

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RENAN ARNON ROMANO

Aumento da eficiência da inativação fotodinâmica pela incorporação de
fotossensibilizador induzida por luz em *Candida albicans*

São Carlos
2016

RENAN ARNON ROMANO

Aumento da eficiência da inativação fotodinâmica pela incorporação de fotossensibilizador induzida por luz em *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Versão Corrigida
(versão original disponível na unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2016

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

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Romano, Renan Arnon

Aumento da eficiência da inativação fotodinâmica pela incorporação de fotossensibilizador induzida por luz em *Candida albicans* / Renan Arnon Romano; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães - versão corrigida -- São Carlos, 2016.

115 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Inativação fotodinâmica. 2. Microscopia confocal de fluorescência. 3. Photogem. 4. Curcumina. I. Guimarães, Francisco Eduardo Gontijo, orient. II. Título.

Aos meus pais e familiares.
Por nunca deixar de acreditar no meu potencial.
Por me fornecerem condições de seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus eu agradeço.
Pela minha vida iluminar desde o começo.
Por me dar força pra levantar depois de um tropeço.
Pelo caminho me mostrar quando me aborreço.

Agradeço também aos meus pais Rita e Valdenir.
Pelo apoio de sempre, sem nunca me restringir,
Por, num momento de fraqueza, me incentivar a não desistir,
Por sempre lutarem para me fazerem poder sorrir.

Agradeço aos meus familiares.
Por sempre serem meus pilares.
Por torcerem pelo meu sucesso.
Por terem seu apoio sempre expresso.

Da república eu agradeço à galera.
Que mesmo nunca perdendo uma zuera, sempre foi sincera.
Caio e Breno, sempre sereno.
Rogério, Godô, Iury e Marcel, sempre fazendo escarcéu.

Agradeço aos amigos Gustavo, Vitti e Yuro, de monte alto,
que mesmo separados por muito asfalto,
sempre estiveram presente,
e me ajudaram a caminhar tranquilamente.

Agradeço também os companheiros de grupo pela amizade.
Onde, em um grupo com tanta diversidade,
Não poderei aqui dar a todos a real notoriedade.
Neste grupo pude encontrar liberdade e ter integridade,
para construir uma irmandade de verdade.
Agradeço ao Sebastião, Ramon e Bruno pelas conversas, ajudas e pela lealdade.
À Larissa, Thaila e Paulinha pela cumplicidade e sinceridade.

Agradeço aos amigos da Embrapa.
Gutto, Gaúcho, Jéssica, Chambz, Roberto, Magda e Japa.
Que mesmo que em um período transitório,
Deixaram notórios conselhos de vida e laboratório.

Agradeço à Profa. Dra. Cristina e ao Prof. Dr. Vanderlei,
Nos quais sempre me espelharei.
Agradeço por me darem a oportunidade que sempre esperei,
Por acreditarem em mim quando essa caminhada iniciei,
Pelos puxões de orelha quando errei.
Pelas reuniões, idéias e pelo método de trabalho, que nunca esquecerei.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Francisco E. G. Guimarães.
Que trouxe uma ótima filosofia de trabalho dos alemães.
Com ele notei que “vestir a camisa de físico” é importante.
Pensar nos efeitos a todo instante.
Planejar experimentos com sensatez o bastante.
Para sempre procurar por resultados significantes.

Agradeço ao IFSC pela infra-estrutura desde a graduação,
Pelos bons professores que até hoje me trazem inspiração.
Pelo programa de pós graduação.
E pelo auxílio em cada realização.

Agradeço aos órgãos de fomento que esta pesquisa permitiram realizar,
Capes, CNPq, FAPESP e FAFQ, através dos quais não seria possível viabilizar,
Visualizar e tão pouco, este trabalho, finalizar.

"Boa sorte, firme e forte, vai com a força da mente.
Vai sabendo que não há nenhum peso que você não aguento.
Vai na marra, vai na garra, vai em frente.
Se agarra no seu sonho com unhas e dentes.
Pra saber o que é possível é preciso que se tente conseguir o impossível, então tente!
Sempre alimente a esperança de vencer.
Só duvide de quem duvida de você."

Gabriel O Pensador – trecho da música “Sem Parar”

RESUMO

ROMANO, R.A.. **Título: Aumento da eficiência da inativação fotodinâmica pela incorporação de fotossensibilizador induzida por luz em *Candida Albicans*.** 2016. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Devido à grande preocupação com a geração de novas tecnologias mais ágeis, eficientes e de baixo custo, as reações fotodinâmicas (RF) têm ganhado destaque. Estas envolvem a ativação de um fármaco fotossensível (fotossensibilizador (FS)), pela iluminação em uma faixa específica de comprimentos de onda, gerando assim espécies reativas altamente citotóxicas levando as células à morte. As RF são divididas em duas categorias: terapia fotodinâmica (TFD) e inativação fotodinâmica (IFD). A primeira é utilizada para tratamentos oncológicos, dermatológicos, entre outros. A segunda é utilizada para descontaminação de micro-organismos em infecções localizadas. Atualmente a IFD tem sido alvo de muitos estudos pois tem diversas vantagens quando comparadas com as técnicas de descontaminação atuais. Duas das mais importantes são: a seletividade e a não geração de micro-organismos resistentes aos FSs. Apesar desta técnica ser utilizada com sucesso em diversos campos, ela ainda apresenta baixa eficiência quando comparada às técnicas tradicionais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi criar um novo protocolo de aplicação da IFD visando o aumento de eficiência, bem como um estudo profundo das interações dos FSs com as células, e o monitoramento da dinâmica do FS nestas. O presente estudo utiliza-se de células da levedura *Candida albicans* e demonstra a interação destas células com dois FSs: Photogem[®] e Curcumina. Foi proposto um novo protocolo que promove o aumento da internalização de FS pelas células baseado na pré-iluminação de baixa dose durante o tempo de incubação. Foi possível demonstrar através da medida dos espectros de absorção do sobrenadante de uma solução com células e Photogem[®], que as amostras que tiveram pré-iluminação internalizaram mais FS do meio do que as células mantidas no escuro. Além disso, a partir de ensaios de viabilidade com a levedura e o Photogem[®] foi demonstrado que as amostras que tiveram pré-iluminação apresentaram diminuição de até seis ordens de grandeza nas unidades formadoras de colônia quando comparadas com as amostras tratadas pelo protocolo tradicional de IFD. Através das técnicas de microscopia confocal de fluorescência e de imagem de tempo de vida de fluorescência foi possível compreender a interação entre os FSs e as células, bem como estudar a ligação deste FS em diferentes regiões da célula. Além disso, foi estudada ainda a mobilidade destas moléculas dentro das células sob condições com e sem iluminação de baixa dose. Através deste estudo pôde-se inferir que as moléculas de curcumina tem tempos característicos de entrada nas células mais lentos que os tempos característicos do Photogem[®]. Ainda foi possível tomar vantagem da fluorescência do Photogem[®] para monitorar a entrada deste nas células de levedura, bem como monitorar a formação do seu fotoproduto, determinando assim que 7,5 minutos é o tempo médio de iluminação durante a incubação com FS necessário para que pelo menos 80% das células tivessem o FS internalizado, sem significativa formação de fotoprodutos. Conclui-se ainda que este novo protocolo de incubação com iluminação leva a maior eficiência e seletividade da IFD, abrindo caminho para uma nova linha de pesquisa nas RF em geral, possivelmente podendo este protocolo ser aplicado em diversos tipos de células.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Inativação fotodinâmica. Microscopia confocal de fluorescência. Photogem. Curcumina.

ABSTRACT

ROMANO, R.A. **Title Photodynamic inactivation efficiency increase by light driven photosensitizer uptake in *Candida Albicans***. 2016. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

In the last years, due to the increasing need of generation of novel faster and cheaper technologies, the photodynamic reactions (PR) have been highlighted. These reactions involves the activation of a photosensitive drug, named photosensitizer (PS), by light in proper spectral window and generation of highly cytotoxic reactive species, leading cells to death. The photodynamic reactions may be divided in two categories: photodynamic therapy (PDT) and photodynamic inactivation (PDI). The first one is performed in order to treat oncologic, dermatologic and other diseases, whereas the second one is employed in the decontamination of microorganisms in localized infections. When compared with existing decontamination techniques, PDI has several advantages, among which two of the most important are its selectivity of the PS that acts only at the delivered site, as well as not inducing antibiotic resistance, for such reasons are subjected of many current studies. Although this technique has been performed with great success in many fields, it still has a lack of efficiency. In this context, the purpose of this study was create a new application protocol of this technique in order to increase the efficiency, as well as understand the interactions of the PS with the cells and monitoring the drug dynamic in cells. In this study, *Candida albicans* cells were utilized and the interaction of two PSs (Photogem[®] and Curcumin) were demonstrated. A new protocol which promotes an increase of the PS cells uptake was proposed, this protocol is based on the low dose illumination during the incubation time. By measuring absorption spectra of the supernatant of two solutions with cells and Photogem[®], in which in one of them were applied a low dose light, was demonstrated that the illuminated cells had an uptake increased when compared with the sample kept in the dark. Moreover, viability assays with the Photogem[®] and the cells proved that the cells that receive low dose light in the incubation stage had more damage in the PDI, showing a decrease of six orders of magnitude when compared with the traditional PDI. Through confocal and lifetime fluorescence microscopy techniques it was possible not only to comprehend the interaction between the PS and cells, as well as to study the binding of this molecules in different regions of the cells. Furthermore, the mobility of the PS molecules inside the cells was studied in conditions of illumination and dark, it could be inferred that the curcumin molecules has higher characteristic time than Photogem[®] molecules. Monitoring the cell Photogem[®] uptake, and the photoproduct formation was possible by take advantage of the PS fluorescence. Thus it was possible to determine the average illumination time (7.5 minutes) during the incubation time so at least 80% of the cells had the PS internalized, without much generation of photoproducts. It follows also that this new incubation protocol with low dose illumination leads to greater efficiency of PDI, so this study leads a new field of research in overall photodynamic reaction.

Keywords: *Candida albicans*. Photodynamic inactivation. Fluorescence confocal microscopy. Photogem. Curcumin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 – Célula de *Candida Albicans* e suas estruturas (a); imagem de microscopia eletrônica de varredura de células de *Candida Albicans* (b); imagem de microscopia confocal de fluorescência da célula mostrando o plano focal. 29
- Figura 3.1 – Diagrama de Jablonski. As setas apontando para cima, em violeta e azul e vermelho representam a energia absorvida pelo sistema. Em cinza é possível notar as relaxações vibracionais. A conversão interna e externa está indicada pela seta preta tracejada. A seta preta contínua, indica o cruzamento intersistema, que envolve estados excitados singleto e tripleto. Em verde, está representado o decaimento referente à fluorescência, e em vinho, o decaimento da fosforescência. 34
- Figura 3.2 – Diagrama de Jablonski para reações fotodinâmicas. As setas azuis apontando para cima, representam a energia absorvida pelo sistema. Em cinza é possível notar as relaxações vibracionais. A conversão interna e externa está indicada pela seta preta tracejada. A seta preta contínua, indica o cruzamento intersistema. Em verde, está representado o decaimento referente à fluorescência, e em vinho, o decaimento da fosforescência. Os mecanismos tipo I e II estão representadas pelas setas azuis ao lado dos estados excitados. 37
- Figura 3.3 – Representação da exclusão da luz provinda de fora do ponto focal pela íris. As linhas azuis estão no ponto focal das lentes e passa pelo orifício da íris, enquanto as linhas amarelas não estão no ponto focal e são excluídas. 38
- Figura 3.4 – Representação do plano focal (faixa preta) dentro da célula representada pelo cilindro vermelho. 38
- Figura 3.5 – Representação de um microscópio de fluorescência confocal invertido por varredura a laser. A linha azul representa a luz de excitação proveniente do laser, enquanto a linha verde representa a fluorescência da amostra. 40
- Figura 3.6 – Esquema de funcionamento de um detector TCSPC. As linhas representam cada pulso do laser e o pico vermelho em cada linha representa um fóton detectado. Por fim em barras vermelhas é mostrado o histograma temporal construído a partir da detecção de muitos fótons 42
- Figura 5.1 – Forma molecular dos FSs: Photogem[®] (a) e de Curcumina (b). 46
- Figura 5.2 – Espectro de emissão do Velscope[®]. 48
- Figura 5.3 – *Photobleaching* das moléculas de *Candida Albicans*, a região central tem alta potência do laser enquanto as regiões exteriores tem baixa potência, não degradando as moléculas. 52
- Figura 5.4 – *Candida Albicans* em procedimento de pré irradiação com reservatório de fotossensibilizador no meio. 52
- Figura 5.5 – *Candida Albicans* em procedimento de pré irradiação sem reservatório de fotossensibilizador no meio. 53
- Figura 5.6 – Sinal de tempo de decaimento medido em vermelho, ajuste da IRF em preto e ajuste da função biexponencial em azul. 54
- Figura 5.7 – Processamento das imagens espectrais, a caixa cinza mostra o algoritmo para escolher o número de grupos (K) pelo método K-Means. As setas verdes mostram o método completamente não supervisionado, enquanto as setas azuis mostram o método supervisionado. 56

- Figura 6.1 – Matriz excitação emissão do Phogotem® (a) e da Curcumina (b). O eixo vertical mostra o comprimento de onda de excitação e o horizontal mostra o comprimento de onda de emissão para cada uma dessa excitação. As cores falsas designam a intensidade de fluorescência. 58
- Figura 6.2 – Espectros de excitação (linhas sólidas verde e azul) e emissão (círculos ligados por linha preta) do Photogem® em duas condições, sem degradação (a) e fotodegradado (b). As curvas com preenchimento azul verde e vermelha são os ajustes gaussianos em cada um dos três picos. 59
- Figura 6.3 – Curva de captação de Photogem® pelas células em duas condições, com (vermelho) e sem (azul) pré-iluminação. No caso do experimento com iluminação as doses foram de 0 J/cm² (sem pré-iluminação), 1 J/cm², 2 J/cm² e 4 J/cm². 60
- Figura 6.4 – Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mililitro em diferentes condições. As caixas azuis dividem os grupos: sem Photogem®, sem pré-iluminação e sem luz de inativação (F-PL0L0), representado pela barra branca; sem Photogem®, mas com a pré-iluminação e a luz de inativação (F-PL#L##), representado pelo primeiro conjunto de barras; com Photogem® e com pré-iluminação mas em luz de inativação (F+PL#L0), representado pelo segundo conjunto de barras; com Photogem® com luz de pré-iluminação e luz de inativação (F+PL#L##), representado pelo terceiro conjunto de barras. 62
- Figura 6.5 – Antes (a) e depois (b) e (c) do procedimento de aumento de captação do Photogem® induzido por luz em diferentes áreas da amostra. 66
- Figura 6.6 – Observação do aumento de concentração de Photogem® induzido por luz. A figura representa uma série temporal onde as figuras (a), (b), (c), (d), (e) e (f), mostram os tempos de 0 minutos (inicialmente), 5, 7, 10, 15 e 20 minutos de iluminação respectivamente. As regiões destacadas nas figuras mostram diferentes regiões de interesse a serem estudadas. 68
- Figura 6.7 – Comportamento da fluorescência do Photogem® em diferentes regiões de interesse durante a pré-iluminação, em linha sólida são mostrados os ajustes às respectivas curvas pela equação 14. 69
- Figura 6.8 – Antes (a) e depois (b) do procedimento de iluminação para aumento de concentração de Photogem® induzido por luz utilizando laser pulsado para excitação por dois fótons emitindo em 800 nm. 70
- Figura 6.9 – Comportamento da fluorescência do Photogem® em uma RI de uma única célula durante a pré-iluminação utilizando o regime de excitação por dois fótons. A linha sólida representa o ajuste desta curva pela equação 14. 71
- Figura 6.10 – Antes (a) e depois (b) do procedimento de iluminação do Photogem® de uma amostra sem reservatório de fotossensibilizador. 73
- Figura 6.11 – Comportamento da fluorescência do Photogem® em diferentes condições. Os círculos mostram o aumento da fluorescência da área irradiada com Photogem® no meio, já os quadrados mostram a degradação do Photogem® pela irradiação em uma amostra que não conta com Photogem® no meio. Os triângulos mostram a diferença temporal da área não irradiada. 74
- Figura 6.12 – Investigação temporal da mobilidade das moléculas de FS através do procedimento de *photobleaching*. A região marcada em vermelho sofreu *photobleaching* enquanto a região de fora não sofreu, as RIs azul e verde são células estudadas na próxima figura. As figuras (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h) mostram os tempos de 0 minutos (inicial); 1,5 (*photobleaching*); 2; 4,5 (*photobleaching*); 6; 10; 15 e 25 minutos respectivamente. 77
- Figura 6.13 – Comportamento temporal de difrentes RIs durante o *photobleaching*. A barra azul mostra os tempos onde ocorreu *photobleaching*. A linha vermelha representa a média temporal da fluorescência do FS no local que sofreu *photobleaching*, enquanto a linha preta representa a

região que não sofreu. As linhas verde e azul mostram o comportamento de duas células em específico.	78
Figura 6.14 – Ajuste da função (linha vermelha) empírica nos dados (pontos azuis) dos dois regimes de recuperação da fluorescência, o primeiro onde a fluorescência retorna ao mesmo nível inicial (a) e o segundo onde o nível de fluorescência aumenta em relação ao inicial (b).	80
Figura 6.15 – Recuperação da fluorescência do FS após <i>photobleaching</i> em duas condições, a primeira onde o reservatório de FS está presente no meio (quadrados ligados por linha sólida), e a segunda onde o meio foi lavado, ou seja, este reservatório não está presente (círculos ligados por linha tracejada). A barra azul denota o momento do <i>photobleaching</i> , enquanto a linha vermelha sólida mostra o ajuste pela função exponencial descrita na equação 14.	81
Figura 6.16 – Diferentes condições de recuperação da fluorescência do FS após o <i>photobleaching</i> (curvas com linhas sólidas), comparado com os fluxos de entrada (seta com direção para a esquerda) e saída (seta com direção para a direita) de moléculas das células (cilindros vermelhos).	82
Figura 6.17 – Imagem de campo amplo de <i>Candida Albicans</i> com Curcumina Natural onde a região central teve iluminação.	83
Figura 6.18 – Comportamento da fluorescência da Curcumina em diferentes regiões de interesse durante a pré-iluminação, em linha sólida são mostrados os ajustes às respectivas curvas pela equação 14.	84
Figura 6.19 – Espectro de fluorescência da curcumina em solução (a), e em células irradiadas (b) ou não irradiadas (c) em comparação com o espectro da AF da levedura (d). Em azul verde e vermelho são mostrados os ajustes gaussianos para os picos de 480 nm, 529 nm e 580 nm. A linha preta representa a soma dos três ajustes.	85
Figura 6.20 – Imagens de campo amplo antes (a) e depois (b) do procedimento de iluminação para aumento de concentração de Curcumina natural induzido por luz utilizando laser pulsado para excitação por dois fótons emitindo em 800 nm, para amostra sem reservatório de FS no meio.	86
Figura 6.21 – Recuperação da fluorescência da Curcumina após <i>photobleaching</i> em duas condições, a primeira demonstrada com quadrados ligados por linha sólida onde há reservatório de FS, e a segunda onde o meio foi lavado, ou seja, o reservatório de FS foi removido. A barra azul denota o momento do <i>photobleaching</i> , enquanto a linha vermelha sólida mostra o ajuste pela função exponencial descrita na equação 14.	87
Figura 6.22 – Imagens de tempo de vida de fluorescência do Photogem [®] (a) e da AF da levedura (b), de uma amostra que foi iluminada no centro e contém reservatório de FS. As cores falsas representam o tempo de decaimento da fluorescência, cores avermelhadas discriminam tempos longos enquanto cores azuladas representam tempos mais curtos.	88
Figura 6.23 – Histograma do tempo de decaimento da fluorescência do FS (a) e da AF da levedura (b) para duas regiões distintas da imagem, área irradiada (círculos) e não irradiada (quadrados). Em vermelho são mostrados os ajustes gaussianos (equação 15) para cada pico das distribuições.	89
Figura 6.24 – Imagens FLIM da membrana de células em sua maioria não irradiadas e sem o FS internalizado (a), a mesma imagem, porém invertida apenas para demonstração (b), imagem da membrana das células da região irradiada (c) e do interior destas mesmas células (d).	91
Figura 6.25 – Histogramas para comparação do tempo de decaimento da fluorescência do Photogem [®] em diferentes condições: comparação entre a membrana das células irradiadas (círculos) e não irradiadas (quadrados) (a); e comparação da membrana (círculos) das células irradiadas com o interior (quadrados) das mesmas (b). Em vermelho os ajustes gaussianos (equação	

15) dos picos de menores tempo de vida, em verde o mesmo ajuste nos picos com maiores tempos de vida, em azul a soma dos dois ajustes.	92
Figura 6.26 – Imagens de tempo de vida de fluorescência do Photogem [®] (a) e da AF da levedura (b) de uma amostra que teve o reservatório de FS retirado e foi iluminada. As cores falsas representam o tempo de decaimento da fluorescência, cores avermelhadas discriminam tempos longos enquanto cores azuladas representam tempos mais curtos.	93
Figura 6.27 – Histograma do tempo de decaimento da fluorescência do FS (a) e da AF (b) da amostra que teve o reservatório de FS retirado. Ambas imagens mostram histogramas para duas regiões distintas da imagem, área irradiada (círculos) e não irradiada (quadrados). Em azul os ajustes gaussianos dos picos de menores tempo de vida, em vermelho o mesmo ajuste nos picos com maiores tempos de vida.	94
Figura 6.28 – Grupos espectrais extraídos pelo método K-Means de imagem antes de ser irradiada apresentado em cores falsas.	96
Figura 6.29 – Imagens de microscopia confocal de fluorescência adquiridas pelo modo espectral sem (a) e com aumento (c). As mesmas imagens recoloridas com as cores dos espectros apresentados na figura anterior (b) e (d) respectivamente.	97
Figura 6.30 – Grupos espectrais extraídos pelo método K-Means de imagem após de ser irradiada apresentado em cores falsas	98
Figura 6.31 – Série temporal de imagens espectrais coloridas com cores falsas de acordo com os grupos. Os tempos referentes às figuras (a) até (l) são 0 minutos (inicial); 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 35 minutos respectivamente.	100
Figura 6.32 – Destaque para uma célula da série temporal de imagens espectrais coloridas com cores falsas de acordo com os grupos. Os tempos referentes às figuras (a) até (l) são 0 minutos (inicial); 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 35 minutos respectivamente.	102
Figura 6.33 – Grupos espectrais extraídos pelo método K-Means de imagem após ter seu centro irradiado apresentado em cores falsas.	103
Figura 6.34 – Imagem de cores falsas de acordo com cada um dos sete grupos espectrais. Na figura (a) é mostrada a região de campo amplo, na figura (b) é mostrada a interface entre a região irradiada e a região externa mantida no escuro.	104
Figura 6.35 – Histograma do número de pixels de cada grupo normalizado pelo número total de pixels da imagem. As cores vermelha, magenta, alaranjada, amarela, azul, ciano e preto são respectivas aos grupos 1 até 7.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Resumo dos protocolos das reações fotodinâmicas.	28
Tabela 2.2 – Resumo das aplicações de IFD em <i>Candida Albicans</i>	30
Tabela 2.3 – Resumo das técnicas de monitoramento da dinâmica de FS em células.	31
Tabela 6.1 – Área do ajuste gaussiano de cada pico nos diferentes espectros da curcumina.	85
Tabela 6.2 – Parâmetros do ajuste gaussiano para o tempo de decaimento do Photogem [®] e da AF da levedura em amostra com reservatório de FS presente.	89
Tabela 6.3 – Parâmetros do ajuste gaussiano em cada localização	92
Tabela 6.4 – Parâmetros do ajuste gaussiano para o tempo de decaimento do Photogem [®] e da AF da levedura em amostra com reservatório de FS presente.	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	Avanços nos protocolos das reações fotodinâmicas.....	25
2.2	Novos desafios da Fotodinâmica.....	28
2.3	Monitoramento em tempo real da dinâmica do FS	30
3	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	33
3.1	Princípios básicos de fluorescência	33
3.2	Fotofísica das reações fotodinâmicas	36
3.3	Microscopia de fluorescência confocal por varredura laser	37
3.4	Imagem de tempo de vida de fluorescência.....	40
4	OBJETIVOS.....	43
4.1	Objetivos específicos.....	43
5	MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1	Cultura celular planctônica.....	45
5.2	Fotossensibilizadores.....	45
5.2.1	Caracterização dos Fotossensibilizadores	46
5.3	Experimentos em Microbiologia	46
5.3.1	Ensaio de quantificação de absorção de fotossensibilizador pelas células.....	46
5.3.2	Ensaio de viabilidade celular	49
5.4	Preparação para microscopia confocal	50
5.5	Microscópio confocal de fluorescência de varredura a laser.....	50
5.6	Imagem de tempo de vida de fluorescência via microscopia	53
5.7	Processamento das imagens.....	54
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
6.1	Caracterização dos Fotossensibilizadores	57
6.2	Quantificação de captação do fotossensibilizador pelas células	59
6.3	Ensaio de viabilidade.....	61
6.4	Caracterização óptica da incorporação de FS induzida por luz.....	64
6.4.1	Photogem [®]	64
6.4.2	Curcumina	82
6.4.3	Estudo do tempo de vida de fluorescência do Photogem [®]	87

6.4.4 Monitoramento do aumento de captação de FS induzido por luz.....	95
7 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS.....	109

1 INTRODUÇÃO

Um sistema de saúde pode ser definido como um conjunto de todas as ações que tem objetivo de proteger e melhorar a saúde da população, um dos principais objetivos deste é gerenciar a adoção de novas tecnologias em saúde.¹ Neste contexto, é bastante importante criar novas tecnologias e assim novas alternativas de tratamento que sejam mais rápidos, portáteis, de baixo custo e que demandem poucos profissionais especializados em diversos campos, de modo a obter técnicas de tratamento que possam ser aplicada facilmente em diversos lugares do país.² Uma técnica promissora que tem alto potencial para melhorar este cenário são as chamadas reações fotodinâmicas, pois tem os requisitos citados anteriormente.

As reações fotodinâmicas são conhecidas desde o início do século passado, entretanto só na década de 1970 a técnica teve impulso como terapia para o câncer, onde foram analisadas propriedades de derivados de hematoporfirinas capazes de agir como localizador óptico e como um fármaco fotossensível, chamado fotossensibilizador (FS), seletivo e destrutivo para células tumorais.³⁻⁶ Atualmente, esta tem se mostrado uma técnica em potencial para tratamento de várias doenças, tais como infecções localizadas,⁷⁻⁹ câncer,¹⁰⁻¹² lesões dermatológicas e oftálmicas,¹³⁻¹⁴ entre outras. Ao ser comparada com técnicas tradicionais as reações fotodinâmicas tem diversas vantagens por serem consideradas seletivas, pois apenas a região irradiada irá sofrer dano, não ocorrendo danos posteriores à células do em torno tão pouco às células mais distantes. Além disso, esta técnica é minimamente invasiva, podendo ser curativa, paliativa ou para prevenir lesões, ainda tem efeitos contra micro-organismos resistentes a antibióticos. Através da utilização de diferentes FSs pode-se utilizar iluminação de comprimentos de onda de todo o espectro, o que atribui maior controle à técnica já que, por exemplo, diferentes comprimentos de onda apresentam diferentes profundidades de penetração no tecido.²

As reações fotodinâmicas caracterizam-se de um conjunto de fatores químicos, físicos e biológicos que ocorrem após a administração do FS, seguidas de irradiação por um comprimento de onda específico. O mecanismo de aplicação da técnica é baseado em geral na aplicação do FS, passando por um período de tempo onde espera-se então não só a difusão destas moléculas como também a captura destas pelas células, este período também é chamado de tempo de incubação, por fim o FS é ativado com luz de comprimento de onda apropriado no qual este fármaco tem absorção para excitação. A morte celular ocorre quando o FS ativado interage com moléculas presentes nas células, resultando na geração de oxigênio

singleto e de outras espécies reativas que são altamente citotóxicas e acabam destruindo as células.¹⁵⁻¹⁶

Apesar de ser utilizada com sucesso em grande número de doenças, as reações fotodinâmicas têm alguns limitantes que podem ser subdivididos em dois tipos: fundamentais e atuais. Os fundamentais são, entre outros, a dificuldade de iluminação em regiões intracorpóreas, a penetração limitada da luz nos tecidos, vários parâmetros para serem otimizados, dependência de oxigênio molecular nas células, dificuldade de atingir tratamentos adequados para tumores sólidos de grande massa.¹⁷ Já os limitantes atuais ainda são a acurácia da dosimetria por paciente, seletividade limitada para FS em tratamentos clínicos, precisam ser repetidas diversas vezes para ter resultado, entrega do FS em períodos longos, e algumas vezes o custo das fontes de luz.¹⁷

Estas reações dependem de múltiplos fatores, tais como localização intracelular do FS, tempo de incubação (tempo de captação do FS pelas células), tempo de exposição à luz, intensidade da luz, entre outros. Estes fatores aumentam ou diminuem a eficiência de cada reação fotodinâmica.¹⁷ De todos os fatores descritos acima, alguns dos mais importantes para a morte celular são a captação e a distribuição intracelular do FS, isso ocorre por conta de que tanto as espécies reativas quanto o oxigênio singleto gerados pelo FS tem pequeno comprimento de difusão, bem como tempo de vida médio bastante curto, atuando deste modo bastante próximo ao lugar onde são gerados.¹⁸

Deste modo, é de grande importância gerar novos protocolos de aplicação das reações fotodinâmicas de modo a aumentar sua eficiência, aumentar o nível de dano nas células alvo e a seletividade do FS. Neste contexto, diversos protocolos diferentes são buscados atualmente, estes estão citados na seção 2.1.¹⁹⁻²⁶ Entretanto grande parte dos protocolos atuais nas reações fotodinâmicas passam pela aplicação do FS e espera do tempo de incubação mantendo a amostra no escuro. Apesar disso, iluminar a amostra com baixa dose de luz durante o período de incubação poderia vir a causar dano prévio nas células, tal dano pode desregular o fluxo de fármaco e aumentar a captação deste FS pelas células, posteriormente pode-se aplicar a dose de luz completa para causar a morte celular.

