudo, na TFD, observa-se primeiramente que o citocromo apresenta-se no estado reduzido após 12h decorridas da irradiação, entretanto, após decorrido um período de 36 horas, o citocromo apresenta-se novamente no estado oxidado. Assim, estes indícios revelam que a oxidação do citocromo observada após 12h da irradiação, foi provavelmente causada pelo azul de metileno e que a mudança do estado do citocromo após 36h da irradiação pode estar relacionada com a geração de novas células que não tiveram contato com azul de metileno, não sendo desta forma oxidadas. Isto sugere que a interação entre o pigmento e os cromóforos intracelulares não interferem no processo de destruição celular causado pela TFD, desta forma o mecanismo de fotodestruição da TFD está ligado a geração de espécies reativas de oxigênio devido a absorção por parte do pigmento da luz incidida sobre eles.

REFERÊNCIAS

5- REFERÊNCIAS

ARGUELLO, C.; ACOSTA-AVALOS, D.; ALVARADO-GIL, J. J.; VARGAS, H. **Photoacoustic monitoring of life cycles of *Leishmania Mexicana***. In: 10th INTERNATIONAL CONFERENCE OF PHOTOACOUSTIC AND PHOTOTHERMAL PHENOMENA, 1999, American Institute of Physics. p 585-587.

BALASUBABRAMANIAN, D.; RAO, M. The Malaria Parasite Monitored by Photoacoustic Spectroscopy. **Science.**, v. 223, 1984

BALASUBABRAMANIAN, D.; RAO, M. Application of photoacoustic to biology: some specific systems and methods. **Can. J. Phys.**, v. 64, p.1132-1135, 1986

BERGEVIN, M.; N'SOUKPOÉ-KOSSI, C. N.; CHARLEBOIS, D., LEBLANC, R. M.; WILLEMOT, C. Assessment of Strawberry Maturity by Photoacoustic Spectroscopy. **Applied Spectroscopy.**, v. 49, n. 3, 1995

BERTOLONI, G.; LAURO, F.M.; CORTELLA, G.; MERCHAT, M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1475, p. 169-174, 2000. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/bba>>. Acesso em 15 jun. 2002

BONNET, R. **Chemical Aspects of Fotodynamic Therapy**. London: Gordon and Breach, 1998. p.64-279

BRASLAVSKY, S. E. Photoacoustic and Photothermal Methods Applied to the Study of Radiationless Deactivation Processes in Biological Systems and in Substances of Biological Interest. **Photochemistry and Photobiology**, v. 43, n. 6, P.667-675, 1986

CONTRAN, R. S. et al. **Robbins- Patologia Estrutural e Funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996 1277p.

CARRÉ, V.; GAUD, O.; SILVAIN, I.; BOURDON, O.; SPIRO, M.; BLAIS, J.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; GUILLOTON, M. Fungicidal properties of meso-aryl-glycosylporphyrins: Influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.48, p.57-62, 1999

CIESLAR, G.; ADAMEK, M.; Sierón, A.; KAMINSKI, M. Influence of low-power laser irradiation on activity of some membrane and mitochondrial enzymes of hepatocytes in rats. **SPIE**, v 2323, p.546-550, 1995

DÓKA, O.; AJTONY, Z.; BICANIC, D.; KOEHORST, R. Assessing the Extent of Degradation in the UV Radiation and Heat-Catalyzed Oxidized Whole Milk Powder: The UV Photoacoustic and Diffuse Reflectance Spectroscopies Versus the Peroxide Value. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 9, P.1405-1408, 2000

FALJONI-ALÁRIO, A. Mudanças no estado spin e na reatividade de citocromo *c* induzidas por oxigênio singlete e radicais livres gerados fotoquimicamente. In: WORKSHOP EM TERAPIA FOTODINÂMICA: Complexo de moléculas fotoativadas e suas aplicações. Aspectos físicos, químicos, biológicos e médicos, 2002, São Pedro, SP, **Anais...**São Pedro: USP 2002, P. 93-94.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **International Journal of Gynecology & Obstetrics.**, v.71, p. S21-S27, 2000. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/ijgo>> . Acesso em 15 jun. 2002

FLEMING, H. Espectroscopia. Disponível em <<http://www.sma.if.usp.br/~fleming/planck/mode4.html#tex2html3>> . Acesso em 05.jan. 2004

GABRIELLI, D.; BELISE, E.; SEVERINI, D.; KOWALSTOWSKI, A. J.; BAPTISTA, M. S. Agregação do azul de metileno em mitocôndrias. In: WORKSHOP EM TERAPIA FOTODINÂMICA: Complexo de moléculas fotoativadas e suas aplicações. Aspectos físicos, químicos, biológicos e médicos, 2002, São Pedro, SP, **Anais...**São Pedro: USP 2002, P. 117-118.

HENRY, J.B. **Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19. ed São Paulo: Manole, 1999. 1552p.

HOPE, W.; LOHMANN, W.; MARKL, H.; ZIEGLER, H. **Biophysics**. 2. ed New York: Spring- Verlag, 1983.787p.

