UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de
Cryptococcus neoformans com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma
cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão

Gabriela Braga Rodrigues

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de *Cryptococcus neoformans* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Gabriela Braga Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 12/12/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rodrigues, Gabriela Braga

Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de *Cryptococcus neoformans* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalúminio ftalocianina em nanoemulsão. Ribeirão Preto, 2012.

119 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP –
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Braga, Gilberto Úbida Leite

1. Inativação fotodinâmica de fungos. 2. Fenotiazínicos. 3. Ftalocianinas. 4. *Cryptococcus neoformans*. 5. Espécies de *Candida*. 6. Espécies de *Trichophyton*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Gabriela Braga Rodrigues

Título do trabalho: Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de *Cryptococcus neoformans* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalúminio ftalocianina em nanoemulsão

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

- A minha filha Mariana, amor incondicional;
- Ao meu marido Luiz pelo amor, carinho e paciência. Obrigada por fazer parte da minha vida, tornando-a melhor. Eu te amo muito;
- A minha mãe Graça e irmã Roberta pelo apoio e pelos conselhos que foram fundamentais para me guiar. Vocês são a minha base, sem vocês não sou ninguém;
- A minha tia Zelinda pelo seu imenso entusiasmo. Não tenho como agradecer por me apresentar este extraordinário mundo da pesquisa;
- E a Deus por me proteger e centralizar.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga muito obrigada por me receber em seu laboratório e acreditar em mim, não tenho palavras para expressar minha gratidão em todos esses anos;
- A CAPES (Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de Doutorado;
- Aos técnicos Sérgio H. da Silva, Ludmilla Tonani, Fabrício L. Tulini, Maria Laura de P. L. Pereira e Fernando Grine Martins pela imensa contribuição na realização deste trabalho;
- Ao Dr. Fernando Lucas Primo pela síntese das ftalocianinas em nanoemulsão, pelas exposições ao laser e pelo esclarecimento de dúvidas;
- Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi por disponibilizar seu laboratório para os ensaios de citotoxicidade com células de fibroblasto de camundongo;
- Aos técnicos do laboratório de Glicoimunobiologia Lilian Cataldi Rodrigues, Francine Bianchini e Rubens Eduardo Silva pela assistência nos ensaios de citotoxicidade;

- Ao Dr. Lenaldo Branco Rocha, responsável pelo Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela assistência na aquisição das imagens;

- Aos meus amigos do laboratório de Fotobiologia e Genética de Microrganismos Letícia A. Schiave, Fernanda P. Gonzales, Ana Luiza Calil, Letícia G. Salgado, Érika Nascimento, Everaldo dos Reis Marques, Bruno H. R. Barros, Tiago A. Cocio, Alessandra Marques, Henrique Dantas de Menezes, Marina Batistuti, Patrícia J. P. Poiani, Thayse T. Mota, Liana K. S. Ferreira, Guilherme Brancini e Mariana Rambaldi por todos os dias de trabalho;

- Ao técnico do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Homeopática José Orestes Del Ciampo por viabilizar as medidas de potencial zeta;

- A Dra. Aline Carolo por nos fornecer o conjunto de 96 LED vermelhos;

- A todos da minha família e àqueles que considero minha família.

"Nenhum vencedor acredita no acaso"

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Rodrigues, G. B. **Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de *Cryptococcus neoformans* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão.** 2012. 119f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Espécies de fungos dos gêneros *Candida* e *Trichophyton* e *Cryptococcus neoformans* são os mais importantes agentes causadores de micoses em humanos. A seleção de linhagens tolerantes aos fungicidas atualmente utilizados torna extremamente necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o controle desses patógenos. A inativação fotodinâmica (IF) de fungos baseia-se na utilização de um fotossensibilizador (FS) que se acumula preferencialmente nas células-alvo e que pode ser ativado por exposições à luz visível. A ativação do FS induz a formação de espécies reativas de oxigênio que matam a célula fúngica. O uso de FS para o tratamento de micoses é uma aplicação recente e promissora da IF de fungos. No presente estudo, foram avaliados os efeitos dos tratamentos fotodinâmicos (TF) com os FS fenotiazínicos azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO), novo azul de metileno (NMBN), o derivado pentacíclico do azul de metileno S137 e com uma cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão (CIAIPc/NE) nas leveduras *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e nos microconídios dos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. Os efeitos dos TF com os diferentes FS fenotiazínicos também foram avaliados na linhagem celular L929 de camundongo. Inicialmente, a eficácia dos TF foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada FS para cada dose de luz. Adicionalmente, nas condições otimizadas, também foram determinados os efeitos dos TF na sobrevivência das diferentes espécies de fungos. Os MICs variaram tanto entre FS como entre espécies e diminuíram com o aumento da dose de luz. Entre os FS fenotiazínicos, para a maioria dos tratamentos (espécies e doses de luz), o NMBN e o S137 apresentaram os menores MICs. Os MICs para o NMBN e para o S137 foram $\leq 2,5 \mu\text{M}$ para todas as espécies de *Candida*, para doses $\geq 20 \text{ J cm}^{-2}$. MICs para a CIAIPc/NE foram tão baixos quanto $0,01 \mu\text{M}$ para algumas das espécies de *Candida*. O TF com NMBN e S137 resultaram em redução de pelo menos 3 logs na sobrevivência de todas as espécies de *Candida* e de *Trichophyton*. O TF com CIAIPc/NE resultou em redução de até 4 logs na sobrevivência de *C. albicans* e *C. tropicalis* e de até 6 logs na sobrevivência de células melanizadas de *C. neoformans*. A internalização da CIAIPc foi confirmada por microscopia confocal de fluorescência e a quantidade incorporada pelas células foi dependente da concentração do FS. As toxicidades relativas entre os diferentes FS para as células de mamífero foram semelhantes às observadas em fungos, por exemplo maior toxicidade e fototoxicidade do NMBN e do S137 comparada às do MB e TBO.

Palavras-chave: inativação fotodinâmica de fungos, fenotiazínicos, ftalocianinas, *Cryptococcus neoformans*, espécies de *Candida*, espécies de *Trichophyton*.

ABSTRACT

Rodrigues, G. B. **Photodynamic inactivation of *Candida* and *Trichophyton* species and of *Cryptococcus neoformans* with phenothiazinium photosensitisers and with a chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion.** 2012. 119f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Fungal species of the genera *Candida* and *Trichophyton* and *Cryptococcus neoformans* are the main responsible for mycoses in humans. The selection of fungal strains resistant to currently used fungicides makes the development of alternative fungus-control techniques highly desirable. Fungal photodynamic inactivation (PI) is based on the use of a visible light-activate photosensitiser (PS) that preferentially accumulates in the cell of the target microorganism. The activation of the PS starts photochemical processes that produce a series of reactive oxygen species (ROS) that kill the fungal cell. The use of PS to treat mycoses is a novel and promising application of PI. In the present study, the effects of the photodynamic treatments (PDT) with the phenothiazinium PS methylene blue (MB), toluidine blue O (TBO), new methylene blue N (NMBN), the novel pentacyclic photosensitiser S137 and with a chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion (CIAIPc/NE) on the yeasts *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* and on microconidia of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* were evaluated. The effects of the PDT with the phenothiazinium PS were also evaluated on the mouse fibroblast cell line L929. The efficacies of the PDT were evaluated initially by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) of each PS for each light dose. Additionally, for the optimized conditions, the effects of the PDT on the survival of the different fungal species were also determined. MICs varied both among PS and species and decreased with light dose increase. Among the phenothiazinium PS, for most treatments (species and light doses), NMBN and S137 showed the lowest MICs. MICs for NMBN and S137 were $\leq 2.5 \mu\text{M}$ for all the *Candida* species to light doses $\geq 20 \text{ J cm}^{-2}$. MICs for CIAIPc/NE were as low as $0.01 \mu\text{M}$ for some of the *Candida* species. PDT with NMBN and S137 resulted in a reduction of at least 3 logs in the survival of all *Candida* and *Trichophyton* species. PDT with CIAIPc/NE resulted in reductions up to 4 logs in the survival of *C. albicans* and *C. tropicalis* and up to 6 logs in the survival of *C. neoformans* melanized cells. Internalization of CIAIPc by *C. neoformans* was confirmed by confocal fluorescence microscopy, and the degree of uptake was dependent on PS concentration. The relative toxicities among the different PS to mammalian cell were similar to the antifungal data, i.e. greater toxicity and phototoxicity with NMBN and S137 compared to MB and TBO.

Keywords: fungal photodynamic inactivation, phenothiazinium photosensitisers, chloroaluminum phthalocyanine, *Cryptococcus neoformans*, *Candida*, *Trichophyton*.

RESUMEN

Rodrigues, G. B. **Inactivación fotodinámica de especies de *Candida* y *Trichophyton* y de *Cryptococcus neoformans* con fotosensibilizadores fenotiazina y con un cloroaluminio ftalocianina en nanoemulsión.** 2012. 119f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Especies de hongos del género *Candida* y *Trichophyton* y *Cryptococcus neoformans* son los agentes más importantes causantes de las infecciones fúngicas en los seres humanos. La selección de cepas resistentes a los fungicidas utilizados actualmente se hace extremadamente necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el control de estos patógenos. La inactivación fotodinámica (IF) de los hongos se basa en el uso de una foto sensibilizadora (FS) que se acumula preferentemente en las células diana y puede ser activado por la exposición a la luz visible. La activación de FS induce la formación de especies reactivas de oxígeno que mata la célula fúngica. El uso de FS para el tratamiento de las micosis es una aplicación prometedora y reciente de IF de los hongos. Fueron evaluados los efectos de la terapia fotodinámica (TF) con FS fenotiazinas azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO) y nuevo azul de metileno (NMBN), un derivado de azul de metileno, no comercial, denominado S137 y un cloroaluminio ftalocianina en nanoemulsión (CIAIPc/NE) en la levadura *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* y en los microconidios de los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*. Inicialmente, la eficacia de la TF se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria (CIM). Cuanto menor sea el CIM, fue considerado como más eficaz el TF. Este enfoque fue muy conveniente porque fue posible revisar un gran número de parámetros. Después de determinar los parámetros más adecuados para la IF de cada una de las especies, se realizaron experimentos en los que la eficacia de la TF fue evaluada por la fracción de supervivencia. La supervivencia inferior se consideró la TF más eficaz. En pequeñas dosis de luz (5 y 10 J cm⁻²), la FS fueron el NMBN más eficaz y S137. El FS S137 era tóxico en la oscuridad para todas las especies. Cuando la supervivencia se evaluó por la fracción de supervivencia de la TF con la NMBN FS y S137 fueron capaces de reducir en al menos tres órdenes de magnitud, la supervivencia de todas las especies de *Candida* y *Trichophyton*. El TF con diferentes concentraciones de CIAIPc/NE fueron capaces de reducir, tanto como cuatro órdenes de magnitud de la supervivencia celular, de *C. albicans* y *C. tropicalis*. En las mismas condiciones, CIAIPc/NE fue capaz de reducir hasta seis órdenes de magnitud, la supervivencia celular melanizadas de *C. neoformans*. En el caso específico de IF *C. neoformans* con CIAIPc/NE, experimentos adicionales se realizaron, utilizando espectrofluorimetría y microscopía confocal para determinar la cantidad de FS incorporada por célula, y para determinar la ubicación de FS durante el TF. El CIAIPc/NE entrado en la célula fúngica y distribuido por su citoplasma. La toxicidad de la fenotiazina FS en la oscuridad, y los efectos de la TF también se evaluó en fibroblastos de ratón mediante el ensayo de MTT. El NMBN y TBO fueron tóxicos en la oscuridad a una concentración de 10 mM y la TF con NMBN y S137 fueron los que provocaron la mayor reducción en la viabilidad celular.

Palabras clave: inactivación fotodinámica de hongos, fenotiazinas, ftalocianinas, *Cryptococcus neoformans*, las especies de *Candida*, las especies de *Trichophyton*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química dos FS fenotiazínicos MB e TBO.....	7
Figura 2 –	Estrutura química da cloroalumínio ftalocianina (ClAlPc).....	10
Figura 3 –	Esquema das etapas fotoquímicas/fotofísicas envolvidas na fotossensibilização. Diagrama de Jablonski.....	13
Figura 4 –	Estrutura química dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e ClAlPc.....	27
Figura 5 –	Espectro de absorção no visível dos FS MB, TBO, NMBN e S137. Os espectros foram obtidos na concentração de 10 µM.....	27
Figura 6 –	Emissão espectral dos (A) LED brancos, (B) LED600 e (C) LED96.....	29
Figura 7 –	Efeito das exposições apenas à luz, emitida pelo LED600 (A), e dos TF com o NMBN (2,5 µM) (B) na sobrevivência das diferentes espécies de <i>Candida</i> . As frações de sobrevivência foram determinadas após 96 h.....	47
Figura 8 –	Efeito das exposições apenas à luz, emitida pelo LED96 (A), e dos TF com o S137 (B) na sobrevivência das diferentes espécies de <i>Candida</i> . As frações de sobrevivência foram determinadas após 96 h.....	48
Figura 9 –	Efeito das exposições ao FS ClAlPc/NE na sobrevivência de células de <i>C. albicans</i> (A) e <i>C. tropicalis</i> (B) utilizando doses de 5, 15 e 25 J cm ⁻² . As células (10 ⁷ mL ⁻¹) foram pré-incubadas por 30 min com o FS ClAlPc/NE e, posteriormente, expostas à luz. As frações de sobrevivência foram determinadas após 96 h.....	50
Figura 10 –	Efeito das exposições apenas ao FS ClAlPc/NE (A) e dos TF com ClAlPc/NE utilizando-se doses de 5 J cm ⁻² (B) e 10 J cm ⁻² (C) na sobrevivência de células melanizadas da linhagem <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> . As células (10 ⁷ mL ⁻¹) foram pré-incubadas por 30 min com o FS ClAlPc/NE, lavadas ou não com PBS e, posteriormente, expostas à luz. As frações de sobrevivência foram determinadas após 96 h.....	52
Figura 11 –	Fotoinativação de células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i> . As células (10 ⁷ mL ⁻¹) foram incubadas com ClAlPc/NE (0,045 µM) por 30 min, lavadas e não lavadas com PBS antes de serem expostas à dose de 5 J cm ⁻² . (A) Após as exposições, 10 µL da suspensão de células foram colocados na superfície de meio PDA. As placas foram incubadas no escuro a 28°C por 2 dias. (B) As frações de sobrevivência foram determinadas pela contagem de UFC. Cada valor é a média de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio padrão da média.....	53

- Figura 12 –** Efeito de exposições apenas à luz emitida pelo LED96 (A) e dos TF com o NMBN (10 μM) (B) e S137 (1 μM) (C) na sobrevivência dos microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. * Não foram observados sobreviventes neste tratamento. As frações de sobrevivência foram determinadas após 14 dias.....55
- Figura 13 –** Efeitos de exposições apenas aos FS e dos TF com o MB, TBO, NBMN e S137 (1, 2,5 e 10 μM , 15 J cm^{-2}) na viabilidade de células de fibroblastos de camundongo (L929). A viabilidade foi determinada em relação aos controles não expostos nem à luz e nem aos FS. A viabilidade foi estimada pelo ensaio do MTT.....56
- Figura 14 –** Incorporação e/ou ligação da ClAlPc, em diferentes concentrações do FS (0,045; 0,450 e 4,500 μM), pelas células melanizadas de *C. neoformans*. As células (10^8 mL^{-1}) foram pré-incubadas com o FS por 30 min, lavadas com PBS e tratadas com NaOH-SDS por 24 h. A concentração do FS foi determinada através de espectrofluorimetria. Os valores representam a média de três experimentos independentes e as barras o desvio padrão (* $P < 0,05$, comparando-se as diferentes concentrações).....57
- Figura 15 –** Localização intracelular da ClAlPc em células melanizadas de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas com ClAlPc por 30 min, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 2%. Células não expostas ao ClAlPc (A, B e C) e expostas ao ClAlPc (D, E e F). Figuras A e D imagens obtidas pelo microscópio confocal, B e E pelo microscópio óptico e C e F a sobreposição das figuras A e B, e D e E, respectivamente.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Potencial zeta das diferentes espécies de <i>Candida</i> , de células não melanizadas e melanizadas de <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> e de microconídios de <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	39
Tabela 2 –	Concentração inibitória mínima (μM) dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e CIAIPc/NE na ausência de luz para as diferentes espécies de <i>Candida</i> , para as duas variedades de <i>C. neoformans</i> e para as duas espécies de <i>Trichophyton</i>	41
Tabela 3 –	Concentração inibitória mínima (μM) dos TF com os FS MB, TBO e NMBN para as diferentes espécies de <i>Candida</i> e para as duas variedades de <i>C. neoformans</i> , utilizando-se os LED brancos como fonte de luz e doses de 5 e 10 J cm ⁻² . Os intervalos das CIM foram determinados em três experimentos independentes.....	42
Tabela 4 –	Concentração inibitória mínima (μM) dos TF com os FS MB, TBO, NMBN, S137 e CIAIPc/NE para as diferentes espécies de <i>Candida</i> e para as duas variedades de <i>C. neoformans</i> , utilizando-se o LED600 como fonte de luz e doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm ⁻² . Os intervalos das CIM foram determinados em três experimentos independentes.....	44
Tabela 5 –	Concentração inibitória mínima (μM) dos TF com os FS MB, TBO, NMBN e S137, para as espécies de <i>Trichophyton</i> , utilizando-se o LED600 como fonte de luz e doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm ⁻² . Os intervalos das CIM foram determinados em três experimentos independentes.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (Acquired immune deficiency syndrome)
Al^{3+}	Íon alumínio
ATCC	American type culture collection
CIM	Concentração inibitória mínima
ClAlPc	Cloroalumínio ftalocianina
cm	Centímetros
CO_2	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico (Desoxyribonucleic acid)
Dopa	Dopamina
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
FS^0	Fotossensibilizador no estado fundamental
$^1\text{FS}^*$	Fotossensibilizador no estado excitado singlete
$^3\text{FS}^*$	Fotossensibilizador no estado excitado triplete
g	Gramas
<i>g</i>	Gravidade
Ga^{3+}	Íon gálio
h	Horas
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HeNe	Hélio-Neônio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (Human immunodeficiency vírus)
IF	Inativação fotodinâmica
J	Joules
L	Litro
LED	Light-emitting diodes
LED600	Conjunto de 600 LED
LED96	Conjunto de 96 LED
MB	Azul de metileno (Methylene blue)
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
mV	Milivolts
mW	Mili Watts
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Nanoemulsão
nm	Nanometro
ns	Nanosegundos
NMBN	Novo azul de metileno (New methylene blue N)
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular
PBS	Salina fosfato tamponada (Phosphate buffered saline)
PDA	Potato Dextrose Agar
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)
S137	Derivado do azul de metileno não comercial
S_0	Estado singlete fundamental
S_n	Estado singlete
Seg	Segundos
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBO	Azul de toluidina O (Toluidine blue O)
TF	Tratamento Fotodinâmico
T_n	Estado triplete
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultra violeta
v	Volume
var.	Variedade
Zn^{2+}	Íon zinco
ZnPc	Zinco Ftalocianina
%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro

μm	Micrometro
μM	Micromolar
ϵ_{670}	Coeficiente de absorvidade molar em 670 nm
Φ_{T}	Rendimento quântico de tripleto
β	Beta

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Espécies de <i>Candida</i>	2
1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	3
1.3 Espécies de <i>Trichophyton</i>	4
1.4 Fotossensibilizadores.....	5
1.4.1 Fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	6
1.4.2 Ftalocianinas.....	9
1.5 Inativação fotodinâmica.....	11
1.6 Inativação fotodinâmica de fungos.....	14
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	24
3.1 Espécies utilizadas e condições de crescimento.....	24
3.2. Linhagem e cultura de fibroblasto de camundongo.....	25
3.3 Fotossensibilizadores.....	26
3.4 Fontes de luz.....	28
3.5 Determinação do potencial zeta das células fúngicas.....	30
3.6 Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico pela CIM.....	30
3.6.1 Espécies de <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	30
3.6.2 <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	31
3.7 Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico pela fração de sobrevivência.....	32
3.7.1 Avaliação da eficácia do TF com NMBN e S137 nas diferentes espécies de <i>Candida</i>	32
3.7.2 Avaliação da eficácia do TF com CIAIPc/NE nas células de <i>Candida albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	33
3.7.3 Avaliação da eficácia do TF com CIAIPc/NE nas células de <i>Cryptococcus neoformans</i>	34

3.7.4 Avaliação da eficácia do TF com fenotiazínicos, NMBN e S137, nos microconídios de <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	35
3.8 Avaliação da toxicidade dos FS fenotiazínicos na linhagem L929 de fibroblasto de camundongo.....	35
3.9 Determinação da incorporação (“uptake”) da CIAIPc/NE por <i>C. neoformans</i>	36
3.10 Microscopia confocal.....	37
3.11 Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Determinação do potencial zeta das células fúngicas.....	39
4.2 Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico pela CIM.....	40
4.2.1 Efeito das exposições apenas à luz e apenas aos fotossensibilizadores.....	40
4.2.2 Efeito das exposições simultâneas à luz e aos diferentes FS nas espécies de <i>Candida</i> e variedades de <i>Cryptococcus</i>	41
4.2.3 Efeito das exposições simultâneas à luz e aos FS fenotiazínicos nos microconídios de <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i>	45
4.3 Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico pela fração de sobrevivência.....	46
4.3.1 Avaliação da eficácia do TF com fenotiazínicos em espécies de <i>Candida</i>	46
4.3.2 Avaliação da eficácia do TF com CIAIPc/NE em <i>Candida albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	49
4.3.3 Avaliação da eficácia do TF com CIAIPc/NE nas células de <i>C. neoformans</i> pela fração de sobrevivência.....	50
4.3.4 Avaliação da eficácia do TF com fenotiazínicos nos microconídios de <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. rubrum</i> pela fração de sobrevivência.....	53
4.4 Avaliação da toxicidade e dos efeitos dos TF com fenotiazínicos em células de fibroblastos de camundongo.....	56
4.5 Avaliação da incorporação e/ou ligação (“uptake”) da CIAIPc/NE a células melanizadas de <i>C. neoformans</i>	57
4.6 Microscopia confocal.....	58
5. DISCUSSÃO.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	85

1. INTRODUÇÃO

O estudo da fotobiologia de fungos tem adquirido importância crescente nos últimos anos, tanto por fornecer contribuições relevantes para o entendimento do efeito das radiações visível e UV nas células eucarióticas (BRAGA et al., 2001a,b; BRAGA et al., 2006; SCHIAVE et al., 2009), como pelo surgimento de novas áreas com aplicações importantes, como é o caso da inativação fotodinâmica (IF) de microrganismos, que utiliza fotossensibilizadores (FS) para o controle de fungos e bactérias (SMIJS; PAVEL, 2011; XU et al., 2009; JORI, 2006; TEGOS et al., 2005; MAISCH et al., 2004). O uso indiscriminado de antimicrobianos, o surgimento de doenças como a AIDS e a adoção de novas práticas médicas, como a imunossupressão em transplantados e a quimioterapia, têm criado um cenário favorável para a emergência de novas espécies de fungos patogênicos e para a emergência de microrganismos que apresentam tolerância múltipla aos fungicidas atualmente utilizados (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOSIK; KOSIK, 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2010; HOLZHEIMER; DRALLE, 2002; PHILIP et al., 2005). Embora as espécies do gênero *Candida* e *Cryptococcus neoformans* continuem sendo os principais fungos oportunistas responsáveis por micoses invasivas em humanos, infecções sérias causadas por *Aspergillus* e por outros gêneros de fungos filamentosos têm emergido em todo o mundo (KIM; SUDBERY, 2011; ILKIT; GUZEL, 2011; ESPINEL-INGROFF et al., 2005). Os casos de micoses superficiais causadas por dermatófitos têm aumentado significativamente nas últimas décadas, afetando, atualmente, cerca de 20-25% da população mundial (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Esse aumento deve-se, principalmente, ao maior número de pessoas imunocomprometidas e/ou com *diabetes mellitus* (SMIJS; PAVEL, 2011). Nesse cenário, o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de microrganismos é extremamente desejável. A identificação e o desenvolvimento de FS com potencial para serem empregados como antimicrobianos terão aplicações importantes e serão

de extrema utilidade para o desenvolvimento de novos fungicidas com mecanismo de ação diferente dos fungicidas atualmente utilizados e para os quais a seleção de microrganismos tolerantes seja menos provável.