Também é de fundamental importância compreender e explicar as interações entre diversos FSs e células modelo de fungos, bem como monitorar, em tempo real, a captação e a localização temporal destes FS nas células durante a reação fotodinâmica.^{17,19-20} Diversas técnicas tomam vantagem da fluorescência do FS para permitirem tal compreensão, dentre elas duas que tem grande destaque são as técnicas de microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser e a microscopia de tempo de vida de fluorescência, pois estas podem ser

realizadas com lasers com diferentes comprimentos de onda para excitação das amostras por um ou dois fótons, bem como possibilitam a obtenção de imagens de fluorescência das amostras com alta resolução espacial. Cada uma destas imagens conta com mais de um milhão de pixels onde cada um deles pode conter informações não só de um espectro de fluorescência como também associado a ele sua curva de decaimento temporal, contendo assim diversas informações bioquímicas da amostra estudada.

Alguns trabalhos citados na seção 2.3 ²⁹⁻³³ mostram que estas e outras técnicas espectroscópicas já são utilizadas para monitoramento, entretanto a maioria destes trabalhos não mostram a dinâmica em tempo real, mas sim em diferentes tipos de incubação, e nenhum deles acoplaram este grande banco de dados a algoritmos estatísticos multivariados (tanto supervisionados quanto não supervisionados). Esta junção das técnicas de imagens com tais algoritmos tem como principal objetivo monitorar em tempo real a dinâmica e localização intracelular do FS e dos seus fotoprodutos, tornando-se assim uma ferramenta promissora para monitoramento com alta resolução e sensibilidade e podem facilitar a observação desta dinâmica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As reações fotodinâmicas podem ser divididas em duas classes, a primeira chamada terapia fotodinâmica (TFD) é assim nomeada por conta de realizar tratamento de lesões. A segunda chamada inativação fotodinâmica (IFD) é assim nomeada por ser utilizada para descontaminação (inativação) de micro-organismos.

As lesões dermatológicas foram as primeiras a serem estudadas com a TFD devido à fácil acessibilidade do FS e a luz externa,^{4,6} com a descoberta da fotossensibilização endógena induzida pela administração de ácido aminolevulinico (ALA) e formação da protoporfirina IX (ALA-PpIX) lesões não pigmentadas malignas ou pré-malignas se tornaram um alvo fácil para a TFD.³⁴ Pesquisas clínicas estudaram recentemente este tipo de TFD em carcinomas baso celular, carcinoma celular escamoso, linfoma cutâneo, entre outros.³⁵⁻³⁷

A TFD também tem sido aplicada com sucesso em casos de câncer de cabeça e pescoço, onde um estudo mostrou ser bem-sucedido ao tratar neoplasias nesta região.³⁸ Outros casos de câncer tratados com TFD são carcinoma ginecológico,³⁹ câncer de próstata,⁴⁰ gastroenterológico,⁴¹ pulmonar,⁴² entre outros.³⁷

No final da década de 1990 trabalhos de IFD começaram a ganhar destaque, em um destes trabalhos, por exemplo, foi mostrado que a IFD obteve sucesso com o objetivo de descontaminar o sangue de agentes virais de imunodeficiência humana (HIV) e hepatite pré-transfusão.⁴³ Posteriormente, devido à alta preocupação atual com a resistência de bactérias a antibióticos, surgiram diversos trabalhos onde a IFD foi realizada em cepas resistentes a múltiplas drogas.⁷⁻⁸ Atualmente a IFD já é utilizada em diversos campos, entre eles na odontologia para tratar periodontite (inflamação da gengiva),⁹ ortopedia para tratamento de úlceras,⁴⁴ otorrinolaringologia tratando infecções de garganta,⁴⁵ estética inativando as bactérias causadoras das acne,⁴⁶ e na podologia para tratamento de micose de unha.³⁴⁻³⁵

2.1 Avanços nos protocolos das reações fotodinâmicas

A TFD convencional é realizada utilizando doses altas de FS e alta fluência de luz. Mas alguns anos atrás estudos de tumores de cérebro, tanto clínicos quanto pré-clínicos, mostraram uma nova forma de aplicação da TFD utilizando ALA-PpIX como FS. Isso ocorreu devido ao cérebro ter alta sensibilidade ao dano causado pela TFD, provavelmente pelo fato do FS estar localizado nas células vasculares. Este novo método de aplicação da TFD baseia-se em algo análogo à quimioterapia, com entrega de doses baixas de ALA-PpIX bem como de luz, este

método foi chamado de TFD metronômica.^{17,19} Os desafios de implementar esta técnica são não só administrar o FS continuamente de modo a manter os níveis de ALA-PpIX equitativo temporalmente, como também iluminar os tumores durante vários dias ou semanas. Para contornar este último desafio alguns pesquisadores implantam LEDs no cérebro, outros pesquisadores ainda implantam fibras ópticas no crânio para uma iluminação externa com laser.²⁰ Outra opção pode ser utilizar LEDs orgânicos.⁴⁹

Outro modo de aplicação da TFD está exatamente no outro extremo, utilizando pulsos de laser ultracurtos (tipicamente menores do que 100 fs) tanto não focalizados de modo a fazer TFD com maiores comprimentos de onda e intensidade,²¹ como também focalizados de modo a ativar o FS por processos não lineares de dois fótons (tratados na seção 3.1). Neste último caso, a energia total absorvida pelo FS com a absorção de dois fótons é o mesmo do que quando excitado por um fóton, resultando do mesmo modo na geração de espécies reativas e de oxigênio singleto. Uma das principais vantagens dessa técnica é que estes lasers têm comprimento de onda próximo ao infravermelho próximo, este comprimento de onda é menos absorvido pelos fluoróforos biológicos além de ter menor espalhamento e maior comprimento de penetração no tecido, sendo assim possível de se tratar tecidos mais profundos, ainda que seja limitada.²² Outra vantagem desta técnica é que a probabilidade de absorção de dois fótons tem dependência quadrática com a intensidade de luz, isso leva ao fato de que há um confinamento espacial para a TFD, ou seja, neste caso a TFD será feita apenas no volume focal do laser, onde os dois fótons coexistem temporal e espacialmente. Neste contexto, esta técnica está sendo analisada de modo a reduzir efeitos colaterais de danos causados pela TFD em degeneração macular em retinas.¹⁷ As desvantagens desta técnica são em geral relacionadas à necessidade de lasers com pulsos ultra-curtos, que em geral é tem alto custo e difícil portabilização para embarcar em instrumentos clínicos.¹⁷

Ainda no contexto de aplicação de lasers pulsados na TFD existe ainda uma outra técnica emergente. Nela são utilizadas duas fontes de iluminação deste tipo onde a primeira delas tem um comprimento de onda próprio de modo a excitar o FS para um estado singleto, este estado depois de poucos nanosegundos se transforma em um estado excitado tripleto. Neste ponto, o segundo pulso de laser com comprimento de onda onde há absorção do estado tripleto, gerando assim estados tripletos mais excitados. Estes estados interagem diretamente com as moléculas, sendo assim, esta técnica de TFD é independente da existência de oxigênio molecular nas células como a TFD convencional.⁵⁰ As dificuldades desta técnica são, novamente, não só os lasers pulsados como também os FSs, que necessitam de altos coeficientes de extinção tanto no estado fundamental quando nos estados tripletos em

comprimentos de onda razoavelmente longos para atingir profundidades de penetração maiores.²⁴ Apesar destas dificuldades, nos últimos anos foi mostrada uma alternativa utilizando lasers contínuos para ativação, neste caso a absorção acontece em ambos estados do FS continuamente.²³

Outra linha de pesquisa que tem ganho destaque em TFD é a utilização de nanopartículas, estas já são utilizadas em diversas outras áreas da medicina tanto como diagnóstica e terapêutica.²⁵ Diversos avanços recentes demonstraram novas abordagens para TFD em que nanopartículas podem ser utilizadas tanto como veículos de entrega do FS, como também podem ser utilizadas como FS por si próprias como transdutores de energia.⁴⁵⁻⁴⁶ Primeiramente no âmbito de veículo de entrega, as nanopartículas podem carregar FS ou outros agentes de contraste para imagens ou compostos terapêuticos. As principais vantagens desta técnica são além de evitar a liberação do FS e ativação do fármaco prematura, é possível que o número de moléculas de FS por nanopartícula pode ser bastante alto, além de que esta nanopartícula pode ser feita para um alvo específico de ligação.²⁶ Neste caso a localização intracelular do FS não depende exclusivamente da sua molécula, podendo assim melhorar a biodistribuição desse fármaco nas células. Já ao utilizar as nanopartículas por si mesmo como substâncias fotoativadas, foi demonstrado por meio de luminescência de uma solução de oxigênio singleto que nanopartículas de silício ou ouro que tinham grande razão superfície-volume são capazes de gerar este oxigênio através da absorção de luz e transferência de energia direta.⁵² Outra demonstração desta capacidade foi realizada utilizando moléculas esféricas de carbono-60 como agentes de TFD que poderiam ser entregues como nanopartículas nos alvos.⁵³ A maior limitação desta técnica é o fato de que estas nanopartículas tipicamente absorvem comprimentos de onda próximo ao ultravioleta e quase não absorvem nos intervalos de visível e infravermelho.¹⁷

A Tabela 2.1 resume os diferentes protocolos de TFD e suas diversas aplicações.

Tabela 2.1 – Resumo dos protocolos das reações fotodinâmicas.

Tipos de TFD	Tipo de incubação	Entrega de FS	Iluminação na TFD	Dose de luz
Tradicional	Escuro	Dose completa	Contínua	Alta
Metronômica ^{19,20}	-	Periódico em baixa dose	Periódica	Baixa
Laser pulsado – Excitação por dois fótons ^{21,22}	Escuro	Dose completa	Contínua	Alta
Laser pulsado – Excitação de diversos estados ^{23,24}	Escuro	Dose completa	Contínua	Alta
Nanopartículas ^{25,26}	Escuro	Dose completa guiada pela nanopartícula	Contínua	Alta

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.2 Novos desafios da Fotodinâmica

Em ambos campos TFD e IFD, necessita-se ainda de diversos estudos e avanços. Muitos deles passam não só por compreender de forma mais clara a interação dos FSs com as células de modo a otimizar o tempo de incubação do FS e a intensidade e dose da luz utilizada, como também gerar novos protocolos. Neste contexto, a utilização de células modelo em estudos *in vitro* são bastante importantes para tal compreensão. Sob este ponto de vista o interesse em leveduras e fungos é extremamente alto, tais células são de fácil cultivo e têm suas funções bem definidas. Além disso, recentemente com o crescimento de resistência dos fungos aos agentes fungicidas aumentaram o interesse em IFD nestes micro-organismos.

A levedura mais comumente encontrada no corpo humano é chamada *Candida albicans* e pode ser encontrada em diversos lugares, tais como boca, garganta, trato digestivo, pele, unhas e nos órgãos sexuais, ^{48,54} e em hospedeiros com sistema imune comprometido pode provocar diversas doenças. ⁵⁵ Neste contexto, é de grande importância compreender a IFD nestes micro-organismos, por este motivo diversos estudos têm sido feitos utilizando esta levedura. Estes trabalhos demonstram o efeito de diversos FSs contra tais micro-organismos, ⁵⁶⁻⁶⁰ bem como a IFD com co-cultura destas leveduras com células epiteliais, ⁶¹ e também em modelos animais. ⁵⁷⁻⁵⁸

As células de *C. albicans* tem suas estruturas bem definidas e é mostrada na Figura 2.1 (a), além disso esta célula tem forma ovalada como pode ser visto na imagem de microscopia eletrônica de varredura (Figura 2.1 (b)). Na Figura 2.1 (c) é mostrada uma imagem de microscopia confocal de fluorescência, mostrando que o plano focal pode mostrar essa célula

sem problema de resolução, ainda é possível notar que a célula tem auto-fluorescência em seu núcleo.

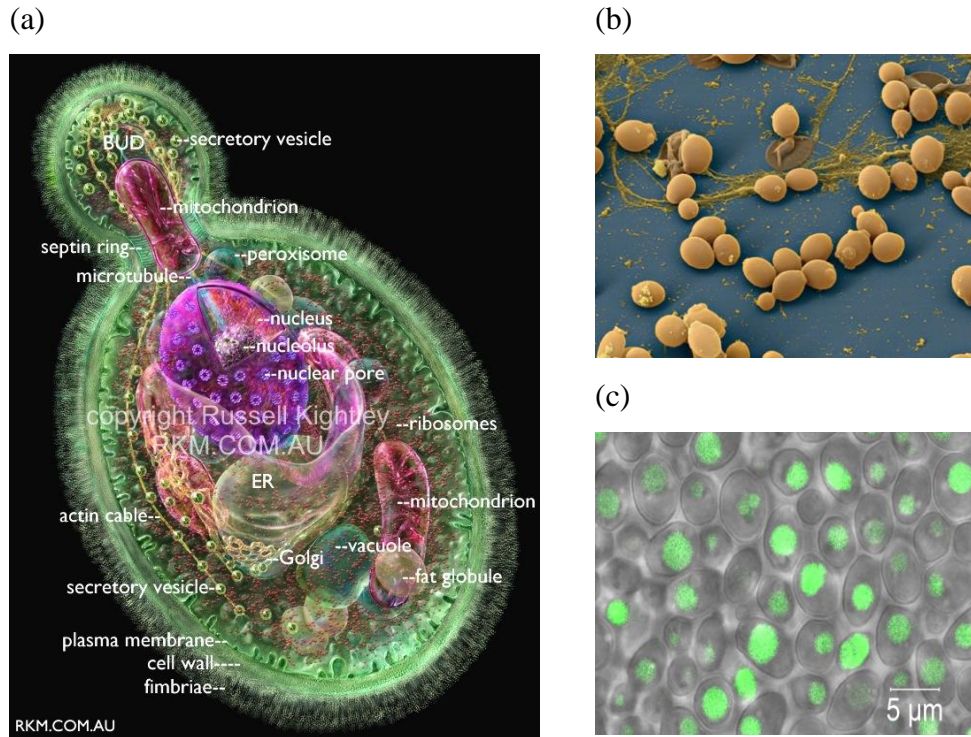


Figura 2.1 – Célula de *C. albicans* e suas estruturas (a); imagem de microscopia eletrônica de varredura de células de *C. albicans* (b); imagem de microscopia confocal de fluorescência da célula mostrando o plano focal.

Fonte: (a) TIME AERIALS⁶⁴; (b) SISTEMA...⁶⁵; (c) Elaborada pelo autor.

A Tabela 2.2 mostra um resumo das aplicações de IFD em *C. albicans*, utilizando diversos FSs e fontes de iluminação.

Tabela 2.2 – Resumo das aplicações de IFD em *C. albicans*.

Autor	Tempo de incubação no escuro (min)	FS utilizado	Comprimento de onda de iluminação (nm)	Dose de luz (J/cm ²)	Tipo de experimento
Carmello, et al. ⁵⁶	20	Photoditazine	660	37	<i>In vivo</i>
Teichert, et al. ⁶³	10	Azul de metileno	664	100	<i>In vivo</i>
Dovigo, et. at. ⁶⁰	20	Curcumina	440	0,2-20	<i>In vitro</i>
Cormick, et al. ⁵⁹	30-50-100-150	Porfirinas tri e tetra cationicas	420	2-100	<i>In vitro</i>
Lambrechts, et al. ⁵⁸	30	Porfirina cationica	424	2-30	<i>In vitro</i>
Dovigo, et al. ⁵⁷	30	Photogem [®]	455	17-25-38	<i>In vitro</i>

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.3 Monitoramento em tempo real da dinâmica do FS

Nos últimos anos muitos estudos utilizaram técnicas espectroscópicas com o objetivo de investigar a localização e a captação de vários FSs em células, estas técnicas são tanto macroscópicas como microscópicas. No primeiro caso, Vollet-Filho²⁹ mostrou que a fluorescência superficial do tecido pode ser correlacionada com o dano causado pela TFD em tempo real.

No caso das técnicas microscópicas, Pan, et al.³⁰ demonstrou, através das imagens de fluorescência obtidas pelo microscópio confocal de varredura, a localização de um FS acoplado com nanopartículas de sílica em células de câncer cervical, em outro estudo também utilizando esta técnica de microscopia foi demonstrado a localização de um derivado de benzoporfirina (que faz a função de um FS) em cultura de células tridimensionais.³¹ Este tipo de microscopia também já foi utilizado para estudar a IFD em micro-organismos, neste caso um trabalho conduzido por Gollmer, et. at.³² Mostrou em tempo real a absorção do FS azul de metileno por bactérias *S.aureus*.

Outra técnica de microscopia que também já foi utilizada para monitoramento da captação do FS por células foi a microscopia de tempo de vida de fluorescência, neste caso foram investigados os tempos de vida da fluorescência do Photofrin[®] quando ligado em diferentes locais de células de adenocarcinoma de próstata de ratos.³³

No caso de FS baseados em paládio que tem alta eficiência quântica de geração de oxigênio singlete, ou seja, tem baixa eficiência quântica de fluorescência, Farhadi, et al.³³ mostrou que foi possível monitorar a entrada de nanopartículas plasmônicas acopladas com o FS através da técnica de espectroscopia Raman de superfície melhorada.

Apesar destes trabalhos mostrarem a localização do FS em células poucos deles mostram a dinâmica do FS em tempo real, em geral trabalhos deste tipo tomam variados tempos de incubação em células diferentes para fazer a aquisição das imagens em diferentes períodos de tempo de incubação.

Tabela 2.3 – Resumo das técnicas de monitoramento da dinâmica de FS em células.

Autor	Técnica	Condição de monitoramento
Vollet-filho ²⁹	Fluorescência de estado estacionário	Tempo real
Pan, et al. ³⁰	Microscopia confocal de fluorescência	Periódica
Glidden, et al. ³¹	Microscopia confocal de fluorescência	Periódica
Gollmer, et al. ³²	Microscopia de fluorescência	Tempo real
Farhadi, et al. ³³	Espectroscopia Raman de superfície melhorada	Periódica

Fonte: Elaborada pelo autor.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Princípios básicos de fluorescência

Quando a luz incide em uma molécula, ela pode espalhar ou absorver estes fótons. A radiação emitida pelo primeiro processo tem comprimento de onda igual ou bastante próximo à radiação incidente, enquanto a radiação emitida pelo segundo processo tem um comprimento de onda bastante diferente do de excitação. Estes processos são chamados de espalhamento e luminescência respectivamente. Em temperatura ambiente, a maioria das moléculas está no seu estado de menor energia, chamado de estado fundamental. Entretanto a estrutura eletrônica destas moléculas pode absorver fótons, causando um aumento de energia, e promovendo-as então a estados quânticos excitados e menos estáveis. Para esta molécula excitada voltar ao equilíbrio ela deve dissipar a energia absorvida, o que pode ocorrer por processos de decaimento não-radiativos ou radiativos (luminescentes). No primeiro a energia é liberada por meio de relaxações vibracionais ou por transferência de energia, enquanto no segundo, a energia é liberada por meio da emissão de um fóton. Os processos de decaimento luminescentes são divididos em dois tipos: fluorescência, que ocorre a partir de estados excitados discretos do tipo singlete, em que o spin dos elétrons encontra-se anti-paralelos; e fosforescência, em que o decaimento ocorre a partir de estados excitados discretos do tipo tripleto, no qual o spin dos elétrons encontram-se paralelos, ou seja, tem sua multiplicidade alterada devido ao cruzamento intersistemas antes da emissão do fóton.

Para explicar os processos de luminescência deve-se antes fazer uma aproximação e assumir que os movimentos nucleares e eletrônicos podem ser matematicamente separados numa molécula, isso envolve assumir que o movimento eletrônico é muito maior do que o movimento nuclear, esta é chamada de aproximação de Born-Oppenheimer. Outro princípio importante é o de Franck-Condon, este afirma que quando uma molécula sofre uma transição eletrônica (absorção de fótons), a configuração nuclear não tem mudança significativa, isso se deve não só ao fato de que o núcleo é muito mais massivo do que os elétrons como também ao fato de que as transições eletrônicas são mais rápidas do que o núcleo pode responder. Além disso, este princípio define que o espectro de absorção consiste de muitas linhas ao invés de um único nível eletrônico, isso se deve ao fato de que os núcleos em uma molécula sofrem forças de Coulomb de todos os elétrons e núcleos de outros átomos da molécula, quando excitada estas forças coulombicas são alteradas, esta mudança leva a um novo alinhamento do núcleo fazendo com que este passe por uma vibração.⁶⁶

A Figura 3.1 mostra um típico diagrama de Jablonski, este diagrama representa uma molécula isolada e ideal, e a partir dele será explicado o fenômeno da luminescência descrito acima. O estado fundamental singlete (S_0), o primeiro estado excitado singlete (S_1), e o estado tripleto (T_1) estão representados por linhas escuras horizontais. Nestes estados, os fluoróforos podem existir em diferentes níveis de energia vibracionais (representados por 0, 1, 2...). As setas verticais representam as transições entre os estados e o comprimento de cada seta bem como sua cor representam a energia e o comprimento de onda respectivamente.^{66,67}

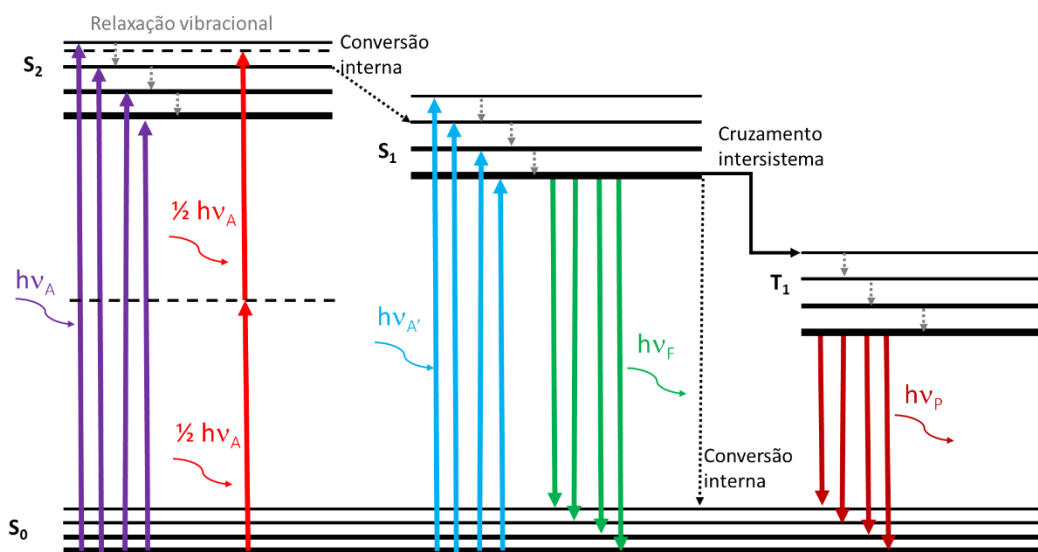


Figura 3.1 –Diagrama de Jablonski. As setas apontando para cima, em violeta e azul e vermelho representam a energia absorvida pelo sistema. Em cinza é possível notar as relaxações vibracionais. A conversão interna e externa está indicada pela seta preta tracejada. A seta preta contínua, indica o cruzamento intersistema, que envolve estados excitados singlete e tripleto. Em verde, está representado o decaimento referente à fluorescência, e em vinho, o decaimento da fosforescência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As transições para absorção de energia ocorrem tipicamente em tempos da ordem de 10^{-15} s (Princípio de Franck-Condon). Após este processo, o fluoróforo excitado pode estar no nível eletrônico excitado S_2 , e para voltar ao estado fundamental, inicialmente a perda de energia se dá por decaimentos não-radiativos, ou seja, a energia absorvida é dissipada em vibrações moleculares, colisões de moléculas, e transferência de energia entre moléculas (Regra de Kasha). Estes processos não-radiativos tem duração aproximada de 10^{-12} s.⁶⁶

Após o processo de relaxação vibracional, caso o fluoróforo ainda possua energia suficiente para migrar para outro estado excitado singlete, ele o faz por conversão interna (S_2 para S_1). Neste processo a molécula passa para outro estado, ainda excitado, mas com menor energia sem passar por mudanças de multiplicidade do spin (singlete-singlete ou tripleto-triplete). Esta conversão é bastante eficiente quando os dois níveis são próximos de tal modo

que os seus estados vibracionais se sobrepõem. Este tipo de conversão também pode ocorrer entre os estados S_0 e S_1 porém é menos provável.⁶⁶⁻⁶⁷

O retorno ao estado fundamental a partir do mais baixo nível vibracional do estado excitado S_1 pode ocorrer ainda por uma transição permitida por dipolo elétrico, e as regras de seleção que determinam estas transições são $\Delta l = \pm 1$, $\Delta m = 0, \pm 1$ e $\Delta s = 0$, sendo neste caso a variação total do spin nula. O tempo de vida, ou seja, o tempo que a molécula fica neste estado excitado antes de decair é da ordem de 10^{-9} s, e pode ter grandes variações pois depende das interações que esta molécula está sofrendo com o meio ou com outras moléculas. Este tipo de processo radiativo é chamado de fluorescência.^{66,67}

A molécula pode ainda, a partir do estado excitado S_1 , sofrer um cruzamento intersistema, esta tem então uma conversão para primeiro estado tripleto T_1 . Neste caso, diferentemente do anterior ocorre uma variação não nula no valor do spin total do fluoróforo ($\Delta s = 1$). Emissões a partir deste estado são proibidas pelas regras de seleção de dipolo citadas anteriormente, entretanto podem ocorrer via interações de quadrupolo elétrico ($\Delta s = 0$). Este decaimento radiativo é denominado fosforescência, o tempo de vida deste estado é da ordem de 10^{-3} s.⁶⁶

Existem ainda outros modos de absorção de fótons por uma molécula, um deles é um processo não linear onde dois fótons de baixa energia que são absorvidos simultaneamente de modo a atingir um estado excitado singleto (Figura 3.1). Por si só, um único fóton de baixa energia não pode ser absorvido pois não tem energia ressonante com a transição a ser ativada, não estimulando assim os decaimentos radiativos. Entretanto, pode-se atingir a energia de excitação caso dois fótons de baixa energia atinjam a molécula com um intervalo de tempo de aproximadamente 10^{-16} s entre si, sendo assim, juntos eles podem atingir o limiar de excitação. Este tipo de absorção da luz tem uma probabilidade bastante baixa de acontecer em intensidades moderadas de luz, por isso para ativar estas transições são utilizados lasers de alta intensidade com pulsos ultracurtos (da ordem de 10^{-12} s).^{66,68}

A intensidade de fluorescência (I_F) de um conjunto de moléculas depende de diversos fatores: intensidade da excitação (Φ); energia do fóton incidente ($h \cdot \nu$) (onde h é a constante de plank e ν é a frequência da onda eletromagnética); eficiência de coleta da fluorescência (E); coeficiente de extinção (ϵ); eficiência quântica da reação de fluorescência (Ξ); e concentração do FS (C). Esta intensidade pode ser dada pela equação 1:

$$I_F = \frac{\Phi \cdot E \cdot \epsilon \cdot E \cdot C}{h \cdot \nu} \quad (1)$$

Alguns destes termos podem, muitas vezes, serem considerados constantes, tais como, a eficiência de coleta e o coeficiente de extinção, enquanto a intensidade de excitação pode também ser mantida constante.