IRUDAYARAJ, J.; YANG,H. Analysis of Cheese Using Step-Scan Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy. **Applied Spectroscopy.**, v. 54, n. 4, P.595-600, 2000

ISAK, S. J.; EYRING, E. M.; SPIKES, J. D.; MEEKINS, P. A. Direct blue dye solutions: photo properties. **J. of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 134, p. 77-85, 2000

KARU, T.I.; TIPHLOVA, O. A. ; FEDOSEYEVA, G. E. Bioestimulating action of low-intensity monochromatic visible light: is it possible?. **Laser Chem.**, v. 5, p. 19-25, 1984

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J. of Quantum Eletronics.**, v.23, n.10, p.1703-1719, 1987a

_____. Bioestimulation of HeLa cells by low-intensity visible light. V. stimulation of cell proliferation *in vitro* by HeNe laser irradiation. **Nuovo Cimento.**, v.9, n.12, p. 1485-1494, 1987b

_____. Molecular Mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Laser in Life Sciences.**,v.2, n.1, p.53-74, 1988

_____. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics.**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989

_____. Activation of metabolism of nonphotosynthesizing with monochromatic visible (Laser) light: A critical review. **Laser in Life Sciences.**, v.7, n1, p. 11-33, 1996

_____. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, v. 49, p. 1-17, 1999

KARU, T.I; PYTIABRAT, LV; KALENDO, SG. Cell attachment modulation by radiation from a pulsed light Diode ($\lambda=820\text{nm}$) and various chemicals. **Laser in Surgery and Medicine .**, v. 28, p. 227-236, 2001

KARU, T.I; AFANASYEVA. N.I.; KOLYAKOV, S.F.; PYATIBRAT, L.V.; WELSER,L. Changes in absorbance of monolayer of living cells induced by laser radiation at 633, 670, e 820 nm. **IEE J. of Topics in Quantum Eletronics.**, v. 7, n. 6, p.982-988, 2001b

KIRSCHENBAUM, D.M. **Atlas of protein spectra in the ultraviolet and visible regions.** 1º ed New York: IFI/Plenum, 1972. 290p.

LEDO,E.; LEDO,A. Photerapy, photochemotherapy, and photodynamic therapy: Unapproved uses or indications **Clinics in Dermatology.**, v.18, p. 77-86, 2000

LIMA, A. A.L. A.; PRAMALHO, L. N. Z.; BRASIL I. R. C., ZUCOLOTO, S.; BAGNATO, V.; JUNIOR, O.C. S. Efeitos do Laser na função mitocondrial e regeneração hepática em ratos cirróticos hepatectomizados. **Acta Cir. Bras.**, v.15, n.2, 2000

MACDONALDS, I. J. ; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodinamic therapy. **J. Porphirins and Phtalocyanines.**, v.5, p. 105-129, 2001

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova.**, v.23, n.2, 2000

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA,L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, v. 38, p. 25-30, 1997

MARDEGAN, D. A.; LIMA, L. D.; ROCHA, S..M. ^a; BALBI, M.M.V.; WERNECK, C. E.; ZÂNGARO, R. A. Terapia fotodinâmica em cultura de *Candida albicans*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 18.2002, São José dos Campos , SP. **Anais...** São José dos Campos: UNIVAP, 2002. P. 144-146.

MARQUEZINI, M.V.; CELLA, N.; MANSANARES, ^a M.; VARGAS, H.; MIRANDA, L.C.M. Open Cell Spectroscopy. **Meas. Sci. Technol.** v. 2, p. 396-401, 1991

OCAÑA-QUERO, J. M.; GOMEZ-VILLAMNDOS, R.; MORENO-MILLAN, M.; SANTISTEBAN-VALENZUELA, J. M. Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. **J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, v.40, p. 294-298, 1997

OLIVEIRA, R.D.R.; MAFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. **Ver. Ass. Med. Brasil.**, v.47, n. 3, p. 231-235, 2001

PASSARELLA, A; PERLINO, E; QUAGLIARELLO. Evidence of changes, induced by HeNe laser irradiation, in the optical and biochemical properties of rat liver mitochondria. **J. of Electroanal. Chem. And Constituting.**, v.10, p. 185-198, 1983

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. ; **MICROBIOLOGIA.** 5.ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil. 1980. 1v. 566 p.

ROSENCWAIG, A. Photoacoustic Spectroscopy. **Ann. Rev. Bipphys. Bioeng.**, v. 9, P. 31-54, 1980

SEVERINO, D; JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M.S. Agregação do azul de metileno em interfaces: Mudança no mecanismo de fotossensibilização. In: WORKSHOP EM

TERAPIA FOTODINÂMICA: Complexo de moléculas fotoativadas e suas aplicações. Aspectos físicos, químicos, biológicos e médicos, 2002, São Pedro, SP, **Anais...São Pedro: USP 2002**, P. 115-116.

SIBATA; C., H.; OLEINICK, N.,L.; KINSELLA;T., J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 33, n. 8, p. 870-880, 2000

SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia—um texto ilustrado**.Teresópolis, RJ:Eventos, 1999. 531p.

SIMPLICIO, F. I. ; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. terapia fotodinâmica : Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova** ., v. 25, n. 5, 2002

SOBOLEV, A.S.; JANS A. D.; ROSENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. **Progress in Biophysics& Molecular Biology.**, v.73, p. 51-90, 2000

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 Surgery Medicine Oral Pathology.**,v. 93, n. 2, P.155-160, 2002

WAINWRIGHT, M., PHOENIX, D. A.; RICE, L.; BURROW, S. M.; WARING, J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **Journal of photochemistry and photobiology b: biology.**, v. 40, p.233-239, 1997

WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J. Oral Pathol Med.**, v.22, p. 354-357, 1993

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; D., PURCELL, W.M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology.**, v.144, p. 274-278, 2001

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; CORRY, D., PURCELL, W.M. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vitro*. **Cutaneous Biology.**, v.146, p.568-573, 2002