1.1 Espécies de *Candida*

O gênero *Candida* compreende diversas espécies de leveduras comensais que colonizam principalmente a cavidade oral e o trato vaginal (KIM, SUDBERY; 2011; RUHNKE et al., 2011; REX; RINALDI; PFALLER, 1995). A candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais frequente entre pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Estima-se que mais de 90% dos pacientes infectados com HIV desenvolvem candidíase, ao menos uma vez, durante o desenvolvimento da doença. (REPENTIGNY; LEWANDOWSKI; JOLICOEUR, 2004; LEIGH; SHETTY; FIDEL, 2004). A candidíase orofaríngea pode ser tratada com agentes tópicos, como polienos ou azóis. Em casos de candidíase orofaríngea resistentes ao fluconazol ou em um surto, durante a profilaxia com esse medicamento, podem ser administrados o itraconazol, posaconazol, anidulafungina, caspofungina, micafungina ou voriconazol. A anfotericina B pode ser utilizada após o insucesso de todas as opções terapêuticas citadas anteriormente (RUHNKE et al., 2011).

A candidíase esofagiana é, frequentemente, um dos primeiros sinais da infecção por HIV e é considerada um indicador da doença (VAZQUEZ, 2003; KIM; SUDBERY, 2011). A candidíase esofagiana pode ser tratada com antifúngicos sistêmicos. A primeira opção de terapia é o fluconazol. Algumas alternativas ao fluconazol para o tratamento de infecções recorrentes são itraconazol, voriconazol, posaconazol, anidulafungina, caspofungina, micafungina ou anfotericina B (RUHNKE et al., 2011).

A candidíase vulvovaginal é uma infecção comum e pode acometer 75% de mulheres, pelo menos uma vez durante a vida. Em alguns casos, ocorrem episódios repetidos, uma

condição conhecida com candidíase vulvovaginal recorrente (KIM; SUDBERY, 2011; ILKIT; GUZEL, 2011). A maioria dos casos pode ser tratada, com sucesso, com azóis tópicos ou políenos. A terapia oral com fluconazol ou itraconazol é uma alternativa eficaz. Infecções graves ou recorrentes necessitam de um tratamento prolongado com fluconazol ou itraconazol oral por mais de 14 dias, seguido por uma terapia supressiva continuada.

Na prática clínica, a espécie mais prevalente do gênero *Candida* é a *Candida albicans* (KIM; SUDBERY, 2011; HAYNES, 2001). Outras espécies de *Candida* estão se tornando a causa mais comum de infecções mucocutâneas e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (REPENTIGNY; LEWANDOWSKI; JOLICOEUR, 2004; BLISS et al., 2004). Na América Latina, as espécies não albicans mais prevalentes são *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e, nos Estados Unidos, a espécie mais prevalente é *C. glabrata* (NUCCI et al., 2010; PFALLER; DIEKEMA, 2010).

1.2 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans é um basidiomiceto encapsulado, saprófita, de distribuição cosmopolita, normalmente isolado de solos contaminados com excretas de aves e detritos vegetais em decomposição. Apesar da existência saprofítica, o fungo é capaz de infectar e causar doença em uma grande variedade de hospedeiros animais, como mamíferos, aves e insetos (HEITMAN; LIN, 2006; SORRELL; ELLIS, 1997; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). *C. neoformans* é uma causa importante de morbidade e mortalidade. Em países desenvolvidos, 5 a 10% dos pacientes com AIDS desenvolvem criptococose; essa taxa é maior em países em desenvolvimento, atingindo 13 a 45 % dos pacientes. A criptococose foi documentada em 2,8% dos pacientes submetidos a transplante de órgãos, com uma mortalidade próxima de 42% (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009). Um dos fatores responsáveis pela patogenicidade, pela virulência e pela

tolerância a fungicidas de *C. neoformans* é a presença de melaninas. Linhagens melanizadas são mais virulentas do que linhagens não melanizadas em modelos animais (EISENMAN et al., 2005). A terapia utilizada atualmente inclui a anfotericina B, o fluconazol e a flucitosina, ou uma combinação dessas drogas. Embora tenha sido obtido algum sucesso no tratamento de micoses causadas por *C. neoformans* com essas drogas, o tratamento é longo e apresenta efeitos tóxicos potenciais (FUCHS et al., 2007).

1.3 Espécies de *Trichophyton*

As espécies do gênero *Trychophyton* são dermatófitos antropofílicos, com ampla distribuição geográfica (ALY, 1994). Dermatófitos são fungos que podem causar infecções em tecidos queratinizados da pele, nos cabelos e unhas, devido à sua capacidade de utilizar queratina como fonte de carbono e energia (SMIJS et al., 2007). Existem, aproximadamente, 40 espécies de dermatófitos, divididas em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A maioria das micoses superficiais de pele é causada por seis espécies de dermatófitos e *Trichophyton rubrum* é a espécie prevalente. A ocorrência de micoses superficiais tem aumentado muito nas últimas décadas. Atualmente, as micoses de pele afetam entre 20 e 25% da população mundial, sendo uma das formas mais frequentes de infecção (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Esse aumento deve-se, principalmente, ao crescente número de indivíduos imunocomprometidos ou com *diabetes mellitus* (SMIJS; PAVEL, 2011). No Brasil, as espécies mais prevalentes de dermatófitos são *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes* (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Nos Estados Unidos, 10% da população apresenta micoses cutâneas em qualquer período da vida e pelo menos 40% da população apresenta micoses durante a vida (SMIJS et al., 2004). Os dermatófitos mais comuns em isolados clínicos são o *T. rubrum* e o *T. mentagrophytes*. *T. rubrum* é a espécie

mais prevalente na Europa, enquanto *T. mentagrophytes* é a espécie mais prevalente na Ásia (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). As maiores limitações das terapias utilizadas atualmente para o controle de dermatófitos são o retorno da infecção (provavelmente pela reinfecção pelos conídios que sobreviveram à terapia) e a longa duração do tratamento (VERA; CERVERA, 2001). Os resultados do tratamento tópico com fungicidas convencionais são, geralmente, satisfatórios para as micoses localizadas. No caso de micoses disseminadas, inflamatórias ou dermatomicoses persistentes, o tratamento sistêmico é necessário. Entretanto, os efeitos adversos da terapia prolongada com os fungicidas utilizados são bem conhecidos e incluem a hepatotoxicidade e as interações medicamentosas (SMIJS et al., 2004). Adicionalmente, muitos fungicidas atualmente utilizados são apenas fungistáticos e não fungicidas, o que explica a longa duração do tratamento.

Devido às limitações da terapêutica convencional, é extremamente necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de micoses causadas por leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e por dermatófitos. O tratamento fotodinâmico (TF) é uma nova e promissora estratégia terapêutica que está sendo proposta para o controle de micoses causadas por fungos (HUANG; DAI; HAMBLIN, 2010; SMIJS; PAVEL, 2011).

1.4 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz na região do visível (JORI, 2006). Quando o FS é exposto à radiação com comprimentos de onda apropriados, sua molécula é excitada, o que leva a uma série de transferências moleculares de energia que normalmente originam espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ânion superóxido e o ânion radical hidroxila, que são extremamente reativos e citotóxicos (SOUKOS et al., 1998; FRIEDBERG et al., 2001; HAMBLIN et al., 2002; SMIJS et al., 2004). Embora o conceito de

morte celular induzida pela interação entre a luz e substâncias químicas seja conhecido há mais de um século (ACKROYD et al., 2001), o interesse por FS tem aumentado nos últimos anos e novos FS estão sendo desenvolvidos, em virtude do uso desse grupo de substâncias no tratamento de tumores malignos e para o controle de microrganismos em diversos sistemas biológicos, tanto *in vitro*, como *in vivo* (VENEZIO et al., 1985; ZEINA et al., 2001; STRAKHOVSKAYA et al., 2002; BLISS et al., 2004; TEGOS et al., 2005; GORMAN; BROWN; GRIFFITHS, 2006; WAINWRIGHT et al., 2010).

Propriedades físico-químicas dos FS, como carga, lipo e hidrossolubilidade, são muito importantes para a eficácia do TF (FUCHS et al., 2007). A especificidade pela célula-alvo, o curto intervalo de tempo entre a administração do FS e a sua máxima absorção pelas células-alvo, a rápida eliminação do FS pelas células não alvo, a ativação num comprimento de onda considerado ótimo para a absorção celular e a alta capacidade de produção de oxigênio singlete são as características que se desejam no FS ideal (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992, CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; HUANG; DAI; HAMBLIN, 2010; SMIJS; PAVEL, 2011).

1.4.1 Fotossensibilizadores fenotiazínicos

Os FS fenotiazínicos possuem estruturas tricíclicas simples e planas que conferem às suas moléculas propriedades fotossensibilizadoras e são, normalmente, catiônicos. São moléculas que têm uma boa eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio e têm absorção máxima entre 620 a 660 nm (DONNELLY; McCARRON; TUNNEY, 2008, WAINWRIGHT, 1998). Os fenotiazínicos mais utilizados são o azul de metileno (methylene blue, MB) e o azul de toluidina O (toluidine blue O, TBO) (Figura 1). O MB e o TBO têm sido utilizados com sucesso no tratamento de micoses orais causadas por *Candida albicans*

(WAINWRIGHT, 1996; WAINWRIGHT, 1998; WILSON; MIA, 1993; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005a) e na IF de conídios de fungos filamentosos (GONZALES et al., 2010).

Figura 1 – Estrutura química dos FS fenotiazínicos MB e TBO

Os fenotiazínicos têm mostrado potencial para serem utilizados no TF como agentes antitumorais e antimicrobianos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). A ação fotossensibilizadora dos fenotiazínicos, como o MB, em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, leveduras e vírus é conhecida há décadas (MACMILLAN; MAXWELL; CHICHESTER, 1966; ITO, 1977; AL-RUBEAI; EL-HASSI, 1986; WAINWRIGHT, 1996). Um dos fatores que determinam a seletividade desses compostos para células microbianas é a interação eletrostática entre as cargas positivas desses FS e as cargas negativas da superfície externa da célula microbiana (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). Na maioria dos casos, o sítio primário de ação dos fenotiazínicos é a membrana externa (no caso das bactérias Gram-negativas) e a membrana plasmática (no caso de bactérias Gram-positivas e de fungos) da célula-alvo. A ação do FS envolve a modificação de lipídios e/ou lipopolissacarídeos (no caso de bactérias Gram-negativas) e a inativação de proteínas e enzimas essenciais, presentes na membrana plasmática, provocando a morte da célula. Esses compostos também podem ser internalizados pela célula durante o processo de fotossensibilização, infligindo danos a um grande número de sítios intracelulares. Em células bacterianas, embora o principal sítio interno de ação seja o DNA, os fenotiazínicos podem exibir múltiplos sítios de ação dentro de

um tipo específico de células e mostram diferentes sítios de ação entre diferentes espécies de microrganismos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). Em leveduras e em conídios, não foi observada a internalização significativa de fenotiazínicos, como MB e o TBO, e a morte celular é atribuída aos danos na membrana, provocados pelo oxigênio singlete produzido no meio extracelular (SHIMIZU; EGASHIRA; TAKAHAMA, 1979; AL-RUBEAI; EL-HASSI, 1986). A multiplicidade de sítios-alvo das EROs produzidas durante o TF faz com que a seleção de microrganismos resistentes ao TF seja extremamente improvável e torna os fenotiazínicos uma alternativa interessante aos antibióticos convencionais.

O MB é o protótipo dos fenotiazínicos e está bem estabelecido que sua toxicidade para humanos é baixa. O uso seguro do MB é atestado há quase um século e suas aplicações, entre outras, incluem sua administração tópica oral como anti-séptico, desinfetante e antídoto para envenenamento por nitrato (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). A baixa toxicidade para humanos e o fato de serem FS eficientes, tanto em células de leveduras, como em conídios de fungos filamentosos, podem apressar os estudos clínicos desses FS na IF antimicrobiana (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005b).

Uma grande variedade de fontes de luz, como lasers, light-emitting diodes (LED) e vários tipos de lâmpadas incandescentes têm sido utilizada para a fotoativação dos fenotiazínicos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). O MB, como outros fenotiazínicos, apresenta absorção máxima de luz na região do vermelho (656 nm), que é a janela desejável para o TF. Essa região espectral é ideal para o TF, pois as biomoléculas apresentam absorção mínima nessa região espectral, permitindo uma penetração mais profunda da luz nos tecidos humanos durante a terapia. A química do MB está bem estabelecida, e diversos estudos têm mostrado que as modificações químicas do corante produzem derivados que mantêm as características desejáveis de absorção de luz do composto original, mas que apresentam uma maior fototoxicidade para as células-alvo (HARRIS;

CHATFIELD; PHOENIX, 2006; WAINWRIGHT; MOHR; WALKER, 2007; WAINWRIGHT et al., 2010).

Diversos FS derivados do MB têm sido desenvolvidos e suas características fotoquímicas e fotofísicas tornam-nos potencialmente úteis para a IF de microrganismos (WAINWRIGHT, 2010; WAINWRIGHT et al., 2010). A realização de bioensaios com espécies de fungos filamentosos e com leveduras de interesse clínico é essencial para a avaliação da atividade fungicida e fungistática desses novos compostos.

1.4.2 Ftalocianinas

As ftalocianinas foram descobertas no início dos anos 1900 como impurezas em preparações industriais de ftalamida e subsequentemente identificadas como parentes da família das porfirinas (GORMAN; BROWN; GRIFFITHS; 2006). As porfirinas são compostos que podem ser facilmente preparados por métodos clássicos e minuciosos processos de purificação (SHARMAN; ALLEN; van LIER, 1999).

As ftalocianinas mimetizam as porfirinas em seu macrociclo central, que é constituído por uma unidade cíclica tetrapirrólica. Entretanto, suas subunidades pirrólicas são unidas por átomos de nitrogênio, enquanto nas porfirinas as subunidades são unidas via pontes de metileno. Além disso, nas ftalocianinas, a conjugação do macrociclo é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas, resultando em uma forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível. As ftalocianinas possuem muitas vantagens quando comparadas aos FS de primeira geração (como as porfirinas), como alta absorção de luz ($\epsilon_{670} \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) nos comprimentos de onda de 600 a 800 nm (janela terapêutica) e baixa toxicidade *in vitro* (GOMER, 1991). As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente dependentes do íon metálico central. A complexação das ftalocianinas com íons metálicos diamagnéticos, tais como Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} dá origem a compostos com alto

rendimento quântico do estado excitado triplete ($\Phi_T > 0,40$) e com tempos de vida longos (IDOWU; NYOKONG, 2007; IDOWU; NYOKONG, 2008). Entre as metalo-ftalocianinas, as zinco (ZnPc) e as cloroalumínio ftalocianinas (ClAlPc) (Figura 2) são as que apresentam as propriedades fotofísicas mais favoráveis para aplicação no TF. Por exemplo, os estados singletes com tempo de vida relativamente longo (3-8 ns) e os estados tripletes são produzidos com alto rendimento quântico (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004).

Figura 2 – Estrutura química da cloroalumínio ftalocianina (ClAlPc)

Infelizmente, essas ftalocianinas (ZnPc e ClAlPc) são insolúveis em água ou em solventes compatíveis com os sistemas biológicos. Dessa maneira, elas devem ser administradas *in vivo* por meio de sistemas de distribuição, como os lipossomos e as nanoemulsões (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004). As nanoemulsões são sistemas coloidais obtidos por um processo de interação interfacial entre tensoativos e/ou polímeros que levam à diminuição da tensão superficial entre duas fases imiscíveis, as quais dão origem a um colóide por emulsificação, seja ela espontânea ou não (OLIVEIRA et al., 2004). Esses sistemas isotrópicos possuem alta estabilidade físico-química (termodinamicamente estáveis), além de atuarem diretamente na constante de ionização de diversos fármacos, o que otimiza o uso de diversos compostos insolúveis com atividade farmacêutica. A fase interna constitui um ambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades, atuando como agregados esféricos e com diâmetros

geralmente menores que 1000 nm (BOUCHEMAL et al., 2004; PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008). A formação das nanoemulsões envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativos, fase aquosa, fase oleosa e, quando necessário, um co-tensoativo. O processo de emulsificação leva a emulsões do tipo óleo em água (o/a), água em óleo (a/o) ou emulsões mistas (o/a/o ou a/o/a), dependendo do mecanismo de preparo e da quantidade de componentes da formulação (OLIVEIRA et al., 2004). O desenvolvimento da tecnologia farmacêutica e cosmética conferiu a esses sistemas o *status* de nanocarreadores de fármacos (OLIVEIRA et al., 2004; BOUCHEMAL et al., 2004; PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000). Esses sistemas são utilizados em diversos tipos de aplicações, desde a veiculação de biomoléculas e princípios ativos para o tratamento de doenças, até a administração de agentes antioxidantes e substâncias exógenas de origem natural para tratamento estético ou cosmecêutico (ARAÚJO, et al., 2007; WEYENBERG, et al. 2007).

1.5 Inativação Fotodinâmica

A IF é um processo específico decorrente da acumulação e/ou metabolização preferencial do FS nas células-alvo e da exposição localizada à luz visível (400-700 nm). A administração do FS é seguida pela exposição das células ou tecidos às radiações com comprimentos de onda capazes de ativar a molécula fotossensibilizadora, que, na presença de oxigênio, pode matar ou inativar as células-alvo, devido à formação de diversas espécies reativas de oxigênio (KOCHEVAR et al., 1996).

A exposição do FS a comprimentos de onda apropriados é capaz de excitá-lo. Após absorver um fóton, a molécula do FS passa de seu estado fundamental (FS^0) para o primeiro estado excitado singlete ($^1FS^*$). Esse estado tem um tempo de vida curto, da ordem de nanosegundos, o que dá à molécula pouco tempo para interagir com o meio circundante e

limita muito o seu raio de ação (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). O FS pode dissipar a energia adicional de diversas maneiras. Ele pode retornar ao estado fundamental pela emissão da energia absorvida por meio de um processo radiativo (fluorescência) ou não radiativo (conversão interna ou relaxamento vibracional), em que a energia é perdida como calor para o meio circulante. Uma outra rota de desativação do estado $^1\text{FS}^*$ envolve o processo não radiativo cruzamento intersistemas, no qual a molécula do FS no estado excitado $^1\text{FS}^*$ passa para o primeiro estado excitado triplete $^3\text{FS}^*$. Apesar dessa transição não ser muito eficiente, deve-se ressaltar que um bom FS necessita desse processo para ser o mais eficiente possível, porque o estado triplete é a origem do seu efeito fotossensibilizante. Na ausência de outras moléculas para interagir, o estado excitado triplete pode perder energia pela emissão de energia luminosa por meio de fosforescência. Alternativamente, o estado triplete pode participar de um cruzamento intersistemas. Se estiver próximo de moléculas reativas (como oxigênio molecular ou substratos ricos em oxigênio), o estado triplete, devido a seu tempo de vida relativamente longo (10^{-4} segundos ou mais), pode participar de reações fotodinâmicas com produção de um ou mais tipos de EROs. Existem dois tipos básicos de processos fotodinâmicos capazes de produzir EROs, que são conhecidos por fotoprocessos do Tipo I e do Tipo II. Ambos os processos requerem oxigênio para ocorrer. O fotoprocessos do Tipo I envolve reações de transferência de elétrons do estado triplete do fotossensibilizador, com a participação de um substrato, para produzir radicais iônicos que podem reagir com o oxigênio, produzindo espécies citotóxicas, como o ânion superóxido e radical hidroxila. O fotoprocessos do Tipo II envolve transferência de energia do estado triplete do FS para o oxigênio molecular, com nível basal de energia, produzindo o estado excitado oxigênio singlete. O efeito citotóxico do oxigênio singlete é decorrente de sua reação rápida e indiscriminada com todos os tipos de biomoléculas, provocando a oxidação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (HAMBLIN et al., 2002). Tanto nas reações do Tipo I como nas

reações do tipo II, a molécula do fotossensibilizador retorna ao seu estado fundamental, podendo produzir continuamente altos níveis de EROs, enquanto a exposição à luz perdurar. Entretanto, quando o FS é exposto a altas intensidades de luz, pode ocorrer o fotobranqueamento, ou seja, a degradação permanente do FS (GORMAN; BROWN; GRIFFITHS, 2006). O fotoprocesso do Tipo II é geralmente aceito como o principal mecanismo de dano foto-oxidativo na célula microbiana. Um FS com suficiente população de estado triplete e disponibilidade de oxigênio tem o potencial de causar dano numa variedade de biomoléculas por um ou ambos os mecanismos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). As etapas fotoquímicas/fotofísicas da fotossensibilização estão representadas no Diagrama de Jablonski (Figura 3).