3.2 Fotofísica das reações fotodinâmicas

As reações fotodinâmica envolvem interações entre a luz, fotossensibilizador e oxigênio presente no meio, estas reações levam à morte celular, esta é causada por espécies reativas geradas através do fotossensibilizador. Existem diversos tipos de mecanismos que podem causar morte celular, os principais são chamados mecanismo I e II.^{17,69} Ambos acontecem devido à excitação eletrônica da molécula do FS, esta a partir do estado excitado pode fluorescer conforme mostrado na seção anterior, ou pode também dar origem à estes mecanismos.

O mecanismo I gera, através da transferência de elétrons para as moléculas do meio, íons-radicaís que geram espécies reativas que são altamente tóxicas. Já o mecanismo II gera oxigênio singleto a partir da transferência de energia do FS quando este encontra-se no estado tripleto para o oxigênio molecular. Oxigênio singleto é uma forma reativa do oxigênio altamente citotóxica, sendo muitas vezes o principal mediador do dano celular causado pelas reações fotodinâmicas.^{17,70-71}

A Figura 3.2 mostra como funciona a iniciação dos mecanismos I e II a partir do diagrama de Jablonski. Através da absorção de luz, o fotossensibilizador é excitado, do seu estado singleto fundamental a um outro estado singleto excitado. No mecanismo tipo I pode-se ter geração de espécies reativas a partir deste estado singleto ou do estado tripleto. Já para o mecanismo tipo II ocorrer é necessário que haja a inversão do spin do elétron excitado (cruzamento intersistema) que gera o estado tripleto do fotossensibilizador. Como o elétron excitado agora tem spin paralelo ao seu elétron emparelhado antigo, ele não pode imediatamente se reverter para um nível de energia mais baixo por conta do princípio de exclusão de Pauli. Por conta das regras de seleção de spin que especificam que interações tripleto-singleto não são permitidas, e interações tripleto-tripletto são permitidas, o fotossensibilizador pode reagir facilmente com o oxigênio molecular que é uma das poucas moléculas que tem estado tripleto como estado fundamental.^{17,69-71}

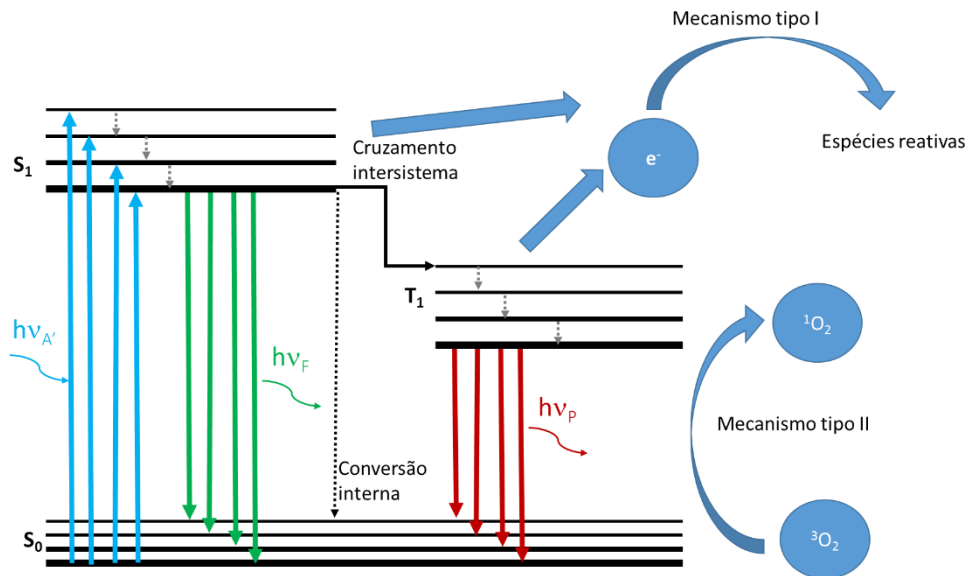


Figura 3.2 – Diagrama de Jablonski para reações fotodinâmicas. As setas azuis apontando para cima, representam a energia absorvida pelo sistema. Em cinza é possível notar as relaxações vibracionais. A conversão interna e externa está indicada pela seta preta tracejada. A seta preta contínua, indica o cruzamento intersistema. Em verde, está representado o decaimento referente à fluorescência, e em vinho, o decaimento da fosforescência. Os mecanismos tipo I e II estão representadas pelas setas azuis ao lado dos estados excitados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao se contar com muitas moléculas no meio, ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente e cada fotosensibilizador tem uma probabilidade diferente de fazer cada um dos dois mecanismos por conta da sua constituição molecular, além disso, estes produtos também podem ser formados pela concentração de oxigênio e pelo meio intracelular. A morte causada pelas reações fotodinâmicas pode ser por necrose ou apoptose.¹⁷

3.3 Microscopia de fluorescência confocal por varredura laser

Um microscópio de fluorescência nada mais é que um microscópio convencional, que utiliza lentes convergentes para proporcionar uma visualização aumentada de objetos, porém com iluminação monocromática apropriada para excitar a amostra. Este tipo de microscópio utiliza ainda filtros ópticos apropriados de modo a não captar a luz proveniente da fonte luminosa, proporcionando a aquisição apenas da luz emitida pela espécie, de modo a formar a imagem de fluorescência da amostra de interesse. Em geral, estes microscópios são ditos invertidos, já que a amostra é iluminada por baixo. Além disso, o sinal de fluorescência é normalmente captado na geometria de reflectância.^{68,72}

A microscopia de fluorescência é dita confocal quando, além do aparato descrito anteriormente, existe ainda a presença de uma íris, também chamada de *pinhole*, que permite

apenas a passagem de luz provinda do ponto focal das lentes, e é posicionada antes do detector. Deste modo, a imagem adquirida é apenas de um ponto focal, justificando o nome desta técnica de microscopia. A Figura 3.3 mostra o funcionamento desta íris. Nela é possível observar os raios luminosos partindo da esquerda para a direita: os raios azuis estão no ponto focal das lentes, eles passam pelo orifício da íris e atingem o detector; os raios de luz representados em amarelo não estão no ponto focal das lentes, sendo, portanto, barrados pela íris e não atingindo o detector (As cores foram escolhidas aleatoriamente e são meramente ilustrativas, não representando diferentes comprimentos de onda). Na Figura 3.4, o cilindro vermelho representa uma célula de *C. albicans* utilizada neste trabalho, a faixa preta representa o plano focal de onde a fluorescência é coletada.

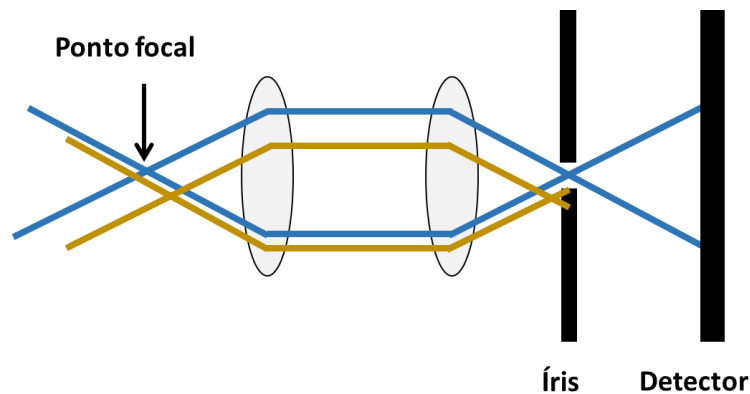


Figura 3.3 – Representação da exclusão da luz provinda de fora do ponto focal pela íris. As linhas azuis estão no ponto focal das lentes e passa pelo orifício da íris, enquanto as linhas amarelas não estão no ponto focal e são excluídas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

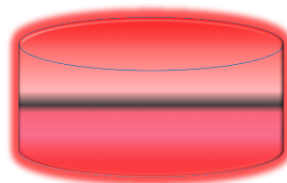


Figura 3.4 – Representação do plano focal (faixa preta) dentro da célula representada pelo cilindro vermelho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Do diâmetro da abertura da íris deriva-se a capacidade de diminuir espessura do plano focal observado no microscópio (resolução no eixo z). Entretanto, não apenas menores diâmetros de abertura da íris resultam em maior resolução, já que esta é limitada pelo limite de difração. Além disso, menores aberturas resultam em captação de menos fótons pelo detector, diminuindo assim a razão sinal-ruído. Visando melhorar esta razão pode-se escolher uma lente objetiva com maior abertura numérica para captar mais fótons, ou então, usar um comprimento de onda de excitação menor para uma melhor resolução. Deste modo, os

diâmetros de abertura da íris (d_A) podem ser otimizados de acordo com a equação 2, este diâmetro tem unidades de *Airy* e depende não só do comprimento de onda utilizado (λ), como também da abertura numérica da lente (NA). Usualmente são utilizados diâmetros de 0,7 até 1,5 *Airy* para a abertura da íris, dependendo do nível de sinal que é obtido pela fluorescência da espécie analisada.^{68,72}

$$d_A = \frac{1,22 \lambda}{NA} = 1 \text{ Airy} \quad (2)$$

Deste modo, o microscópio de fluorescência confocal ilumina a amostra ponto a ponto, coletando a fluorescência em apenas um plano focal. Para iluminar vários pontos e por fim construir uma imagem de fluorescência confocal, são utilizados dois espelhos de varredura (um no eixo x e outro no eixo y), a resolução (d) (segundo o critério de *Rayleigh*)⁷² nestes eixos (resolução lateral) está limitada ao limite de difração (equação 3) e é de aproximadamente algumas centenas de nanômetros.

$$d = \frac{\lambda}{2 NA} \quad (3)$$

A Figura 3.5 mostra um esquema de um microscópio de fluorescência confocal invertido por varredura a laser, a luz proveniente do laser representada pela linha azul é encaminhada até a amostra pelos espelhos de varredura e as lentes do microscópio. Ao atingir a amostra é gerada a fluorescência, representada pela linha verde, e esta é coletada pelo mesmo caminho da luz de excitação passando ainda por filtros ópticos de modo a excluir a reflexão do laser e pela íris para excluir a fluorescência proveniente de fora do ponto focal.

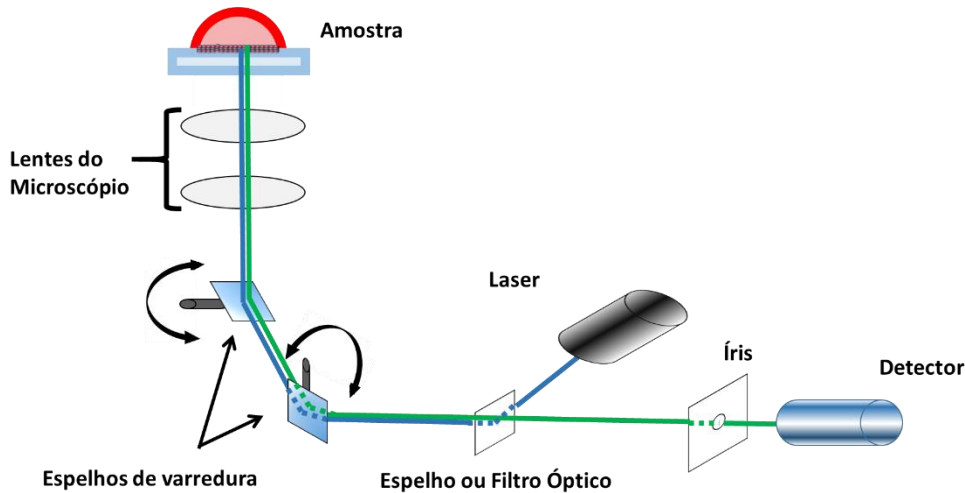


Figura 3.5 – Representação de um microscópio de fluorescência confocal invertido por varredura a laser. A linha azul representa a luz de excitação proveniente do laser, enquanto a linha verde representa a fluorescência da amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Imagem de tempo de vida de fluorescência

Para fazer imagens de tempo de vida de fluorescência (FLIM – acrônimo do inglês *fluorescence lifetime imaging microscopy*) precisa-se antes entender o comportamento temporal da fluorescência. Este comportamento baseia-se na variação do número de moléculas excitadas (n) em relação ao tempo (t) e na taxa de decaimento de fluorescência (τ) seguindo a equação 4:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau}n(t) \quad (4)$$

Esta equação tem um comportamento de decaimento exponencial, além disso vale notar que ela só tem início temporal após a excitação das moléculas.⁷²

Além disso, diferentes fluoróforos podem apresentar diferentes tempos de decaimento, ou até mesmo um único fluoróforo pode apresentar tempos diferentes devido às condições de interações entre moléculas ou entre a molécula e o meio. Por isso mais geralmente, o decaimento pode ser escrito como a forma de uma combinação de um número N de decaimentos exponenciais (equação 5).^{66,72}

$$f(t) = \sum_{i=1}^N a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (5)$$

Onde $f(t)$ é a função de decaimento de fluorescência que varia em relação ao tempo (t), τ_i é o tempo de decaimento e a_i é a amplitude dessa exponencial. Pode-se ainda, através dos valores τ_i e a_i , calcular o tempo de vida médio (τ_m) pela equação 6.^{66,72}

$$\tau_m = \frac{\sum_{i=1}^N a_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^N a_i \tau_i} \quad (6)$$

Para medir o tempo de decaimento de fluorescência a forma mais utilizada é uma técnica conhecida como contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC – acrônimo do inglês *Time-Correlated Single Photon Counting*). Nesta técnica é utilizado um laser de pulsos curtos (em geral da ordem de centenas de picosegundos) para excitar a amostra, a fluorescência é coletada e encaminhada a detectores rápidos (em geral fotodiodos de avalanche). As condições deste experimento são tais que não mais do que um único fóton seja detectado por pulso. Desta forma, é medido o intervalo de tempo entre a excitação e a chegada do fóton ao detector após cada pulso de excitação. Depois de contar o tempo deste fóton o detector aguarda o próximo pulso do laser para iniciar novamente a aquisição. Após da contagem de múltiplos fótons, um histograma de tempos é construído. Este histograma representa a curva de decaimento temporal da fluorescência. Devido ao fato de que o pulso do laser tem uma largura temporal e a eletrônica do sistema não tem resposta instantânea, o sinal de fluorescência de uma molécula que tenha tempo de decaimento de fluorescência extremamente curto ($\tau \rightarrow 0$) não seria medido como uma distribuição delta de Dirac, mas como uma função alargada. De fato esse alargamento pode ser observado em todas as medidas realizadas, e este é chamado de função resposta do sistema (IRF – acrônimo do inglês *Instrument Response Function*).

O sinal medido é então a convolução do decaimento exponencial ideal com a IRF. Portanto para a análise do sinal, esta IRF deve ser deconvoluída da curva de decaimento e a partir daí é possível calcular os tempos de vida de fluorescência.⁷²⁻⁷³

A Figura 3.6 ilustra o funcionamento de um sistema TCSPC, as linhas intituladas Pulso 1,2..N mostram o tempo necessário para o primeiro fóton chegar ao detector, após contar todos estes fótons é construído um histograma que mostra a distribuição de probabilidade de decaimento em relação ao tempo, ao extrair a IRF e ajustar esse histograma pela equação 5 pode-se tirar o tempo de decaimento da fluorescência.⁷³

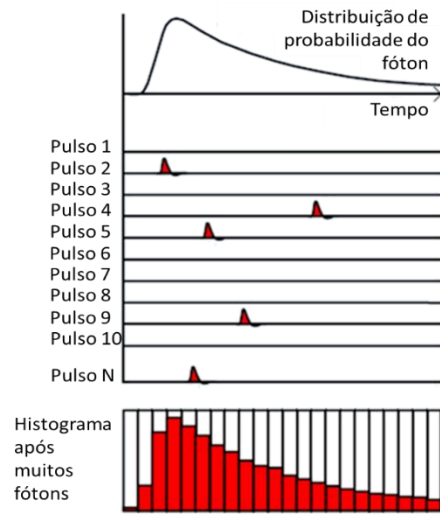


Figura 3.6 –Esquema de funcionamento de um detector TCSPC. As linhas representam cada pulso do laser e o pico vermelho em cada linha representa um fóton detectado. Por fim em barras vermelhas é mostrado o histograma temporal construído a partir da detecção de muitos fótons

Fonte: Adaptada de BECKER⁷³

4 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a hipótese de um novo tipo de protocolo para IFD, neste foi estudado o efeito de uma pré-iluminação na incubação de dois FSs, sendo um deles o Photogem[®] e outro a Curcumina Natural em células de *C. albicans*.

4.1 Objetivos específicos

- Investigar os comprimentos de onda de absorção e emissão dos FSs de modo a caracterizá-los para melhorar o processo da IFD.
- Avaliar o efeito da pré-iluminação no aumento de concentração intracelular de Photogem[®] em células de *C. albicans*.
- Inferir o efeito da pré-iluminação na inativação de células de *C. albicans* com o Photogem[®].
- Estudar a interação do FS na célula de *C. albicans* por meio de imagens de microscopia confocal de fluorescência, e de imagens de tempo de decaimento de fluorescência.
- Desenvolver métodos multivariados para monitoramento em tempo real da entrada e da localização do FS nas células.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cultura celular planctônica

Foram utilizadas células de *C. albicans* ATCC 90028, fornecidas pela FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). Estas células foram cultivadas e cresceram por 24 horas a uma temperatura de 37°C em meio Sabouraud Dextrose Agar (Difco® – BD & Co, EUA).

Esta célula foi escolhida por ter tamanho suficiente para que a resolução do microscópio seja muito superior ao diâmetro da célula, além disso, por conta do seu formato ovalado, esta célula torna-se interessante para realizar medidas de microscopia confocal, pois é bem representada pelo corte do plano focal, permitindo assim o estudo de interação dos FS com a membrana e o interior das células. Além disso, ainda é uma célula de simples cultivo.

5.2 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores utilizados foram o Photogem® (produzido pela Photogem LLC, Company, Moscow, Russia) e Curcumina Natural (produzida pela PDT Pharma Ltda., Cravinhos, Brasil). O primeiro foi utilizado em todos os experimentos, enquanto o segundo foi utilizado apenas nos experimentos de microscopia confocal.

Para o primeiro foi preparada uma solução de 5 mg/mL de Photogem® em água destilada, já para o segundo foi preparada uma solução de mesma concentração mas desta vez solubilizada em 1% DMSO (dimetil sulfóxido) e 99% álcool, já que a Curcumina é insolúvel em água e tem alta taxa de degradação diária.⁷⁴

A curcumina natural é constituída por 3 pigmentos curcuminoides: aproximadamente 53,4% de curcumina, 46,6% demetoxicurcumina e *bis*-demetoxicurcumina.

As moléculas de Photogem® e curcumina são mostradas na Figura 5.1 (a) e (b) respectivamente.

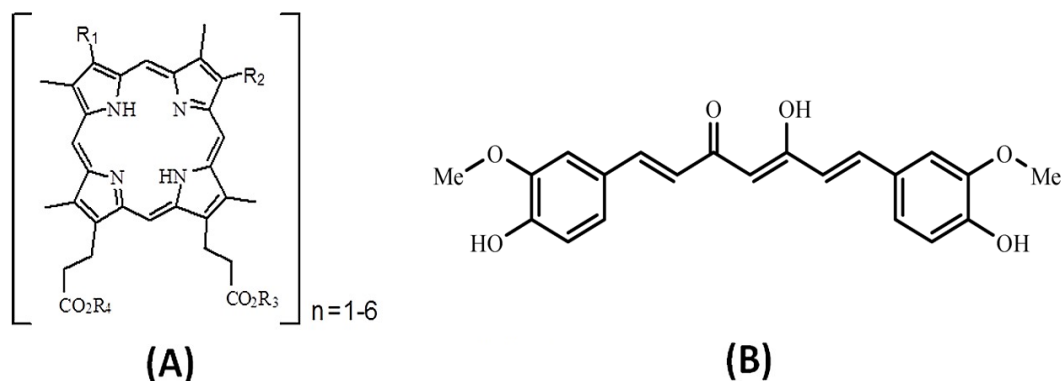


Figura 5.1 – Forma molecular dos FSs: Photogen[®] (a) e de Curcumina (b).
 Fonte: (a) MENEZES.⁷⁵; (b) SILVA.⁷⁶

5.2.1 Caracterização dos Fotosensibilizadores

De modo a caracterizar a absorção e emissão dos FS foram feitas medidas dos mesmos em um fluorímetro UV-Vis (Perkin Elmer, UV-1601PC), os FSs foram diluídos em água e a concentração escolhida foi de 25 μM de modo a não saturar o equipamento. As matrizes de excitação emissão (MEE) foram realizadas com passo de 10 nm entre 290-500 nm e o espectro de fluorescência foi coletado entre 500-800 nm com resolução de 0,5 nm.

5.3 Experimentos Microbiológicos

Em todos os experimentos de microbiologia, as células foram retiradas do meio de cultura, diluídas em solução tampão fosfato salino (PBS – acrônimo do inglês *phosphate buffered saline*) e centrifugadas três vezes (5500 rpm durante 8 min) e ressuspendidas em mesmo tampão, a concentração de células em cada um dos experimentos variou de modo a demonstrar melhor as diferenças esperadas.

5.3.1 Ensaios de quantificação de absorção de fotosensibilizador pelas células

A concentração de *C. albicans* inicial para este experimento foi de 10^8 células/mL e 5 mL desta solução foi utilizada. De modo a escolher a concentração de FS a ser utilizada, uma rápida estimativa foi realizada, esta teve por objetivo obter um número de moléculas que possa recobrir toda a superfície da levedura. Para esta estimativa foram feitas duas aproximações. Primeiramente, foi assumido que o diâmetro de uma célula de *C. albicans*

(forma esférica) é aproximadamente 6 μm e que o tamanho de uma molécula de FS é de aproximadamente 4 nm (anel plano de uma porfirina, Figura 5.1). Consideramos também que a interação da molécula de FS com a parede celular é tal que ela assume um ordenamento.

Deste modo, o número de moléculas de FS (N) necessárias para recobrir toda a extensão da membrana de uma única célula deve ser dado por:

$$N \simeq \frac{A_{celula} (m^2)}{A_{FS} (m^2)} = \frac{4 \pi R_{celula}^2}{4 \pi R_{FS}^2} = \frac{4 \pi (3 \cdot 10^{-6})^2}{\pi (2 \cdot 10^{-9})^2} \quad (7)$$

$$N \simeq \frac{2 \cdot 10^{-12}}{10^{-18}} = \frac{9 \cdot 10^6 \text{ moléculas}}{\text{célula}} \quad (8)$$

Onde A_{celula} , A_{FS} , R_{celula} e R_{FS} são a área e o raio da célula e da molécula de FS respectivamente. Tendo em vista que a concentração de células é de 10^8 células/mL e a solução continha 5 mL, o número de moléculas de FS necessárias para cobrir todas estas células (N_t) é de aproximadamente:

$$N_t \simeq \frac{9 \cdot 10^6 \text{ moléculas}}{\text{cel}} \cdot \frac{10^8 \text{ cel}}{\text{mL}} \cdot 5 \text{ mL} \quad (9)$$

$$N_t \simeq 10^{15} \text{ moléculas de FS} \quad (10)$$

O número de mols equivalentes a este número de moléculas é:

$$N_t \simeq \frac{10^{15}}{6 \cdot 10^{23}} \simeq 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \quad (11)$$

Deste modo, conhecendo a concentração da solução estoque de FS (600 $\mu\text{M/L}$), a concentração de FS (C_{FS}) necessária para obter este número de moléculas na solução de *C. albicans* deve ser aproximadamente:

$$C_{FS} \simeq \frac{1 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}{5 \cdot 10^{-3} \text{ L}} \simeq 2 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \quad (12)$$

Deste modo, a concentração escolhida foi de 100 μM pois assim haverá moléculas suficientes para que todas as células tenham moléculas de FS na sua membrana e também no seu volume, caso haja incorporação no interior das mesmas.

A fonte de luz para pré iluminação utilizada foi o Velscope® (Velscope, EUA) com potência média de 3 mW/cm^2 e emitindo em torno de 410 nm e 450 nm, com doses totais de 0 J/cm^2 (sem pré-iluminação), 1 J/cm^2 , 2 J/cm^2 e 4 J/cm^2 . Foram preparadas duas amostras que continham o micro-organismo juntamente com Photogem®, onde uma foi pré iluminada e outra teve sua incubação no escuro. Devido à alta degradação desse FS nesse comprimento de onda de iluminação⁷⁷, uma terceira amostra contendo apenas o FS foi também iluminada com o objetivo de normalizar a amostra iluminada contendo as células e o FS.

O espectro de emissão da fonte de luz utilizada pra pré-iluminação (Velscope®) é mostrado na Figura 5.2. Esta fonte tem dois picos de emissão na região do azul, o primeiro menos intenso em 410 nm e o segundo mais intenso em 450 nm, não apresentando assim emissão em nenhum outro comprimento de onda.

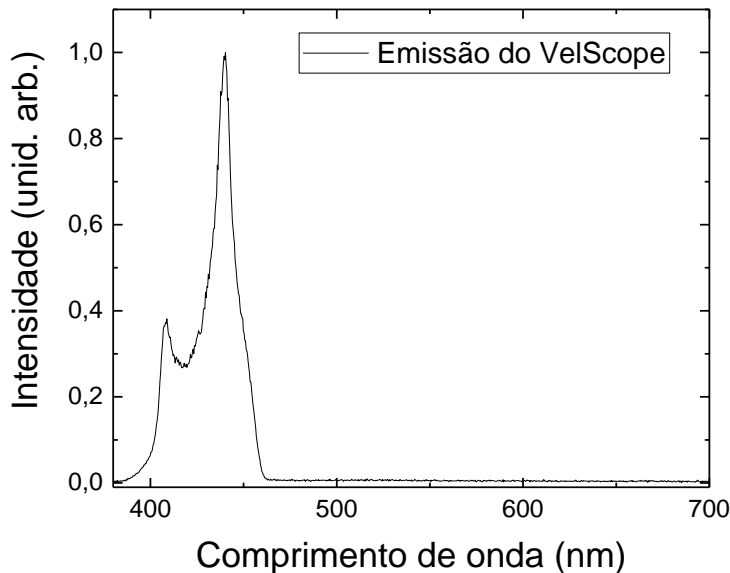


Figura 5.2 – Espectro de emissão do Velscope®.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram então realizados períodos de pré iluminação de 5; 10; e 20 minutos. Após cada período de iluminação as amostras foram centrifugadas a 5500 rpm, tiveram parte do seu sobrenadante retirado e foi então medido o espectro de absorção deste sobrenadante de cada uma das três, este espectro está ligado à concentração destas moléculas de FS neste meio. Por

meio deste experimento foi possível obter de forma indireta uma quantificação da entrada de moléculas de FS nas células, já que tais moléculas saíram do sobrenadante.

5.3.2 Ensaios de viabilidade celular

A concentração de *C. albicans* inicial para este experimento foi de 10^6 células/mL, enquanto a concentração de Photogem[®] foi de 10 µg/mL, esta concentração foi escolhida de acordo com o trabalho de Dovigo et al.,⁵⁷ este demonstrou que esta concentração de FS não foi suficiente para inativar todas as células de *C. albicans*.

Para pré iluminação foi utilizado o mesmo equipamento e mesmas condições descritas anteriormente. Já para inativação fotodinâmica foi utilizado um sistema para iluminação de placas multipoços (desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico - LAT/USP do Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP) de 35 mW/cm² de potência emitindo em 630 nm com doses totais de 8 J/cm² e 17 J/cm². Novamente, tais condições experimentais foram escolhidas de acordo com o estudo de Dovigo et al.⁵⁷ que utilizou estas doses de luz e demonstrou que esta levedura não tinha grande inativação utilizando o Photogem[®] com estes parâmetros.

Foram analisadas quatro condições experimentais, para descrevê-las será utilizada a notação “L##” para Luz de inativação e “PL#” para luz de pré-iluminação, onde “##” e “#” é o número de Joules/cm² entregues às células em cada uma das etapas respectivamente. A notação “F+/-” foi utilizada para o fotossensibilizador, onde “+” ou “-” denotam presença ou ausência de fotossensibilizador respectivamente. Todas as placas foram mantidas no escuro e em repouso por 20 minutos para atingir a condição de difusão total do fotossensibilizador e incubação. As amostras que não foram pré-iluminadas foram mantidas em repouso durante o mesmo tempo que as tiveram iluminação, de modo que o tempo de incubação total não fosse alterado.