Figura 3 – Esquema das etapas fotoquímicas/fotofísicas envolvidas na fotossensibilização. Diagrama de Jablonski

Existe uma ampla variedade de fontes de luz, coerentes e não coerentes, que podem ser utilizadas no processo de fotossensibilização, como os lasers (de diversos tipos), os diodos emissores de luz (LED), lâmpadas incandescentes e lâmpadas fluorescentes (BRANCALEON; MOSELEY, 2002). O aspecto prioritário que deve ser considerado para a escolha da fonte de luz é sua habilidade de excitar o FS, o que provoca um efeito adverso mínimo nas células não alvo (WAINWRIGHT, 1998; WAINWRIGHT, 2000). O TF de

infecções superficiais e localizadas, como as micoses cutâneas, é simplificado pela acessibilidade da pele à exposição à luz e permite o uso de qualquer fonte de luz com comprimento de onda apropriado. Os valores de irradiância (intensidade de radiação), doses e tempos de exposição necessários para a IF dos microrganismos usualmente não provocam um efeito térmico significativo e podem ser facilmente obtidos por meio de fontes de luz não coerentes, de baixo custo, que requerem tecnologia simples e medidas de proteção mínimas, tanto para o operador, quanto para o paciente (JORI, 2006). Os lasers equipados com fibras ópticas revolucionaram a inativação fotodinâmica por tornar possível a distribuição da luz em praticamente todos os sítios do corpo humano (LUKSIENE, 2003).

1.6 Inativação fotodinâmica de fungos

O uso de FS para a eliminação de microrganismos antecede a quimioterapia antimicrobiana baseada na utilização de antibióticos. A primeira demonstração da IF de células microbianas foi descrita em 1900 por Oscar Raab, que observou que corantes, como a acridina e a eosina, foram capazes de inativar *Paramecium caudatum* na presença de luz (DOUGHERTY et al., 1998; HOCKBERGER, 2002; MAISCH et al., 2004). A IF de microrganismos baseia-se no princípio de que, se um microrganismo demonstra seletividade por um determinado corante, que também é FS, deve ser possível destruí-lo, expondo-o à luz após a aplicação do corante (WAINWRIGHT, 2000). A IF de microrganismos utiliza FS e luz visível para promover uma resposta fototóxica, normalmente oxidativa, que é capaz de danificar virtualmente todos os tipos de biomoléculas e estruturas celulares, o que provoca a morte do microrganismo (WAINWRIGHT, 1996; WAINWRIGHT, 1998).

Os danos do TF nas células estão bem estabelecidos em alguns sistemas biológicos, particularmente em bactérias, leveduras e dermatófitos e, de maneira geral, não diferem muito dos danos observados nas células de eucariotos superiores (WAINWRIGHT, 1998; HUANG;

DAI; HAMBLIN, 2010; SMIJS; PAVEL, 2011). As reações do Tipo I com a água, no interior da célula microbiana, geram radicais hidroxila, que reagem com biomoléculas ou combinam-se, originando peróxido de hidrogênio *in situ* com efeitos citotóxicos. Tipicamente, as reações do tipo I incluem a remoção de hidrogênios de moléculas insaturadas, como os fosfolipídios presentes na membrana plasmática (WAINWRIGHT, 1998). A peroxidação de lipídios afeta a estrutura e o funcionamento da membrana celular, diminuindo a sua fluidez e aumentando sua permeabilidade a íons. Também pode ocorrer a inativação de receptores celulares e de enzimas localizados na membrana plasmática (WAINWRIGHT, 2000). Os processos do Tipo II são geralmente aceitos como os principais responsáveis pelo dano foto-oxidativo à célula microbiana. Como nas reações do Tipo I citadas anteriormente, o oxigênio singlete também poderá reagir com as moléculas envolvidas na manutenção da estrutura e do funcionamento da parede e da membrana celular, como os fosfolipídios, peptídeos e esteróides (no caso dos fungos) (SMIJS; PAVEL, 2011). Também podem ocorrer reações entre o oxigênio singlete e outras moléculas da parede e da membrana. O aminoácido triptofano reage com o oxigênio singlete e o produto intermediário instável degrada-se, formando derivados reativos capazes de provocar ligações cruzadas nos peptídeos. Os resíduos de metionina são oxidados pelo oxigênio singlete, com a formação de sulfoxido de metionina. A reação com os ácidos nucléicos ocorre principalmente por meio dos resíduos de guanosina e, novamente, existe uma diferença entre a seletividade dos processos do Tipo I e do Tipo II. No primeiro caso, o açúcar é atacado pelo radical hidroxila e, no segundo, a base nitrogenada é atacada pelo oxigênio singlete. A multiplicidade de sítios-alvo afetados durante a IF de microrganismos faz com que a seleção de linhagens e/ou espécies tolerantes seja extremamente improvável, o que é uma das vantagens da técnica em relação à quimioterapia antimicrobiana convencional (MAISCH et al., 2004; KÖMERIK; MacROBERT, 2006). O padrão de modificação celular fotoinduzida

também dificulta o reparo das moléculas danificadas e a expressão de genes envolvidos na resposta celular ao estresse oxidativo (JORI, 2006).

FS que exibem um efeito maior em microrganismos do que em células animais sugerem que o dano foto-oxidativo é direcionado a sítios específicos e altamente suscetíveis (como a membrana externa das bactérias) e à membrana plasmática das células fúngicas (KÖMERIK; MacROBERT; 2006). A morfologia da célula microbiana apresenta uma ampla variação, tanto entre espécies, como entre linhagens. A variação da morfologia do microrganismo modula a interação dos FS exógenos com os constituintes celulares, afetando a eficiência e os caminhos dos processos de fotossensibilização (WAINWRIGHT, 1998; HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI, 2006; KÖMERIK; MacROBERT, 2006). A interação primária do FS ocorre geralmente com a parede celular, que envolve grande parte das células microbianas. A parede celular dos diferentes grupos de microrganismos apresenta uma grande variabilidade na sua complexidade, arquitetura estrutural, permeabilidade e capacidade de associação com moléculas externas (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI, 2006; SMIJS; PAVEL, 2011).

A célula fúngica é circundada por uma rígida parede celular, composta principalmente por polissacarídeos solúveis e insolúveis, como quitina, β -glucana e glicoproteínas. A deposição de pigmentos, como as melaninas, na parede dos fungos, modifica as características físicas, químicas e estruturais da parede celular (EISENMAN et al., 2005). A melanização diminui a porosidade da parede de *C. neoformans* (JACOBSON; IKEDA, 2005) e é um dos fatores responsáveis pela carga negativa da parede celular dos fungos (FRASES et al., 2007). As cargas negativas da parede podem facilitar a ligação de FS catiônicos, como o MB e o TBO, à superfície celular. Por serem eficientes inativadores de radicais livres, as melaninas aumentam a tolerância das células fúngicas às espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (WANG; CASADEVALL, 1994). Se, por um lado, devido à carga, a presença da melanina

favorece a ligação de FS catiônicos à superfície da célula fúngica, por outro lado, sua ação antioxidante pode favorecer a inativação das espécies reativas geradas durante o processo de fotossensibilização. O fato de a melanização poder ser controlada em *C. neoformans* torna esse fungo um modelo interessante para se estudar a influência da melanização na sensibilidade ao TF (RODRIGUES et al., 2012a).

Os conídios de fungos, particularmente os microconídios de dermatófitos, são estruturas notavelmente tolerantes aos fungicidas tradicionais e também são as estruturas fúngicas, normalmente, responsáveis pela reinfecção do hospedeiro (SMIJS et al., 2004). Qualquer tratamento que vise à cura de dermatomicoses causadas por *Trichophyton* requer, portanto, necessariamente, que seja capaz de matar os microconídios. As características físico-químicas da superfície e da parede dos conídios (por exemplo, composição química, carga e hidrofobicidade) diferem muito das características de células vegetativas de leveduras e de hifas de fungos filamentosos. A parede celular dos conídios de muitas espécies de fungos, como *Aspergillus nidulans*, é extremamente hidrofóbica e possui superfície com cargas negativas (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988; GIRARDIN et al., 1999; SHAH et al., 2007). A superfície externa dos conídios é formada por uma camada organizada, composta por uma família de proteínas anfifílicas denominadas hidrofobinas (GIRARDIN et al., 1999; PARIS et al., 2003). Outras moléculas, como açúcares e lipídios, fazem parte da superfície de conídios, ascósporos e hifas e desempenham papel importante na determinação de suas características físico-químicas (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988; GIRARDIN et al., 1999). Tanto a composição química, como a organização da parede celular, variam muito entre espécies e entre os diferentes estágios de desenvolvimento dos fungos (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988; SHAH et al., 2007; DAGUE et al., 2008).

Mesmo sendo um alvo celular maior e mais complexo do que bactérias e vírus, os fungos podem ser inativados pelos mesmos FS e sob condições similares às aplicadas aos

outros grupos microbianos (ZEINA et al., 2001; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005a; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004; HUANG; DAI; HAMBLIN, 2010; SMIJS; PAVEL, 2011). Entretanto, a utilização clínica da IF para o tratamento de micoses em humanos depende da determinação da sua toxicidade seletiva e da avaliação da intensidade e da extensão dos efeitos tóxicos nos tecidos do hospedeiro. Os efeitos citotóxicos dos TF, em condições necessárias para a IF de microrganismos, têm sido avaliados em diversos tipos celulares, como fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos e leucócitos. Os resultados indicam que a citotoxicidade dos diferentes TF varia bastante, tanto em função do tipo de FS como do tipo celular (LAMBRECHTS et al., 2005; ZEINA et al., 2002; ZEINA et al., 2003).

Lambrechts e col. (2005) avaliaram os efeitos do TF com uma porfirina (TriP[4]) em fibroblastos humanos, em condições suficientes para fotoinativar *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans*. Os TF, nas condições necessárias para a IF de *P. aeruginosa* e *C. albicans*, provocaram danos substanciais nos fibroblastos. Ribeiro e col. (2010) verificaram que os TF com Photogem[®] (um FS de primeira geração derivado da hematoporfirina), em condições necessárias para a IF de *C. albicans*, provocaram um decréscimo irreversível de 90 a 97% na atividade mitocondrial de fibroblastos (L929) e odontoblastos. Os TF também induziram alterações na morfologia celular, necrose e aumento no nível intracelular de EROs.

De maneira geral, os TF com fenotiazínicos, como o MB, nas condições utilizadas para a IF de fungos, têm mostrado-se menos tóxicos para as células de mamíferos. Tanaka e col. (2012) avaliaram os efeitos dos TF com diversos FS, em condições ótimas para a IF de *S. aureus*, em neutrófilos. A maioria dos neutrófilos continuou viável (> 80%) após o TF com TBO ou MB. Os TF com outros FS, como eritrosina B, rosa bengala, cristal violeta, porfirina, laserfirina e novo azul de metileno, provocaram alterações na morfologia e reduziram a viabilidade (< 70%) dos neutrófilos. Zeina e col. (2002) observaram que o TF com MB

causou uma taxa de mortalidade para queratinócitos 18 a 200 vezes menor do que as taxas observadas para microrganismos da pele, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *C. albicans*. Os mesmos autores reportaram que o TF com MB, suficiente para provocar a redução de diversas ordens de grandeza na sobrevivência de microrganismos, não provocou efeito genotóxico em queratinócitos humanos (ZEINA et al., 2003). Xu e col. (2009) avaliaram os efeitos dos TF com MB na viabilidade celular e na atividade mitocondrial de fibroblastos e osteoblastos humanos, utilizando as mesmas condições utilizadas para a IF de patógenos endodônticos. O TF teve um pequeno efeito na sobrevivência e na atividade mitocondrial dos osteoblastos e fibroblastos e nenhum sinal de apoptose foi observado nos dois tipos celulares.

A descoberta e a utilização dos antibióticos a partir de meados do século passado fizeram com que as propriedades antimicrobianas da IF de microrganismos fossem esquecidas, atrasando significativamente o desenvolvimento da técnica. A emergência de novas espécies de bactérias e de fungos patogênicos, o surgimento de linhagens tolerantes aos quimioterápicos utilizados, o reduzido número de antifúngicos disponíveis e o alto custo do desenvolvimento de novos antibióticos criaram um cenário que favoreceu a retomada dos estudos para a utilização da IF de microrganismos como uma alternativa à quimioterapia convencional (MAISCH et al., 2004; KÖMERIK; MacROBERT, 2006). Apesar de extremamente promissora, a IF de microrganismos encontra-se em estágio inicial de desenvolvimento (ZEINA et al., 2001; HAMBLIN; HASAN, 2004; HUANG; DAI; HAMBLIN, 2010).

A maioria dos estudos de fotossensibilização foi conduzida *in vitro* e os dados a respeito da IF de microrganismos *in vivo* para o tratamento de micoses em animais-modelo e em pacientes ainda são escassos (HAMBLIN; HASAN, 2004; KÖMERIK; MacROBERT,

2006; HUANG; DAÍ; HAMBLIN, 2010; SMIJS; PAVEL, 2011). A IF *in vivo* ou em sistemas biológicos mais complexos normalmente é mais difícil e requer concentrações maiores do FS e maiores doses de luz. Isso ocorre porque a matéria orgânica presente no meio pode inativar tanto o FS como as EROs produzidas durante a fotossensibilização (KÖMERIK; WILSON, 2002).

Apesar do potencial que a IF tem para ser utilizada como estratégia alternativa aos fungicidas convencionais para o tratamento de micoses localizadas, o número de estudos reportando os efeitos da IF em dermatófitos é muito limitado. Adicionalmente, a maioria dos estudos foi conduzida, *in vitro*, e praticamente todos os trabalhos foram feitos com a espécie *Trichophyton rubrum*. Diversos aspectos da IF de *T. rubrum* com o FS Sylsen B, incluindo a mecanística do processo, foram descritos (SMIJS; SCHUITMAKER, 2003; SMIJS et al., 2004; SMIJS et al., 2007; SMIJS et al., 2008; SMIJS et al., 2009). Ouf e col. (2003) estudaram o efeito da IF de sete espécies de dermatófitos, dentre elas quatro espécies do gênero *Trichophyton* (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. verrucosum* e *T. violaceum*) com os FS hematoporfirina, MB e TBO. A IF induziu uma marcante inibição da germinação dos esporos dos fungos. A taxa de inibição variou de acordo com a espécie e com a concentração do FS. A completa inibição da germinação de *T. verrucosum* e *T. mentagrophytes* foi observada quando os fungos foram tratados com hematoporfirina e com MB na concentração de 10^{-3} M. Ao contrário, a máxima redução na germinação foi induzida pela menor concentração de TBO (10^{-7} M).

Embora diversos aspectos dos mecanismos moleculares da IF de fungos responsáveis pelos efeitos biológicos continuem desconhecidos, diversos trabalhos foram feitos para entender como diferentes FS interagem com a célula fúngica, tanto antes, como durante a IF. Também foram conduzidos estudos para determinar as moléculas e estruturas celulares danificadas durante o processo. As características físico-químicas da superfície celular

influenciam na seletividade e eficácia de vários FS (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003; FUCHS et al., 2007; USACHEVA et al., 2008). A membrana celular e a parede celular são carregadas negativamente, favorecendo a ligação de FS catiônicos, como MB, TBO e diversos outros derivados. O TBO liga-se instantaneamente a polifosfatos localizados na superfície externa da membrana plasmática da levedura *Saccharomyces fragilis* (TIJSSEN; BEEKES; VAN STEVENINCK, 1981). Ito (1977) verificou que o TBO não penetra na célula de *Saccharomyces cerevisiae* e atribuiu toda a atividade fotodinâmica do FS à sua ação iniciada no meio extracelular. Durante a IF de conídios de *A. nidulans*, FS, como MB e TBO, não se ligam à superfície e nem penetram na célula. Nesses casos, a inativação dos conídios é decorrente da produção de espécies reativas de oxigênio no meio extracelular e é inibida quando as células são lavadas antes de serem expostas à luz (GONZALES et al., 2010). Alguns FS ligam-se à superfície externa da célula, mas não penetram no seu interior, a menos que a parede celular seja danificada, o que pode ocorrer ao longo da inativação fotodinâmica (JORI, 2006). Smijs e col. (2008) relataram severas deformidades e ruptura da parede celular, tanto em microconídios, como em hifas, após a IF com o FS catiônico Sylsens B. O efeito foi observado após a ligação da porfírina catiônica às cargas negativas da superfície externa das paredes de conídios e hifas.

Existem casos em que o FS penetra na célula microbiana. Quando isso ocorre, ele pode associar-se fortemente às estruturas celulares, que serão danificadas, preferencialmente durante a IF, ou pode ser eliminado pela célula por meio de mecanismos ativos de transporte. A eliminação por bombas de efluxo, entretanto, está limitada a células metabolicamente ativas, devendo ter importância limitada, se tiver, em células dormentes, como esporos de bactérias e conídios de fungos filamentosos. Tegos e col. (2008) e Prates e col. (2011b) demonstraram que inibidores de bombas de efluxo aumentam a eficácia da IF com fenotiazínicos.

As informações atualmente disponíveis sobre a IF de fungos filamentosos ainda são limitadas. A extensão dos estudos para novas espécies de fungos e a identificação de FS que possam ser utilizados como fungicidas é importante para o desenvolvimento e utilização clínica da técnica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar, em diferentes condições, a inativação fotodinâmica de espécies de *Candida*, *C. neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* utilizando-se FS fenotiazínicos e uma ftalocianina.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a influência de parâmetros, como a fonte de luz, a dose, o FS e a sua concentração na fotossensibilização de espécies de *Candida*, duas variedades de *C. neoformans* e duas espécies de *Trichophyton*.
- Avaliar a eficácia dos FS fenotiazínicos e da ClAlPc/NE no tratamento fotodinâmico de espécies de *Candida*, *C. neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* pela fração de sobrevivência.
- Avaliar a toxicidade dos FS fenotiazínicos em fibroblastos utilizando os melhores parâmetros para fotoinativar os diferentes fungos testados.
- Determinar a quantidade do FS cloroalumínio ftalocianina associado às células melanizadas de *C. neoformans* e sua localização celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Espécies utilizadas e condições de crescimento

Os experimentos de fotossensibilização foram realizados com as linhagens de *Candida albicans* ATCC 64548, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* ATCC 90112, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 e *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. Os fungos foram obtidos da “American Type Culture Collection” (ATCC) (Manassas, VA, EUA).

As espécies de *Candida* foram crescidas em meio “Sabouraud Dextrose Agar” (SDA) (Acumedia, EUA) a 35°C, por 48 h. As duas variedades de *Cryptococcus* foram crescidas em meio “Potato Dextrose Agar” (PDA) (Acumedia, EUA) a 28°C, por 48 h. No caso específico da linhagem *C. neoformans* var. *neoformans*, também foram produzidas células não melanizadas e melanizadas por meio do crescimento do fungo em meio líquido não indutor (MLNI) e meio líquido indutor (MLI) da melanização. O meio líquido não indutor (MLNI) e o meio líquido indutor (MLI) foram preparados como descrito por Rosas e Casadevall (2001). O MLNI é composto por 2,7 g L⁻¹ (15 mM) de glicose (Vetec, RJ, Brazil), 4 g L⁻¹ (29,4 mM) de KH₂PO₄ (Labsynth, SP, Brazil), 2,5 g L⁻¹ (10 mM) de MgSO₄.7H₂O (Labsynth, SP, Brazil), 1 g L⁻¹ (13 mM) de glicina (Sigma) e 0,001 g L⁻¹ (0,003 mM) de tiamina (Sigma). O MLI foi preparado adicionando-se 0,197 g L⁻¹ (1 mM) de L-3,4 diidroxifenilalanina (Sigma) ao MLNI. Todos os componentes foram solubilizados em água destilada e os meios foram filtrados a vácuo em uma membrana porosa (éster de celulose, poros com 0,22 µm, 47 mm de diâmetro) (Millipore, SP, Brasil). As células melanizadas e não melanizadas dessa variedade foram utilizadas nos experimentos de fotossensibilização com CIAIPc/NE e nos experimentos para determinar a incorporação do FS e a sua localização intracelular.

As espécies de *Trichophyton* foram crescidas em meio SDA (Acumedia, EUA) a 28°C, por 14 dias. Os microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* foram obtidos como descrito por Smijs e col. (2004), com modificações. Os fungos cresceram em placas de Petri (90 × 15 mm) sobre meio SDA a 28°C, por 14 dias. Após esse período, 10 mL de solução 0,01% (v/v) de Tween 80 (Sigma-Aldrich) foram colocados sobre a superfície da colônia e, com ajuda de uma alça de vidro, os microconídios foram recolhidos. A suspensão foi filtrada em membrana de polycarbonato, com poros de 8 µm (Nucleopore, NJ, EUA), centrifugada a 3.400 g e os microconídios foram resuspensores em PBS (“phosphate buffered saline”). A concentração da suspensão foi determinada por contagens em hematómetro e todas as diluições necessárias foram feitas em PBS.