Cada condição experimental foi realizada em triplicata e a contagem das colônias foi realizada após 48 h, o número de colônias foi considerado com referência à diluição. A partir da contagem de colônias foi calculada a média e o desvio padrão (das triplicatas de cada amostra) do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (*UFC/mL*) através da equação 13.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} de col\^onias \times n^{\circ} de dilui\^oes}{Volume (mL)} \quad (13)$$

As condi\^oes experimentais foram as seguintes: “F-PL0L0“, ou seja, sem fotosensibilizador, sem pr\^e ilumina\^ao e sem luz de inativa\^ao fotodin\^amica (controle), “F+PL0L0”, com fotosensibilizador mas sem nenhum tipo de ilumina\^ao de modo a avaliar a toxicidade da droga no escuro, “F-PL#L##”, isto \^e, sem fotosensibilizador mas com doses de pr\^e-ilumina\^ao de 0 J/cm², 1 J/cm², 2 J/cm² e 4 J/cm², todas seguidas de uma ilumina\^ao de 8 J/cm² ou 17 J/cm², de modo a avaliar a capacidade de inativa\^ao da luz sem droga, e por fim “F+PL#L##”, isto \^e, utilizando as mesmas doses descritas anteriormente entretanto neste caso com o fotosensibilizador presente, para avaliar se a pr\^e-irradia\^ao est\^a auxiliando a inativa\^ao fotodin\^amica.

5.4 Preparação para microscopia confocal

Assim como nos experimentos de microbiologia, para os experimentos de microscopia, as c\^elulas foram retiradas do meio, diluidas em PBS e centrifugadas tr\^es vezes (5500 rpm durante 8 min) e ressuspendidas em mesmo tamp\^ao, foi ent\^ao fixada uma concentra\^ao de aproximadamente 10⁸ c\^elulas/mL . Esta concentra\^ao foi utilizada de modo a diminuir o espa\^co livre entre as c\^elulas para que estas n\^ao se movessem durante as medidas de microscopia. Do mesmo modo que no item 5.3.1 a concentra\^ao de FS escolhida foi de 100 μM pela mesma estimativa. Durante estes experimentos a temperatura foi mantida constante de 37°C.

5.5 Microscópio confocal de fluorescência de varredura a laser

As imagens foram obtidas atrav\^es de um microscópio de fluoresc\^encia confocal de varredura a laser invertido (Zeiss – LSM780, Zeiss, Jena, Alemanha). Este conta com um laser de diodo emitindo em 405 nm, um laser de Argonio (Ar⁺) emitindo em 488 nm; 514 nm e 528 nm, o primeiro operando em modo cont\^inuo (tamb\^em chamado de *cw*) e pulsado, e o segundo operando apenas em modo cont\^inuo, estes dois lasers foram utilizados para excita\^oes por \^unico f\^oton. Para excita\^ao por duplo f\^oton foi utilizado um laser pulsado de femtosegundo de

Ti:Sa (Chameleon Vision II, Coherent Inc., Santa Clara, Canadá) com largura de pulso de aproximadamente 100 fs, comprimento de onda sintonizável entre 690-1080 nm, sendo este fixado em 800 nm. Para detecção o microscópio conta com trinta e duas (32) fotomultiplicadoras de GaAsP de alta sensibilidade.

O microscópio pode operar em dois modos de aquisição. Para o primeiro, chamado de modo Canal, são destinadas duas (2) fotomultiplicadoras e neste modo o intervalo de aquisição foi fixado, através de filtros ópticos, de forma diferente para cada FS, ou seja, para o Photogem[®] a fluorescência de 400-600 nm foi encaminhada a primeira fotomultiplicadora (Canal 1) e a 600-700 nm para a segunda (Canal 2), enquanto para a Curcumina natural foram fixados os intervalos de 400-500 nm (Canal 1) e 500-700 nm (Canal 2), separando em ambos os casos a autofluorescência (AF) da levedura e a fluorescência do FS. Neste modo cada pixel da imagem contém a intensidade de fluorescência de cada uma das duas regiões espectrais separadamente. O segundo tipo de aquisição é chamado de modo Espectral, onde trinta e duas (32) fotomultiplicadoras são utilizadas e um elemento dispersivo divide cada fração espectral para um dos 32 detectores, deste modo é possível observar um intervalo espectral de 400-700 nm com resolução aproximada de 9 nm, neste modo cada pixel da imagem contém a intensidade de fluorescência de um pequeno intervalo do espectro, formando assim uma imagem espectral.

Dois regimes foram investigados usando as imagens do modo Canal, o primeiro regime foi observar como a concentração de FS aumenta com a pré irradiação, neste caso tanto para o Photogem[®] quanto a Curcumina Natural os lasers utilizados foram o de 405 nm (contínuo) e o de 800 nm (pulsado), em ambos os casos a potência do laser foi mantida baixa e constante, a velocidade de varredura em torno de 3 μ s por pixel, contando com 1024 pixels em cada eixo.

O segundo regime foi investigar a mobilidade das moléculas dos FS, neste caso uma região de interesse (RI) da imagem foi escolhida para sofrer uma degradação devida à uma alta potência de irradiação (*photobleaching*). Para isso, o laser, ao fazer a varredura na amostra, ao chegar na RI teve sua potência aumentada cerca de 30 vezes (Figura 5.3), degradando assim as células e moléculas de FS presentes nesta região, ao observar temporalmente a RI após este photobleaching pode-se ter informações da mobilidade de moléculas da amostra. A recuperação da fluorescência do FS ao nível inicial após o photobleaching foi ajustada com a equação 14, nela o parâmetro A mostra o máximo de intensidade de fluorescência atingido e o parâmetro τ mostra o tempo característico de recuperação. Já para o regime quando a intensidade de fluorescência retorna ao nível maior que o inicial outra equação foi utilizada, esta será descrita na seção de resultados.

$$F(t) = f \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \quad (14)$$

Ambos regimes foram repetidos para ambos FS e em dois experimentos, o primeiro onde a amostra contém com um reservatório de FS no meio (Figura 5.4), e o segundo onde as células foram lavadas de modo a tirar todo o FS presente no meio (Figura 5.5).

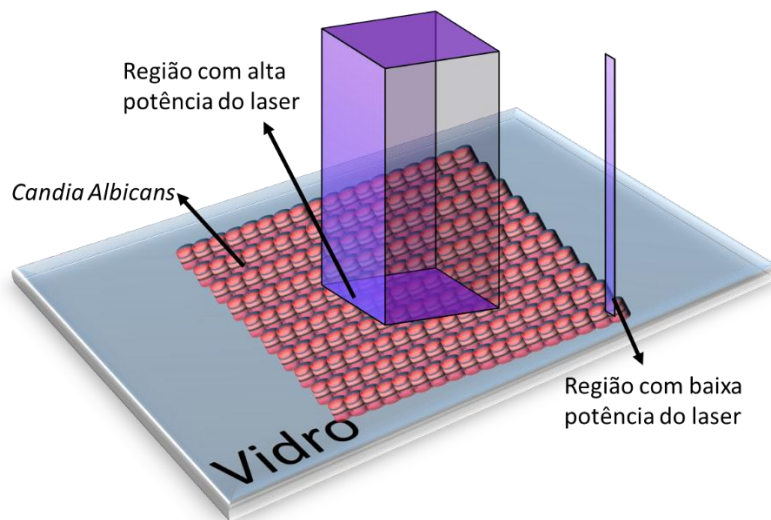


Figura 5.3 – *Photobleaching* das moléculas de *C. albicans*, a região central tem alta potência do laser enquanto as regiões exteriores tem baixa potência, não degradando as moléculas.
Fonte: Elaborada pelo autor.

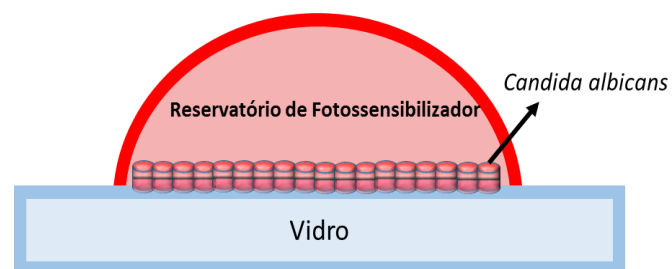


Figura 5.4 – *Candida Albicans* em procedimento de pré irradiação com reservatório de fotossensibilizador no meio.
Fonte: Elaborada pelo autor

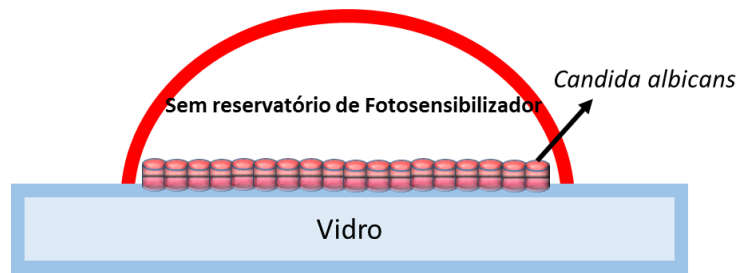


Figura 5.5 – *C. albicans* em procedimento de pré irradiação sem reservatório de fotossensibilizador no meio.
Fonte : Elaborada pelo autor.

Já no modo Espectral as imagens tiveram o intuito de monitorar o aumento de concentração do Photogem[®] com a irradiação, neste caso o laser utilizado foi o de 800 nm (pulsado), sua potência foi mantida baixa e constante, a velocidade de varredura em torno de 3 μ s por pixel, contando com 1024 pixels em cada eixo.

5.6 Imagem de tempo de vida de fluorescência via microscopia

O sistema de imagem de tempo de vida de fluorescência via microscopia, FLIM, faz uso do não só dos lasers, bem como do sistema óptico do microscópio confocal descrito na seção anterior, entretanto para esta medida a fluorescência da amostra transportada a dois detectores TCSPC de avalanche SPAD (acrônimo do inglês *single-photon avalanche diode*), em cada um deles é colocado um filtro óptico de modo que apenas a fluorescência de uma região espectral específica seja adquirida em cada um dos detectores.

Como as células utilizadas neste trabalho tem auto-fluorescência na região espectral de 400-500 nm, um dos detectores fixado nesta região espectral, enquanto no outro foi utilizado um filtro optico que permite a passagem da banda 600-700 nm com o objetivo de coletar a fluorescência do Photogem[®].

Cada pixel da imagem teve seu tempo de decaimento aferido, e através do histograma de contagem de fótons, foi ajustado uma IRF e um decaimento exponencial duplo, ou seja $N=2$ na equação 4 (Figura 5.6). Foi calculado então através da equação 5 o tempo de decaimento médio para cada pixel, a imagem foi produzida com cores falsas onde cores mais azuladas mostram tempos de decaimento menores, enquanto cores mais avermelhadas mostram tempos maiores.

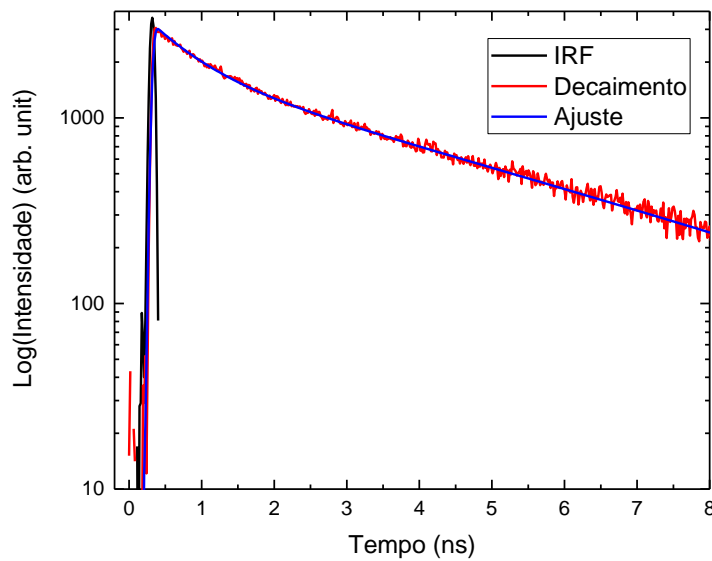


Figura 5.6 – Sinal de tempo de decaimento medido em vermelho, ajuste da IRF em preto e ajuste da função biexponencial em azul.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Cada pixel da imagem leva a informação de um tempo de vida médio, deste modo um histograma destes tempos foi então construído para possibilitar a comparação dos tempos para cada região, este histograma foi normalizado de forma que o seu máximo tivesse valor igual a uma unidade e por fim os picos destas distribuições foram aproximados por funções Gaussianas de modo a obter o centro do pico (x_c) e a sua largura à meia altura (w) (equação 15).

$$y = y_0 + Ae^{-\frac{(x-x_c)^2}{2w^2}} \quad (15)$$

5.7 Processamento das imagens

Conforme descrito no item 5.5, foram realizados dois tipos de aquisição das imagens, designados modo Canal e Espectral. Utilizando o modo Canal dois regimes foram investigados, o primeiro regime foi observar como a concentração de FS aumenta com a irradiação, para isso a intensidade média de fluorescência dos pixels de diferentes RIs foram analisadas temporalmente. As RIs escolhidas foram não só algumas células, como também a média de toda a região irradiada.

Outro regime estudado com as imagens de modo Canal foi o *photobleaching* do FS em condições de meio distintas. Foram então analisados os dados de intensidade média de

fluorescência de duas diferentes RIs da imagem, a primeira RI foi a que sofreu o *photobleaching*, enquanto a segunda foi a região que não sofreu. A primeira intensidade média de fluorescência foi dividida pela segunda de modo a normalizar pela degradação do FS.

Já para as imagens coletadas no modo Espectral foram realizados dois tratamentos estatísticos multivariados distintos (Figura 5.7), um supervisionado e um não supervisionado. Nas imagens pré e pós aumento de concentração de Photogem[®], cada pixel foi utilizado como entrada no algoritmo K-Means.⁷⁸ Este é um método iterativo não supervisionado onde K é o número de grupos e é determinado pelo usuário, este algoritmo assimila cada observável (pixel) a um dos K grupos, para isso baseia-se na distância Euclidiana entre os vetores de entrada (espectro equivalente ao pixel). O número K foi iterado de dez (10) até três (3), para cada um o método foi repetido cinco (5) vezes randomizando os K grupos iniciais, além disso o máximo de iterações até o método convergir foi fixado em cem (100). Para ambas imagens o método foi realizado para diversos valores de K, por fim foi escolhido o número máximo de K onde após as cem iterações o método convergiu em pelo menos três (3) das cinco (5) repetições. Deste modo foram fixados para a imagem pré-irradiação quatro (4) grupos, enquanto para a imagem pós-irradiação foram sete (7) grupos.

O próximo passo foi então calcular o espectro médio correspondente a cada um dos grupos, por meio da multiplicação destes espectros com o sistema RGB CIE94 foram escolhidas cores falsas para cada espectro médio de cada um dos K grupos, além disso a imagem original foi recolorida de acordo com a cor escolhida para o espectro.

A série temporal de imagens adquiridas durante o aumento de concentração de Photogem[®] induzido por luz foi investigada por meio de um método estatístico supervisionado chamado de rede neural artificial⁷⁹, este método é inspirado nas conexões neurais biológicas e tem sido utilizado em diversas áreas. Neste método uma rede de neuronios artificiais é construída e treinada (através de conexões únicas entre camadas de entrada e saída) para reconhecer padrões pré-estabelecidos em um novo conjunto de dados. Para treinar a rede foi escolhida a imagem do meio da série temporal, nesta imagem foi aplicado o método K-Means com os mesmos parâmetros descritos anteriormente de modo a encontrar grupos espectrais padrões a serem reconhecidos, com este método foram escolhidas cinco (K=5) classes. O treinamento da rede contou com os parâmetros de dez (10) camadas ocultas e vinte e três mil trezentos e cinquenta e sete (23.357) espectros de cada uma das classes. Com a rede treinada para reconhecer estes padrões cada pixel de cada imagem da série temporal foi testado e classificado como um dos K grupos discretizados anteriormente, totalizando mais de 94 milhões de pixels. De modo a observar as mudanças espectrais nas

imagens, estas foram reconstruídas de acordo com a classificação de saída da rede neural, a cada pixel foi então recolorido com cores falsas de alto contraste entre si com o objetivo de viabilizar a melhor observação das mudanças espectrais.

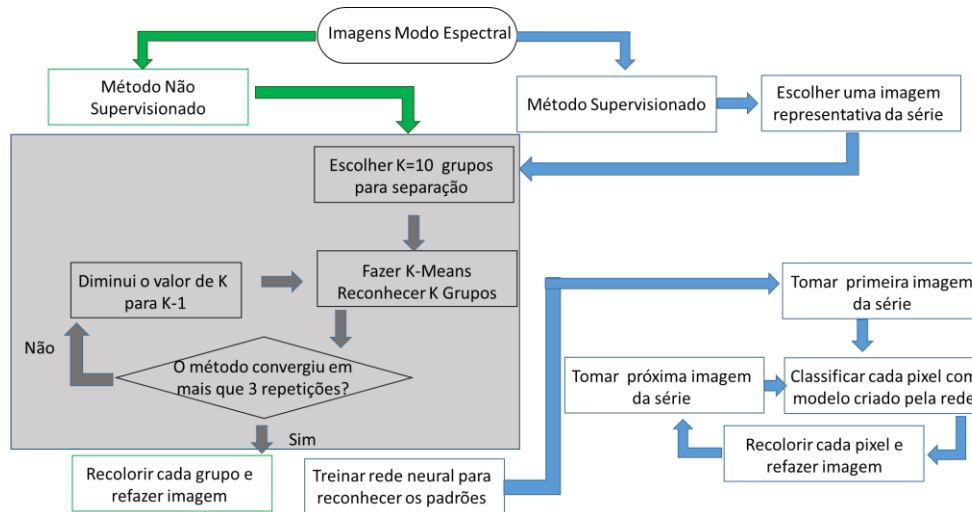


Figura 5.7 –Processamento das imagens espectrais, a caixa cinza mostra o algoritmo para escolher o número de grupos (K) pelo método K-Means. As setas verdes mostram o método completamente não supervisionado, enquanto as setas azuis mostram o método supervisionado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização dos Fotosensibilizadores

A caracterização dos FSs é necessária para poder definir parâmetros otimizados para estudo destas moléculas em técnicas como a microscopia confocal e imagem de tempo de vida de fluorescência.

As Figura 6.1 (a) e (b) mostram as matrizes excitação emissão do Photogem[®] sob diferentes condições, o primeiro mostra o FS não degradado, enquanto o segundo mostra o FS após 20 minutos de fotodegradação, a Figura 6.1 (c) mostra a mesma matriz para a Curcumina. Este gráfico mostra no eixo vertical diferentes comprimentos de onda de excitação, e no eixo horizontal os comprimentos de onda de emissão, as cores falsas mostram a intensidade de fluorescência, quanto mais azul menor intensidade, enquanto cores mais avermelhadas denotam maiores intensidades. As duas faixas diagonais brancas são a luz de excitação e a segunda ordem de difração da mesma respectivamente.

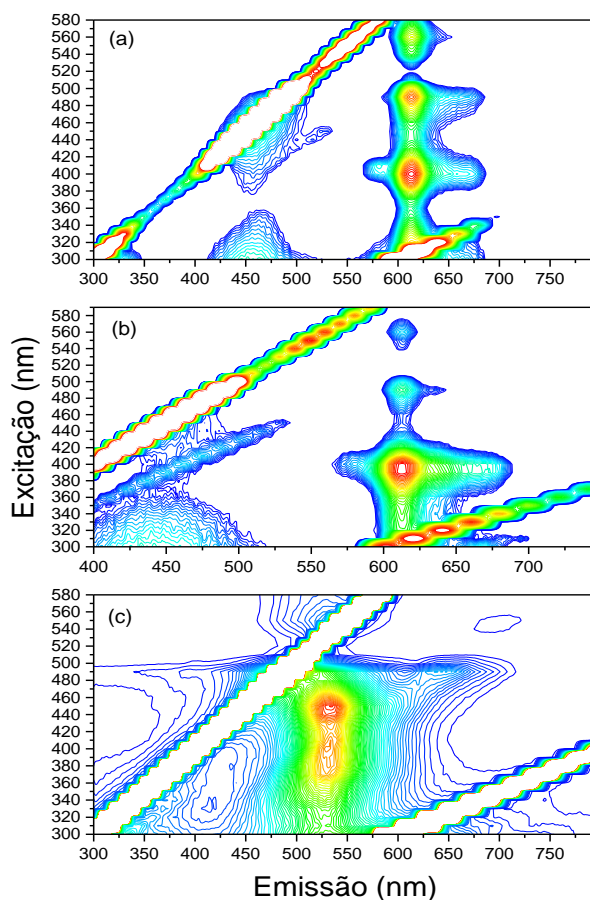


Figura 6.1 – Matriz excitação emissão do Photogem® não degradado (a) e após 20 minutos de fotodegradação (b), e da Curcumina (c). O eixo vertical mostra o comprimento de onda de excitação e o horizontal mostra o comprimento de onda de emissão para cada uma dessa excitação. As cores falsas designam a intensidade de fluorescência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota-se que o Photogem® (Figura 6.1 (a)) pode ser excitado nos comprimentos de onda de 390-410 nm (banda de Soret), 480-500 nm e 550-570 nm (bandas Qs), emitindo sempre nos comprimentos de onda de 600-625 nm, 660-700 nm, o mesmo FS após ser fotodegradado mostra diferença na sua excitação, deixando as bandas Qs de serem apresentadas com alta intensidade. É conhecido também que o Photogem® apresenta ainda mais uma banda Q em torno de 630 nm que não foi possível observar com este experimento.

Já na Figura 6.1 (c) pode-se notar que a Curcumina Natural ao excitada de 290-490 nm emite em torno de 450-550 nm, mas tem dois comprimentos de onda de excitação preferenciais de 390-410 nm e 440-460 nm, emitindo na mesma banda, corroborando com o estudo de Mondal, *et al.*⁷⁴ que mostra que quando diluída em água a curcumina tem grande banda de absorção que vai da região do ultravioleta até o azul. Vale ainda ressaltar que diferentes solventes podem alterar não só a emissão quanto a excitação das moléculas.

A Figura 6.2 (a) e (b) mostra os espectros de excitação e emissão do Photogem[®] nas duas condições da figura anterior, ou seja, sem degradação e fotodegradado respectivamente. As curvas preenchidas azul, verde e vermelha representam ajustes gaussianos para diferentes picos de emissão deste FS, é importante notar que o pico verde, em 638 nm aparece mais pronunciado no FS fotodegradado, isso se deve ao fato de que este pico de emissão é do fotoproduto do Photogem[®]. Ainda nesta figura, é importante notar que o espectro de excitação do fotoproduto é bastante diferenciado, não apresentando as bandas Qs, conforme mostrado no gráfico anterior.

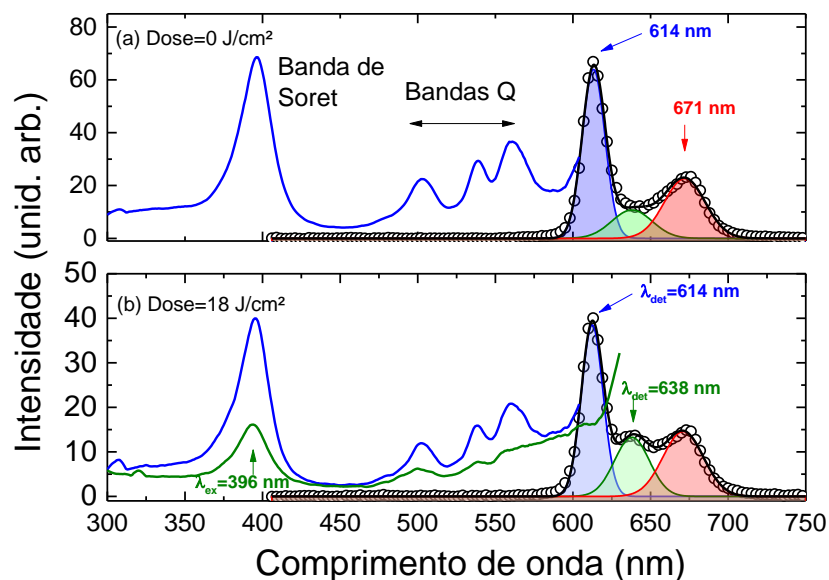


Figura 6.2 – Espectros de excitação (linhas sólidas verde e azul) e emissão (círculos ligados por linha preta) do Photogem[®] em duas condições, sem degradação (a) e fotodegradado (b) (verde). As curvas com preenchimento azul verde e vermelha são os ajustes gaussianos em cada um dos três picos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2 Quantificação de captação do fotossensibilizador pelas células

Medidas de concentração a partir da técnica de absorvância óptica em solução podem ser utilizadas para quantificar a interação e incorporação do FS com as células bem como otimizar as doses das drogas a serem empregadas na IFD. Este método é de uso geral, podendo ser empregado para qualquer outro sistema. Em especial, esta seção pretende demonstrar o aumento substancial da incorporação/interação do Photogem[®] induzido pela pré-iluminação durante o processo de incubação em células de *C. albicans* no regime de baixa dose de radiação. Os protocolos de IFD não consideram essa pré-iluminação. Otimizar e

reduzir as doses de radiação e do FS é de fundamental importância para a padronização de procedimentos, para a eficácia e sucesso dessa terapia e para a economia de materiais.

A Figura 6.3 mostra a absorvância normalizada do sobrenadante para diferentes tempos de incubação no intervalo de 20 minutos em duas condições: com iluminação (vermelha) para as doses de 0 J/cm² (sem pré-iluminação), 1 J/cm², 2 J/cm² e 4 J/cm² e sem iluminação (azul) mas com os mesmos tempos de incubação.

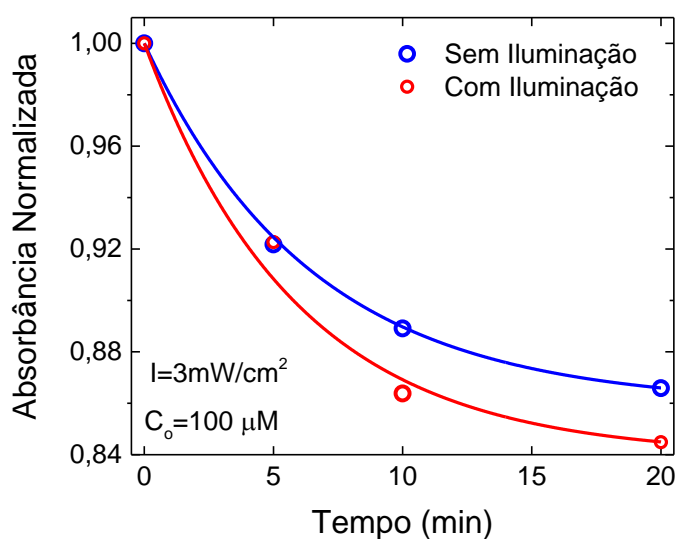


Figura 6.3 – Curva de captação de Photogem[®] pelas células em duas condições, com (vermelho) e sem (azul) pré-iluminação. No caso do experimento com iluminação as doses foram de 0 J/cm² (sem pré-iluminação), 1 J/cm², 2 J/cm² e 4 J/cm².

Fonte: Elaborada pelo autor.

Primeiramente, nota-se que a concentração do FS diminui 12% da concentração inicial ($C_0=100 \mu\text{M}$) após 20 minutos de incubação sem iluminação. Isso significa que 12 μM de FS interage as células e desaparece do sobrenadante. Esta concentração de FS que interage com as células é 5,5 vezes maior que a concentração estimada no item 5.3.1, ou seja, a membrana da *C. albicans* pode estar acomodando mais FS ou uma fração desta molécula está sendo internalizada durante a incubação.

Além disso, o decréscimo da concentração se aproxima da função exponencial com tempo característico de aproximadamente de 6 minutos sem iluminação, o que corrobora com os protocolos tradicionais, onde o tempo típico de incubação para estas células é de aproximadamente de 30 min.⁵⁷ Nota-se também que apesar deste tempo de 30 minutos ser bastante utilizado, em 20 minutos já é possível notar uma estabilização nesta incubação.

É interessante notar ainda que as células de *C. albicans*, que sofreram irradiação no comprimento de onda da banda de Soret (em torno de 400 nm) durante a incubação, apresentam maior processo de incorporação/interação do Photogem[®].

Pode-se ainda estimar a fração de FS que incorporou nas células nestas condições. Para isso tomamos o ponto inicial deste gráfico como referência, assumindo que neste momento todas as moléculas (10^{17}) estão no meio e nenhuma está dentro das células e que com 20 minutos de iluminação há uma incorporação adicional de aproximadamente 0,02 % provindas das moléculas livres no sobrenadante para a amostra irradiada. Ao levar em consideração o número total de moléculas e o número de células na solução após a centrifugação, pode-se inferir que, em média, cada célula irradiada continha aproximadamente 10^5 moléculas a mais por célula do que a não irradiada.