3.2 Linhagem e cultura de fibroblasto de camundongo

Os experimentos para a avaliação da toxicidade dos FS fenotiazínicos a células de mamíferos foram conduzidos com a linhagem de fibroblasto de camundongo L929 (ATCC CCL-1). As células foram crescidas em garrafas de cultura celular de 25 cm² (TPP, Suíça) em meio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EUA), suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (Gibco), 2 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 1% de solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10.000 unidades mL⁻¹, estreptomicina 10 mg mL⁻¹ e anfotericina B 25 µg mL⁻¹) (Sigma, A5955) e 1% de solução de glutamina 200 mM (GlutaMAX, Gibco, 35050) a 37°C, em incubadora com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. O meio foi trocado a cada 2 dias. Para os subcultivos, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas a 37°C, por 5 min, com solução de tripsina-EDTA (Sigma, T4174).

3.3 Fotossensibilizadores

Os experimentos foram realizados com os seguintes FS: (1) azul de metileno (methylene blue, MB) ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) (Sigma-Aldrich, Inc., MO, EUA), (2) novo azul de metileno N (new methylene blue N, NMBN) ($C_{18}H_{22}ClN_3S$) (Sigma, EUA), (3) azul de toluidina O (toluidine blue O, TBO) ($C_{15}H_{16}N_3S$) (Sigma, EUA), (4) derivado do MB 1,11-Diethyl-2,2,4,8,10,10-hexamethyl-1,2,3,4,8,9,10,11-octahydrodipyrrodo (3,2-b:2',3'-i) phenothiazinium hydrogensulphate ($C_{28}H_{39}O_4N_3S_2$) (S137) e (5) cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão (ClAlPc/NE). O S137 foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Dr. Mark Wainwright, da Liverpool John Moores University, UK. A ClAlPc/NE foi sintetizada e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP. As fórmulas estruturais e os espectros de absorção (entre 400 e 800 nm) dos FS são mostradas nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Foram preparadas soluções-estoque de MB, TBO, NMBN e S137 em PBS, pH 7,4, com concentrações (2000 μ M) dez vezes maiores do que a maior concentração utilizada. As soluções foram aliquotadas e mantidas no escuro, a $-18^{\circ}C$, por até 14 dias. As soluções de ClAlPc/NE foram preparadas em PBS, imediatamente antes da utilização.

Figura 4 – Estrutura química dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e ClAlPc

Figura 5 – Espectro de absorção no visível dos FS MB, TBO, NMBN e S137. Os espectros foram obtidos na concentração de 10 μM

3.4 Fontes de luz

Como fontes de luz, foram utilizadas: (1) um conjunto de 96 LED (“light-emitting diodes”) brancos, com espectro de emissão entre 400 e 700 nm, (2) um conjunto de 600 LED vermelhos, denominado LED600 (DE PAULA et al., 2010), com emissão entre 590 e 690 nm e irradiância de $9,23 \text{ mW cm}^{-2}$ (calculada entre 250 nm e 950 nm) e (3) um conjunto de 96 LED vermelhos, denominado LED96, com emissão entre 600 e 650 nm e irradiância de $9,89 \text{ mW cm}^{-2}$ (calculada entre 250 nm e 950 nm). As irradiâncias foram medidas com um espectroradiômetro USB 4000 (Ocean Optics, FL, EUA). Os espectros de emissão dos LED utilizados são mostrados na Figura 6.

Figura 6 – Emissão espectral do (A) LED brancos, (B) LED600 e (C) LED96

Nos experimentos de fotossensibilização de células com ClAlPc/NE, foi utilizado, como fonte de luz, um laser de diodo modelo Eagle (Quantum Tech, Brazil), com comprimento de onda de 675 nm e 100 mW de potência, acoplado a uma fibra óptica.

3.5 Determinação do potencial zeta das células fúngicas

A determinação do potencial zeta das células foi realizada nas células leveduriformes das cinco espécies de *Candida*, em células melanizadas e não melanizadas da linhagem *C. neoformans* var. *neoformans* e em conídios das duas espécies de *Trichophyton*, utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido). As células foram suspensas em PBS, pH 7,4, na concentração 5×10^4 células mL⁻¹.

3.6 Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico pela CIM

3.6.1 Espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*

Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), foram colocados 50 µL da suspensão de células (em PBS) e 50 µL dos FS, nas diferentes concentrações. A concentração final de células nas suspensões foi 5×10^3 células mL⁻¹. As concentrações finais do MB, TBO, NMBN e S137 foram 1, 2,5; 5; 10; 12,5; 25; 50; 75; 100 e 200 µM. As concentrações finais da ClAlPc/NE foram 0,0025; 0,005; 0,01; 0,025; 0,045; 0,1; 0,25; 0,45; 1 e 4,5 µM. As microplacas foram mantidas no escuro por 30 min (período de pré-incubação) e, a seguir, foram expostas à luz. As fontes utilizadas foram o conjunto de LED brancos e o LED600. Para o conjunto de LED brancos, as doses finais foram de 5 e 10 J cm⁻² (obtidas com 30 e 60 min de exposição, respectivamente) e, para o LED600, as doses finais foram de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm⁻² (obtidas com 20, 40, 60, 80, 100 e 120 min de exposição, respectivamente). Microplacas-controle, que ficaram protegidas da luz durante as exposições, foram preparadas em paralelo em todos os experimentos (“dark controls”). Também foram preparados controles nos quais as células foram expostas à luz na ausência do FS (“light controls”). Após as exposições, 100 µL de meio RPMI 1640 (com o dobro da concentração original) (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EUA) foram acrescentados aos poços. As microplacas foram incubadas no escuro, a 35°C (espécies de *Candida*) e 28°C (*C. neoformans*), por até 96 h. O

crescimento foi avaliado após 48, 72 e 96 h. Nos poços onde o crescimento foi completamente inibido, o conteúdo foi agitado e uma alíquota de 10 µL foi removida e transferida para a superfície de meio SDA (*Candida*) ou PDA (*C. neoformans*), em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C (*Candida*) e 28°C (*C. neoformans*). O desenvolvimento foi acompanhado por até 96 h, quando a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada. A eficácia dos FS baseou-se na sua CIM; quanto menor a sua CIM, maior foi considerada a sua eficácia. Foram realizados três experimentos independentes.

3.6.2 *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*

Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), foram adicionados 50 µL da suspensão de conídios e 50 µL dos FS, nas diferentes concentrações. A concentração final de microconídios nas suspensões foi 10^5 células mL⁻¹. As concentrações finais do MB, TBO e NMBN foram 1, 2,5; 5; 10; 12,5; 25; 50; 75; 100 e 200 µM e as concentrações finais do S137 foram 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 5; 10; 15; 20 e 25 µM. As microplacas foram mantidas no escuro por 30 min (período de pré-incubação) e, a seguir, foram expostas às doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm⁻² (obtidas com 20, 40, 60, 80, 100 e 120 min de exposição, respectivamente), utilizando-se o LED600 como fonte de luz. Microplacas-controle, que ficaram protegidas da luz durante as exposições, foram preparadas em paralelo em todos os experimentos (“dark controls”). Também foram preparados controles nos quais os microconídios foram expostos à luz na ausência do FS (“light control”). Após as exposições, 100 µL de meio RPMI 1640 (com o dobro da concentração original) (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EUA) foram acrescentados aos poços. As microplacas foram incubadas no escuro, a 28°C, por até 168 h (7 dias). As avaliações do crescimento foram feitas com 120, 144 e 168 h (5, 6 e 7 dias, respectivamente). Nos poços onde o crescimento foi completamente inibido, o conteúdo foi agitado e uma alíquota de 10 µL foi removida e transferida para a superfície de meio SDA,

em placas de Petri. As placas foram incubadas a 28°C. O desenvolvimento foi acompanhado por até 7 dias, quando a CIM foi determinada. A determinação da eficácia dos FS baseou-se na sua CIM; quanto menor a CIM, maior foi considerada a sua eficácia. Foram realizados três experimentos independentes.

3.7 Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico pela fração de sobrevivência

3.7.1 Avaliação da eficácia do TF com NMBN e S137 nas diferentes espécies de *Candida*

Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), foram adicionados 100 µL da suspensão de células (em PBS) e 100 µL dos FS NMBN e S137. As concentrações finais nas misturas foram 10^7 células mL⁻¹ e 2,5 µM dos FS. As microplacas foram mantidas no escuro por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, foram expostas à luz. Para as exposições, foram utilizados como fonte de luz o LED600 e o LED96. As doses finais com o LED600 foram de 5, 10 e 15 J cm⁻² (obtidas com 20, 40 e 60 min de exposição, respectivamente) e as doses finais com o LED96 foram de 5, 10, 15 e 25 J cm⁻² (obtidas com 3, 6, 9 e 15 min de exposição, respectivamente). Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-3}), e 50 µL de cada diluição foram espalhados na superfície de 5 mL de SDA, em placas de Petri (60 × 15 mm). Foram preparadas três placas-réplica por tratamento. As placas foram incubadas a 35°C, no escuro, e a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi iniciada, com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de 8 ×), após 24 h e estendida até 96 h. Controles nos quais as células foram expostas à luz, na ausência do FS, e controles nos quais as células foram tratadas com o FS, mas não expostas à luz, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Células que não originaram colônias após 96 h foram consideradas mortas pelo tratamento. O efeito de cada tratamento fotodinâmico foi estimado por meio da fração de sobrevivência, expressa por n/n_0 , sendo n o número de colônias do tratamento e n_0 o número de colônias do controle não exposto à luz nem ao FS. Quanto

menor a fração de sobrevivência, mais eficaz foi considerado o tratamento fotodinâmico. Foram realizados três experimentos independentes.

3.7.2 Avaliação da eficácia do TF com CIAIPc/NE nas células de *Candida albicans* e *C. tropicalis*

Em microtubos de 1,5 mL (polipropileno, Axygen Scientific, CA, EUA), foram adicionados 150 μL da suspensão de células de *C. albicans* e *C. tropicalis* (em PBS) e 1350 μL de CIAIPc/NE, em diferentes concentrações. As concentrações finais nas misturas foram de 10^7 células mL^{-1} e 0,045; 0,450 e 4,500 μM do FS. Os microtubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, 400 μL de cada suspensão foram colocados em placas de cultura de células com 24 poços (poliestireno, TPP, Suíça). As placas foram expostas ao laser com doses finais de 5, 15 e 25 J cm^{-2} (obtidas com 1 min e 11 seg; 3 min e 32 seg e 5 min e 54 seg de exposição, respectivamente). Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-3}) e 50 μL de cada diluição foram espalhados na superfície de 5 mL de SDA, em placas de Petri (60 $\times$ 15 mm). Foram preparadas três placas-réplica por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das UFC foi iniciada, com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de 8 $\times$), após 24 h e estendida até 96 h. Controles nos quais as células expostas à luz, na ausência do FS, e controles nos quais as células foram tratadas com o FS, mas não foram expostas à luz, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. O efeito das diferentes concentrações do FS foi estimado por meio da determinação da fração de sobrevivência (n/n_0). Células que não originaram colônias após 96 h foram consideradas mortas pelo tratamento. Foram realizados três experimentos independentes.

3.7.3 Avaliação da eficácia do TF com CIAIPc/NE nas células de *Cryptococcus neoformans*

Em microtubos de 1,5 mL (polipropileno, Axygen Scientific, CA, EUA), foram adicionados 50 μL da suspensão de células da linhagem de *C. neoformans* var. *neoformans* (em PBS) e 450 μL de CIAIPc/NE, em diferentes concentrações. As concentrações finais nas misturas foram de 10^7 células mL^{-1} e 0,045; 0,450 e 4,500 μM do FS. Os microtubos foram mantidos, no escuro, por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, as células foram divididas em dois grupos: lavadas com PBS após a pré-incubação e não lavadas. Para a lavagem, as células foram centrifugadas a 1.100 g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em PBS. Em seguida, 400 μL de cada suspensão foram colocados em placas de cultura de células com 24 poços (poliestireno, TPP, Suíça) e as placas foram expostas ao laser com doses finais de 5 e 10 J cm^{-2} (obtidas com 1 min e 11 seg e 3 min e 32 seg de exposição, respectivamente). Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-5}) e 50 μL de cada diluição foram espalhados na superfície de 5 mL de PDA, em placas de Petri (60 $\times$ 15 mm). Foram preparadas três placas-réplica por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das UFC foi iniciada, com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de 8 $\times$), após 48 h e estendida até 96 h. Controles nos quais as células expostas à luz, na ausência do FS, e controles nos quais as células foram tratadas com o FS, mas não foram expostas à luz, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. O efeito das diferentes concentrações do FS foi estimado por meio da determinação da fração de sobrevivência (n/n_0). Células que não originaram colônias após 96 h foram consideradas mortas pelo tratamento. Foram realizados três experimentos independentes.

3.7.4 Avaliação da eficácia do TF com fenotiazínicos, NMBN e S137, nos microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*

Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), foram adicionados 100 µL da suspensão de microconídios e 100 µL de solução dos FS NMBN e S137. As concentrações finais nas misturas foram de 2×10^6 células mL⁻¹ e 10 µM do FS NMBN e 1 e 10 µM do FS S137. As microplacas foram mantidas no escuro, por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, foram expostas ao LED96 com doses finais de 5, 10 e 20 J cm⁻² (obtidas com 3, 6 e 12 min de exposição, respectivamente). Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-3}) e 50 µL de cada diluição foram espalhados na superfície de 5 mL de SDA, em placas de Petri (60 × 15 mm). Foram preparadas três placas-réplica por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das UFC foi iniciada, com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de 8 ×), após 72 h e estendida até 14 dias. Controles nos quais as células foram expostas à luz, na ausência do FS, e controles nos quais as células foram tratadas com o FS, mas não expostas à luz, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Células que não originaram colônias após 14 dias foram consideradas mortas pelo tratamento. O efeito de cada tratamento fotodinâmico foi estimado por meio da fração de sobrevivência expressa por n/n0. Quanto menor a fração de sobrevivência, mais eficaz foi considerado o tratamento fotodinâmico. Foram realizados três experimentos independentes.

3.8 Avaliação da toxicidade dos FS fenotiazínicos na linhagem L929 de fibroblasto de camundongo

Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), foram colocados 200 µL da suspensão de células L929, diluídas em meio RPMI (Gibco), na concentração de 5×10^4 células mL⁻¹. As microplacas foram incubadas por 24 h, a 37°C. A seguir, o meio foi retirado e 200 µL dos FS MB, TBO, NMBN e S137, diluídos em PBS, foram adicionados aos poços. As concentrações

finais dos FS foram 1, 2,5 e 10 μM . Em poços-controle foi adicionado apenas PBS. Para o controle de morte celular, foi adicionado 3,5% de H_2O_2 , diluído em PBS. Após 30 min (pré-incubação), as placas foram expostas à dose de 15 J cm^{-2} (obtida com 9 min de exposição), utilizando-se o LED96 como fonte de luz. A seguir, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados aos poços 180 μL de RPMI e 20 μL de MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma] (5 mg mL^{-1} diluído em PBS). Após 4 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 200 μL de solução solubilizadora [5% (v/v) de Triton X-100, Sigma; 20 mL de álcool isopropílico, Nuclear; 162 μL de ácido clorídrico (37%), Merck; 18 mL de água destilada]. A mistura foi incubada por 12 h e, a seguir, a absorbância a 570 nm foi determinada em leitor de microplacas (Spectramax Plus/Softmax program – Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.9 Determinação da incorporação (“uptake”) da ClAlPc/NE por *C. neoformans*

Os experimentos para determinar a incorporação da ClAlPc/NE por células melanizadas de *C. neoformans* foram feitos de acordo com as metodologias modificadas descritas por Fuchs e col. (2007) e por Smijs e Schuitmaker (2003). Células melanizadas da linhagem de *C. neoformans* var. *neoformans* (10^7 células mL^{-1}) foram incubadas com diferentes concentrações de ClAlPc/NE (0,045; 0,450 e 4,500 μM), por 30 min, no escuro. A seguir, as células foram centrifugadas a 3.300 g, por 7 min; o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em PBS. As células foram centrifugadas novamente (3.300 g, por 7 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 0,1 M NaOH-1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Essa mistura foi incubada por 24 h. A seguir, as células foram centrifugadas (3.300 g, por 7 min) e o sobrenadante foi diluído em acetonitrila (1:2). As dosagens para a determinação da ClAlPc recuperada foram feitas com espectrofluorímetro (F-4500/HITACHI) com comprimento de onda de excitação de 610 nm e comprimentos de onda

de emissão entre 650 nm e 800 nm. A curva de calibração foi feita com o FS puro, dissolvido em acetonitrila, como descrito por Siqueira-Moura e col. (2008). Os valores de interação (número de moléculas do fotossensibilizador associadas a cada célula) foram calculados, dividindo-se o número de mol L⁻¹ do FS pela quantidade de células L⁻¹ na suspensão e utilizando-se a constante de Avogrado.

3.10 Microscopia confocal

A microscopia confocal foi utilizada para determinar a localização intracelular da CIAIPc/NE nas células melanizadas de *C. neoformans*. Cinquenta microlitros da suspensão de células e 450 µL do FS (concentrações finais de 10⁷ células mL⁻¹ e 4,500 µM) foram colocados em microtubos de 1,5 mL, que foram mantidos no escuro, por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, centrifugados (1.100 g, 5 min). As células foram lavadas duas vezes com o tampão de lavagem [preparado como descrito por Gabriel e col. (2006)], para a retirada do FS não ligado. A seguir, foram adicionados 100 µL da solução de fixação [paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences) 2% (v/v) diluída em PBS] e 300 µL do tampão de lavagem, e a mistura foi incubada por 90 minutos, no escuro. A seguir, as células foram lavadas três vezes (1.100 g, 5 min) com tampão de lavagem e suspensas em PBS para a montagem das lâminas. A visualização foi feita com microscópio confocal Leica TCS SP2 SE (Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), laser HeNe com comprimento de onda fixo de 633 nm, detector espectral ajustado entre 640 a 800 nm, objetiva de 63 ×, com abertura numérica de 1,2 e imersão em água.

3.11 Análise Estatística

Inicialmente, foi feita uma análise exploratória dos dados de todos os experimentos, com a determinação de medidas de posição central e de dispersão. A seguir, os dados foram

submetidos à análise de variância. As comparações entre os tratamentos foram feitas, utilizando-se contrastes ortogonais (MONTGOMERY, 2001). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. A análise estatística foi feita, utilizando-se a PROC GLM do programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., *SAS/STAT® User's Guide, Version 9.0*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2003).

4. RESULTADOS

4.1 Determinação do potencial zeta das células fúngicas

A Tabela 1 mostra o potencial zeta das células leveduriformes das diferentes espécies de *Candida*, de células leveduriformes não melanizadas e melanizadas de *C. neoformans* e dos microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Em todos os casos, as células foram suspensas em PBS. O potencial zeta de todas as células foi negativo e variou entre -9,67 e -25,2 mV.

Tabela 1 – Potencial zeta das diferentes espécies de *Candida*, de células não melanizadas e melanizadas de *C. neoformans* var. *neoformans* e de microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*

Espécie	Potencial zeta (mV)
PBS	-9,54
<i>C. albicans</i>	-14,18
<i>C. glabrata</i>	-11,83
<i>C. krusei</i>	-14,54
<i>C. parapsilosis</i>	-11,34
<i>C. tropicalis</i>	-14,71
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> não melanizada	-25,2
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> melanizada	-21,4
<i>T. mentagrophytes</i>	-9,67
<i>T. rubrum</i>	-15,53

4.2 Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico pela CIM

4.2.1 Efeito das exposições apenas à luz e apenas aos fotossensibilizadores

Exposições apenas à luz, independentemente da fonte (LED brancos, LED600, LED96 e laser) ou da dose utilizada, não inibiram o crescimento de nenhuma das linhagens avaliadas (dados não mostrados).

Os tratamentos com os FS MB, TBO e NMBN, na ausência de luz, em concentrações de até 200 μM (que foi a maior concentração avaliada), não inibiram o desenvolvimento de nenhuma das espécies de *Candida* (Tabela 2). O NMBN foi tóxico no escuro apenas para as duas variedades de *Cryptococcus* (CIM = 25 μM). O FS S137 inibiu o crescimento no escuro para todas as espécies. A CIM foi 25 μM para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, 12,5 μM para *C. krusei* e para as duas espécies de *Trichophyton*, 75 μM para *C. tropicalis*, 5 μM para *C. neoformans* var. *neoformans* e 10 μM para *C. neoformans* var. *grubii*. A CIAIPc/NE não inibiu o crescimento no escuro para nenhuma das espécies e variedades, em nenhuma das concentrações utilizadas.