O resultado acima demonstra que a pré irradiação durante o processo de incubação do FS favorece a sua incorporação em células de *C. albicans*. Mostraremos na seção a seguir que doses totais de até 4 J/cm^2 não são suficientes para promover grande dano às células durante a IFD, mas que podem influenciar no processo de incorporação do FS nestas células. Fazer incubação de FS sob iluminação pode permitir ainda um controle mais eficaz e localizado da IFD e contribuir para um protocolo alternativo de tratamento mais rápido. Estes aspectos serão estudados mais profundamente nas seções a seguir.

6.3 Ensaio de viabilidade

Conforme mostrado no item anterior, as células que tiveram pré-iluminação tiveram maior captação de Photogem[®], deste modo torna-se importante observar não só se esta pré-iluminação de baixa dose acarreta morte celular, como também se as células irradiadas sofrem maior dano devido à IFD. Ensaios de viabilidade das amostras de *C. albicans* utilizando o Photogem[®] podem dar maiores informações sobre os efeitos da incorporação desse FS em função das doses de pré-iluminação excitando a banda de Soret, e na condição de IFD excitando na banda Q em 630 nm, responsável pela inativação.

O resultado dos ensaios de viabilidade das amostras de *C. albicans* utilizando o Photogem[®] em diferentes condições de pré-iluminação e iluminação de inativação é mostrado em barras na Figura 6.4. A concentração de FS utilizada neste experimento foi de $100 \mu\text{M}$. As caixas azuis discriminam as diferentes condições: a primeira barra representa o grupo controle (F-PL0L0), ou seja, nesta não foi utilizado Photogem[®] nem nenhum tipo de pré-iluminação ou iluminação de inativação. Já o primeiro conjunto de barras (F-PL#L##) mostra a

quantidade de morte celular induzida apenas pela luz, com diferentes doses tanto com a pré-iluminação (0 J/cm², 1 J/cm², 2 J/cm² e 4 J/cm²) como a iluminação de inativação (8 J/cm² e 17 J/cm²), mas ainda sem FS. O segundo grupo de barras (F+PL0L0) denota a toxicidade do Photogem[®] sem nenhum tipo de iluminação de inativação mas já com pré-iluminação de baixa dose. Já no terceiro conjunto de barras é considerado o efeito de diferentes doses de IFD bem como diferentes doses de pré-iluminação (F+PL#L##). Neste caso, as barras com preenchimento diagonal denso representam doses de IFD de 17 J/cm² enquanto as com preenchimento diagonal esparso tem doses de 8 J/cm².

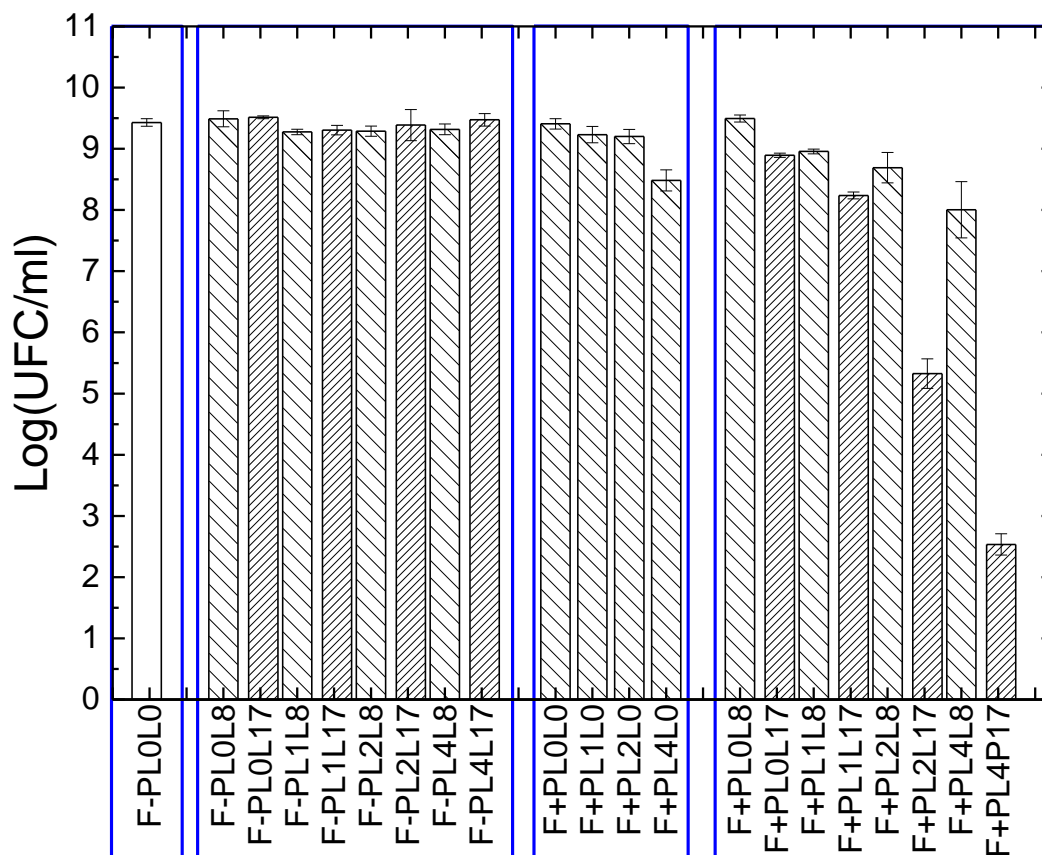


Figura 6.4 –Logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mililitro em diferentes condições. As caixas azuis dividem os grupos: sem Photogem[®], sem pré-iluminação e sem luz de inativação (F-PL0L0), representado pela barra branca; sem Photogem[®], mas com a pré-iluminação e a luz de inativação (F-PL#L##), representado pelo primeiro conjunto de barras; com Photogem[®] e com pré-iluminação mas em luz de inativação (F+PL#L0), representado pelo segundo conjunto de barras; com Photogem[®] com luz de pré-iluminação e luz de inativação (F+PL#L##), representado pelo terceiro conjunto de barras.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se inferir que o primeiro conjunto de barras, ou seja, o ensaio de viabilidade sem FS utilizando apenas luz, não teve grande diferença frente ao grupo controle em nenhuma das doses entregues aos micro-organismos. O segundo grupo de barras corresponde às medidas de

incorporação durante a incubação com pré-iluminação da Figura 6.3. As doses de pré-iluminação de 1 e 2 J/cm² não produzem uma inativação mensurável, enquanto que a maior dose de 4 J/cm² já acarreta a morte de uma pequena fração das células na cultura, como pode ser visto na última barra desse grupo (F+PL4L0). As células nesse caso possuem 10⁶ moléculas adicionais que foram incorporadas com a ação da pré-iluminação. Este resultado é bastante significativo uma vez que aumento da incorporação do FS induzido por luz pode levar ao uso de doses baixas de radiação durante a IFD.

O terceiro conjunto de barras corresponde à IFD propriamente dito. O caso sem pré-iluminação (F+PL0L##) é representado pelas duas primeiras barras. É interessante ver que, para esse caso, a IFD com ambas doses de luz não foram suficientes para causar morte celular de forma apreciável. As barras subsequentes mostram que a IFD obteve maior sucesso com pré-iluminação. A última barra (F+PL4L17) mostra uma diminuição de seis ordens de grandeza nas unidades formadoras de colônia em relação à mesma condição sem iluminação. Isso se deve ao excesso de FS incorporado nas células induzido pela pré-iluminação, o que produziu grande morte celular e portanto maior eficiência da IFD. Deve-se lembrar que o terceiro grupo já demonstrava toxicidade com a pré-iluminação associada ao FS (F+PL4L0), reduzindo uma ordem de grandeza as unidades formadoras de colônia.

Estudo de IFD conduzido por Dovigo *et al.*⁵⁷, considerou a mesma levedura e o mesmo FS sob condições similares ao caso sem pré-iluminação (F+PL0L17). Este estudo utilizou uma fonte de iluminação para a IFD com emissão em torno de 450 nm enquanto o presente trabalho utilizou o comprimento de onda de 660 nm. Apesar disso, a IFD mostrou resultado parecido ao caso sem pré-iluminação em que a dose na IFD não foi suficiente para produzir grande diminuição do número de unidade formadoras de colônias. Ainda assim, pôde-se inferir através da comparação da segunda (F+PL0L17) e da sexta barra (F+PL2L17) do último grupo da Figura 6.4 que a IFD de 17 J/cm² com pré-iluminação de 2 J/cm² produziu uma diminuição de aproximadamente quatro ordens de grandeza no número de células quando comparado com a IFD tradicional. Além disso, nota-se diminuição de seis ordens de grandeza nas amostras com pré-iluminação de 4 J/cm² quando comparado com a IFD tradicional ao se comparar novamente a segunda barra (F+PL0L17) com a última (F+PL4L17) do último grupo desta figura.

Este experimento demonstrou que, através de uma pequena mudança no protocolo de IFD, foi possível obter maior dano para nas células. Tal resultado se deve à maior entrada de FS nas células pré-irradiadas com baixa dose, corroborando com o experimento da seção anterior. Estudos sobre o efeito de campos elétricos intensos em membranas celulares

mostram eletroporação induzida por luz ⁸⁰. Neste caso, o campo elétrico da luz produz a abertura dos poros das células, o que facilita a entrada de moléculas. Outra hipótese que pode ser aplicada no presente trabalho é que as moléculas do FS ligadas à membrana das células geram pequenos danos nas membranas sob condição de pré-iluminação de baixa dose. Tais danos permitem o maior fluxo de moléculas de FS para dentro da célula. Experimentos mais elaborados foram realizados para entender melhor os possíveis processos que podem estar induzindo a incorporação do FS e serão tratados com mais detalhes a seguir.

6.4 Caracterização óptica da incorporação de FS induzida por luz

6.4.1 Photogem[®]

Na microscopia confocal por varredura a dose de radiação foi entregue por um laser contínuo no comprimento de onda de 405 nm (banda de Soret) com potência fixada em 40 μ W para cada pixel de imagem com resolução óptica típica de 200 nm em um tempo típico de varredura da ordem de 3 μ s, o que equivale aproximadamente 0,5 J/cm² por pixel em cada varredura ou uma pré-iluminação de baixa dose. Nesta condição, esta dose é adicionada por pixel, em média, ao sistema a cada varredura de imagem. Assim, a condição de FDS determinada na seção anterior (dose maior que 8 J/cm²) podem ser atingidas acumulativamente após 16 varreduras, por exemplo, em uma série temporal de imagens. Doses de radiação acumuladas no tempo só são possíveis se a luz produzir um efeito permanente no sistema, como um dano molecular ou na membrana produzido por FDS. Esses efeitos serão abordados mais a frente.

Em uma etapa inicial do experimento, uma região microscópica de varredura de interesse na amostra foi irradiada de forma controlada por meio de uma série temporal de imagens (1 imagem a cada 30 segundos) enquanto outra região foi mantida no escuro para comparação. Assim, espera-se medir efeitos de incorporação em tempos de imagem da ordem de minutos.

A Figura 6.5 mostra imagens de fluorescência de um corte confocal no modo canal de um campo amplo (303 μ m x 303 μ m) da amostra de *C. albicans* com Photogem[®]. Uma solução de 100 μ l de *C. albicans* foi colocada em um compartimento contendo uma janela de vidro para análise. Um volume de solução de Photogem[®] foi adicionado às células de modo a atingir a concentração final de 100 μ M. Após o processo de decantação das células sobre a lâmina e da incubação do FS, os estudos de microscopia confocal foram realizados. Nessas

imagens a cor falsa em azul representa a AF da célula provinda do núcleo e detectada entre 420 e 550 nm, enquanto a cor vermelha representa a fluorescência do FS medida entre 600 e 750 nm.

Na Figura 6.5 (a) é mostrada uma região da amostra após total difusão do FS no recipiente de incubação, mas antes de uma pré-iluminação. Nesta imagem é possível notar que algumas células em vermelho intenso já têm FS internalizado. Entretanto na maioria das células nota-se o FS localizado na membrana celular. Na Figura 6.5 (b) é mostrada a mesma região, mas dessa vez uma região de menor área ($101\ \mu\text{m} \times 101\ \mu\text{m}$) foi iluminada por meio de uma série temporal, demodo que uma dose de irradiação de $20\text{J}/\text{cm}^2$ foi entregue a cada pixel da imagem, ou seja, condição praticamente análoga à condição de iluminação para a IFD de $17\ \text{J}/\text{cm}^2$ da seção anterior. A região se destaca em vermelho indicando maior intensidade de fluorescência do Photogem[®] em relação à região não irradiada, ou seja, grande concentração de FS. A reprodutibilidade do experimento pode ser vista na Figura 6.5 (c) em que as mesmas condições de iluminação e área foram repetidas (região abaixo em vermelho). É interessante notar que a primeira área irradiada aumentou em extensão lateral, o que pode ser uma consequência da migração das células durante o experimento *in vitro*.

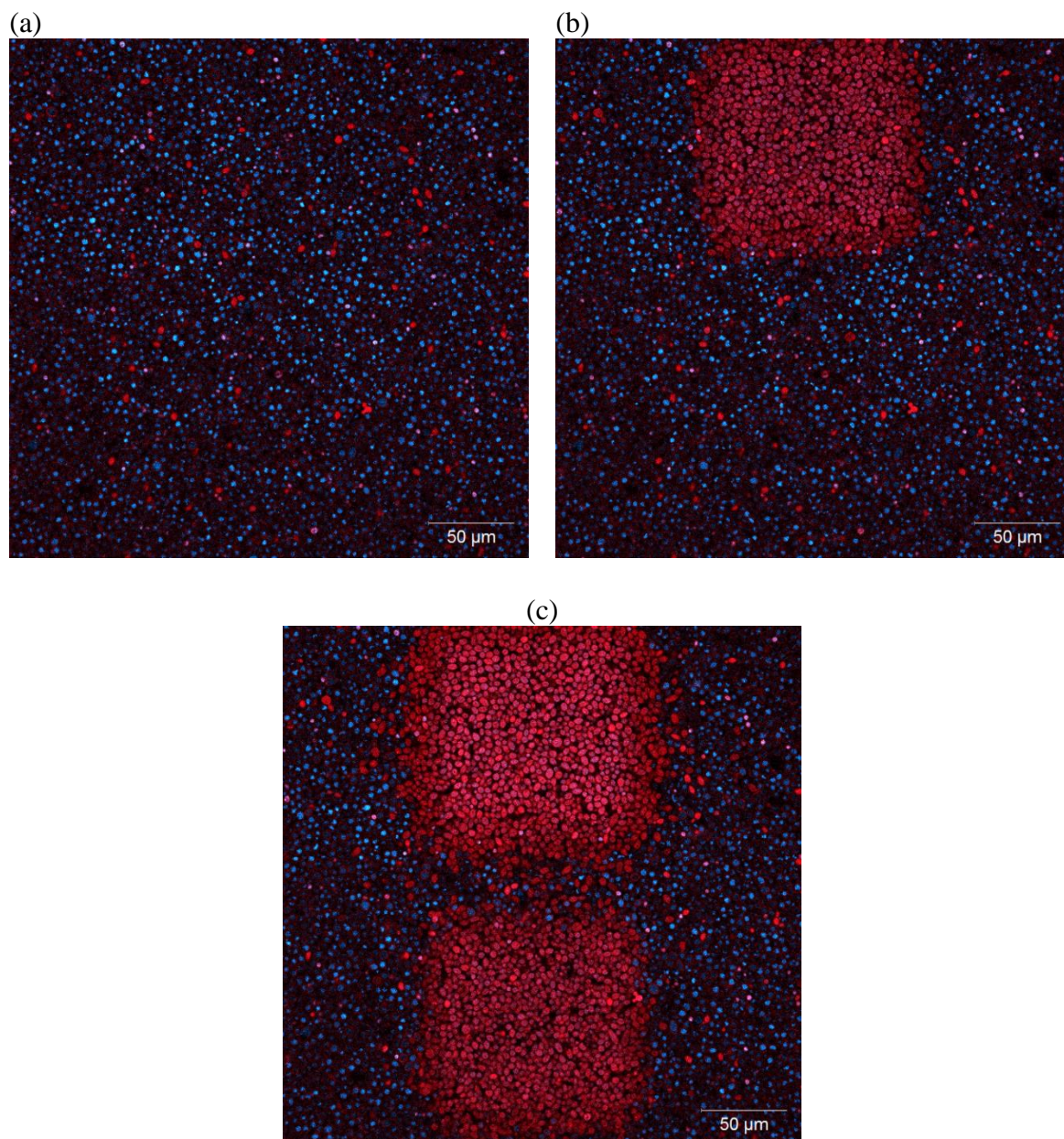


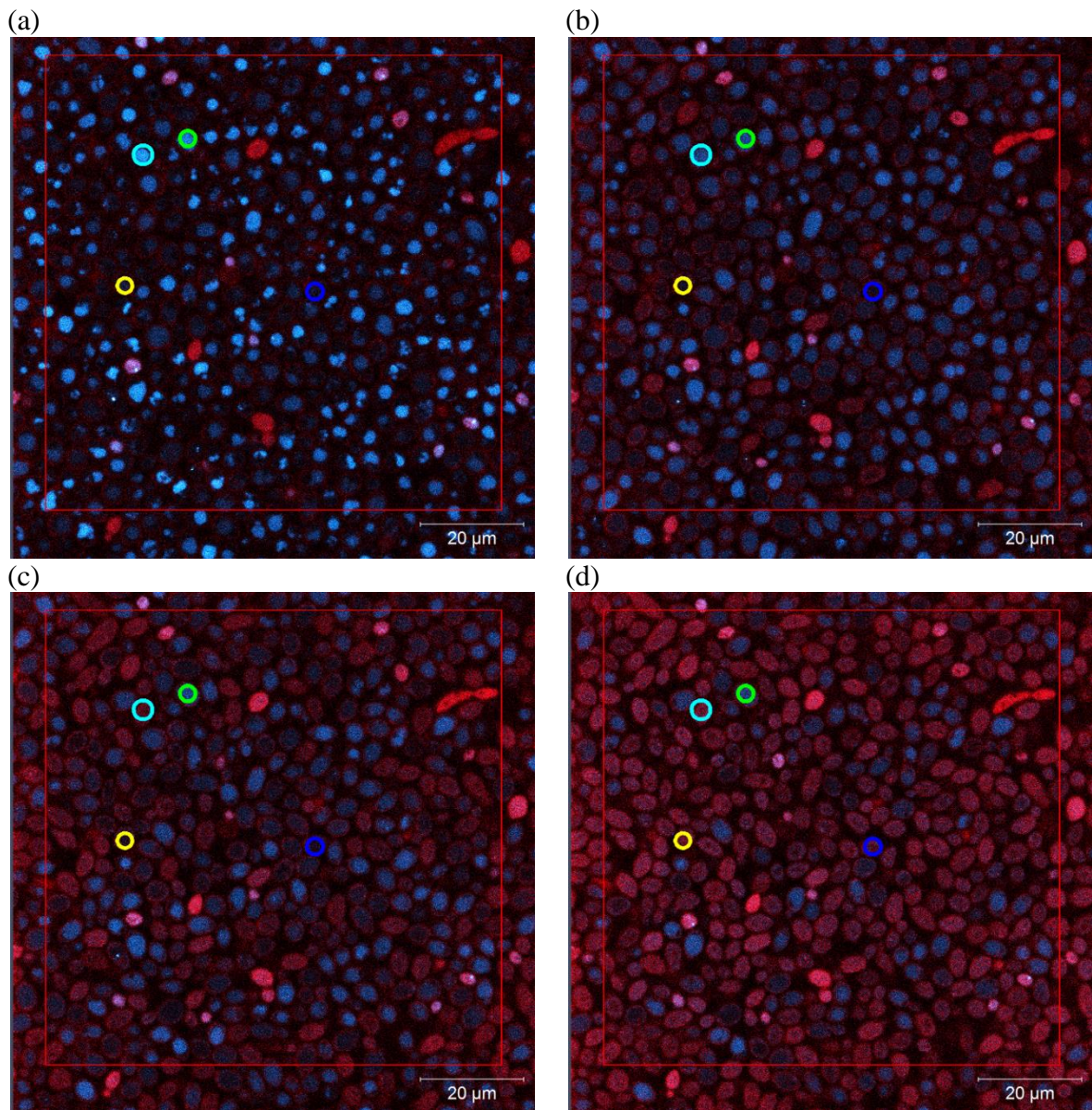
Figura 6.5 – Antes (a) e depois (b) e (c) do procedimento de aumento de captação do Photogem[®] induzido por luz em diferentes áreas da amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dois experimentos das Figuras 6.5 (b) e (c) foram realizados consecutivamente. Estes além de demonstrarem a acumulação localizada e homogênea do FS na área pré iluminada, também indicam que o FS permanece no interior das células após a iluminação. Estas características de acumulação localizada (seletiva) e homogênea são requisitos importantes para um protocolo de IFD eficiente.

Tendo em vista tal comportamento, é importante então acompanhar cada quadro da imagem para compreender como se dá este processo de aumento de fluorescência do FS dentro das células. Para isso as imagens de modo canal da Figura 6.6 mostram, com as

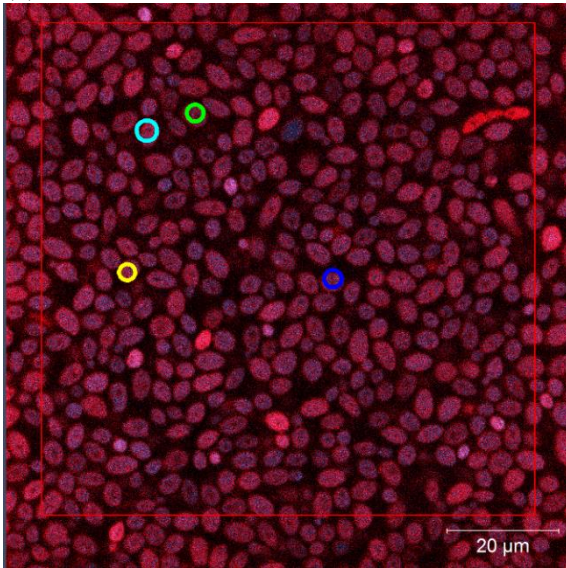
mesmas cores da imagem anterior, uma série temporal de imagens de um corte confocal enquanto a amostra é iluminada. Esta série é mostrada em 0 minutos (inicial), 5, 7, 10, 15 e 20 minutos de iluminação de baixa intensidade, o que equivale a aproximadamente às doses de 0; 5; 10; 15; 20 J/cm². Estas são apresentadas nas Figuras 6.5 (a), (b), (c), (d), (e) e (f) respectivamente.



continua

conclusão

(e)



(f)

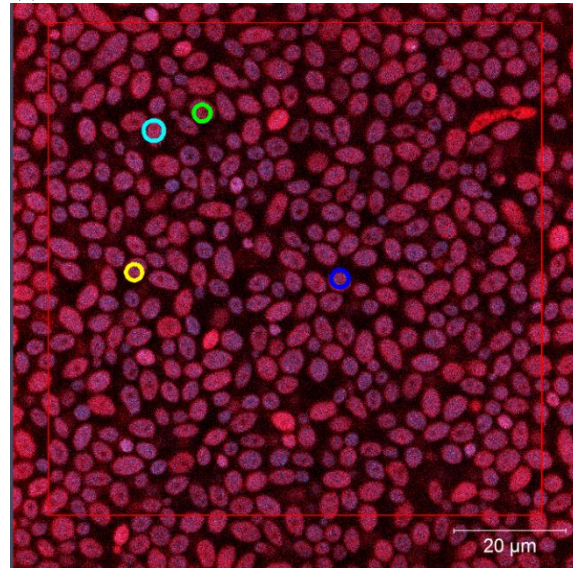


Figura 6.6 – Observação do aumento de concentração de Photogem[®] induzido por luz. A figura representa uma série temporal onde as figuras (a), (b), (c), (d), (e) e (f), mostram os tempos de 0 minutos (inicialmente), 5, 7, 10, 15 e 20 minutos de iluminação respectivamente. As regiões destacadas nas figuras mostram diferentes regiões de interesse a serem estudadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estas imagens mostram que cada célula leva um tempo distinto para aumentar a fluorescência do FS na região da iluminação. Nelas estão marcadas algumas regiões de interesse (RI). A RI quadrada em vermelho corresponde à média geral da fluorescência de toda a região escaneada. As outras RIs em verde, azul, amarela e ciano delimitam a região de uma célula única escolhida de forma aleatória e a fluorescência analisada provem de um plano confocal do interior das mesmas. Pode-se notar primeiramente que a intensidade na membrana das células aumenta e a intensidade da autofluorescência AF cai para uma pequena dose de 5 J/cm^2 (Figura 6.6 (b)) quando comparado com a imagem com dose 0 J/cm^2 (Figura 6.6 (a)). Além disso, a intensidade de fluorescência no interior das células aumenta com o tempo de pré iluminação na série de imagens ou com o aumento da dose.

O comportamento da intensidade da fluorescência do Photogem[®] (canal vermelho) nas RIs apresentadas na Figura 6.6 em relação ao tempo de medida está apresentado na Figura 6.7. Os pontos (círculos) possuem as mesmas cores que estão representadas pelas RIs correspondentes. As linhas sólidas são ajustes destas curvas pela equação 14.

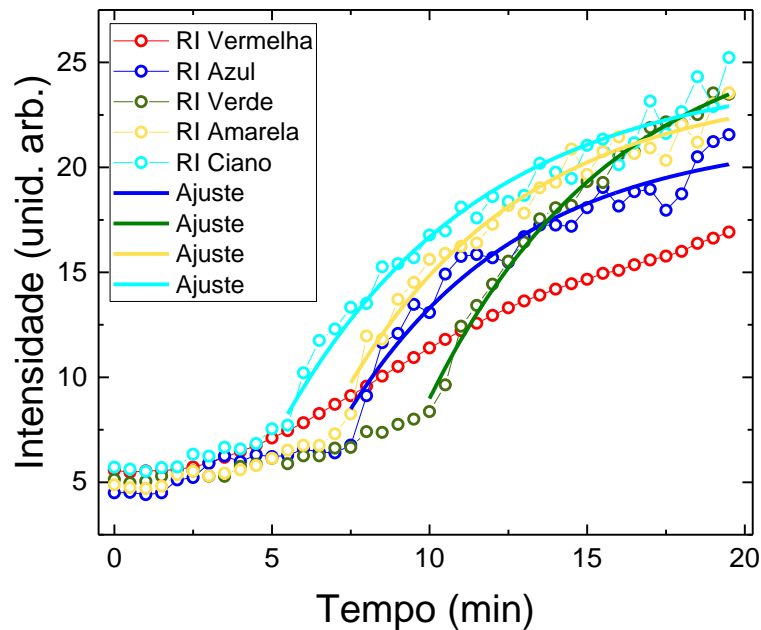


Figura 6.7 – Comportamento da fluorescência do Photogem[®] em diferentes regiões de interesse durante a pré-iluminação, em linha sólida são mostrados os ajustes às respectivas curvas pela equação 14.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se observar que a intensidade média na área irradiada (RI vermelha) aumenta monotonicamente com o tempo de exposição à radiação do laser de 405 nm. Já a dependência temporal da intensidade da fluorescência do FS no interior das células (RIs circulares) possui dois comportamentos distintos: um regime em doses pequenas em que a intensidade aumenta 40% do seu valor no tempo igual a zero e outro regime acima de uma dose para a qual a intensidade aumenta praticamente 4 vezes até entrar em um regime que tende a saturação. A dose que marca o começo desta grande variação de intensidade depende da célula avaliada, porém o seu valor fica entre 5 e 10 J/cm². Neste intervalo se encontra a dose de 8 J/cm² usada nos testes de viabilidade na seção anterior para a qual já ocorre morte celular. Os tempos característicos (τ) em minutos de ($5,5 \pm 0,2$); ($6,3 \pm 0,1$); ($6,0 \pm 0,2$); e ($6,2 \pm 0,2$) relacionados com os aumentos da intensidade foram obtidos pelos ajustes para as RIs em azul, verde, amarela e ciano respectivamente.

Existe uma boa concordância entre as doses que produzem morte celular (avaliadas no experimento de viabilidade), doses que permitem maior internalização de FS pelas células (experimento de absorção do sobrenadante), e aquelas associadas com o início de uma grande incorporação de FS no interior das células observada por microscopia confocal. Nesse experimento, a dose foi entregue para cada pixel de imagem de forma descontínua a cada 30

segundos no comprimento de onda de 405 nm (banda de Soret). Já na medida de viabilidade celular, a dose de radiação continuamente no comprimento de onda de 630 nm da banda Q. A acumulação das doses descontínuas no experimento de microscopia confocal indica que a iluminação produz efeitos permanentes até atingir a dose limiar que produz uma incorporação quase instantânea de FS o interior das células. Vimos que doses menores que esse limiar não são suficientes para gerar morte celular. Questões como, que efeitos permanentes são responsáveis pela incorporação eficiente do FS?, são difíceis de ser respondidas. Porém, os estudos a seguir podem dar algumas respostas para direcionar o entendimento do fenômeno.