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (μM) dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e CIAIPc/NE na ausência de luz para as diferentes espécies de *Candida*, para as duas variedades de *C. neoformans* e para as duas espécies de *Trichophyton*

Espécie/FS	MB	TBO	NMBN	S137	CIAIPc/NE
<i>C. albicans</i>	>200	>200	>200	25	>4,5
<i>C. glabrata</i>	>200	>200	>200	25	>4,5
<i>C. krusei</i>	>200	>200	>200	12,5	>4,5
<i>C. parapsilosis</i>	>200	>200	>200	25	>4,5
<i>C. tropicalis</i>	>200	>200	>200	75	>4,5
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	>200	>200	25	5	>4,5
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	>200	>200	25	10	>4,5
<i>T. mentagrophytes</i>	>200	>200	>200	12,5	-
<i>T. rubrum</i>	>200	>200	>200	12,5	-

4.2.2 Efeito das exposições simultâneas à luz e aos diferentes FS nas espécies de *Candida* e variedades de *Cryptococcus*

TF com os LED brancos. A Tabela 3 mostra as CIM (em μM) dos TF com os diferentes FS para as espécies de *Candida* e variedades de *Cryptococcus*. As cinco espécies de *Candida* e as duas variedades de *C. neoformans* foram pré-incubadas por 30 min, com os FS MB, TBO e NMBN e, a seguir, expostas à luz emitida pelos LED brancos (doses de 5 e 10 J cm^{-2}). Como a maior concentração testada dos FS foi 200 μM , resultados >200 μM indicam que o TF não inibiu completamente o crescimento em nenhuma das concentrações avaliadas. Com exceção de *Candida parapsilosis* e *C. tropicalis*, células expostas à luz (dose de 5 J cm^{-2}), na presença de MB, não tiveram o crescimento completamente inibido em nenhuma das concentrações testadas. No TF com o TBO (dose de 5 J cm^{-2}), apenas *C. albicans* e *C. glabrata* não tiveram o crescimento completamente inibido. Quando a maior dose de luz foi utilizada (10 J cm^{-2}), tanto o MB como o TBO inibiram o crescimento de todas as espécies. A única exceção foi *C.*

glabrata, que foi tolerante ao TF com ambos os FS. O TF com NMBN, com ambas as doses de luz, inibiu completamente o crescimento de todas as espécies e variedades.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (μM) dos TF com os FS MB, TBO e NMBN para as diferentes espécies de *Candida* e para as duas variedades de *C. neoformans*, utilizando-se os LED brancos como fonte de luz e doses de 5 e 10 J cm^{-2} . Os intervalos das CIM foram determinados em três experimentos independentes

Espécie/FS	5 J cm^{-2}			10 J cm^{-2}		
	MB	TBO	NMBN	MB	TBO	NMBN
<i>C. albicans</i>	>200	>200	10	25-50	5-12,5	2,5-5
<i>C. glabrata</i>	>200	>200	10-50	>200	>200	5-10
<i>C. krusei</i>	>200	10-12,5	5	10-25	5-10	2,5-5
<i>C. parapsilosis</i>	12,5-25	10-12,5	2,5-12,5	2,5-25	2,5-12,5	1-10
<i>C. tropicalis</i>	10-50	5	2,5-5	1-10	1-10	2,5
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	>200	5-75	2,5	5-25	2,5-10	1-2,5
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	>200	2,5-25	1-2,5	2,5-50	1-10	1-5

TF com o LED600. A Tabela 4 mostra as CIM dos TF com os diferentes FS nas espécies de *Candida* e nas duas variedades de *C. neoformans*. As células foram incubadas por 30 min, em diferentes concentrações dos FS MB, TBO, NMBN, S137 e CIAIPc/NE e, a seguir, expostas a doses de luz que variaram de 5 a 30 J cm^{-2} , utilizando-se o LED600 como fonte de luz. As exposições foram feitas na presença dos FS. Os TF com todos os FS fenotiazínicos, em todas as doses de luz, inibiram o crescimento de todas as espécies, embora a CIM tenha variado entre as diferentes espécies e entre os diferentes fenotiazínicos.

De maneira geral, quanto maior a dose de luz, (no intervalo entre 5 e 15 J cm^{-2}), menor foi a CIM do FS necessária para inibir o crescimento dos fungos. Não se observou diferença, entre as CIM, nas exposições com doses maiores que 15 J cm^{-2} . Nas menores doses (5 e 10 J cm^{-2}).

cm⁻²), os FS mais eficazes (com menores CIM), foram o NMBN e S137. Nas maiores doses (>15 J cm⁻²), não houve diferença entre as CIM dos diferentes FS. Como a maior concentração testada do FS CIAIPc/NE foi 4,5 µM, resultados >4,5 µM indicam que não se observou a inibição do crescimento em nenhuma das concentrações avaliadas. O TF com CIAIPc/NE e dose de 5 J cm⁻² não inibiu o crescimento de nenhum dos fungos. O crescimento de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não foi inibido pelos TF com CIAIPc/NE em nenhuma das concentrações e doses testadas. O crescimento de células de *C. krusei* só foi inibido com doses maiores que 20 J cm⁻². O crescimento de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e as duas variedades de *C. neoformans* só foi inibido pelo TF com CIAIPc/NE com doses maiores que 10 J cm⁻².

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (μM) dos TF com os FS MB, TBO, NMBN, S137 e CIAIPc/NE para as diferentes espécies de *Candida* e para as duas variedades de *C. neoformans*, utilizando-se o LED600 como fonte de luz e doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm^{-2} . Os intervalos das CIM foram determinados em três experimentos independentes

	FS/Dose	5 J cm^{-2}	10 J cm^{-2}	15 J cm^{-2}	20 J cm^{-2}	25 J cm^{-2}	30 J cm^{-2}
<i>C. albicans</i>	MB	5-12,5	2,5-5	1-5	2,5-5	2,5-5	2,5-5
	TBO	5	2,5	2,5-5	2,5-5	2,5-5	2,5-5
	NMBN	2,5	1	1	1	1	1
	S137	2,5	2,5	2,5	1	1	1
	CIAIPc/NE	>4,5	0,045-0,25	0,025-0,045	0,01-0,025	0,005-0,025	0,005
<i>C. glabrata</i>	MB	25-50	5-12,5	2,5-10	5	2,5-5	2,5-5
	TBO	10-12,5	5-10	2,5-5	5	2,5	2,5-5
	NMBN	2,5-5	2,5	2,5	2,5	1-2,5	1
	S137	2,5-5	2,5	2,5-5	2,5	2,5	2,5
	CIAIPc/NE	>4,5	>4,5	>4,5	>4,5	>4,5	>4,5
<i>C. krusei</i>	MB	10-25	5-10	5	2,5-10	2,5-5	2,5-5
	TBO	5-12,5	2,5-5	2,5	2,5	2,5	2,5
	NMBN	2,5	1-5	1	1-2,5	1	1-2,5
	S137	2,5-5	2,5-5	2,5	2,5	1	1-2,5
	CIAIPc/NE	>4,5	>4,5	>4,5	0,45	0,25	0,1
<i>C. parapsilosis</i>	MB	10-25	5-10	2,5-5	2,5-5	2,5-5	2,5-5
	TBO	5-10	2,5-5	2,5	2,5-5	2,5	2,5
	NMBN	2,5-10	1-2,5	1-2,5	1	1-10	1
	S137	2,5	2,5	1-2,5	2,5	2,5	2,5
	CIAIPc/NE	>4,5	>4,5	>4,5	>4,5	>4,5	>4,5
<i>C. tropicalis</i>	MB	10-25	2,5-10	2,5-5	1-5	2,5-10	2,5-5
	TBO	5	2,5-5	2,5-5	2,5-5	2,5-5	2,5
	NMBN	2,5	1-2,5	1	1	1	1
	S137	2,5	2,5	1-2,5	2,5	1	1
	CIAIPc/NE	>4,5	0,1	0,025-0,1	0,025-0,1	0,045-0,1	0,025-0,045

continua

Continuação Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (μM) dos TF com os FS MB, TBO, NMBN, S137 e CIAIPc/NE para as diferentes espécies de *Candida* e para as duas variedades de *C. neoformans*, utilizando-se o LED600 como fonte de luz e doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm^{-2} . Os intervalos das CIM foram determinados em três experimentos independentes

	FS/Dose	5 J cm^{-2}	10 J cm^{-2}	15 J cm^{-2}	20 J cm^{-2}	25 J cm^{-2}	30 J cm^{-2}
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	MB	10-50	2,5-10	2,5-5	1-5	2,5-5	1-2,5
	TBO	5-10	2,5	2,5	2,5	1-2,5	2,5
	NMBN	1-2,5	1-2,5	1-5	1	1	1
	S137	1-2,5	1	1	1-5	1-2,5	1-2,5
	CIAIPc/NE	>4,5	0,25	0,025	0,01	0,005-0,025	0,005-0,01
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	MB	10-12,5	2,5-10	2,5-5	1-5	1-5	1-5
	TBO	2,5	2,5	1-2,5	2,5	2,5	1-2,5
	NMBN	1-2,5	1	1	1	1	1
	S137	2,5	1-2,5	1	1	1	1
	CIAIPc/NE	>4,5	0,025-0,45	0,01-0,045	0,01	0,005-0,025	0,005-0,01

4.2.3 Efeito das exposições simultâneas à luz e aos FS fenotiazínicos nos microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*

A Tabela 5 mostra as CIM dos TF com os FS fenotiazínicos, nas duas espécies de *Trichophyton*. Os microconídios foram incubados por 30 min, em diferentes concentrações dos FS MB, TBO, NMBN e S137 e, a seguir, expostos às doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm^{-2} , utilizando-se o LED600 como fonte de luz. As exposições foram feitas na presença dos FS. Os TF com todos os FS, em todas as doses de luz, foram capazes de matar os microconídios das duas espécies. As CIM, para as duas espécies, variaram tanto em função do FS, como em função da dose de luz utilizada. Por exemplo, a CIM, para a dose de 5 J cm^{-2} , variou de 2,5 a 50 μM e de 1 a 75 μM , para os microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, respectivamente (Tabela 5). O FS mais eficaz foi o S137, apresentando CIM < 2,5 μM , em doses de luz maiores ou iguais à 5 J cm^{-2} , para os microconídios das duas espécies.

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (μM) dos TF com os FS MB, TBO, NMBN e S137, para as espécies de *Trichophyton*, utilizando-se o LED600 como fonte de luz e doses de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 J cm^{-2} . Os intervalos das CIM foram determinados em três experimentos independentes

	FS/Dose	5 J cm^{-2}	10 J cm^{-2}	15 J cm^{-2}	20 J cm^{-2}	25 J cm^{-2}	30 J cm^{-2}
<i>T. mentagrophytes</i>	MB	25	10-12,5	10-12,5	5-12,5	10	10-12,5
	TBO	12,5-50	2,5-25	2,5-12,5	2,5-25	5-25	5-10
	NMBN	12,5	2,5-12,5	12,5	12,5	10-12,5	10-12,5
	S137	2,5	0,5-2,5	0,5-2,5	1-2,5	1-2,5	0,1-2,5
<i>T. rubrum</i>	MB	12,5-25	12,5-25	25-50	12,5	5-12,5	5-25
	TBO	5-75	2,5-25	5-50	1-25	2,5-25	1-25
	NMBN	12,5-25	10-12,5	10	10	5-25	2,5-12,5
	S137	1-2,5	0,5-2,5	0,5-1	0,5-1	0,5-2,5	0,5-5

4.3 Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico pela fração de sobrevivência

4.3.1 Avaliação da eficácia do TF com fenotiazínicos em espécies de *Candida*

As células das cinco espécies de *Candida* foram incubadas com o FS NMBN ou S137, na concentração de 2,5 μM e, a seguir, expostas à luz na presença do FS, utilizando-se o LED600 (NMBN) ou o LED96 (S137) como fonte de luz. A sobrevivência dos diferentes tratamentos foi calculada em relação aos controles não expostos à luz e nem ao FS.

Os efeitos das exposições apenas à luz (LED600) e os efeitos das exposições à luz e ao FS NMBN são mostrados nas Figuras 7A e 7B, respectivamente (Anexo A). Exposições apenas à luz (doses 5, 10 e 15 J cm^{-2}) emitida pelo LED600 não mataram as células de nenhuma das espécies de *Candida* (Fig. 7A). Exposições apenas ao FS também não mataram nenhuma das espécies. O FS NMBN, em todas as doses de luz utilizadas, foi capaz de matar as células de todas as espécies de *Candida*. As únicas exceções foram os TF de *C. krusei*, nas doses de 5 e 10 J cm^{-2} , que não diferiram do controle ($P = 0,519$ e $0,876$, respectivamente) (Fig. 7B). O efeito dos TF variou, tanto em função da dose de luz, como em função das

espécies de *Candida*. A sobrevivência foi inversamente proporcional à dose de luz para a maioria dos tratamentos. *C. parapsilosis* foi a espécie mais sensível ao TF com o NMBN, que reduziu a sobrevivência em três ordens de grandeza em relação ao controle.

Figura 7 – Efeito das exposições apenas à luz, emitida pelo LED600 (A), e dos TF com o NMBN (2,5 µM) (B) na sobrevivência das diferentes espécies de *Candida*. As frações de sobrevivência foram determinadas após 96 h

Os efeitos das exposições apenas à luz (LED96) e os efeitos dos TF com o FS S137 são mostrados nas Figuras 8A e 8B, respectivamente (Anexo B). *C. glabrata* foi a única espécie cuja sobrevivência foi reduzida pelas exposições apenas à luz e a redução ocorreu em todas as doses ($P < 0,0001$ para todas as doses). Exposições apenas ao FS não mataram nenhuma das espécies. Os TF com o S137 foram capazes de matar as células de todas as espécies testadas em todas as doses de luz utilizadas ($P < 0,0001$, para todas as doses de luz e

para todas as espécies) (Fig. 8B). Como observado com o NMBN, o efeito dos TF variou tanto em função da dose de luz como em função das espécies de *Candida*. A sobrevivência foi inversamente proporcional à dose de luz para a maioria dos tratamentos. Nas maiores doses de luz (15 e 25 J cm⁻²), os TF com o S137 reduziram a sobrevivência de todas as espécies em pelo menos 3 ordens de grandeza. A única exceção foi *C. krusei*, que foi mais tolerante ao TF.

Figura 8 – Efeito das exposições apenas à luz, emitida pelo LED96 (A), e dos TF com o S137 (B) na sobrevivência das diferentes espécies de *Candida*. As frações de sobrevivência foram determinadas após 96 h

4.3.2 Avaliação da eficácia do TF com CIAIPc/NE em *Candida albicans* e *C. tropicalis*

Células de *Candida albicans* (Fig. 9A) e *C. tropicalis* (Fig. 9B) foram incubadas com o FS CIAIPc/NE, nas concentrações de 0,045; 0,450 e 4,500 μM e, a seguir, expostas ao laser com doses finais de 5, 15 e 25 J cm^{-2} . A sobrevivência dos diferentes tratamentos foi calculada em relação aos controles não expostos à luz e nem ao FS. Exposições apenas à luz (doses 5, 15 e 25 J cm^{-2}) e exposições apenas ao FS (0,045, 0,450 e 4,500 μM) não mataram as espécies de *Candida* testadas. A CIAIPc/NE, em todas as concentrações e doses de luz utilizadas, foi capaz de matar as células das duas espécies de *Candida* ($P < 0,05$, para todas as concentrações quando comparadas com os controles). Não houve diferença quando comparados os efeitos das três doses nas três concentrações do FS ($P > 0,05$ para todas as comparações). Também não houve diferença entre as diferentes espécies testadas (Fig. 9A com Fig. 9B).

Figura 9 – Efeito das exposições ao FS CLAIPc/NE na sobrevivência de células de *C. albicans* (A) e *C. tropicalis* (B) utilizando doses de 5, 15 e 25 J cm⁻². As células (10⁷ mL⁻¹) foram pré-incubadas por 30 min com o FS CLAIPc/NE e, posteriormente, expostas à luz. As frações de sobrevivência foram determinadas após 96 h

4.3.3 Avaliação da eficácia do TF com CLAIPc/NE nas células de *C. neoformans* pela fração de sobrevivência

A Figura 10 mostra a IF de células melanizadas da linhagem *C. neoformans* var. *neoformans*, com diferentes concentrações de CLAIPc/NE. As células foram pré-incubadas por 30 min com o FS, lavadas ou não com PBS e, a seguir, expostas as doses de 5 J cm⁻² (Fig. 10B) e 10 J cm⁻² (Fig. 10C) emitidas pelo laser (Anexo C). As contagens das UFC foram feitas após 96 h. As sobrevivências foram determinadas em relação a controles não expostos à

luz e nem ao FS. Na ausência de luz, a ClAlPc/NE não foi tóxica em nenhuma das concentrações utilizadas (Fig. 10A). Nas exposições às doses 5 e 10 J cm⁻², a fotoinativação ocorreu tanto nas células lavadas como nas células não lavadas para todas as concentrações testadas. Não houve diferença entre as concentrações (0,045; 0,450 e 4,500 µM), exceto nas células não lavadas expostas a dose 5 J cm⁻² ($P < 0,001$ para todas as concentrações) (Fig. 10B). A diferença na sobrevivência das células lavadas e não lavadas foi observada apenas nas exposições a menor dose (5 J cm⁻²) nas concentrações 0,450 e 4,500 µM ($P < 0,0001$, para ambas) (Fig. 10B). Isso indica que nas duas maiores concentrações do FS a luz é parcialmente bloqueada e a eficácia do TF é reduzido.

Não houve diferença quando comparados os efeitos das duas doses (comparação da Fig. 10B com a Fig. 10C), nas três concentrações do FS. A IF foi significativamente maior para a maior dose de luz apenas em células não lavadas nas concentrações 0,450 e 4,500 µM ($P < 0,0001$, para ambas).

Os resultados indicaram que a ClAlPc/NE foi extremamente eficaz na IF de células melanizadas de *C. neoformans*, já que baixíssimas concentrações foram suficientes para matar o fungo.

Figura 10 – Efeito das exposições apenas ao FS CIAIPc/NE (A) e dos TF com CIAIPc/NE utilizando-se doses de 5 J cm^{-2} (B) e 10 J cm^{-2} (C) na sobrevivência de células melanizadas da linhagem *C. neoformans* var. *neoformans*. As células (10^7 mL^{-1}) foram pré-incubadas por 30 min com o FS CIAIPc/NE, lavadas ou não com PBS e, posteriormente, expostas à luz. As frações de sobrevivência foram determinadas após 96 h

Os efeitos da IF com ClAlPc/NE na sobrevivência de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* são mostrados na Figura 11. As células (10^7 células mL^{-1}) foram incubadas com o FS ClAlPc/NE ($0,045 \mu\text{M}$) por 30 min, lavadas ou não, para a retirada do FS e, posteriormente, expostas à luz (dose de 5 J cm^{-2}). Não houve diferença significativa entre a tolerância das células melanizadas e não melanizadas ($P = 0,41$ e $0,81$ para as comparações entre células melanizadas e não melanizadas, lavadas e não lavadas, respectivamente).

Figura 11 – Fotoativação de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans* var. *neoformans*. As células (10^7 mL^{-1}) foram incubadas com ClAlPc/NE ($0,045 \mu\text{M}$) por 30 min, lavadas e não lavadas com PBS antes de serem expostas à dose de 5 J cm^{-2} . (A) Após as exposições, $10 \mu\text{L}$ da suspensão de células foram colocados na superfície de meio PDA. As placas foram incubadas no escuro a 28°C por 2 dias. (B) As frações de sobrevivência foram determinadas pela contagem de UFC. Cada valor é a média de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio padrão da média

4.3.4 Avaliação da eficácia do TF com fenotiazínicos nos microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* pela fração de sobrevivência

Microconídios das duas espécies de *Trichophyton* foram incubados com os FS NMBN e S137, nas concentrações de 10 e $1 \mu\text{M}$ e, a seguir, expostos à luz na presença dos FS,

utilizando-se LED96 como fonte de luz. A sobrevivência dos diferentes tratamentos foi calculada em relação aos controles não expostos à luz e nem ao FS.

Exposições apenas à luz (doses de 5, 10 e 20 J cm⁻²) emitida pelo LED96 não mataram os microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* ($P > 0,245$ e $P > 0,246$, respectivamente) (Fig. 12A, Anexo D). Os FS NMBN e S137, nas concentrações de 10 µM e 1 µM, respectivamente, na ausência de luz, não mataram os conídios das duas espécies ($P > 0,05$ para ambas as espécies). O S137 foi tóxico, no escuro, na concentração de 10 µM, matando aproximadamente 50% dos microconídios das duas espécies (dados não mostrados).

Todos os TF (doses de 5, 10 e 20 J cm⁻²) com os dois FS reduziram a sobrevivência dos microconídios das duas espécies de fungos ($P < 0,0001$ para todas as comparações) (Fig. 12B e 12C, Anexo D). Para ambos os FS e para as duas espécies, não houve diferença na sobrevivência entre doses maiores ou iguais a 5 J cm⁻² ($P > 0,05$ para todas as comparações). Também não houve diferença entre a suscetibilidade de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* ao tratamento fotodinâmico com ambos os FS em nenhuma das doses ($P > 0,178$ para todas as comparações entre tratamentos). A redução na sobrevivência foi diretamente proporcional à dose de luz, para ambas as espécies e para os dois FS. O TF, com 10 µM de NMBN e dose de luz de 20 J cm⁻², provocou uma redução de quatro ordens de grandeza na sobrevivência dos microconídios de *T. rubrum*. O mesmo tratamento fotoinativou completamente os conídios de *T. mentagrophytes* (Fig. 12B). O tratamento fotodinâmico, com 1 µM de S137 e dose de luz de 20 J cm⁻², provocou uma redução de três ordens de grandeza na sobrevivência dos microconídios das duas espécies. O TF com o S137, na concentração de 10 µM e nas três doses de luz, fotoinativou completamente os conídios das duas espécies (dados não mostrados).

Figura 12 – Efeito de exposições apenas à luz emitida pelo LED96 (A) e dos TF com o NMBN (10 μM) (B) e S137 (1 μM) (C) na sobrevivência dos microconídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. * Não foram observados sobreviventes neste tratamento. As frações de sobrevivência foram determinadas após 14 dias

4.4 Avaliação da toxicidade e dos efeitos dos TF com fenotiazínicos em células de fibroblastos de camundongo

A toxicidade no escuro e os efeitos dos TF com os FS MB, TBO, NMBN e S137 foram avaliados em células da linhagem L929 de fibroblasto de camundongo. As células foram incubadas com os FS e, a seguir, expostas à dose de 15 J cm^{-2} utilizando-se o LED96 como fonte de luz. A toxicidade celular dos diferentes tratamentos foi avaliada através do teste do MTT. Os resultados são mostrados na Figura 13 (Anexo E).

Células expostas apenas à luz na ausência do FS e células expostas apenas ao FS não foram mortas pelo tratamento. As exceções foram as exposições ao TBO ($10 \mu\text{M}$) e ao NMBN ($2,5$ e $10 \mu\text{M}$) que reduziram significamente a viabilidade (Fig. 13). Os TF com os FS MB e TBO, nas concentrações 1 e $2,5 \mu\text{M}$, não reduziram a viabilidade celular. Os TF com o NMBN e S137, em todas as concentrações, reduziram a viabilidade em, pelo menos, 70%.