O mesmo procedimento de varredura utilizando série temporal acima foi realizado com excitação por 2 fótons de um laser de femtosegundo pulsado sintonizado no comprimento de onda de 800 nm. Nesse caso, a banda de Soret está sendo excitada de forma preferencial. A sua intensidade foi ajustada de modo a obter imagens comparáveis às apresentadas na Figura 6.6, ou seja, baixas doses da ordem de $0,5 \text{ J/cm}^2$ foram utilizadas nesse experimento. O resultado foi semelhante ao encontrado para a excitação por 1 fóton em 405 nm e pode ser visto na Figura 6.8(a) e 6.8 (b) para dose inicial e final, respectivamente.

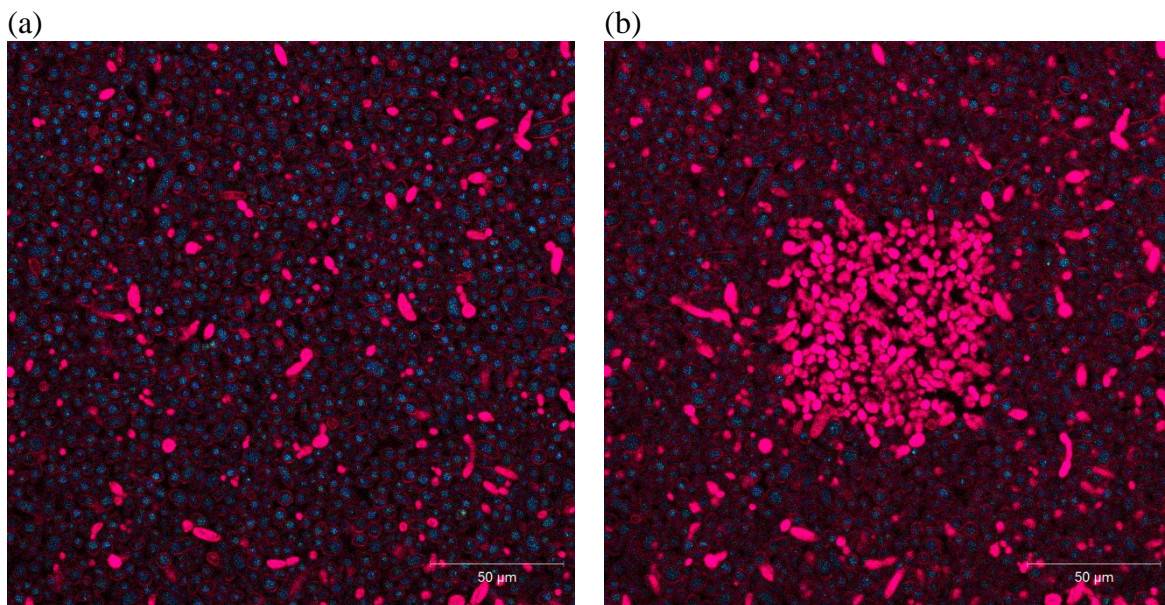


Figura 6.8 – Antes (a) e depois (b) do procedimento de iluminação para aumento de concentração de Photogem[®] induzido por luz utilizando laser pulsado para excitação por dois fótons emitindo em 800 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O comportamento temporal da intensidade da fluorescência do Photogem (canal vermelho) em uma região de interesse da imagem da Figura 6.8 está apresentado na Figura

6.9. A linha sólida corresponde ao ajuste do comportamento experimental pela função da equação 14 para doses maiores que o limiar de grande incorporação do FS.

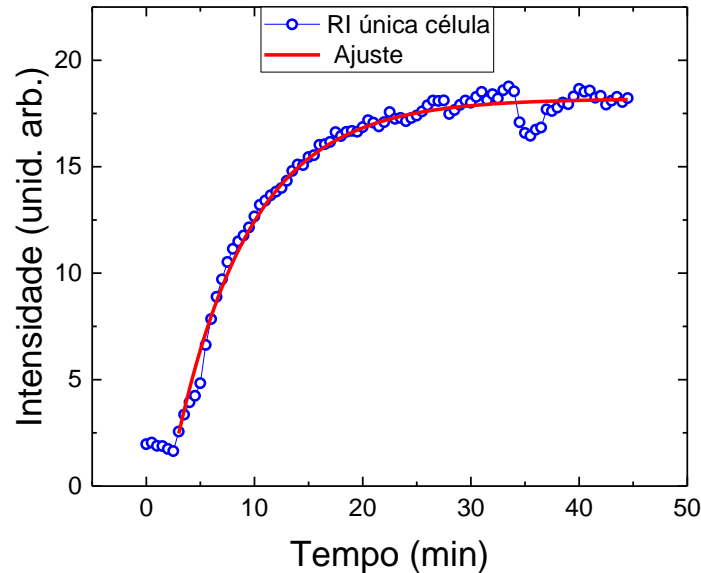


Figura 6.9 – Comportamento da fluorescência do Photogem[®] em uma RI de uma única célula durante a pré-iluminação utilizando o regime de excitação por dois fótons. A linha sólida representa o ajuste desta curva pela equação 14.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesse regime, a intensidade de emissão aumenta praticamente 9 vezes do seu valor no tempo zero e, claramente, apresenta saturação para no regime de altas doses. A dose limiar que marca o começo desta grande variação de intensidade é menor do que aquele observado no experimento anterior mas, como foi observado anteriormente, depende da célula avaliada. Através do ajuste desta curva pela equação 14, obteve-se um tempo característico $\tau = (7,2 \pm 0,1)$ minutos. A saturação da incorporação de FS no regime de altas doses pode estar associado à processos de fotodegração do FS, que foi avaliado no presente trabalho, ou pela alteração de mecanismos que controlam a incorporação dessa molécula.

Por outro lado, o aumento da intensidade de emissão do FS no interior da célula pode ser decorrente da concorrência de dois fenômenos: melhora da eficiência quântica de fluorescência do FS por mudar de meio; ou ainda pode ser decorrente de um aumento de concentração. Para avaliar qual destes fenômenos teve maior contribuição neste efeito, uma outra condição experimental foi analisada. Nesse caso, o meio contendo o reservatório de FS foi lavado após o processo de incubação sem iluminação e trocado apenas pela mesma solução tampão de PBS. As imagens para um corte confocal utilizando excitação por dois fótons em 800 nm antes de fazer a série temporal ($t=0$ min) e após realizar a série (de imagens

a cada 30 s na área limitada pelo quadrado branco ($t=15$ min) são apresentadas nas Figura 6.10 (a) e (b), respectivamente.

Ao contrário do aumento da fluorescência observado anteriormente para as amostras contendo um estoque de FS na solução do tampão, a intensidade da fluorescência não aumenta mesmo aplicando altas doses de iluminação. Isto significa que o grande aumento da emissão do FS no interior das células observado no presente trabalho se deve à incorporação e acumulação contínua em seu interior. Caso a eficiência quântica de fluorescência do FS fosse maior quando este está internalizado na célula, deveria-se esperar o mesmo comportamento de aumento de intensidade. Entretanto, as Figura 6.10 (a) e (b) mostram que este comportamento de aumento de fluorescência não foi repetido neste caso. Nesta figura, um campo amplo ($202 \mu\text{m} \times 202 \mu\text{m}$) de uma mesma região antes e depois de uma iluminação local ($72 \mu\text{m} \times 72 \mu\text{m}$) respectivamente.

Todos os parâmetros da Figura 6.5, ou seja, tempo para difusão do FS, concentração do mesmo, intensidade do laser, bem como a objetiva utilizada, foram mantidos iguais para esta figura, deste modo o procedimento de iluminação foi o mesmo. Entretanto, neste caso com esta iluminação tanto a autofluorescência como a fluorescência do Photogem[®] foram degradadas na área irradiada. É interessante observar que as células não apresentam FS mensurável acumulado nas membranas (Figura 6.10 (a) e (b)), significando que o Photogem[®] está fracamente complexado à membrana celular. Por outro lado, o fotossensibilizador que já se encontra no interior das células (em vermelho) permanece internalizado após o experimento.

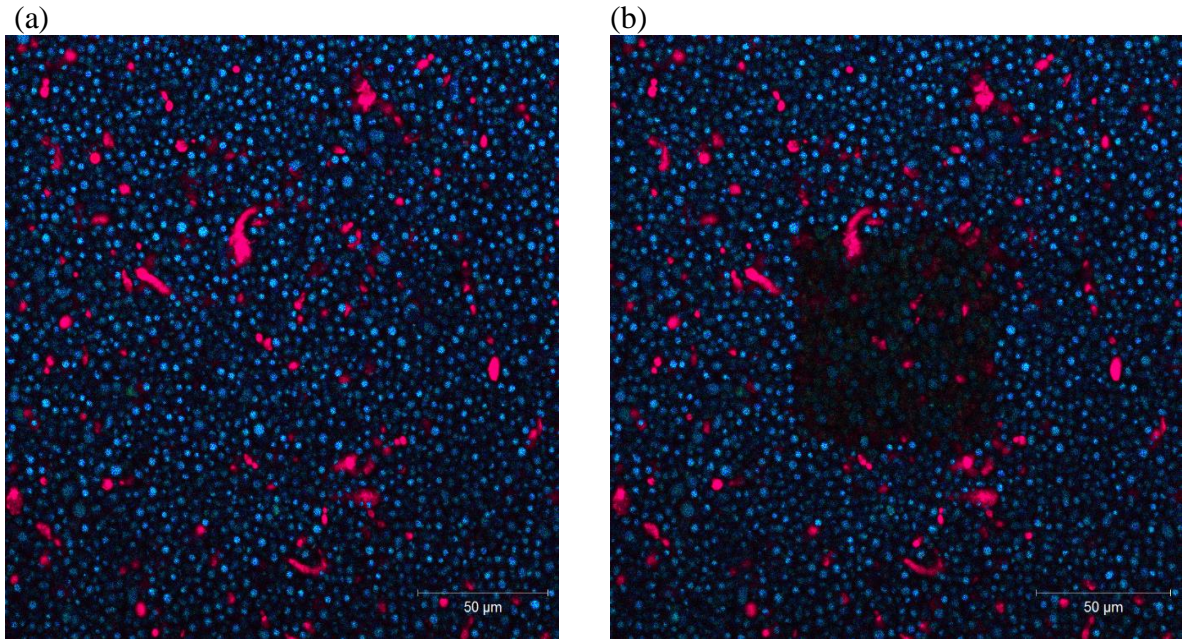


Figura 6.10 – Antes (a) e depois (b) do procedimento de pré iluminação do Photogem[®] de uma amostra sem reservatório de fotossensibilizador.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 6.11 mostra uma comparação da intensidade de fluorescência do Photogem[®] em relação ao tempo de iluminação nas regiões irradiadas em duas das condições apresentadas anteriormente (Figura 6.5 e Figura 6.10), ou seja, com e sem o reservatório de FS no meio representados na Figura 6.11 por quadrados e círculos respectivamente, além disso mostra também a variação da mesma fluorescência em regiões que não foram irradiadas representada por triângulos.

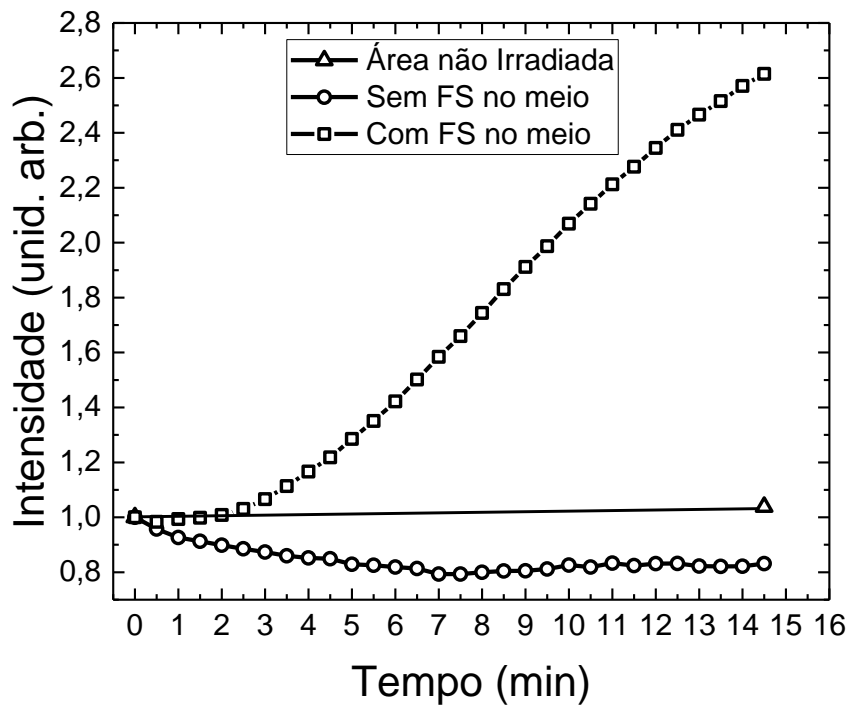


Figura 6.11 – Comportamento da fluorescência do Photogem[®] em diferentes condições. Os círculos mostram o aumento da fluorescência da área irradiada com Photogem[®] no meio, já os quadrados mostram a degradação do Photogem[®] pela irradiação em uma amostra que não conta com Photogem[®] no meio. Os triângulos mostram a diferença temporal da área não irradiada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

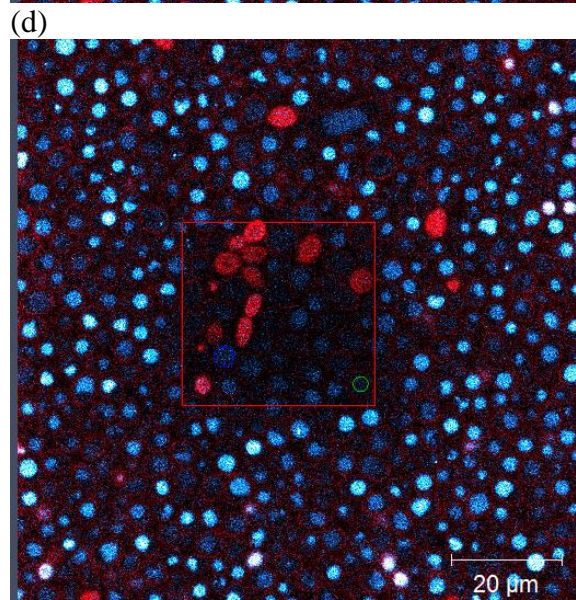
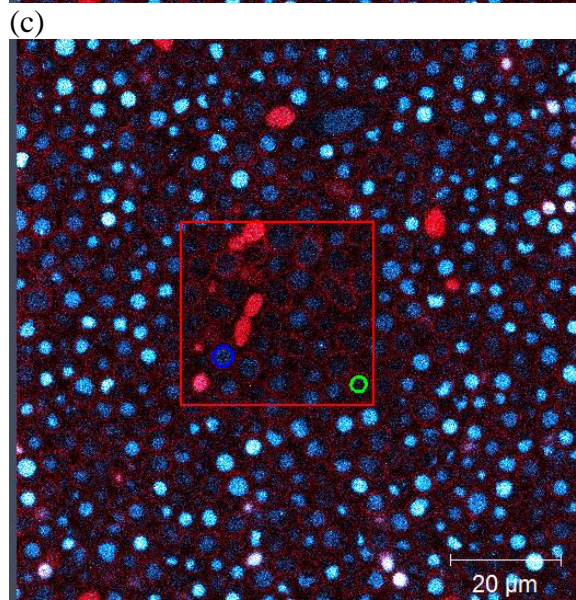
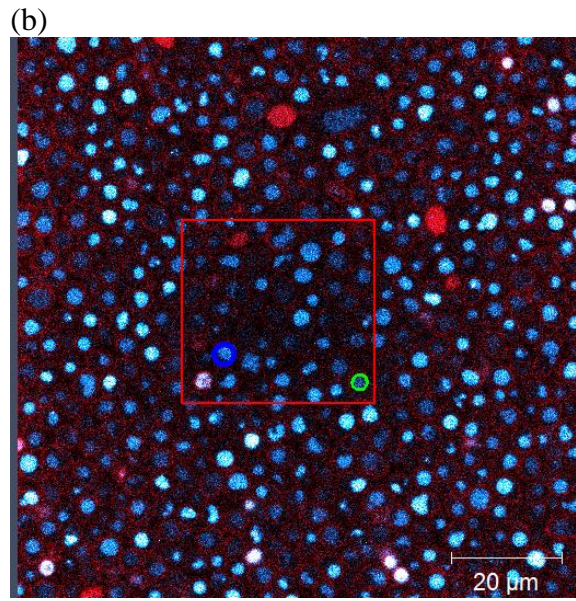
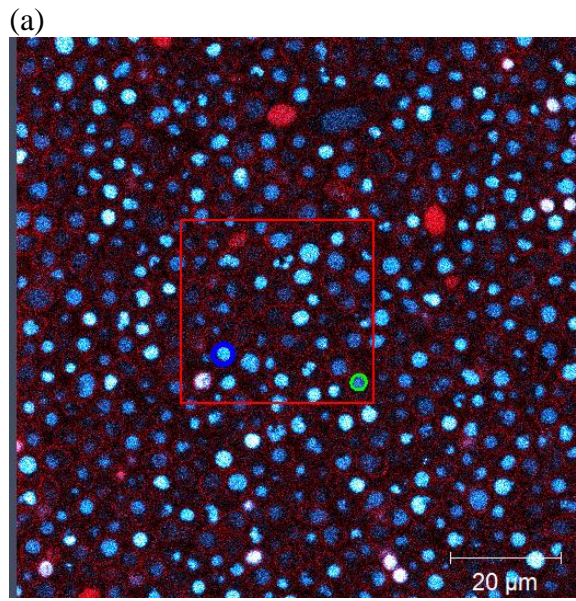
Pode-se notar nesta figura que a amostra que contém o reservatório de Photogem[®] tem um aumento de aproximadamente duas vezes e meia da sua fluorescência a partir do limiar de dose de iluminação correspondente ao tempo de 3 minutos. Já a intensidade de fluorescência na região irradiada da amostra que não contém o estoque de FS no meio teve diminuição de aproximadamente 20%. Esta diminuição se deve à fotodegradação produzida pelo laser de dois fótons durante a série temporal. Através deste resultado é possível demonstrar que a luz induziu não apenas um aumento de fluorescência do FS, mas também um aumento de concentração do FS dentro das células.

Gollmer et al.,³² mostrou em seu estudo *in vitro* que o FS azul de metileno quando irradiado em bactérias, teve sua intensidade de fluorescência do FS aumentada representativamente durante o tempo até estabilizar-se, entretanto este autor definiu tal comportamento apenas como aumento de eficiência quântica de fluorescência, apesar de parte desse aumento poder ser devido à tal eficiência, o presente estudo demonstra que houve aumento da captação de Photogem[®] pelas células de levedura.

As observações acima mostram uma grande incorporação do FS a partir de uma dose limiar nas células de *C. albicans*. Esse experimento de microscopia confocal envolveu uma cinética para a qual a dose foi entregue periodicamente em cada imagem de uma série temporal, aumentando assim a dose proporcionalmente ao número de imagens. Apesar do aspecto dinâmico do experimento, este não permite extrair informações de forma direta das propriedades cinéticas do FS. Para se obter informações desta cinética do FS é preciso tornar visível propriedades associadas ao movimento do FS. A ferramenta de microscopia confocal mais utilizada para estudar aspectos da dinâmica de incorporação de moléculas em células é a técnica de recuperação da intensidade da fluorescência após fotodegradação (*Fluorescence recovering after photobleaching*, ou FRAP). Esta técnica consiste em medir uma série temporal da intensidade da fluorescência em uma pequena área antes e após a realização de uma etapa de fotodegradação. Esta etapa é realizada em um intervalo de tempo curto utilizando um laser focado em alta intensidade ao varrer essa região de interesse da imagem.

A recuperação subsequente da fluorescência ocorre pela difusão lateral do FS que é monitorada pelo mesmo feixe de laser, porém atenuado. A cinética de recuperação vai depender da taxa com a qual as moléculas fotodegradadas são trocadas por moléculas não degradadas naquela área. Portanto, a cinética de recuperação depende da mobilidade da molécula estudada no meio em que se encontra.

A Figura 6.12 mostra uma série temporal de imagens de microscopia confocal utilizando laser contínuo em 405 nm de uma amostra que tem um reservatório de FS no meio tampão. Nesta amostra, somente a região demarcada em vermelho sofreu uma sequência de *photobleaching* realizados a cada 2,5 minutos após 1,5 minuto. Além disso, esta figura mostra ainda RIs em azul e em verde de duas células para avaliação do comportamento temporal posteriormente da intensidade da fluorescência no interior das mesma na região fotodegradada. A intensidade foi monitorada também fora dessa região para efeito de comparação. As Figura 6.12 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h) mostram imagens de um plano confocal realizadas em uma série temporal nos tempos de 0 minutos (inicial); 1,5 (*photobleaching*); 2; 4,5 (*photobleaching*); 6; 10; 15 e 25 minutos respectivamente.



continua

conclusão

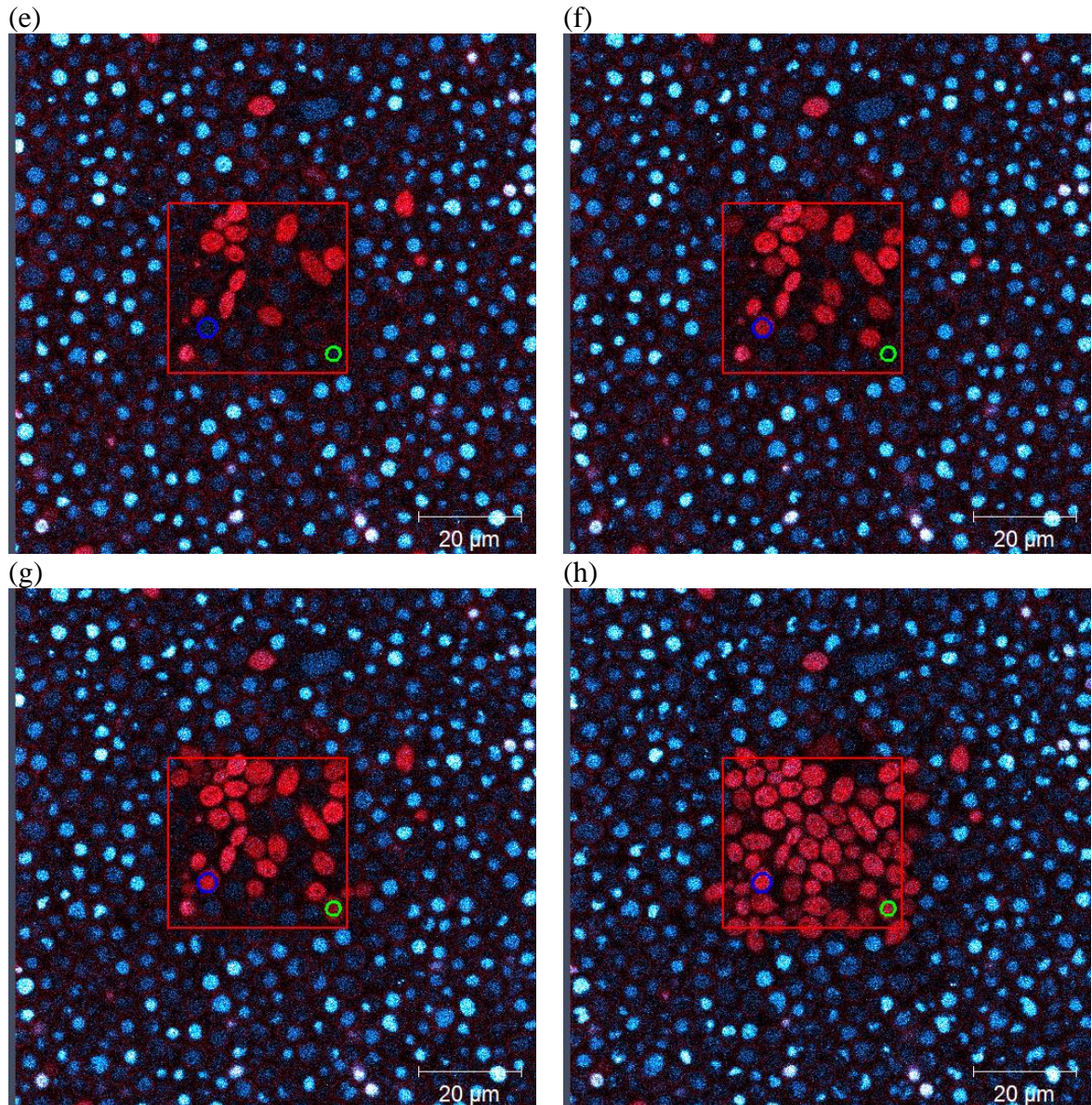


Figura 6.12 – Investigação temporal da mobilidade das moléculas de FS através do procedimento de *photobleaching*. A região marcada em vermelho sofreu *photobleaching* enquanto a região de fora não sofreu, as RIs azul e verde são células estudadas na próxima figura. As figuras (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) e (h) mostram os tempos de 0 minutos (inicial); 1,5 (*photobleaching*); 2; 4,5 (*photobleaching*); 6; 10; 15 e 25 minutos respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota-se que para o tempo inicial (Figura 6.12 (a)), as células contendo FS nas membranas na cor vermelha e autofluorescência em azul. Deve-se notar ainda que as Figura 6.12 (b) e (d) correspondem ao momento logo após ao primeiro *photobleaching* na área delimitada em vermelho e 1,5 minutos após este momento, respectivamente. A sequência de imagens na Figura 6.12 mostra ainda que algumas células apresentam alta concentração de FS após a fotodegradação e que o número dessas células aumenta durante o experimento na área

iluminada. Ao final do experimento (Figura 12(f)), todas as células apresentam alta incorporação de FS, cobrindo de forma homogênea a área que sofreu fotodegradação.

A intensidade da fluorescência cai em torno de 30 % com a fotodegradação e se recupera em parte após 2 minutos. A evolução da média temporal das intensidades avaliadas nas RIs está representada na Figura 6.13. A queda repentina da intensidade de fluorescência durante os tempos de *photobleaching*, representados pela sequencia de barras azuis, esta queda é então seguida de uma rápida recuperação da intensidade em um tempo da ordem de 2 min. O mesmo ocorre para doses maiores que a dose limiar, onde há um grande aumento na incorporação do FS na célula, repetindo os resultados das Figuras 6.7 e 6.9. A curva em preto corresponde à intensidade da fluorescência do FS na região fora da área em vermelho que sofre uma pequena modulação produzida pelo espalhamento do laser de excitação durante a fotodegradação, esta é apresentada para comparação com as demais regiões.

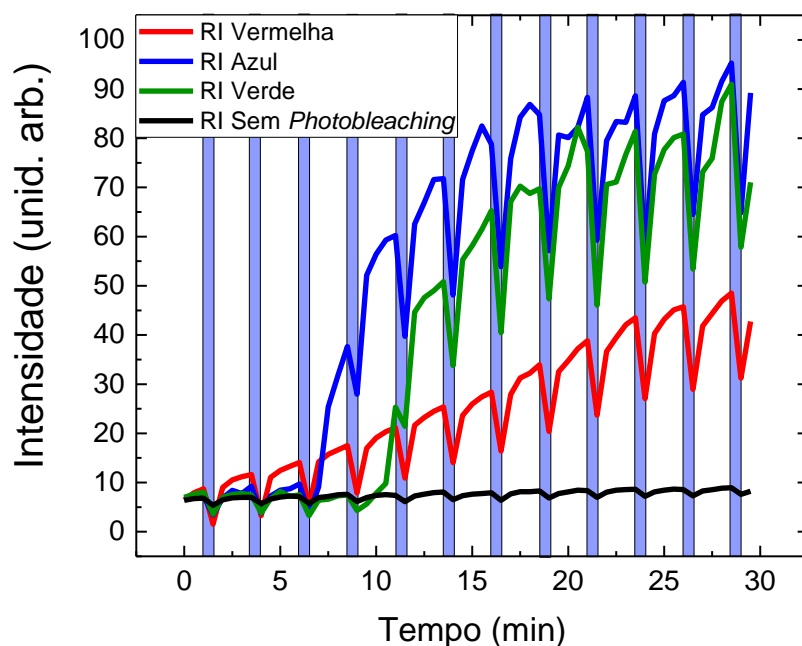


Figura 6.13 – Comportamento temporal de diferentes RIs durante o *photobleaching*. A barra azul mostra os tempos onde ocorreu *photobleaching*. A linha vermelha representa a média temporal da fluorescência do FS no local que sofreu *photobleaching*, enquanto a linha preta representa a região que não sofreu. As linhas verde e azul mostram o comportamento de duas células em específico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O comportamento da fluorescência do FS após o *photobleaching* demonstra a mobilidade das moléculas, já que neste as moléculas do FS são degradadas de modo a não

mais fluorescerem. Com o retorno dessa fluorescência a níveis como o inicial é possível inferir que estas moléculas foram trocadas dentro das células, estando assim móveis. Pode-se ainda notar dois regimes durante este estudo, o primeiro onde a fluorescência volta ao estado inicial, e outro onde a fluorescência volta mais intensa.