Figura 13 – Efeitos de exposições apenas aos FS e dos TF com o MB, TBO, NMBN e S137 (1 , $2,5$ e $10 \mu\text{M}$, 15 J cm^{-2}) na viabilidade de células de fibroblastos de camundongo (L929). A viabilidade foi determinada em relação aos controles não expostos nem à luz e nem aos FS. A viabilidade foi estimada pelo ensaio do MTT

4.5 Avaliação da incorporação e/ou ligação (“uptake”) da CIAIPc/NE a células melanizadas de *C. neoformans*

Para avaliar a quantidade do FS associado às células, células melanizadas de *C. neoformans* foram pré-incubadas com o FS, em diferentes concentrações (0,045; 0,450 e 4,500 μM), lavadas com PBS e tratadas com NaOH-SDS por 24 h. A seguir, o sobrenadante foi diluído em acetonitrila e a concentração do FS recuperado foi determinada por espectrofluorimetria. O número de moléculas do FS por célula fúngica aumentou com o aumento da concentração do FS (Fig. 14). O número de moléculas por célula na concentração de 4,500 μM foi 6 vezes maior do que o número na concentração de 0,045 μM ($P < 0,0001$) e 4 vezes maior do que na concentração 0,450 μM ($P < 0,0001$). A diferença entre o número de moléculas associados às células também foi significativa entre as concentrações de 0,045 e 0,450 μM ($P = 0,046$) (Fig. 14).

Figura 14 – Incorporação e/ou ligação da CIAIPc, em diferentes concentrações do FS (0,045; 0,450 e 4,500 μM), pelas células melanizadas de *C. neoformans* var. *neoformans*. As células (10^8 células mL^{-1}) foram pré-incubadas com o FS por 30 min, lavadas com PBS e tratadas com NaOH-SDS por 24 h. A concentração do FS foi determinada através de espectrofluorimetria. Os valores representam a média de três experimentos independentes e as barras o desvio padrão (* $P < 0,05$, comparando-se as diferentes concentrações)

4.6 Microscopia confocal

A microscopia confocal foi utilizada para determinar a localização da CIAIPc/NE nas células melanizadas de *C. neoformans* (Fig. 15). As células foram pré-incubadas com o FS por 30 min, lavadas com solução de lavagem, fixadas com paraformaldeído (0,5%) por 90 min e, a seguir, lavadas novamente para a montagem das lâminas. As Figuras 15A, 15B e 15C mostram os controles não tratados com FS. As Figuras 15D, 15E e 15F mostram as células tratadas com FS. As imagens 15A e 15D foram obtidas com microscopia confocal, as imagens 15B e 15E com microscopia óptica e 15C e 15F são as sobreposições das imagens (microscopia confocal e microscopia óptica). A maior fluorescência foi observada na periferia das células.

Figura 15 – Localização intracelular da CIAIPc em células melanizadas de *C. neoformans* var. *neoformans*. As células foram pré-incubadas com CIAIPc por 30 min, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 2%. Células não expostas ao CIAIPc (A, B e C) e expostas ao CIAIPc (D, E e F). Figuras A e D imagens obtidas pelo microscópio confocal, B e E pelo microscópio óptico e C e F a sobreposição das figuras A e B, e D e E, respectivamente

5. DISCUSSÃO

Embora extremamente promissora, a inativação fotodinâmica (IF) antimicrobiana encontra-se em fase inicial de desenvolvimento (HAMBLIN; HASAN, 2004; SMIJS et al., 2009; ZEINA et al., 2001). A maioria dos estudos foi conduzido *in vitro* e poucos trabalhos avaliaram a eficácia da inativação fotodinâmica para o tratamento de micoses em animais-modelo ou em humanos (DAI et al., 2011; KHARKWAL et al., 2011; HAMBLIN; HASAN, 2004; KÖMERIK; MacROBERT, 2006; PROPST; LUBIN, 1978; TEICHERT et al., 2002; ZEINA et al., 2001). Alguns estudos mostraram que a IF pode ser utilizada para matar leveduras e fungos filamentosos que causam micoses superficiais ou invasivas em humanos (GONZALES; MAISCH, 2012; CALZAVARA-PINTON et al., 2012; DAI et al. 2012, CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; FRIEDBERG et al., 2001; FUCHS et al., 2007; SMIJS; SCHUITMAKER, 2003), entretanto, até agora, nenhum FS foi licenciado para ser utilizado na terapia fotodinâmica antimicrobiana (CASSIDY et al., 2009; HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006).

As características físicoquímicas da superfície da célula fúngica influenciam a seletividade e a eficácia dos vários FS (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005b; FUCHS et al., 2007; HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI, 2006; PAARDEKOOPEL et al., 1992; SMIJS et al., 2007; SMIJS et al., 2008; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003; USACHEVA et al., 2008). A parede celular dos fungos protege a célula do meio ambiente. Na maioria dos casos, a parede das leveduras apresenta carga negativa e é constituída principalmente por glucanas, *n*-acetilglicosamina e nanoproteínas. Pigmentos, como melaninas, também podem estar presentes na parede (FUCHS et al., 2007; WANG; AISEN; CASADEVALL, 1996). Externamente à parede, algumas leveduras, como *C. neoformans*, apresentam uma espessa cápsula polissacarídica, constituída principalmente por glucuronoxilomanana (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). As

características estruturais e fisicoquímicas (por exemplo, composição química, carga eletrostática, hidrofobicidade) da parede diferem muito entre diferentes fases do desenvolvimento e entre diferentes espécies (GONZALES et al., 2010).

A eficiência da inativação fotodinâmica de microrganismos e a utilização da técnica para o controle de diferentes espécies dependem do desenvolvimento de novos FS que se acumulem seletivamente na célula microbiana, em comparação com as células do hospedeiro. As ftalocianinas estão entre os FS de segunda geração mais promissores para o tratamento de câncer e também demonstraram ser capazes de fotoinativar células de fungos (BERTOLONI et al., 1992; MANTAREVA et al., 2007; NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004; PAARDEKOOOPER et al., 1994; PAARDEKOOOPER et al., 1995). Entre as metalo-ftalocianinas, as zinco e as cloroalumínio ftalocianinas apresentam as características fotofísicas mais favoráveis (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004). Infelizmente, essas ftalocianinas são insolúveis em água ou em solventes biocompatíveis, exigindo que as mesmas sejam apropriadamente veiculadas para serem utilizadas em sistemas biológicos. A CIAIPc utilizada nesse trabalho foi veiculada em nanoemulsão.

Além da escolha do FS mais apropriado para cada espécie e/ou estrutura, a eficácia da inativação fotodinâmica antimicrobiana também depende de estudos nos quais são determinados parâmetros (como por exemplo, concentração do FS, dose e fonte de luz) mais apropriados para a fotoinativação (CALZAVARA-PINTON et al., 2012; KHARKWAL et al., 2011; FUCHS et al., 2007; GONZALES et al., 2010). A realização de experimentos iniciais em microplacas, nos quais o efeito fotodinâmico foi avaliado através da inibição do crescimento e da concentração inibitória mínima (CIM), foi muito conveniente, pois permitiu avaliar um grande número de tratamentos (foram avaliados os efeitos de diversos FS, em várias concentrações, utilizando-se diferentes fontes de luz, com várias doses por fonte, em diversas espécies de leveduras). Esse tipo de experimento é mais rápido e tem uma execução

mais fácil do que os experimentos baseados na contagem das unidades formadoras de colônia. Na etapa inicial, foram identificados os tratamentos mais eficazes para as diferentes espécies e determinados os parâmetros mais apropriados para a inativação fotodinâmica utilizados nos experimentos complementares.

Exposições simultâneas à luz emitida pelos LED brancos e aos FS fenotiazínicos mostraram que o NMBN, em baixas concentrações, e na menor dose de luz utilizada (5 J cm^{-2}), foi capaz de matar todas as espécies, avaliadas. O MB e o TBO foram menos eficazes do que o NMBN. Trabalhos anteriores que compararam a eficácia de FS fenotiazínicos mostraram que o NMBN foi o FS mais eficaz na inativação fotodinâmica de bactérias e fungos (DAI et al., 2011; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005b; RAGÀS et al., 2010; WAINWRIGHT et al., 2001). Dentre as diferentes espécies e variedades testadas, *C. glabrata* foi a mais tolerante à inativação fotodinâmica com fenotiazínicos. Como essa espécie é considerada a segunda maior causa de candidemia nos EUA e é resistente aos principais antifúngicos utilizados (ZIMBECK et al., 2010), a inativação fotodinâmica poderá ser uma alternativa interessante aos fungicidas convencionais para o tratamento de micoses causadas pelo fungo. O espectro de emissão da fonte de luz é um importante fator para a eficácia da fotossensibilização. Além de LED emissores de luz branca, também foram utilizados, como fonte de luz, LED que emitem luz em uma faixa espectral (590-690 nm) na qual encontram-se as absorções máximas dos fenotiazínicos (MB: λ_{max} 665 nm; TBO: λ_{max} 636 nm, NMBN: λ_{max} 630 nm, S137: λ_{max} 687 nm) e, portanto, são mais eficientes para a excitação desse grupo de FS. Os resultados mostraram que, com essa fonte de luz (LED600), doses de 5 J cm^{-2} foram suficientes para fotoinativar todas as espécies, independentemente do fenotiazínico utilizado, embora a CIM tenha variado bastante entre os diferentes FS. O NMBN e o S137 foram mais eficazes em menores concentrações (apresentaram menores CIM) do que o MB e o TBO. O S137 foi o FS que apresentou a maior fototoxicidade no escuro. Embora os fenotiazínicos

estejam entre os FS mais estudados (WAINWRIGHT; BYRNE; GATTRELL, 2006; WAINWRIGHT; MOHR; WALKER, 2007), apenas Rodrigues e col. (2012b) avaliaram a inativação fotodinâmica de fungos filamentosos com NMBN e S137. O presente trabalho foi o primeiro a determinar a toxicidade desses dois compostos em células animais. A obtenção desses dados é fundamental para a utilização desses compostos em modelos animais. Um fator que pode ser atribuído ao sucesso da utilização de fenotiazínicos é à interação entre as cargas negativas da parede dos diferentes fungos e as cargas positivas desse grupo de FS. Os resultados do potencial zeta confirmaram a presença de cargas negativas na superfície das diferentes espécies testadas.

A CIAIPc/NE foi muito eficiente para a fotoinativação da maioria das espécies de *Candida* e para as duas variedades de *Cryptococcus*. Quando o LED600 foi utilizado como fonte de luz, doses acima de 20 J cm^{-2} mataram *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e as duas variedades de *Cryptococcus neoformans*. Nessa dose, a CIM variou de $0,01 \text{ }\mu\text{M}$ (para as duas variedades de *Cryptococcus*) a $0,45 \text{ }\mu\text{M}$ para *C. krusei*. Apenas *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foram tolerantes à inativação fotodinâmica em todas as concentrações do FS e em todas as doses de luz testadas (5 a 30 J cm^{-2}). A menor dose de luz (5 J cm^{-2}) não foi suficiente para inibir nenhuma das linhagens testadas. Isso ocorreu, provavelmente, porque o FS dificultou a penetração da luz, que, nessa dose, foi o fator limitante para a inativação fotodinâmica. Paardekooper e col. (PAARDEKOOOPER et al., 1994; PAARDEKOOOPER et al., 1995) verificaram que a CIAIPc (o FS foi solubilizado em DMSO antes de ser misturado à suspensão de células) fotoinativou a levedura *Kluyveromyces marxianus*. A morte celular foi atribuída ao comprometimento da síntese de proteínas. A fotoinativação de leveduras utilizando ftalocianinas não selecionou linhagens resistentes e o tratamento com esse FS foi mais tóxico para as células de leveduras do que para os queratinócitos. Efeitos mutagênicos

não foram observados em *C. albicans* e *K. marxianus* (DONNELLY; MCCARRON; TUNEY, 2008).

Poucos estudos desmonstram os efeitos da inativação fotodinâmica em espécies de *Cryptococcus*. Soares e col. (2011) reportaram que isolados de *Cryptococcus gattii* apresentaram uma susceptibilidade variável a inativação fotodinâmica com o FS TBO *in vitro*. Fuchs e col. (2007) fotoinativaram células de uma linhagem selvagem e células de uma linhagem mutante, que apresentava alterações na constituição da parede celular. Os resultados mostraram que a susceptibilidade de *Cryptococcus* a fotossensibilização está associada com a integridade da parede celular. Como FS, foi utilizado a clorina (e6). Prates e col. (2011a) demonstraram que a cápsula de *C. neoformans* protege a célula contra espécies reativas de oxigênio geradas pelo tratamento fotodinâmico com MB, rosa bengala e pL-ce6 (poli-L-lisina clorina conjugada).

Apesar das vantagens dos experimentos iniciais conduzidos em microplacas, a avaliação da sobrevivência através da contagem de unidades formadoras de colônias ainda é o método mais indicado em microbiologia (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005a; FUCHS et al., 2007). Todos os tratamentos fotodinâmicos (diferentes doses e diferentes fontes de luz) com os FS NMBN e S137 reduziram a sobrevivência das espécies de *Candida* e das duas espécies de *Trichophyton*. Quando a eficácia da IF foi avaliada por meio da sobrevivência, o FS S137 reduziu a sobrevivência de todas as espécies, em pelo menos três ordens de grandeza. O S137 é um novo derivado do MB, recentemente sintetizado e ainda não está disponível no mercado.

Os efeitos do tratamento fotodinâmico, *in vitro*, com MB e TBO na sobrevivência de espécies de *Candida* foi anteriormente descrito e os resultados variaram dependendo das condições experimentais. A redução na sobrevivência de *C. albicans* após o tratamento fotodinâmico com MB variou de 59% a 2,7 log₁₀ (WILSON; MIA, 1993; SOUZA et al., 2010; JACKSON et al., 1999). Reduções de 84,8%, 91,6% e 82,3% foram observadas após o

tratamento fotodinâmico com MB em *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, respectivamente (DE SOUZA et al., 2006). Neste estudo, o tratamento fotodinâmico com TBO foi mais efetivo para as espécies de *Candida* do que o MB. Foram observadas reduções, entre uma a cinco ordens de grandeza, na sobrevivência de *C. albicans* após o tratamento fotodinâmico com TBO (WILSON; MIA, 1993; JACKSON et al., 1999; SOARES et al., 2009). Os efeitos do tratamento fotodinâmico com TBO também foram estudados em outras espécies de *Candida*. Wilson e Mia (1993) relataram uma redução de 65%, 63% e 40% na viabilidade de *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* e *C. kefyr*, respectivamente, enquanto Soares e col. (2009) observaram reduções de 2 log₁₀ para *C. parapsilosis* e 1,95 log₁₀ para *C. tropicalis*. Em um trabalho recente, Dai e col. (2011) também verificaram os efeitos fotodinâmicos *in vitro* dos FS MB, TBO e NMBN em *C. albicans*. Este grupo relatou uma redução mínima na sobrevivência de *C. albicans* utilizando 20 µM de MB e TBO, enquanto o NMBN reduziu aproximadamente 4 logs, utilizando um dose de luz de 9,75 J cm⁻². Os autores também observaram que a eficácia do tratamento fotodinâmico com NMBN estava relacionada com a proporção entre a concentração do FS e a concentração de células fúngicas. Quando a concentração celular foi aumentada de 10⁷ a 10⁸ UFC mL⁻¹, a eficácia do tratamento foi drasticamente reduzida e a fração de sobrevivência foi de aproximadamente 70%, utilizando-se a mesma dose de luz. No presente trabalho, foi observado que tanto o NMBN como o S137 inibiram o crescimento de todas as espécies de *Candida* em concentrações de 5 µM e dose de luz de 5 J cm⁻² e concentração celular de 5 × 10³ células mL⁻¹. Quando a eficácia da IF foi avaliada pela fração da sobrevivência, o TF com o FS S137 resultou em reduções entre 3 e 4 ordens de grandeza em quatro das cinco espécies de *Candida* testadas. O tratamento fotodinâmico com NMBN resultou em reduções entre uma (*C. krusei*) a aproximadamente 3 ordens de grandeza (*C. parapsilosis*). *C. krusei* foi a espécie mais tolerante ao tratamento fotodinâmico.

A avaliação da toxicidade dos FS fenotiazínicos em cultura de células, utilizando os melhores parâmetros para fotoinativar as diferentes espécies estudadas, revelaram a alta toxicidade dos FS NMBN e S137 quando expostos a luz. Baixas concentrações de MB e TBO, quando expostos a luz, não diminuíram a viabilidade celular de fibroblastos da linhagem L929. O estudo da citotoxicidade dos FS MB e TBO, em diferentes tipos celulares, mostra que estes FS poderão ser seguramente utilizados para fotoinativar microrganismos sem causar danos às células do hospedeiro (XU et al., 2009; ZEINA et al., 2002; ZEINA et al., 2003; TANAKA et al., 2012; SOUKOS et al., 1996).

Adicionalmente, os experimentos baseados nas UFC permitiram estimar a sobrevivência das células fúngicas após o tratamento fotodinâmico com 4 ordens de grandeza a mais do que os experimentos conduzidos em microplacas (10^7 ao invés de 10^3). A atividade fotodinâmica da ClAlPc/NE em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e em células melanizadas de *C. neoformans*, utilizando-se laser com fonte de luz, foi avaliada através de experimentos baseados na contagem de UFC. O TF com todas as concentrações e doses de luz reduziu a sobrevivência das duas espécies de *Candida* em até 4 ordens de grandeza. Nestes experimentos foram utilizadas células melanizadas de *C. neoformans*, porque a melanização aumenta a tolerância de *Cryptococcus* a diversos fatores ambientais indutores de estresse, incluindo, fungicidas e espécies reativas de oxigênio (IKEDA et al., 2003; JACOBSON; TINNELL, 1993; VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; WANG; AISEN; CASADEVALL, 1994; WANG; CASADEVALL, 1995). Nossos resultados indicaram que não houve diferença na tolerância a IF entre células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*. Como estas comparações foram realizadas utilizando-se apenas uma dose de luz (5 J cm^{-2}) e uma concentração do FS ($0,045 \text{ }\mu\text{M}$), há a possibilidade de se observar diferenças entre melanizadas e não melanizadas utilizando-se outras combinações de doses de luz e concentrações de FS.

Experimentos simples permitem obter informações importantes a respeito do tipo de interação entre a célula e o FS. Por exemplo, se a atividade fotodinâmica não é inibida pela lavagem das células antes da exposição à luz, provavelmente ocorreu a ligação do FS à parede celular ou à sua entrada na célula. Os estudos anteriores mostraram que existem FS que ligam-se fortemente e penetram na célula fúngica, que ligam-se fortemente e não penetram, que ligam-se fracamente e que não se ligam (FUCHS et al., 2007; GONZALES et al., 2010; SMIJS et al., 2008). A lavagem antes da exposição à luz, para a retirada da CIAIPc/NE não ligada às células, não impediu a fotoinativação das células melanizadas de *C. neoformans*, indicando que ocorreu a ligação ou a internalização do FS. Através dos experimentos de fluorimetria foi possível estimar o número de moléculas do FS associado a cada célula. Conforme esperado, o número aumentou com o aumento da concentração do FS. Estudos anteriores mostraram que a lavagem reduziu a atividade fotodinâmica de ftalocianinas em células de *S. aureus* e *C. albicans* (BERTOLONI et al., 1992; MANTAREVA et al., 2007). A internalização da CIAIPc/NE foi confirmada por microscopia confocal, embora não tenha sido possível associar a localização do FS a uma estrutura celular específica.

Os microconídios de dermatófitos são estruturas notavelmente tolerantes aos fungicidas tradicionais e também são as estruturas fúngicas, normalmente, responsáveis pela reinfecção do hospedeiro (SMIJS et al., 2004). Qualquer tratamento que vise à cura de dermatomicoses causadas por *Trichophyton* requer, portanto, necessariamente, que seja capaz de matar microconídios. Nós avaliamos o efeito do tratamento fotodinâmico com dois FS fenotiazínicos, o MB e o TBO, que já foram utilizados anteriormente para a IF de fungos filamentosos e dois FS desse grupo, o NMBN e o S137, que ainda não haviam sido testados. Todos os FS foram capazes de fotoinativar os microconídios das duas espécies de *Trichophyton*. Como observado com *Candida*, o FS que apresentou a menor CIM, para as duas espécies, foi o S137. O tratamento fotodinâmico com o NMBN, na concentração de 10

μM e dose de luz de 20 J cm^{-2} , reduziu a sobrevivência de *T. rubrum* em quatro ordens de grandeza e fotoinativou completamente os microconídios de *T. mentagrophytes*. O tratamento fotodinâmico com S137 na concentração de $10 \mu\text{M}$ foi mais eficaz, fotoinativando completamente os conídios das duas espécies (dados não mostrados) em todas as doses de luz testadas. O S137, na concentração de apenas $1 \mu\text{M}$, provocou uma redução de três ordens de grandeza na sobrevivência das duas espécies.

A eficácia dos novos derivados dos fenotiazínicos também está sendo investigada em outras espécies de microrganismos. Dai e col. (2011) reportaram que o tratamento fotodinâmico com o novo azul de metileno foi mais efetivo contra células de *C. albicans* do que os FS MB e TBO. O FS S137, utilizado no presente estudo, foi considerado um fotobactericida altamente eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium acnes* quando comparado com o MB (WAINWRIGHT et al., 2012).

Poucos trabalhos avaliaram o efeito do tratamento fotodinâmico em dermatófitos. Propst & Lubin (1978) reportaram que o tratamento fotodinâmico de *Trichophyton mentagrophytes* com MB, na concentração de 3 mM , provocou uma mortalidade de aproximadamente 65% em uma suspensão constituída por conídios e fragmentos de micélio. A suspensão foi exposta por dez minutos à irradiância de 1800 W cm^{-2} , emitida por uma lâmpada fluorescente branca. Ouf et al. (2003) avaliaram o efeito dos FS MB e TBO em sete espécies de dermatófitos, incluindo *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, que também foram avaliadas no presente estudo. Os autores reportaram que o MB, na concentração de $1000 \mu\text{M}$, foi capaz de inibir completamente a germinação dos conídios de *T. mentagrophytes* e que o TBO, na concentração de $0,1 \mu\text{M}$, inibiu 86 e 66% a germinação dos conídios de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, respectivamente. Entretanto, como as avaliações basearam-se na análise de, no máximo, 200 conídios, a inibição foi avaliada com apenas duas ordens de grandeza. Nossos resultados indicaram que, utilizando-se fontes de luz mais apropriadas para

a ativação dos FS fenotiazínicos, como os LED vermelhos, e FS mais eficientes, como o NMBN e o S137, é possível melhorar a eficiência da IF para matar os microconídios de dermatófitos. A alta eficácia da inativação dos conídios das duas espécies torna a IF uma alternativa interessante aos fungicidas convencionais para o tratamento de micoses causadas por essas duas espécies de dermatófitos.

Os resultados desse estudo confirmaram a eficácia dos FS fenotiazínicos, como o MB e o TBO, para a inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e de duas espécies de *Trichophyton*; indicaram que novos FS desse grupo como, o NMBN e o S137, são mais eficientes para a inativação fotodinâmica de todas as espécies de *Candida* testadas e para as duas variedades de *C. neoformans* e demonstraram que a ClAlPc/NE foi capaz de fotoinativar *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e as duas variedades de *Cryptococcus*, o que abre a perspectiva da utilização desse FS no controle de micoses causadas por essas espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

AL-RUBEAI, M.; EL-HASSI, M. Inactivation of wild type and mutant *Aspergillus nidulans* conidia by far-UV, near-UV, visible and sun lights. **Environmental and Experimental Botany**, v. 26, p. 243-252, 1986.

ALY, R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 21-25, 1994.

ARAÚJO, S. C.; MATTOS, A. C. A.; TEIXEIRA, H. F.; COELHO, P. M. Z.; NELSON, D. L.; OLIVEIRA, M. C. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 307-315, 2007.

BERTOLONI, G.; ROSSI, F.; VALDUGA, G.; JORI, G.; ALI, H.; VAN LIER, J. E. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. **Microbios**, v. 71, p. 22-46, 1992.

BLISS, J. M.; BIGELOW, C. E.; FOSTER, T. H.; HAIDARIS, C. G. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, v. 6, p. 2000-2006, 2004.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1795-1805, 1988.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n.2, p. 418-422, 2006.

BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 734-739, 2001a.

BRAGA, G. U.; FLINT, S. D. MESSIAS, C. L., ANDERSON, A. J., ROBERTS, D. W. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 2, p. 140-146, 2001b.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 3, p. 173-186, 2002.

CALZAVARA-PINTON, P.; ROSSI, M. T.; SALA, R.; VENTURINI, M. Photodynamic antifungal chemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 512-522, 2012.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2005.

CASSIDY, C. M.; TUNNEY, M. M.; MCCARRON, P. A., DONNELLY, R. F. Drug delivery strategies or photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, p. 71-80, 2009.

DAGUE, E., DELCORTE, A., LATGE' J.-P.; DUFRÊNE, Y. F. Combined use of atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, and secondary ion mass spectrometry for cell surface analysis. **Langmuir**, v. 24, n. 7, p. 2955-2959, 2008.

DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; PRATES, R. A.; ASTRAKAS, C.; DENIS, T. G. S.; RIBEIRO, M. S.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 120, p. 1-16, 2012.

DAI, T.; ARCE, V. J. B.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Blue dye and red light, a dynamics combination for prophylaxis and treatment fo cutaneous *Candida albicans* infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5710-5717, 2011.

DE PAULA, L. F.; SANTOS, R. O.; MENEZES, H. D.; DE BRITTO, J. R.; VIEIRA JR., J. B.; GONTIJO FILHO, P. P.; DE OLIVEIRA, C. A. A comparative study of irradiation systems for photoinactivation of microorganisms. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 4, p. 694-700, 2010.

DE SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. Photosensitization of diferente *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, n. 1, p. 34-38, 2006.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005a.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6918-6925, 2005b.

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

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

EISENMAN, H. C.; NOSANCHUK, J. D.; WEBBER, J. B. W.; EMERSON, R. J.; CAMESANO, T. A.; CASADEVALL, A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3683-3693, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A.; FOTHERGILL, A.; GHANNOUM, M.; MANAVATHU, E.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PFALLER, M.; RINALDI, M.; SCHELL, W.; WALSH, T. Quality control and reference guidelines for CSLI broth microdilution susceptibility method (M-38-A Document) for amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5243-5246, 2005.

FRASES, S.; SALAZAR, A.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 615-621, 2007.

FRIEDBERG, J. S.; SKEMA, C.; BAUM, E. D.; BURDICK, J.; VINOGRADOV, S. A.; WILSON, D. F.; HORAN, A. D.; NACHAMKIN, I. *In vitro* effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 105-107, 2001.

FUCHS, B. B.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2929-2936, 2007.

GABRIEL, M.; KOPECKÁ, M.; YAMAGUCHI, M.; SVOBODA, A.; TAKEO, K.; YOSHIDA, S.; OHKUSU, M.; SUGITA, T.; NAKASE, T. The cytoskeleton in the unique cell reproduction by conidiogenesis of the long-neck yeast *Fellomyces (Sterigmatomyces) fuzhouensis*. **Protoplasma**, v. 229, p. 33-44, 2006.

GIRARDIN, H.; PARIS, S.; RAULT, J.; BELLON-FONTAINE, M. N.; LATGÉ, J. P. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 364-369, 1999.

GOMER, C. J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 6, p. 1093-1107, 1991.

GONZALES, F. P.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Fungal Biology**, v. 116, p. 1-10, 2012.

GONZALES, F. P.; SILVA, S. H.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 3, p. 653-661, 2010.

GORMAN, S. A.; BROWN, S. B.; GRIFFITHS, J. An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 79-108, 2006.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemistry and Photobiology Sciences**, v. 3, p. 436-450, 2004.

HAMBLIN, M. R.; O'DONNELL, A.; MURTHY, N.; CONTAG, C. H.; HASAN, T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by *in vivo* bioluminescence imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 1, p. 51-57, 2002.

HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitizers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 615-627, 2006.

HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 2-15, 2008.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 591-596, 2001.

HEITMAN, J.; LIN, X. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **The Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105, 2006.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does Photodynamic therapy work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

HOCKBERGER, P. E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 6, p. 561-579, 2002.

HOLZHEIMER, R. G.; DRALLE, H. Management of mycoses in surgical patients - review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 7, n. 5, p. 200-226, 2002.

HUANG, L.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. **Methods in Molecular Biology**, v. 635, p. 155-173, 2010.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of tetrasulfonated silicon and germanium phthalocyanines in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 197, p. 273-280, 2008.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminium phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 188, p. 200-206, 2007.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology Immunology**, v. 47, p. 271-277, 2003.

ILKIT, M; GUZEL, A. B. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: A mycological perspective. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 250-261, 2011.

ITO, T. Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 25, n. 1, p. 47-53, 1977.

JACKSON, Z.; MEGHJI, S.; MACROBERT, A.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. **Lasers in Medical Science**, v. 14, n. 2, p. 150-157, 1999.

JACOBSON, E. S.; IKEDA, R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. **Medical Mycology**, v. 43, n. 4, p. 327-333, 2005.

JACOBSON, E. S.; TINELL, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 7102-7104, 1993.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 505-520, 2006.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.

KHARKWAL, G. B.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p. 755-767, 2011.

KIM, J; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.

KOCHEVAR, I. E.; LAMBERT, C. R.; LYNCH, M. C.; TEDESCO, A. C. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1280, n. 2, p. 223-230, 1996.

KÖMERIK, N.; MacROBERT, A. J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, p. 618-623, 2006.

KÖMERIK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 618-623, 2002.

LAMBRECHTS, S. A. G.; SCHWARTZ, K. R.; AALDERS, M. C. G.; DANKERT, J. B. Photodynamic inactivation of fibroblasts by cationic porphyrin. **Lasers in Medical Science**, v. 20, p. 62-67, 2005.

LEIGH, J. E.; SHETTY, K.; FIDEL, P. L. Oral opportunistic infections in HIV-positive individuals: review and role of mucosal immunity. **AIDS patient care and STDs**, v. 18, n. 8, p. 443-456, 2004.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina**, v. 39, n. 12, p. 1137-1150, 2003.

MACMILLAN, J. D.; MAXWELL, W. A.; CHICHESTER, C. O.; Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser. **Photochemistry and Photobiology**, v. 5, n. 7, p. 55-65, 1966.

MAISCH, T.; SZEIMIES, R. M.; JORI, G.; ABELS, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 10, p. 907-917, 2004.

MANTAREVA, V.; KUSSOVSKI, V.; ANGELOV, I.; BORISOVA, E.; AVRAMOV, L.; SCHNURPFEL, G.; WÖHRLE, D. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 4829-4835, 2007.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. 5ª Edição. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons. p. 557, 2001.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

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

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OUF, S. A.; ABDEL-KADER, M. H.; SHOKEIR, H. A.; EL-ADLY, A. A. Study of solar photosensitization processes on dermatophytic fungi. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 52, n. 1, p. 65-79, 2003.

PAARDEKOOPEL, M.; VAN GOMPEL, A. E.; VAN STEVENINCK, J.; VAN DEN BROEK, P. J. A. The effect of photodynamic treatment of yeast with the sensitizer chloroaluminum phthalocyanine on various cellular parameters. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, p. 561-567, 1995.

PAARDEKOOPEL, M.; VAN GOMPEL, A. E.; DE BONT, H. J. G. M.; NAGELKERKE, J. F.; VAN STEVENINCK, J.; VAN DEN BROEK, P. J. A. Photodynamic treatment of yeast with chloroaluminum-phthalocyanine: role of the monomeric form of the dye. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 2, p. 161-166, 1994.

PAARDEKOOPEL, M.; VAN DEN BROEK, P.; DE BRUIJNE, A.; ELFERINK, J.; DUBBELMAN T.; VAN STEVENINCK, J. Photodynamic treatment of yeast cells with the dye toluidine blue: all-or-none loss of plasma membrane barrier properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1108, p. 86-90, 1992.

PARIS S.; DEBEAUPUIS, J. P.; CRAMERI, R.; CAREY, M.; CHARLÈS, F. PRÉVOST, M. C.; SCHMITT, C.; PHILIPPE, B.; LATGÉ, J. P. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1581-1588, 2003.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.

PHILIP, A.; ODABASI, Z.; RODRIGUEZ, J.; PAETZNICK, V. L.; CHEN, E.; REX, J. H.; OSTROVSKY-ZEICHNER, L. *In vitro* synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3572-3574, 2005.

PRATES, R. A.; HAMBLIN, M. R.; KATO, I. T.; FUCHS, B.; MYLONAKIS, E.; RIBEIRO, M. S.; TEGOS, G. *Cryptococcus neoformans* capsule protects cell from oxygen reactive species generated by antimicrobial photodynamic inactivation. **Proceedings of SPIE**, v. 7887, 2011a.

PRATES, R. A.; KATO, I. T.; RIBEIRO, M. S.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1525-1532, 2011b.

PRIMO, F. L.; BENTLEY M.V. L. B.; TEDESCO A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan[®]/Nanoemulsion (NE) applicable to Photodynamic Therapy skin cancer treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 340-347, 2008.

PROPST, C.; LUBIN, L. *In vitro* and *in vivo* photosensitized inactivation of dermatophyte fungi by heterocyclic dyes. **Infection and Immunity**, v. 20, n. 1, p. 136-141, 1978.

RAGÀS, X.; DAI, T.; TEGOS, G. P.; AGUT, M.; NONELL, S.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, p. 384-390, 2010.

REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 729-759, 2004.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 1995.

RIBEIRO, A. P. D.; PAVARINA, A. C.; TRINDADE, F. Z.; INADA, N. M., BAGNATO, V. S.; COSTA, C. A. S. Photodynamic therapy associating Photogem[®] and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. **Cell Biology International**, v. 34, n. 4, p. 343-351, 2010.

RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; BRAGA, G. U. L. *In vitro* photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* melanized cells with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 440-447, 2012a.

RODRIGUES, G. B.; FERREIRA, L. K. S.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 116, p. 89-94, 2012b.

ROSAS, Á. L.; CASADEVALL, A. Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. **Mycopathologia**, v. 151, p. 53-56, 2000.

RUHNKE, M.; RICKERTS, V.; CORNELLY, O. A.; BUCHHEIDT, D.; GLÖCKNER, A.; HEINZ, W.; HÖHL, R.; HORRÉ, R.; KARTHAUS, M.; KUJATH, P.; WILLINGER, B.; PRESTERL, E.; RATH, P.; RITTER, J.; GLASMACHER, A.; LASS-FLÖRL, C.; GROLL, A. H. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German speaking mycological society and the Paul-Ehrlich-Society for chemotherapy. **Mycoses**, v. 54, p. 279-310, 2011.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, 2000.

SCHIAVE, L. A.; PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Variability in UVB tolerances of melanized and nonmelanized cells of *Cryptococcus neoformans* and *C. laurentii*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 205-213, 2009.

SHAH, F. A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C. J.; BUTT, T. M. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, n. 1, p. 60-66, 2007.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; van LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 11, p. 507-517, 1999.

SHIMIZU, M.; EGASHIRA, T.; TAKAHAMA, U. Inactivation of *Neurospora crassa* conidia by singlet molecular oxygen generated by a photosensitized reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 2, p. 293-296, 1979.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. P. F. Validated spectroscopic methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanoemulsions and nanocapsules useful for cancer treatment by PDT. **Luminescence**, v. 23, p. 268-269, 2008.

SMIJS, T. G.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 556-560, 2003.

SMIJS, T. G.; VAN DER HASS, R. N.; LUGTENBURG, J.; LIU, H.; DE JONG, R. L.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 2, p. 197-202, 2004.

SMIJS, T. G. M.; BOUWSTRA, J. A.; TALEBI, M.; PAVEL, S. Investigation of conditions involved in the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 750-759, 2007.

SMIJS, T. G. M.; MULDER, A. A.; PAVEL, S.; ONDERWATER, J. J. M.; KOERTEN, H. K.; BOUWSTRA, J. A. Morphological changes of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* after photodynamic treatment: a scanning electron microscopy study. **Medical Mycology**, v. 46, n. 4, p. 315-325, 2008.

SMIJS, T. G. M.; PAVEL, S.; TALEBI, M.; BOUWSTRA, J. A. Preclinical studies with 5,10,15-tris(4-methylpyridinium)-20-phenyl-[21H,23H]-porphine trichloride for the photodynamic treatment of superficial mycoses caused by *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 3, p. 733-739, 2009.

SMIJS, T. G. M., PAVEL, S. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 1, p. 2-13, 2011.

SOARES, B. M.; DA SILVA, D. L.; SOUZA, G. R.; AMORIM, J. C.; DE RESENDE, M. A.; PINOTTI, M.; CISALPINO, P. S. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 94, n. 1, p. 65-70, 2009.

SOARES, B. M.; ALVES, O. A.; FERREIRA, M. V.; AMORIM, J. C.; SOUSA, G. R.; SILVEIRA, L. B.; PRATES, R. A.; AVILA, T. V.; BALTAZAR, L. M.; DE SOUZA, D. G.; SANTOS, D. A.; MODOLO, L. V.; CISALPINO, P. S.; PINOTTI, M. *Cryptococcus gattii*: *in vitro* susceptibility to photodynamic inactivation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 2, p. 357-364, 2011.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Review Iberoamerican Micology**, v. 14, n. 2, p. 42-43, 1997.

SOUKOS, N. S.; WILSON, M.; BURNS, T.; SPEIGHT, P. M. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 18, n. 3, p. 253-259, 1996.

SOUKOS, N. S.; FYVIE, L. A. X.; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2595-2601, 1998.

SOUZA, R. C.; JUNQUEIRA, J. C.; ROSSONI, R. D.; PEREIRA, C. A.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. C. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers in Medicine Science**, v. 25, p. 385-389, 2010.

SOUZA, R. C.; JUNQUEIRA, J. C.; ROSSONI, R. D.; PEREIRA, C. A.; MUNIN, E.; JORGE, A. O. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2009.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 667-675, 2003.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15245-15250, 2001.

STRAKHOVSKAYA, M. G.; ZHUKHOVITSKII, V. G.; MIRONOV, A. F.; SEREGIN, A. M.; STRANADKO, E. F.; RUBIN, A. B. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. **Doklady. Biochemistry and Biophysics**, v. 384, p. 155-158, 2002.

TANAKA, M.; KINOSHITA, M.; YOSHIHARA, Y.; SHINOMIYA, N.; SEKI, S.; NEMOTO, K.; HIRAYAMA, T.; DAI, T.; HUANG, L.; HAMBLIN, M. R.; MORIMOTO, Y. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 1, p. 227-232, 2012.

TEGOS, G. P.; DEMIDOVA, T. N.; ARCILA-LOPES, D.; LEE, H.; WHARTON, T.; GALI, H.; HAMBLIN, M. R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 10, p. 1127-1135, 2005.

TEGOS, G. P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; HIGGINBOTHAM, A.; STERMITZ, F. R.; HAMBLIN, M. R. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3202-3209, 2008.

TEICHERT, M. C.; JONES, J. W.; USACHEVA, M. N.; BIEL, M. A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 93, n. 2, p. 155–160, 2002.

TIJSEN, J. P. F.; BEEKES, H. W.; VAN STEVENINCK, H. W. Localization of polyphosphates at the outside of the yeast cell plasma membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 649, n. 3, p. 529–532, 1981.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; USACHEV, Y. M.; SIEVERT, C. E.; BIEL, M. A. Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 1, p. 55-61, 2008.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 165–173, 2001.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 311–319, 2003.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.3394-3400, 2002.

VAZQUEZ, J. A. Invasive oesophageal candidiasis: current and developing treatment options. **Drugs**, v. 63, n. 10, p. 971-989, 2003.

VENEZIO, F. R.; VINCENZO, C. D.; SHERMAN, R.; REICHMAN, M.; ORIGINANO, T. C.; THOMPSON, K.; REICHMAN, O. H. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 1, p. 166-169, 1985.

VERA, J. R.; CERVERA, L. A. Advantages and disadvantages of topical antifungal agents. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 14, n. 3, p. 232-237, 2001.

WAINWRIGHT, M. 'Safe' photoantimicrobials for skin and soft-tissue infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 14-18, 2010.

WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 4, p. 381-394, 2000.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 25, n. 5, p. 351-359, 1996.

WAINWRIGHT, M.; BRANDT, S. D.; SMITH, A.; STYLES, A.; MEEGAN, K.; LOUGHRAN, C. Phenothiazinium photosensitisers VII: Novel substituted asymmetric *N*-benzylphenothiaziniums as photoantimicrobial agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 99, n. 2, p. 74-77, 2010.

WAINWRIGHT, M.; BYRNE, M. N.; GATTRELL, M. A. Phenothiazinium-based photobactericidal materials. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 227-230, 2006.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Photosensitizing agents-circumventing resistance and breaking down films: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 53, n. 2, p. 119-126, 2004.

WAINWRIGHT, M.; MOHR, H.; WALKER, W. H. Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 1, p. 45-58, 2007.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; SMILLIE, T. E.; WAREING, D. R. Phenothiaziniums as putative photobactericidal agents for red blood cell concentrates. **Journal of Chemotherapy**, v. 13, n. 5, p. 503-509, 2001.

WAINWRIGHT, M.; SMALLEY, H.; SCULLY, O.; LOTFIPOUR, E. Comparative photodynamic evaluation of new phenothiazinium derivatives against *Propionibacterium acnes*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 523-526, 2012.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. Melanin, melanin "ghosts" and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2420-2424, 1996.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3864-3866, 1994.

WEYENBERG, W.; FILEV, P.; DEN PLAS, D. V.; VANDERVOORT, J.; DE SMET, K.; SOLLIE, P.; LUDWIG, A. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-1, p. 291-298, 2007.

WILSON, M.; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 22, n. 8, p. 354-357, 1993.

XU, Y.; YOUNG, M. J.; BATTAGLINO, R. A.; MORSE, L. R.; FONTANA, C. R.; PAGONIS, T. C.; KENT, R.; SOUKOS, N. S. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 1, p. 1567-1572, 2009.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W. M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 2, p. 274-278, 2001.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; CORRY, D.; PURCELL, W. M. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vitro*. **British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 4, p. 568-573, 2002.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; CORRY, D.; PURCELL, W. M. Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes *in vitro*. **British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 2, p. 229-232, 2003.