De modo a entender o comportamento da recuperação da fluorescência do FS nos dois regimes um modelo matemático empírico foi proposto, neste considera-se que em um longo tempo a variação da densidade numérica de moléculas de FS no volume interno das células (N) em relação ao tempo (t) deve ser nula, ou seja, em um tempo grande há um equilíbrio no fluxo de entrada e saída de FS. Além disso, a Figura 6.13 mostra que existe um tempo inicial (t_i) onde a célula perde o controle de entrada de FS, este modelo é mostrado nas equações 16 e 17.

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{dN}{dt} = 0 \quad (16)$$

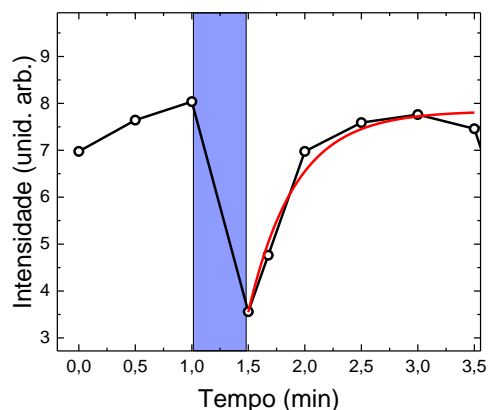
$$\frac{dN}{dt} = \frac{K}{(t - t_i)} \quad (17)$$

Onde K tem unidade de densidade de moléculas, ou seja, número de moléculas por volume, e está relacionado à velocidade de entrada do FS nas células. Integrando essa equação chegamos no número de moléculas dentro das células em função do tempo:

$$N(t) = N_0 + K \ln\left(\frac{t - t_i}{t_0}\right) \quad (18)$$

Esta equação é válida para a condição $t > t_i$, nesta a constante N_0 está relacionada à estabilização final da fluorescência, t_0 denota o tempo de estabilização, para o qual o segundo tempo da equação pode zerar. Esta função pôde então ser ajustada aos dados obtidos no microscópio, a Figura 6.14 mostra este ajuste nos dois regimes, ou seja, quando a fluorescência retorna ao nível inicial e quando a fluorescência fica maior do que a inicial.

(a)



(b)

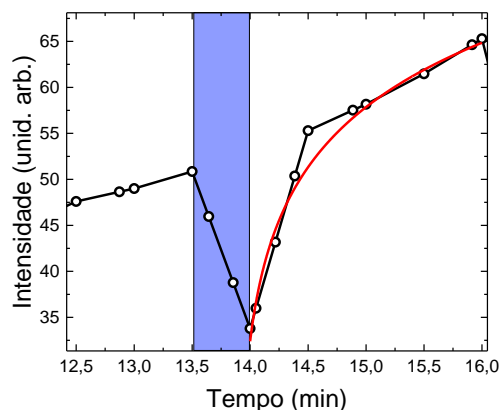


Figura 6.14 – Ajuste da função (linha vermelha) empírica nos dados (pontos azuis) dos dois regimes de recuperação da fluorescência, o primeiro onde a fluorescência retorna ao mesmo nível inicial (a) e o segundo onde o nível de fluorescência aumenta em relação ao inicial (b).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de K para o primeiro regime são em torno de $(1,4 \pm 0,5) \mu\text{m}^{-3}$ enquanto para o segundo regime os valores são em torno de $(11,0 \pm 1,5) \mu\text{m}^{-3}$, isso demonstra que a velocidade de troca das moléculas é maior no regime onde a fluorescência é recuperada a níveis maiores do que o inicial, indicando assim que a célula perdeu a regulação do fluxo de entrada e saída de moléculas de FS, permitindo assim que o fluxo de entrada de moléculas seja maior do que o fluxo de saída.

Do mesmo modo que na Figura 6.11, uma comparação entre as duas condições experimentais com e sem o reservatório de FS presente no meio foi realizada para comparar a mobilidade das moléculas nestas condições. Este resultado é mostrado na Figura 6.15 onde a barra azul representa o momento do *photobleaching*, os quadrados ligados por linha sólida mostram a recuperação de fluorescência com reservatório presente e os círculos ligados por linha tracejada mostram a mesma recuperação mas com a ausência do reservatório de FS.

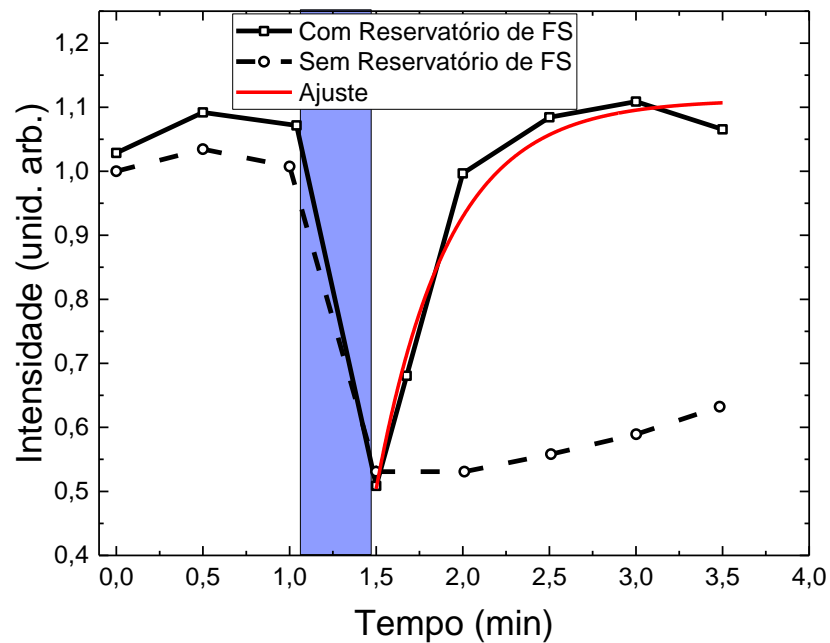


Figura 6.15 – Recuperação da fluorescência do FS após *photobleaching* em duas condições, a primeira onde o reservatório de FS está presente no meio (quadrados ligados por linha sólida), e a segunda onde o meio foi lavado, ou seja, este reservatório não está presente (círculos ligados por linha tracejada). A barra azul denota o momento do *photobleaching*, enquanto a linha vermelha sólida mostra o ajuste pela função exponencial descrita na equação 14.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesta figura é importante notar que quando o FS não está presente no meio praticamente não há recuperação de fluorescência, isso se deve ao fato de que não há moléculas no exterior das células para serem trocadas. Além disso o ajuste mostra que o tempo de recuperação da fluorescência (τ) é de $0,42 \pm 0,01$ min, ou seja, $25,2 \pm 0,6$ s. As Figura 6.11 e Figura 6.15 comprovam que a concentração do Photogem[®] dentro das células tem aumento devido à pré iluminação de baixa dose.

A Figura 6.16 mostra diferentes condições de recuperação da fluorescência dentro das células de *C. albicans*, nesta a curva vermelha demonstra uma condição que a fluorescência retorna a um nível maior que o inicial, indicando a entrada de mais moléculas nas células do que havia no momento inicial. A curva azul demonstra uma situação onde os fluxos de entrada e saída de moléculas das células estão iguais, ou seja, a fluorescência é recuperada até o mesmo nível anterior. Já a curva verde mostra uma situação onde podem haver duas situações, a primeira é que há mais moléculas fluorescentes saindo da célula do que entrando, e a segunda é que as células que sofreram o *photobleaching* dentro da célula não estão móveis e acabam ocupando espaço dentro das células. A curva preta mostra uma situação onde não há fluxo de moléculas na célula, ou uma situação onde todas as moléculas foram degradadas e estavam fixas dentro das células.

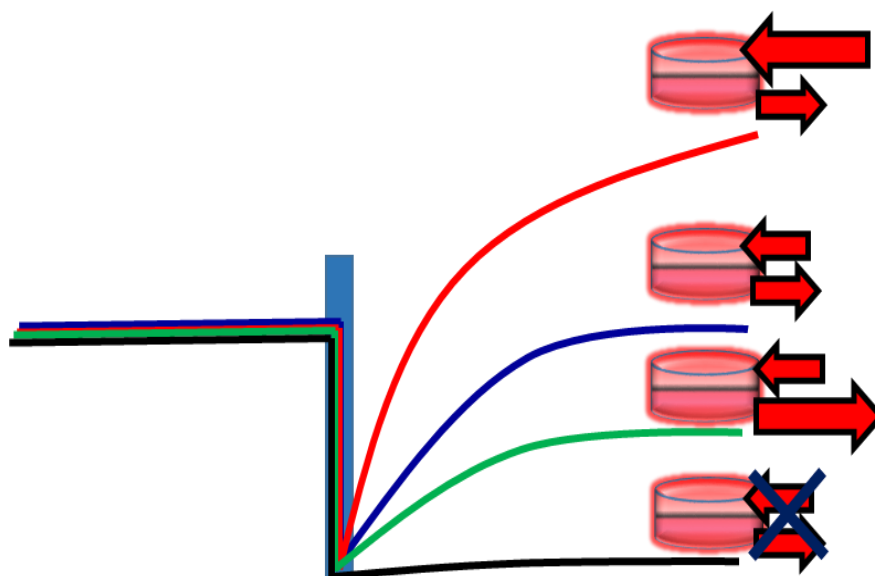


Figura 6.16 – Diferentes condições de recuperação da fluorescência do FS após o *photobleaching* (curvas com linhas sólidas), comparado com os fluxos de entrada (seta com direção para a esquerda) e saída (seta com direção para a direita) de moléculas das células (cilindros vermelhos).

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.2 Curcumina

De modo a verificar se este tipo de comportamento também poderia acontecer com outro FS a Curcumina natural foi utilizada. Neste caso a amostra foi iluminada com o laser pulsado emitindo em 800 nm para excitação por dois fótons. Os experimentos para este FS foram os mesmos que para o Photogem[®], ou seja, duas condições, com e sem reservatório de FS no meio. A Figura 6.17 mostra novamente um campo amplo onde, na região central, foi realizada uma iluminação de baixa dose, esta região tem aumento de fluorescência da Curcumina.

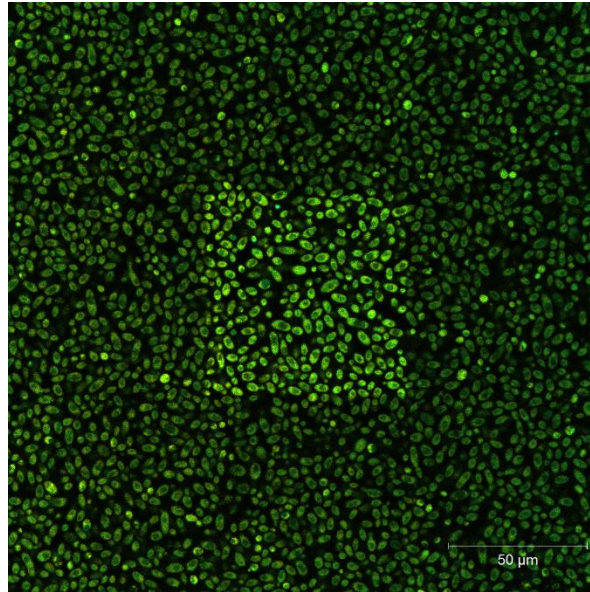


Figura 6.17 – Imagem de campo amplo de *C. albicans* com Curcumina Natural onde a região central teve iluminação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Três células foram escolhidas aleatoriamente de modo a observar o comportamento temporal da fluorescência. A Figura 6.18 mostra as RIs de cada uma das células, nesta pôde-se inferir, através do ajuste desta curva pela equação 14, que os tempos característicos (τ) para a Curcumina foram: $(8,7 \pm 0,3)$; $(6,9 \pm 0,6)$; e $(7,6 \pm 0,4)$ minutos. É importante notar que estes são praticamente um minuto mais longos do que para o Photogem[®], indicando que a célula demanda maior tempo de incubação para captar a Curcumina.

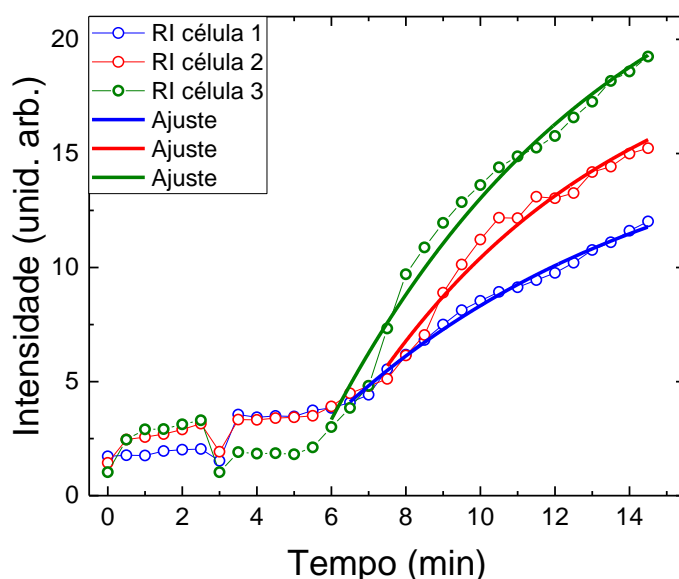


Figura 6.18 – Comportamento da fluorescência da Curcumina em diferentes regiões de interesse durante a pré-iluminação, em linha sólida são mostrados os ajustes às respectivas curvas pela equação 14.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda torna-se importante comparar os espectros da curcumina em diferentes condições, pois esta ao estar aglomerada apresenta espectro de emissão com pico bastante próximo a 550 nm, enquanto quando estas moléculas estão livres a fluorescência de maior intensidade está na região de 480 nm. Neste contexto, os espectros da curcumina nas áreas irradiadas e não irradiadas são comparados não só com a emissão desta em solução, como também com a AF da levedura, esta comparação é mostrada na Figura 6.19.

A Figura 6.19 (a) mostra o espectro da curcumina em solução, enquanto as figuras (b) e (c) mostram o espectro desta mesma molécula dentro da célula em duas diferentes condições, irradiada e não irradiada respectivamente, a figura (d) mostra apenas por motivos de comparação a AF da célula. A partir do ajuste de até três distribuições gaussianas, centradas em 480 nm (azul), 529 nm (verde) e 580 nm (vermelho), a linha preta representa a soma destes ajustes. Nestes espectros, pode-se notar que o espectro de emissão da curcumina em solução não apresenta a gaussiana de menor comprimento de onda, enquanto os espectros da curcumina nas células apresentam esta gaussiana.

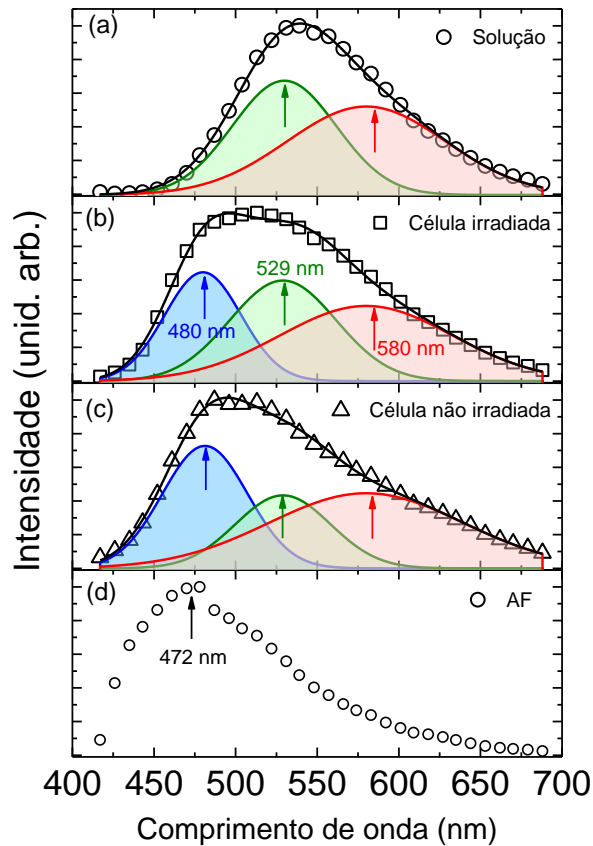


Figura 6.19 – Espectro de fluorescência da curcumina em solução (a), e em células irradiadas (b) ou não irradiadas (c) em comparação com o espectro da AF da levedura (d). Em azul verde e vermelho são mostrados os ajustes gaussianos para os picos de 480 nm, 529 nm e 580 nm. A linha preta representa a soma dos três ajustes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Tabela 6.1 mostra a área de cada pico em cada uma das condições. Nesta é possível inferir que as células irradiadas apresentam menor valor do ajuste do primeiro pico e valor maior no ajuste do segundo pico quando comparadas com as células não irradiadas.

Tabela 6.1 – Área do ajuste gaussiano de cada pico nos diferentes espectros da curcumina.

Curcumina	Área 480 nm	Área 529 nm	Área 580 nm
		(x 10 ⁴)	
Em solução	-	5,39	6,39
Em célula irradiada	3,80	4,87	5,92
Em célula não irradiada	4,78	3,16	6,66

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analogamente ao Photogem[®], o mesmo procedimento de iluminação realizado sem o reservatório de FS no meio. A Figura 6.20 mostra duas imagens de campo amplo, a primeira

(a) antes, e a segunda (b) após a iluminação. Nestas é possível notar que o centro da imagem após o procedimento de pré-iluminação não mostrou aumento de fluorescência, corroborando assim com o resultado obtido anteriormente para o Photogem[®].

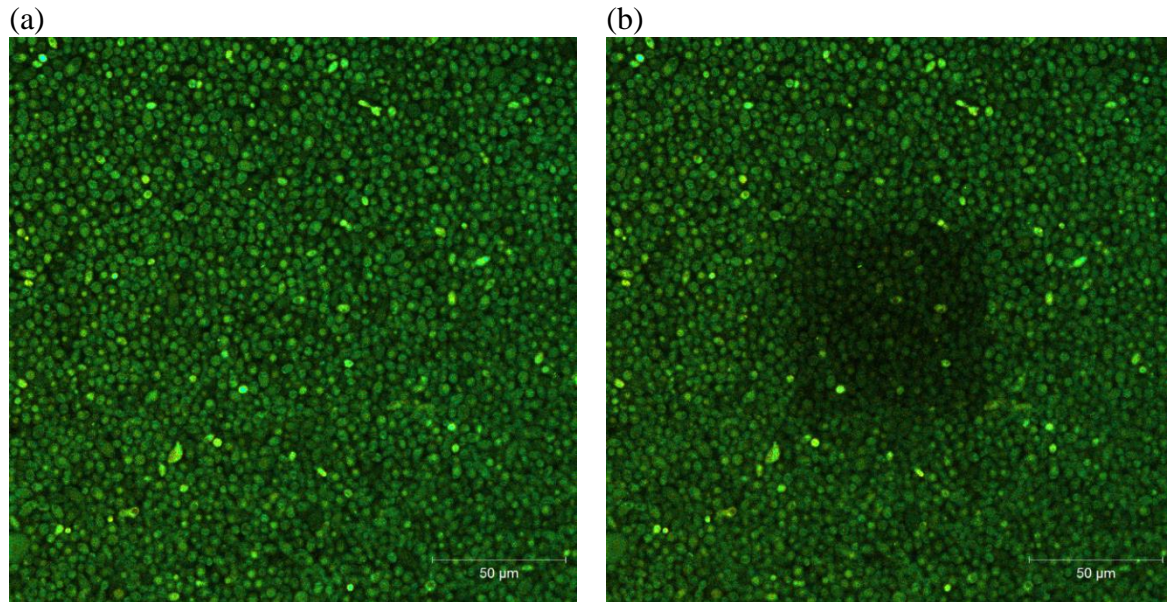


Figura 6.20 – Imagens de campo amplo antes (a) e depois (b) do procedimento de iluminação para aumento de concentração de Curcumina natural induzido por luz utilizando laser pulsado para excitação por dois fótons emitindo em 800 nm, para amostra sem reservatório de FS no meio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Novamente, de modo a inferir sobre a mobilidade das moléculas de Curcumina na célula, o procedimento de *photobleaching* foi realizado. A Figura 6.21 mostra a recuperação da fluorescência da Curcumina Natural após *photobleaching* novamente nas duas condições, com reservatório de FS representado pelos quadrados ligados com linha sólida, enquanto os círculos ligados com linha tracejada representam a amostra com meio lavado. A linha vermelha sólida representa o ajuste da primeira curva pela equação 14.

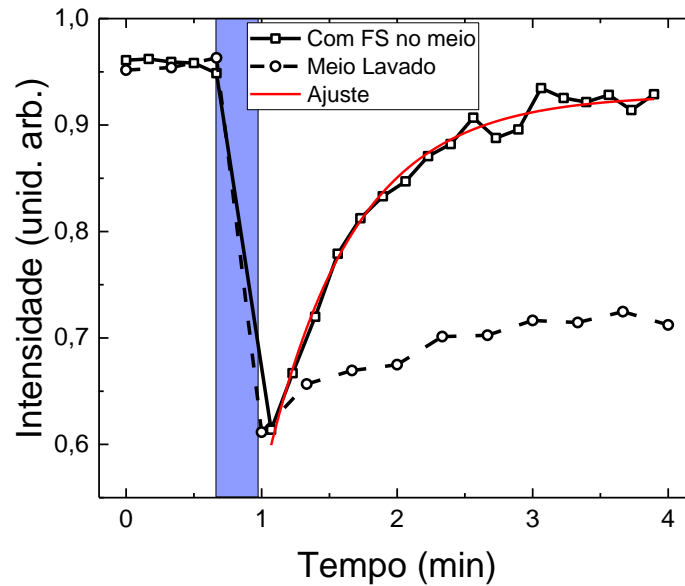


Figura 6.21 – Recuperação da fluorescência da Curcumina após *photobleaching* em duas condições, a primeira demonstrada com quadrados ligados por linha sólida onde há reservatório de FS, e a segunda onde o meio foi lavado, ou seja, o reservatório de FS foi removido. A barra azul denota o momento do *photobleaching*, enquanto a linha vermelha sólida mostra o ajuste pela função exponencial descrita na equação 14.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesta novamente é importante notar que não há mobilidade de moléculas de Curcumina quando o meio é lavado, corroborando com os resultados obtidos para o Photogem[®]. Além disso, o ajuste da Figura 6.21 mostra que o tempo característico de recuperação da fluorescência (τ) da curcumina é de $0,65 \pm 0,01$ min, ou seja, $39,0 \pm 0,6$ s, que quando comparado com o tempo do Photogem[®] este se mostra cerca de 1,5 vezes maior, ou seja, corroborando novamente com o resultado anterior e demonstrando que neste sistema as moléculas de Curcumina são menos móveis do que as moléculas de Photogem[®].

6.4.3 Estudo do tempo de vida de fluorescência do Photogem[®]

A Figura 6.22 mostra imagens FLIM do tempo de decaimento médio (calculado através da equação 5) da fluorescência do FS (Figura 6.22 (a)) e da AF (Figura 6.22 (b)) de uma amostra que contém o reservatório de Photogem[®]. Nesta é possível notar a existência de duas regiões, a central que foi irradiada em baixa dose, e a região externa que foi mantida no escuro. Nesta figura colorida com cores falsas, as cores mais azuladas mostram tempos de decaimentos de fluorescência mais curtos, enquanto cores mais avermelhadas mostram tempos mais longos.

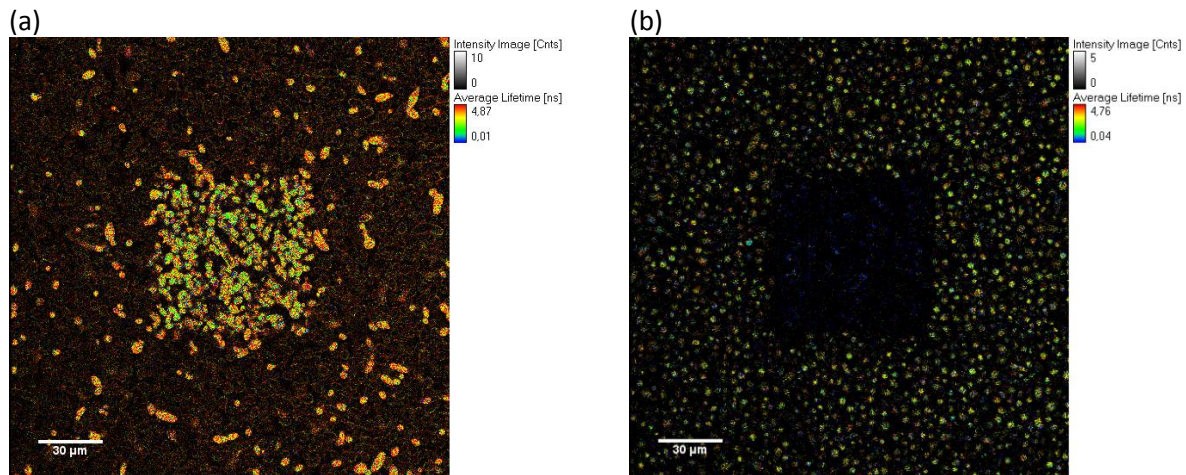


Figura 6.22 – Imagens de tempo de vida de fluorescência do Photogem[®] (a) e da AF da levedura (b), de uma amostra que foi iluminada no centro e contém reservatório de FS. As cores falsas representam o tempo de decaimento da fluorescência, cores avermelhadas descrevem tempos longos enquanto cores azuladas representam tempos mais curtos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

De modo a comparar os tempos de decaimento médios da fluorescência nas duas áreas das figuras acima, um histograma destes tempos foi construído (Figura 6.23) tanto para a fluorescência do FS (Figura 6.23 (a)) quando para a AF (Figura 6.23 (b)), nesta figura os círculos ligados por linha sólida mostram o histograma da região irradiada (central), enquanto os quadrados denotam o histograma da área não irradiada (externa).

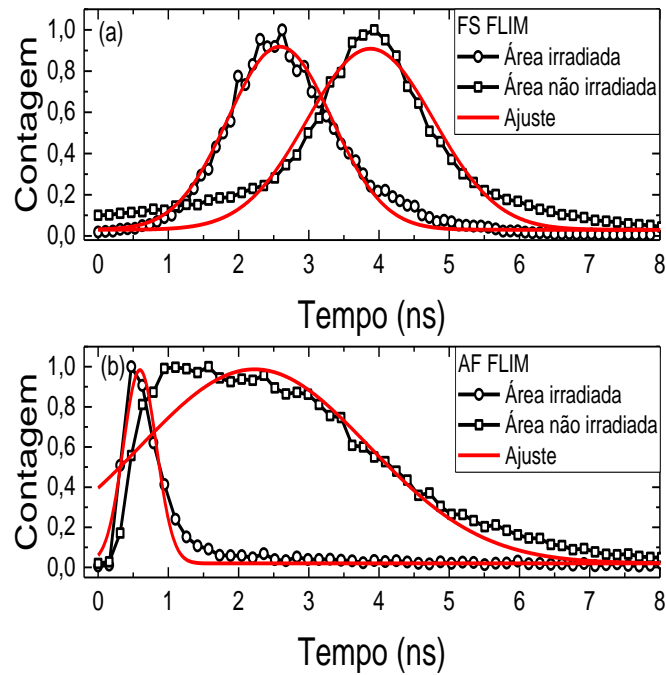


Figura 6.23 – Histograma do tempo de decaimento da fluorescência do FS (a) e da AF da levedura (b) para duas regiões distintas da imagem, área irradiada (círculos) e não irradiada (quadrados). Em vermelho são mostrados os ajustes gaussianos (equação 15) para cada pico das distribuições.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível notar que tanto para a fluorescência do FS quanto para a AF o tempo de decaimento médio é menor na região irradiada do que na região mantida no escuro. Com o ajuste gaussiano é possível observar os parâmetros de centro e largura à meia altura da distribuição do histograma (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 – Parâmetros do ajuste gaussiano para o tempo de decaimento do Photogem[®] e da AF da levedura em amostra com reservatório de FS presente.