ZIMBECK, A. J.; IQBAL, N.; AHLQUIST, A. M.; FARLEY, M. M.; HARRISON, L. H.; CHILLER, T.; LOCKHART, S. R. *FKS* mutations and elevated echinocandin MIC values among *Candida glabrata* isolates from U.S. population-based surveillance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 5042-5047, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Comparações entre as médias das frações de sobrevivência de células das espécies de *Candida* expostas apenas à luz (LED600) e expostas à luz e ao FS NMBN

Comparações	Diferença entre as médias	P – Valor
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,032	0,833
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,155	0,309
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,106	0,483
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,123	0,460
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,074	0,654
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	-0,048	0,771
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	0,088	0,559
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	-0,011	0,941
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	0,147	0,333
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	-0,100	0,548
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	0,058	0,725
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	0,158	0,342
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,146	0,336
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,184	0,227
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,044	0,769
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,038	0,820
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	-0,102	0,540
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	-0,140	0,401
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,169	0,267
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,079	0,600
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,098	0,517

Continua

(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	-0,089	0,591
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	-0,071	0,671
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,019	0,910
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,148	0,328
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,064	0,673
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,077	0,612
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	0,085	0,610
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	0,072	0,666
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,013	0,938
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	-0,005	0,971
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	0,566	0,001
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	0,710	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	0,875	0,0001
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	-0,021	0,876
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	0,496	0,002
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	0,715	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	0,688	0,0001
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	-0,062	0,647
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	0,098	0,519
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	0,026	0,876
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	0,440	0,005
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	-0,081	0,549
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	0,721	0,0001
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	0,883	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	0,901	0,0001
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	-0,054	0,692

Continua

(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	0,413	0,008
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	0,738	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	0,911	0,0001
<i>(C. albicans x C. glabrata)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,016	0,905
<i>(C. albicans x C. krusei)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,057	0,673
<i>(C. albicans x C. parapsilosis)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,076	0,574
<i>(C. albicans x C. tropicalis)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,049	0,720
<i>(C. glabrata x C. krusei)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,041	0,762
<i>(C. glabrata x C. parapsilosis)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,060	0,657
<i>(C. glabrata x C. tropicalis)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,032	0,811
<i>(C. krusei x C. parapsilosis)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,019	0,888
<i>(C. krusei x C. tropicalis)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	0,009	0,950
<i>(C. parapsilosis x C. tropicalis)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	0,028	0,838
<i>(C. albicans x C. glabrata)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,013	0,922
<i>(C. albicans x C. krusei)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,354	0,011
<i>(C. albicans x C. parapsilosis)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,292	0,034
<i>(C. albicans x C. tropicalis)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,333	0,016
<i>(C. glabrata x C. krusei)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,341	0,014
<i>(C. glabrata x C. parapsilosis)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,305	0,027
<i>(C. glabrata x C. tropicalis)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,320	0,021
<i>(C. krusei x C. parapsilosis)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,646	0,0001
<i>(C. krusei x C. tropicalis)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,021	0,877
<i>(C. parapsilosis x C. tropicalis)</i> 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,625	0,0001
<i>(C. albicans x C. glabrata)</i> 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,161	0,238
<i>(C. albicans x C. krusei)</i> 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,655	0,0001
<i>(C. albicans x C. parapsilosis)</i> 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,097	0,472

Continua

Conclusão

(<i>C. albicans</i> x <i>C. tropicalis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,190	0,163
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. krusei</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,494	0,002
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,258	0,060
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. tropicalis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,030	0,827
(<i>C. krusei</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,752	0,0001
(<i>C. krusei</i> x <i>C. tropicalis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,464	0,003
(<i>C. parapsilosis</i> x <i>C. tropicalis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,288	0,037
(<i>C. albicans</i> x <i>C. glabrata</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,146	0,282
(<i>C. albicans</i> x <i>C. krusei</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,497	0,001
(<i>C. albicans</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,018	0,896
(<i>C. albicans</i> x <i>C. tropicalis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,148	0,278
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. krusei</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,351	0,012
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,164	0,229
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. tropicalis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,001	0,992
(<i>C. krusei</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,514	0,000
(<i>C. krusei</i> x <i>C. tropicalis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,349	0,012
(<i>C. parapsilosis</i> x <i>C. tropicalis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,165	0,225

ANEXO B – Comparações entre as médias das frações de sobrevivência de células das espécies de *Candida* expostas apenas à luz (LED96) e expostas à luz e ao FS S137

Comparações	Diferença entre as médias	P – Valor
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,008	0,926
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,065	0,450
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,019	0,829
(0 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	-0,163	0,093
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,057	0,508
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	0,011	0,902
(5 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	-0,171	0,078
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	-0,047	0,589
(10 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	-0,229	0,020
(15 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. albicans</i>	-0,182	0,062
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	0,480	0,0001
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	0,442	0,0001
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	0,441	0,0001
(0 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	0,412	0,0001
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	-0,038	0,664
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	-0,039	0,651
(5 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	-0,068	0,485
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	-0,002	0,985
(10 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	-0,030	0,756
(15 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. glabrata</i>	-0,028	0,768
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	-0,006	0,943
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,050	0,566
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	-0,005	0,949

Continua

(0 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,035	0,714
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,056	0,519
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,001	0,994
(5 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,042	0,666
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	-0,055	0,524
(10 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	-0,014	0,883
(15 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. krusei</i>	0,041	0,672
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,074	0,391
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,052	0,545
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,100	0,249
(0 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	-0,019	0,841
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	-0,022	0,800
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,026	0,766
(5 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	-0,094	0,333
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	0,048	0,582
(10 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	-0,072	0,458
(15 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. parapsilosis</i>	-0,119	0,218
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,060	0,488
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,032	0,707
(0 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,022	0,799
(0 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,182	0,062
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	0,027	0,750
(5 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	0,038	0,660
(5 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,122	0,208
(10 x 15 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	0,010	0,904
(10 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,150	0,123
(15 x 25 J cm ⁻²) apenas luz <i>C. tropicalis</i>	-0,160	0,100

Continua

(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	0,004	0,966
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	0,950	0,0001
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	0,917	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	0,972	0,0001
(Luz x Luz + FS) 25 J cm ⁻² <i>C. albicans</i>	1,163	0,0001
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	-0,071	0,410
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	0,507	0,0001
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	0,553	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	0,557	0,0001
(Luz x Luz + FS) 25 J cm ⁻² <i>C. glabrata</i>	1,163	0,0001
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	-0,048	0,581
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	0,727	0,0001
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	0,770	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	0,902	0,0001
(Luz x Luz + FS) 25 J cm ⁻² <i>C. krusei</i>	1,163	0,0001
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	-0,082	0,344
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	0,918	0,0001
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	0,946	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	0,899	0,0001
(Luz x Luz + FS) 25 J cm ⁻² <i>C. parapsilosis</i>	1,163	0,0001
(Luz x Luz + FS) 0 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	-0,037	0,672
(Luz x Luz + FS) 5 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	1,037	0,0001
(Luz x Luz + FS) 10 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	1,029	0,0001
(Luz x Luz + FS) 15 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	1,020	0,0001
(Luz x Luz + FS) 25 J cm ⁻² <i>C. tropicalis</i>	1,163	0,0001
<i>(C. albicans x C. glabrata)</i> 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,075	0,386

Continua

(<i>C. albicans</i> x <i>C. krusei</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,051	0,552
(<i>C. albicans</i> x <i>C.parapsilosis</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,086	0,322
(<i>C. albicans</i> x <i>C. tropicalis</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,040	0,641
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. krusei</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	0,024	0,784
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,011	0,902
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. tropicalis</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	0,035	0,688
(<i>C. krusei</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	-0,034	0,691
(<i>C. krusei</i> x <i>C. tropicalis</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	0,011	0,898
(<i>C. parapsilosis</i> x <i>C. tropicalis</i>) 0 J cm ⁻² Luz + FS	0,045	0,600
(<i>C. albicans</i> x <i>C. glabrata</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,029	0,737
(<i>C. albicans</i> x <i>C. krusei</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,236	0,007
(<i>C. albicans</i> x <i>C.parapsilosis</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,035	0,688
(<i>C. albicans</i> x <i>C. tropicalis</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,020	0,820
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. krusei</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,265	0,003
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,006	0,948
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. tropicalis</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,009	0,913
(<i>C. krusei</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,271	0,002
(<i>C. krusei</i> x <i>C. tropicalis</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	0,256	0,004
(<i>C. parapsilosis</i> x <i>C. tropicalis</i>) 5 J cm ⁻² Luz + FS	-0,015	0,862
(<i>C. albicans</i> x <i>C. glabrata</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,013	0,880
(<i>C. albicans</i> x <i>C. krusei</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,163	0,062
(<i>C. albicans</i> x <i>C.parapsilosis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,015	0,859
(<i>C. albicans</i> x <i>C. tropicalis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,014	0,872
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. krusei</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,176	0,044
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,002	0,978
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. tropicalis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,001	0,992
(<i>C. krusei</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,178	0,041

Continua

Conclusão

(<i>C. krusei</i> x <i>C. tropicalis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	0,177	0,043
(<i>C. parapsilosis</i> x <i>C. tropicalis</i>) 10 J cm ⁻² Luz + FS	-0,002	0,986
(<i>C. albicans</i> x <i>C. glabrata</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,007	0,938
(<i>C. albicans</i> x <i>C. krusei</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,094	0,276
(<i>C. albicans</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,008	0,927
(<i>C. albicans</i> x <i>C. tropicalis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,007	0,939
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. krusei</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,101	0,243
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,001	0,989
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. tropicalis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,000	0,999
(<i>C. krusei</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,102	0,238
(<i>C. krusei</i> x <i>C. tropicalis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	0,101	0,244
(<i>C. parapsilosis</i> x <i>C. tropicalis</i>) 15 J cm ⁻² Luz + FS	-0,001	0,988
(<i>C. albicans</i> x <i>C. glabrata</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	0,000	0,997
(<i>C. albicans</i> x <i>C. krusei</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	-0,045	0,673
(<i>C. albicans</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	0,000	0,997
(<i>C. albicans</i> x <i>C. tropicalis</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	0,000	0,997
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. krusei</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	-0,045	0,670
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	0,000	1,000
(<i>C. glabrata</i> x <i>C. tropicalis</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	0,000	0,999
(<i>C. krusei</i> x <i>C. parapsilosis</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	0,045	0,670
(<i>C. krusei</i> x <i>C. tropicalis</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	0,045	0,671
(<i>C. parapsilosis</i> x <i>C. tropicalis</i>) 25 J cm ⁻² Luz + FS	0,000	0,999

ANEXO C – Comparações entre as médias das frações de sobrevivência de células melanizadas de *C. neoformans* var. *neoformans* expostas apenas à luz (laser) e expostas à luz e ao FS ClAlPc/NE

Comparações	Diferença entre as médias	P – Valor
(0 x 0,045 μ M) 0 J cm ⁻² células não lavadas	-0,092	0,250
(0 x 0,450 μ M) 0 J cm ⁻² células não lavadas	-0,145	0,073
(0 x 4,500 μ M) 0 J cm ⁻² células não lavadas	-0,248	0,003
(0,045 x 0,450 μ M) 0 J cm ⁻² células não lavadas	-0,053	0,543
(0,045 x 4,500 μ M) 0 J cm ⁻² células não lavadas	-0,155	0,080
(0,450 x 4,500 μ M) 0 J cm ⁻² células não lavadas	-0,102	0,244
(0 x 0,045 μ M) 0 J cm ⁻² células lavadas	-0,089	0,269
(0 x 0,450 μ M) 0 J cm ⁻² células lavadas	-0,156	0,056
(0 x 4,500 μ M) 0 J cm ⁻² células lavadas	-0,116	0,149
(0,045 x 0,450 μ M) 0 J cm ⁻² células lavadas	-0,067	0,443
(0,045 x 4,500 μ M) 0 J cm ⁻² células lavadas	-0,028	0,752
(0,450 x 4,500 μ M) 0 J cm ⁻² células lavadas	0,039	0,651
(0 x 0,045 μ M) 5 J cm ⁻² células não lavadas	1,005	0,0001
(0 x 0,450 μ M) 5 J cm ⁻² células não lavadas	0,437	0,0001
(0 x 4,500 μ M) 5 J cm ⁻² células não lavadas	0,169	0,022
(0,045 x 0,450 μ M) 5 J cm ⁻² células não lavadas	-0,569	0,0001
(0,045 x 4,500 μ M) 5 J cm ⁻² células não lavadas	-0,836	0,0001
(0,450 x 4,500 μ M) 5 J cm ⁻² células não lavadas	-0,268	0,001
(0 x 0,045 μ M) 5 J cm ⁻² células lavadas	0,987	0,0001
(0 x 0,450 μ M) 5 J cm ⁻² células lavadas	1,001	0,0001
(0 x 4,500 μ M) 5 J cm ⁻² células lavadas	1,001	0,0001
(0,045 x 0,450 μ M) 5 J cm ⁻² células lavadas	0,014	0,847

continua

(0,045 x 4,500 μM) 5 J cm^{-2} células lavadas	0,014	0,843
(0,450 x 4,500 μM) 5 J cm^{-2} células lavadas	0,000	0,996
(0 x 0,045 μM) 10 J cm^{-2} células não lavadas	0,973	0,0001
(0 x 0,450 μM) 10 J cm^{-2} células não lavadas	0,973	0,0001
(0 x 4,500 μM) 10 J cm^{-2} células não lavadas	0,973	0,0001
(0,045 x 0,450 μM) 10 J cm^{-2} células não lavadas	0,000	1,000
(0,045 x 4,500 μM) 10 J cm^{-2} células não lavadas	0,000	1,000
(0,450 x 4,500 μM) 10 J cm^{-2} células não lavadas	0,000	1,000
(0 x 0,045 μM) 10 J cm^{-2} células lavadas	1,087	0,0001
(0 x 0,450 μM) 10 J cm^{-2} células lavadas	1,087	0,0001
(0 x 4,500 μM) 10 J cm^{-2} células lavadas	1,087	0,0001
(0,045 x 0,450 μM) 10 J cm^{-2} células lavadas	0,000	0,996
(0,045 x 4,500 μM) 10 J cm^{-2} células lavadas	0,000	0,996
(0,450 x 4,500 μM) 10 J cm^{-2} células lavadas	0,000	1,000
(células não lavadas x lavadas) 0 μM 0 J cm^{-2}	0,000	1,000
(células não lavadas x lavadas) 0,045 μM 0 J cm^{-2}	-0,004	0,967
(células não lavadas x lavadas) 0,450 μM 0 J cm^{-2}	0,010	0,906
(células não lavadas x lavadas) 4,500 μM 0 J cm^{-2}	-0,131	0,136
(células não lavadas x lavadas) 0 μM 5 J cm^{-2}	-0,003	0,963
(células não lavadas x lavadas) 0,045 μM 5 J cm^{-2}	0,015	0,837
(células não lavadas x lavadas) 0,450 μM 5 J cm^{-2}	-0,568	0,0001
(células não lavadas x lavadas) 4,500 μM 5 J cm^{-2}	-0,836	0,0001
(células não lavadas x lavadas) 0 μM 10 J cm^{-2}	0,115	0,112
(células não lavadas x lavadas) 0,045 μM 10 J cm^{-2}	0,000	0,997
(células não lavadas x lavadas) 0,450 μM 10 J cm^{-2}	0,000	1,000
(células não lavadas x lavadas) 4,500 μM 10 J cm^{-2}	0,000	1,000

continua

Conclusão

(0 J cm ⁻² x 5 J cm ⁻²) 0,045 µM células não lavadas	1,092	0,0001
(0 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 0,045 µM células não lavadas	1,092	0,0001
(5 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 0,045 µM células não lavadas	0,000	1,000
(0 J cm ⁻² x 5 J cm ⁻²) 0,045 µM células lavadas	1,074	0,0001
(0 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 0,045 µM células lavadas	1,088	0,0001
(5 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 0,045 µM células lavadas	-0,014	0,841
(0 J cm ⁻² x 5 J cm ⁻²) 0,450 µM células não lavadas	0,577	0,0001
(0 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 0,450 µM células não lavadas	1,145	0,0001
(5 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 0,450 µM células não lavadas	-0,569	0,0001
(0 J cm ⁻² x 5 J cm ⁻²) 0,450 µM células lavadas	1,155	0,0001
(0 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 0,450 µM células lavadas	1,156	0,0001
(5 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 0,450 µM células lavadas	-0,001	0,990
(0 J cm ⁻² x 5 J cm ⁻²) 4,500 µM células não lavadas	0,411	0,0001
(0 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 4,500 µM células não lavadas	1,248	0,0001
(5 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 4,500 µM células não lavadas	-0,836	0,0001
(0 J cm ⁻² x 5 J cm ⁻²) 4,500 µM células lavadas	1,116	0,0001
(0 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 4,500 µM células lavadas	1,116	0,0001
(5 J cm ⁻² x 10 J cm ⁻²) 4,500 µM células lavadas	-0,001	0,994

ANEXO D – Comparações entre as médias das frações de sobrevivência de microconídios de *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* expostas apenas à luz (LED96) e expostas à luz e aos FS NMBN (10 µM) e S137 (1 µM)

Comparações	Diferença entre as médias	P – Valor
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. mentagrophytes</i>	0,165	0,245
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. mentagrophytes</i>	0,148	0,299
(0 x 20 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. mentagrophytes</i>	0,129	0,364
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. mentagrophytes</i>	-0,018	0,906
(5 x 20 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. mentagrophytes</i>	-0,037	0,808
(10 x 20 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. mentagrophytes</i>	-0,019	0,901
(0 x 5 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. rubrum</i>	0,151	0,286
(0 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. rubrum</i>	0,099	0,484
(0 x 20 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. rubrum</i>	0,116	0,415
(5 x 10 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. rubrum</i>	-0,052	0,729
(5 x 20 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. rubrum</i>	-0,036	0,813
(10 x 20 J cm ⁻²) apenas luz <i>T. rubrum</i>	0,017	0,913
(0 x 5 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. mentagrophytes</i>	0,760	0,0001
(0 x 10 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. mentagrophytes</i>	1,052	0,0001
(0 x 20 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. mentagrophytes</i>	1,056	0,0001
(5 x 10 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. mentagrophytes</i>	0,292	0,073
(5 x 20 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. mentagrophytes</i>	0,296	0,114
(10 x 20 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. mentagrophytes</i>	0,005	0,977
(0 x 5 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. rubrum</i>	0,795	0,0001
(0 x 10 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. rubrum</i>	0,838	0,0001
(0 x 20 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. rubrum</i>	0,839	0,0001
(5 x 10 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. rubrum</i>	0,043	0,800

continua

(5 x 20 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. rubrum</i>	0,044	0,781
(10 x 20 J cm ⁻²) FS NMBN <i>T. rubrum</i>	0,002	0,990
(0 x 5 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. mentagrophytes</i>	1,673	0,0001
(0 x 10 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. mentagrophytes</i>	1,686	0,0001
(0 x 20 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. mentagrophytes</i>	1,687	0,0001
(5 x 10 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. mentagrophytes</i>	0,012	0,935
(5 x 20 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. mentagrophytes</i>	0,014	0,926
(10 x 20 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. mentagrophytes</i>	0,002	0,991
(0 x 5 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. rubrum</i>	0,790	0,0001
(0 x 10 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. rubrum</i>	0,795	0,0001
(0 x 20 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. rubrum</i>	0,798	0,0001
(5 x 10 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. rubrum</i>	0,006	0,971
(5 x 20 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. rubrum</i>	0,009	0,954
(10 x 20 J cm ⁻²) FS S137 <i>T. rubrum</i>	0,003	0,983
(Luz x Luz + NMBN) 5 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	0,538	0,002
(Luz x Luz + S137) 5 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	0,819	0,0001
(Luz + NMBN x Luz + S137) 5 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	-0,281	0,100
(Luz x Luz + NMBN) 5 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	0,804	0,0001
(Luz x Luz + S137) 5 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	0,838	0,0001
(Luz + NMBN x Luz + S137) 5 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	-0,034	0,838
(Luz x Luz + NMBN) 10 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	0,848	0,0001
(Luz x Luz + S137) 10 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	0,850	0,0001
(Luz + NMBN x Luz + S137) 10 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	-0,002	0,990
(Luz x Luz + NMBN) 10 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	0,899	0,0001
(Luz x Luz + S137) 10 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	0,896	0,0001

continua

Conclusão

(Luz + NMBN x Luz + S137) 10 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	0,003	0,986
(Luz x Luz + NMBN) 20 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	0,871	0,0001
(Luz x Luz + S137) 20 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	0,870	0,0001
(Luz + NMBN x Luz + S137) 20 J cm ⁻² <i>T. mentagrophytes</i>	0,001	0,995
(Luz x Luz + NMBN) 20 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	0,884	0,0001
(Luz x Luz + S137) 20 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	0,883	0,0001
(Luz + NMBN x Luz + S137) 20 J cm ⁻² <i>T. rubrum</i>	0,001	0,993
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 0 J cm ⁻² Luz	0,000	1,000
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 5 J cm ⁻² Luz	-0,014	0,926
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 10 J cm ⁻² Luz	-0,049	0,748
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 20 J cm ⁻² Luz	-0,013	0,931
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 0 J cm ⁻² Luz + NMBN	0,217	0,102
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 5 J cm ⁻² Luz + NMBN	0,252	0,178
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 10 J cm ⁻² Luz + NMBN	0,003	0,985
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 20 J cm ⁻² Luz + NMBN	0,000	1,000
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 0 J cm ⁻² Luz + S137	0,889	0,0001
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 5 J cm ⁻² Luz + S137	0,005	0,974
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 10 J cm ⁻² Luz + S137	-0,002	0,991
(<i>T. mentagrophytes</i> x <i>T. rubrum</i>) 20 J cm ⁻² Luz + S137	0,000	0,998

ANEXO E – Comparações entre as médias das porcentagens de células L929 expostas aos FS MB, TBO, NMBN e S137, na presença ou ausência de luz (LED96)

Comparações	Diferença entre as médias	P – Valor
(1 μ M x 2,5 μ M) MB 0 J cm ⁻²	3,576	0,687
(1 μ M x 10 μ M) MB 0 J cm ⁻²	8,405	0,346
(2,5 μ M x 10 μ M) MB 0 J cm ⁻²	4,829	0,587
(1 μ M x 2,5 μ M) MB 15 J cm ⁻²	11,753	0,189
(1 μ M x 10 μ M) MB 15 J cm ⁻²	76,261	0,0001
(2,5 μ M x 10 μ M) MB 15 J cm ⁻²	64,508	0,0001
(1 μ M x 2,5 μ M) TBO 0 J cm ⁻²	0,818	0,927
(1 μ M x 10 μ M) TBO 0 J cm ⁻²	39,350	0,0001
(2,5 μ M x 10 μ M) TBO 0 J cm ⁻²	38,532	0,0001
(1 μ M x 2,5 μ M) TBO 15 J cm ⁻²	31,396	0,001
(1 μ M x 10 μ M) TBO 15 J cm ⁻²	99,123	0,0001
(2,5 μ M x 10 μ M) TBO 15 J cm ⁻²	67,727	0,0001
(1 μ M x 2,5 μ M) NMBN 0 J cm ⁻²	20,661	0,023
(1 μ M x 10 μ M) NMBN 0 J cm ⁻²	33,670	0,000
(2,5 μ M x 10 μ M) NMBN 0 J cm ⁻²	13,009	0,147
(1 μ M x 2,5 μ M) NMBN 15 J cm ⁻²	0,499	0,955
(1 μ M x 10 μ M) NMBN 15 J cm ⁻²	4,317	0,627
(2,5 μ M x 10 μ M) NMBN 15 J cm ⁻²	3,818	0,668
(1 μ M x 2,5 μ M) S137 0 J cm ⁻²	-0,804	0,928
(1 μ M x 10 μ M) S137 0 J cm ⁻²	11,663	0,192
(2,5 μ M x 10 μ M) S137 0 J cm ⁻²	12,467	0,164
(1 μ M x 2,5 μ M) S137 15 J cm ⁻²	30,642	0,001
(1 μ M x 10 μ M) S137 15 J cm ⁻²	30,403	0,001
(2,5 μ M x 10 μ M) S137 15 J cm ⁻²	-0,239	0,979