Reservatório de FS presente	Centro do pico (ns)	Largura do pico (ns)
FS - Área irradiada	$2,59 \pm 0,01$	$1,48 \pm 0,03$
FS - Área não irradiada	$3,88 \pm 0,03$	$1,80 \pm 0,06$
AF - Área irradiada	$0,59 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,02$
AF - Área não irradiada	$2,23 \pm 0,06$	$3,24 \pm 0,15$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o Photogem[®] o centro e a largura da distribuição são respectivamente em $(2,59 \pm 0,01)$ ns e $(1,48 \pm 0,03)$ ns para a área irradiada e $(3,88 \pm 0,03)$ ns e $(1,80 \pm 0,06)$ ns para a área não irradiada. Já para a AF estes parâmetros são $(0,59 \pm 0,01)$ ns e $(0,47 \pm 0,02)$ ns na

região iluminada e $(2,23 \pm 0,06)$ ns e $(3,24 \pm 0,15)$ ns na região externa. Devido à maior concentração de moléculas do FS no meio interno das células esperava-se que o tempo de vida desta fluorescência fosse mais longo demonstrando assim que o FS estaria mais agregado, entretanto isso não foi observado. Este comportamento pode então ser explicado devido ao fato de que dentro da célula o FS pode interagir com outras moléculas de modo a diminuir seu tempo de decaimento, ou ainda, devido à maior concentração a probabilidade de colisão entre moléculas também é maior levando ao mesmo efeito de diminuição no tempo de decaimento. Do mesmo modo, a AF teve diminuição ainda mais aguda no tempo médio de decaimento da região irradiada, possivelmente isso se deve ao fato de que pode haver transferência de energia dos fluoróforos responsáveis pela AF da célula para o Photogem[®].

Devido ao fato de que o FS está bastante presente na membrana das células, torna-se importante também não só comparar o tempo de decaimento médio da fluorescência do FS ligado à membrana nas diferentes áreas irradiada ou mantida no escuro, como também comparar os tempos do FS na membrana e dentro das células da região irradiada. A Figura 6.24 mostra uma seleção de imagens FLIM da membrana, na Figura 6.24 (a) estão mostradas as membranas de células em sua maioria não irradiadas e sem o FS internalizado, para facilitar o entendimento desta, a Figura 6.24 (b) mostra a região inversa apenas para demonstração. Já a Figura 6.24 (c) e (d) mostram um aumento onde apenas é possível visualizar a região irradiada, na primeira é possível observar a imagem FLIM da membrana das células desta região, enquanto na segunda a região interna das células é mostrada.

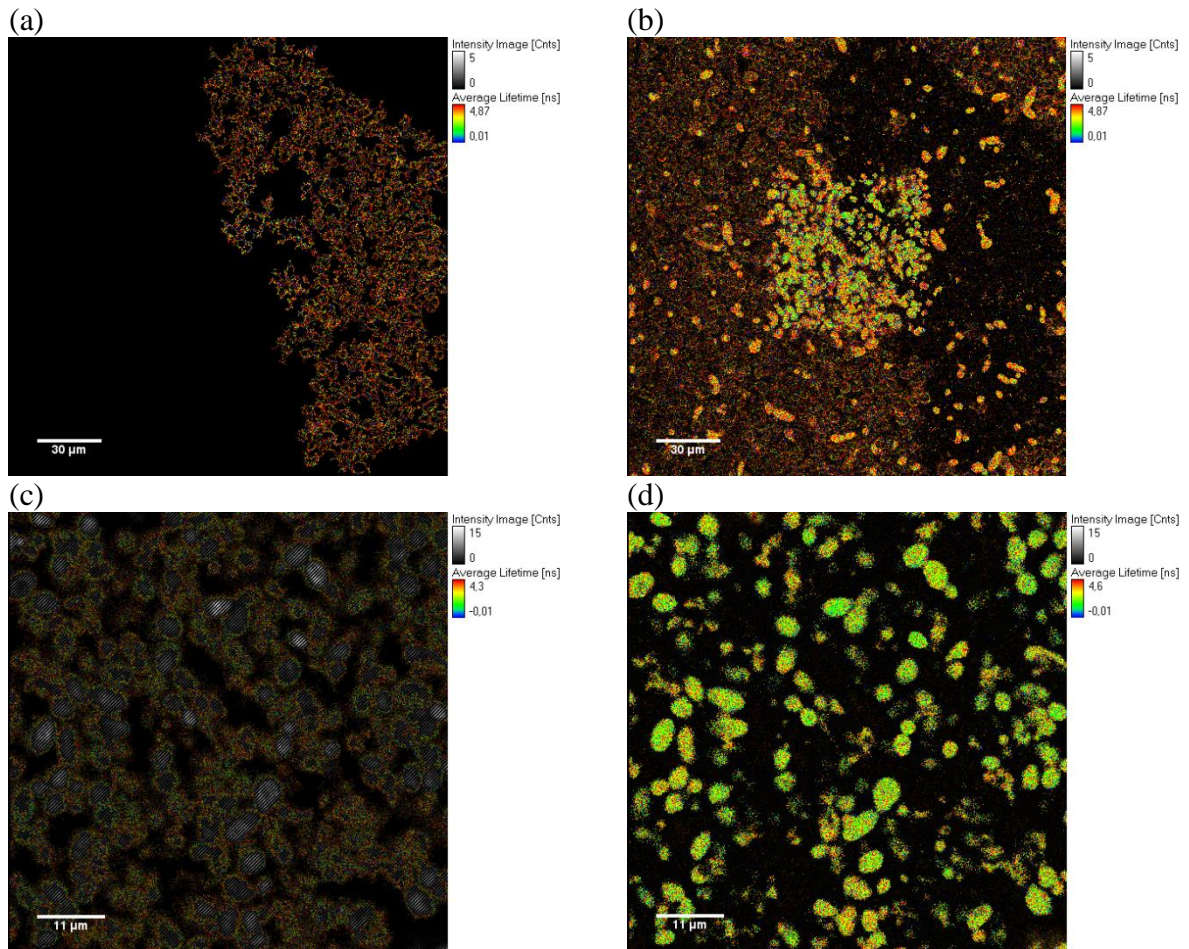


Figura 6.24 – Imagens FLIM da membrana de células em sua maioria não irradiadas e sem o FS internalizado (a), a mesma imagem, porém invertida apenas para demonstração (b), imagem da membrana das células da região irradiada (c) e do interior destas mesmas células (d).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Do mesmo modo anterior, a Figura 6.25 mostra os histogramas das regiões de interesse da Figura 6.24 para comparação. A Figura 6.25 (a) mostra os histogramas de tempos de vida médios do FS ligado à membrana das células irradiadas (círculos) e da membrana das células mantidas no escuro (quadrados). Já na Figura 6.25 (b) é mostrada uma comparação do tempo de decaimento médio do Photogem[®] na membrana das células (círculos) e na parte interna das mesmas (quadrados). Ambas figuras foram ajustadas pela equação 15, entretanto algumas distribuições apresentaram dois picos no histograma enquanto outros não, a linha sólida vermelha mostra o ajuste do primeiro pico (de menor tempo de decaimento), a linha sólida verde mostra o ajuste do segundo pico (de maior tempo de decaimento), enquanto a linha azul sólida mostra a soma dos dois ajustes gaussianos.

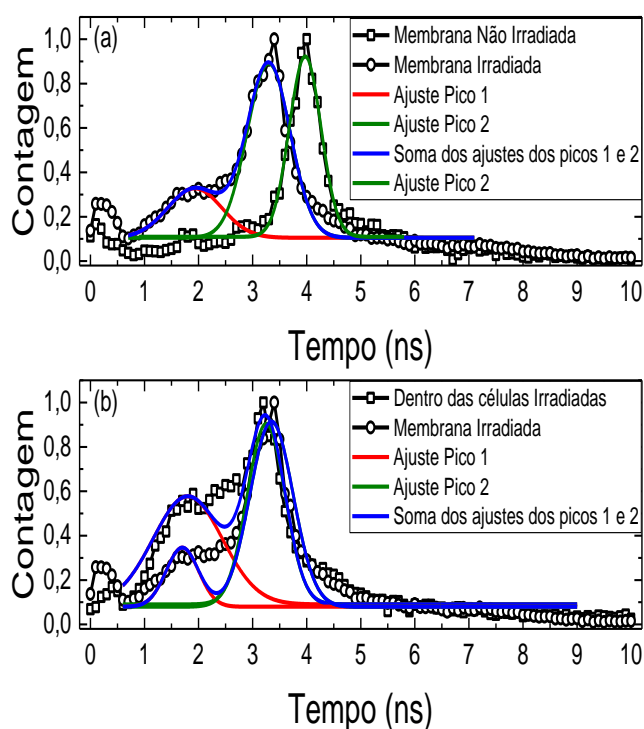


Figura 6.25 – Histogramas para comparação do tempo de decaimento da fluorescência do Photogem[®] em diferentes condições: comparação entre a membrana das células irradiadas (círculos) e não irradiadas (quadrados) (a); e comparação da membrana (círculos) das células irradiadas com o interior (quadrados) das mesmas (b). Em vermelho os ajustes gaussianos (equação 15) dos picos de menores tempo de vida, em verde o mesmo ajuste nos picos com maiores tempos de vida, em azul a soma dos dois ajustes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 6.25 (a) é possível notar que enquanto a membrana das áreas não irradiadas tem apenas um pico, a membrana das áreas irradiadas tem dois picos na distribuição de tempos de vida médio e ambos são menores quando comparados aos primeiros. Já na Figura 6.25 (b) é importante notar que apesar do máximo dos histogramas serem bastante similares, o pico que representa tempos mais curtos está mais acentuado na distribuição do FS interno às células do que o das membranas da área irradiada. A partir do ajuste gaussiano nos picos do histograma foi possível construir a Tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Parâmetros do ajuste gaussiano em cada localização

Localização do Photogem [®]	Centro pico 1 (ns)	Largura pico 1 (ns)	Centro pico 2 (ns)	Largura pico 2 (ns)
Membrana não irradiada	-	-	$3,98 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,02$
Membrana irradiada	$1,92 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,05$	$3,30 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,02$
Dentro das células da área irradiada	$1,81 \pm 0,20$	$1,28 \pm 0,10$	$3,25 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,06$

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível inferir que no primeiro pico há grande alteração no tempo de decaimento da fluorescência do FS. Allison Yeh, et al.⁸¹ demonstrou em um trabalho análogo utilizando Photofrin[®] como FS, que a membrana de células adenocarcinoma de próstata de ratos tem o mesmo comportamento quanto ao tempo de decaimento curto quando comparado com o tempo de decaimento dentro da célula, tal comportamento pode ser devido a interações do FS com a membrana e também com a formação de fotoprodutos citotóxicos.

Do mesmo modo que nas imagens de microscopia confocal de fluorescência, o mesmo experimento foi realizado para uma amostra que teve o reservatório de FS removido, ou seja, o meio lavado. As Figura 6.26 (a) e (b) mostra as imagens FLIM do FS e da AF desta amostra respectivamente.

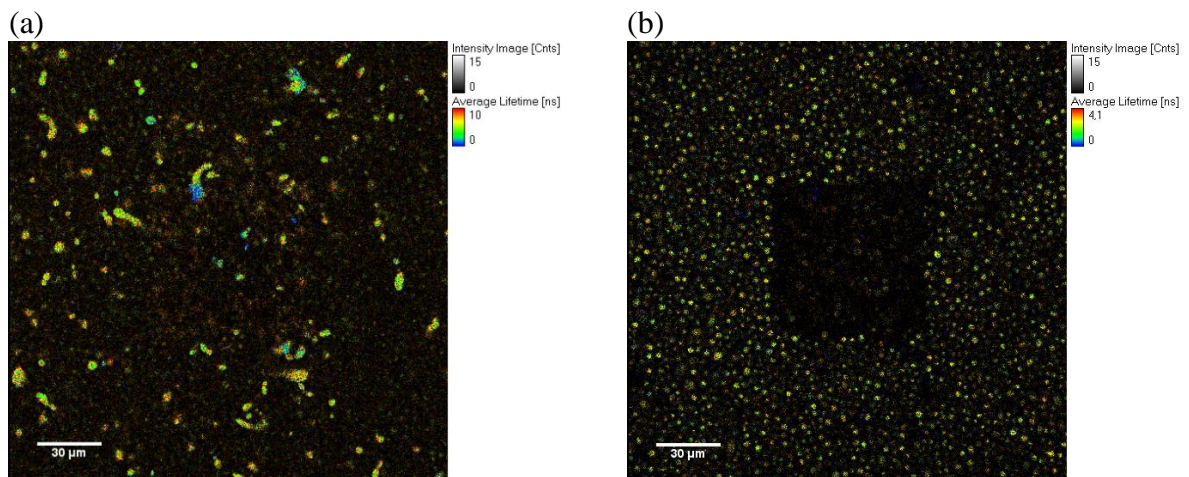


Figura 6.26 – Imagens de tempo de vida de fluorescência do Photogem[®] (a) e da AF da levedura (b) de uma amostra que teve o reservatório de FS retirado e foi iluminada. As cores falsas representam o tempo de decaimento da fluorescência, cores avermelhadas discriminam tempos longos enquanto cores azuladas representam tempos mais curtos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os histogramas das diferentes regiões referentes às figuras mostradas anteriormente estão mostrados na Figura 6.27 (a) e (b) para a fluorescência do FS e da AF respectivamente. Novamente a área irradiada está representada pelos círculos enquanto a área mantida no escuro pelos quadrados.

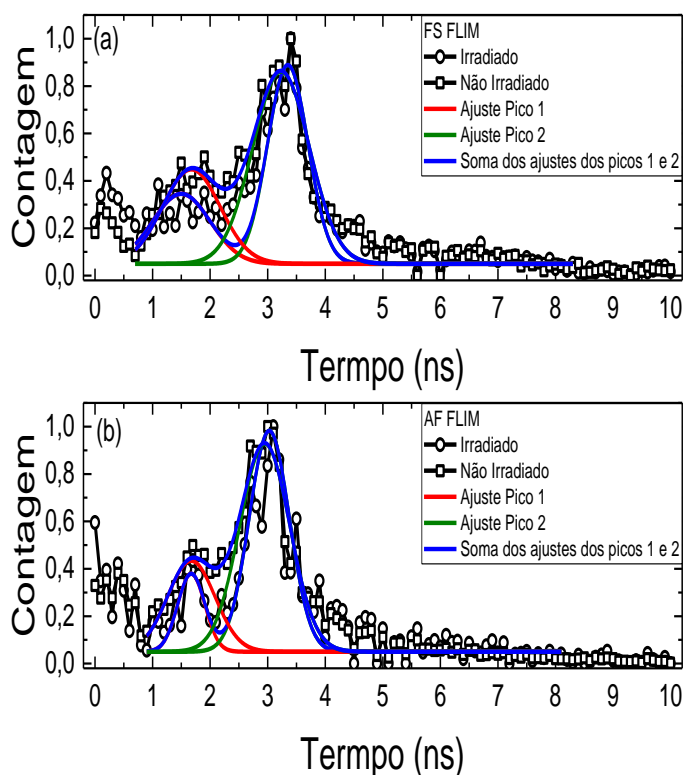


Figura 6.27 – Histograma do tempo de decaimento da fluorescência do FS (a) e da AF (b) da amostra que teve o reservatório de FS retirado. Ambas imagens mostram histogramas para duas regiões distintas da imagem, área irradiada (círculos) e não irradiada (quadrados). Em azul os ajustes gaussianos dos picos de menores tempo de vida, em vermelho o mesmo ajuste nos picos com maiores tempos de vida.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através de uma análise qualitativa dos histogramas acima é possível inferir que o tempo de vida das moléculas de FS das diferentes regiões não apresentam grandes alterações, já o tempo de vida da AF mostra novamente uma diminuição no tempo de vida da área irradiada, apesar de não ser tão acentuada como as mudanças na amostra que contém reservatório de FS no meio esta pode também ser devido ao fato de poder haver transferência de energia para as moléculas do FS. A Tabela 6.4 mostra os parâmetros do ajuste gaussiano para cada um dos histogramas.

Tabela 6.4 – Parâmetros do ajuste gaussiano para o tempo de decaimento do Photogem[®] e da AF da levedura em amostra com reservatório de FS presente.

Sem reservatório de FS	Centro pico 1 (ns)	Largura pico 1 (ns)	Centro pico 2 (ns)	Largura pico 2 (ns)
FS Área irradiada	1,50 ± 0,05	1,00 ± 0,10	3,35 ± 0,03	0,80 ± 0,06
FS Área não irradiada	1,67 ± 0,10	1,00 ± 0,20	3,27 ± 0,03	0,80 ± 0,02
AF Área irradiada	1,67 ± 0,05	0,47 ± 0,10	3,02 ± 0,02	0,70 ± 0,04
AF Área não irradiada	1,67 ± 0,05	0,82 ± 0,10	2,95 ± 0,02	0,87 ± 0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.4 Monitoramento do aumento de captação de FS induzido por luz

Através da junção das imagens espectrais adquiridas com o microscópio confocal de fluorescência com algoritmos estatísticos multivariados foi desenvolvido um método para monitorar em tempo real a localização e a absorção do Photogem[®] e a formação do seu fotoproduto. A Figura 6.28 mostra os grupos espectrais selecionados pelo método K-means a partir de uma imagem (Figura 6.29 (a)) espectral de fluorescência de uma região onde será realizada a iluminação. A Figura 6.29 (b) mostra a imagem recolorida com as cores falsas respectivas a cada um dos espectros, ou seja, os pixels de fundo foram coloridos com a cor preta, enquanto a AF da levedura levou a cor ciano, o espectro azul refere-se à membrana da célula em conjunto com o FS ali localizado, os espectros magenta e vermelho fazem referencia ao Photogem[®] em menor concentração ou maior respectivamente. As Figura 6.29 (c) e (d) mostram as mesmas imagens mas com maior aumento apenas para melhor visualização.

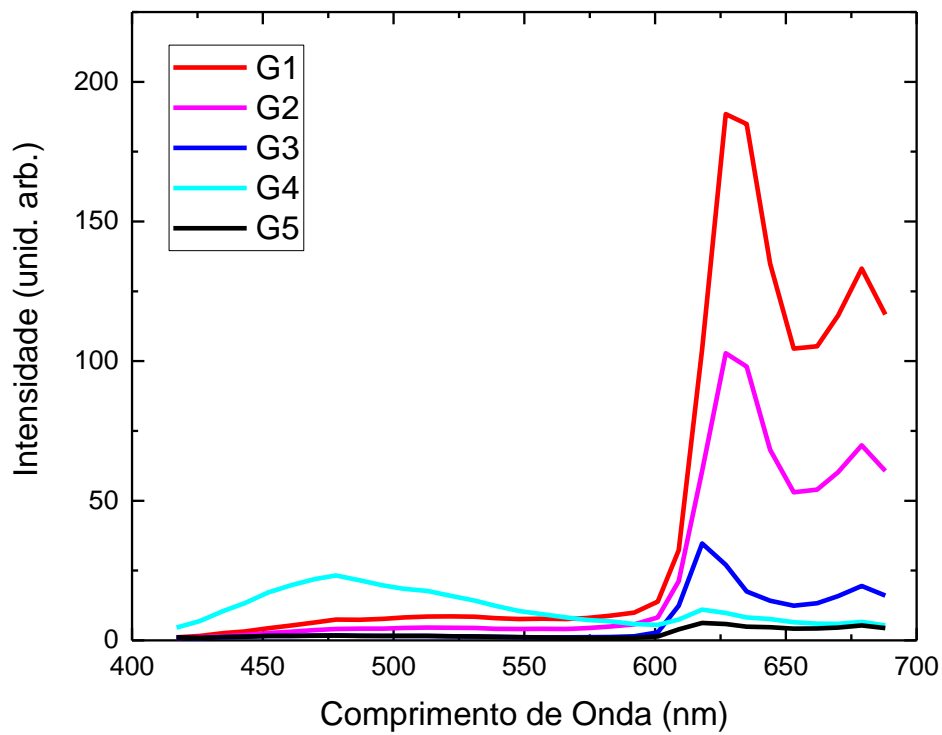


Figura 6.28 – Grupos espectrais extraídos pelo método K-Means de imagem antes de ser irradiada apresentado em cores falsas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

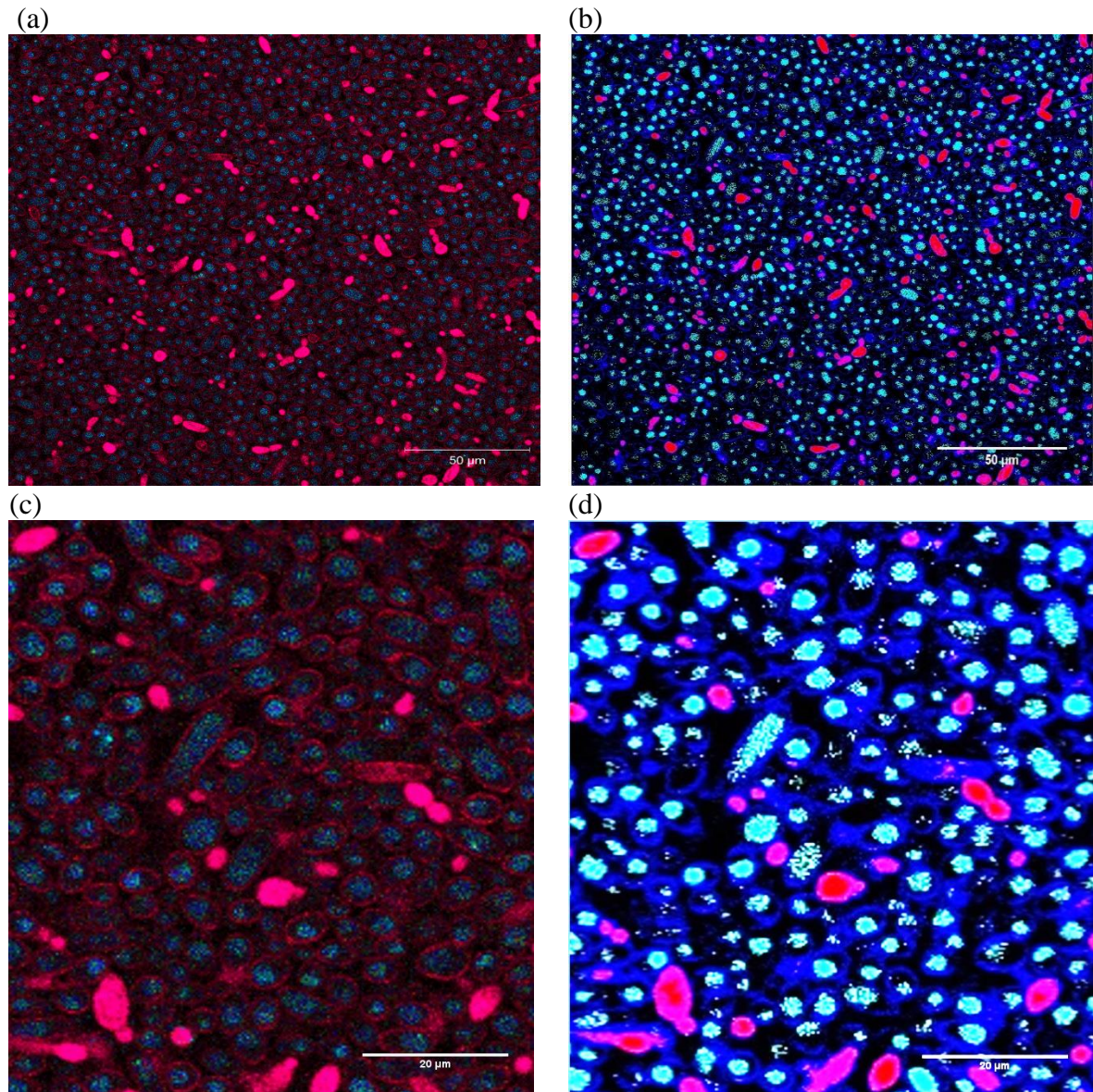


Figura 6.29 – Imagens de microscopia confocal de fluorescência adquiridas pelo modo espectral sem (a) e com aumento (c). As mesmas imagens recoloridas com as cores dos espectros apresentados na figura anterior (b) e (d) respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Este tipo de seleção de grupos é análogo aos já existentes métodos de separação nos softwares de diversos microscópios confocais,⁸²⁻⁸⁴ entretanto a grande diferença do método utilizado neste trabalho é o fato de que neste cada pixel é referente à um único grupo, enquanto nos softwares já existentes cada pixel é colorido de acordo com uma combinação linear dos espectros selecionados, acarretando assim, muitas vezes, dificuldades de distinção entre os pixels e os respectivos espectros.

A região central desta amostra foi escolhida para sofrer uma iluminação de baixa dose, de modo a monitorar a absorção e localização do FS uma rede neural foi treinada para reconhecer os espectros da Figura 6.30, nesta estão presentes cinco grupos espectrais, o de cor

preta está relacionado ao fundo da amostra, a cor verde é relacionada à AF da levedura, enquanto a cor amarela refere-se à membrana das células, a cor magenta mostra a fluorescência do Photogem® e a cor vermelha faz referencia não só à fluorescencia deste FS bem como do seu fotoproduto que tem banda de emissão localizada entre as bandas do Photogem®⁸⁵.

A Figura 6.31 mostra uma série temporal de imagens de cores falsas referentes aos espectros da Figura 6.30, nesta as figuras de (a) até (l) são referentes a 0 minutos (inicial); 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 35 minutos respectivamente.

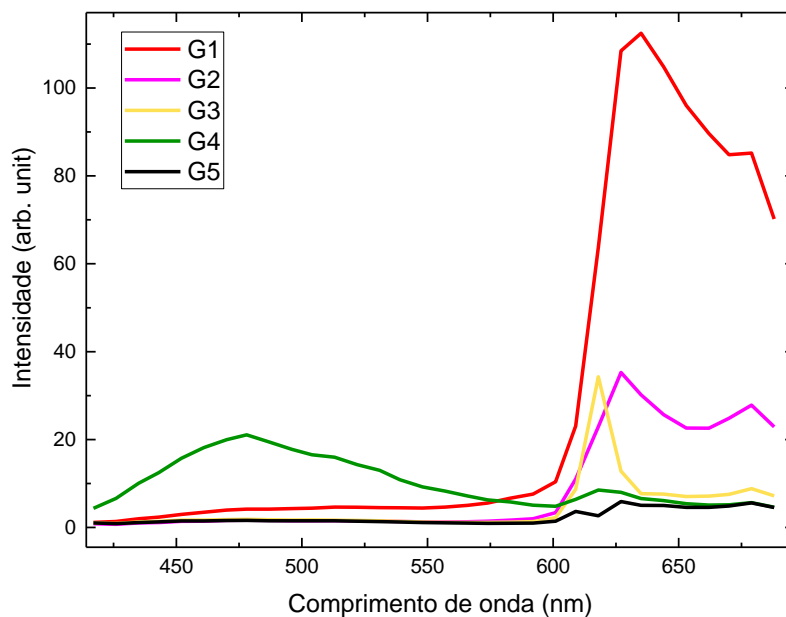
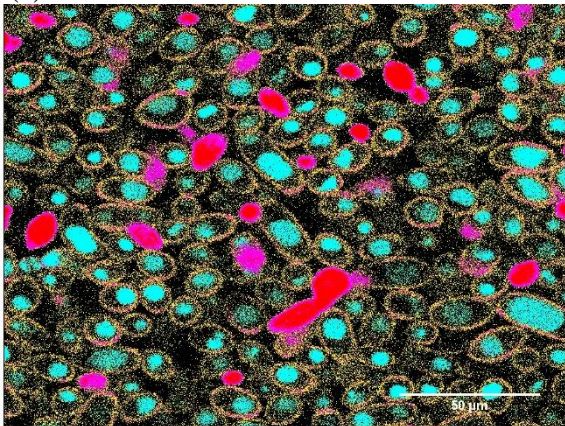


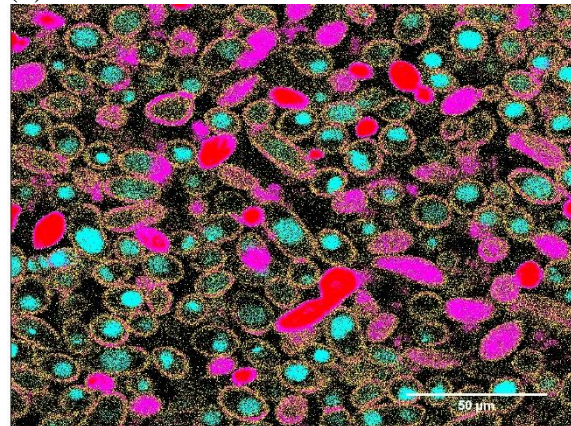
Figura 6.30 - Grupos espectrais extraídos pelo método K-Means de imagem após de ser irradiada apresentado em cores falsas

Fonte: Elaborada pelo autor.

(a)



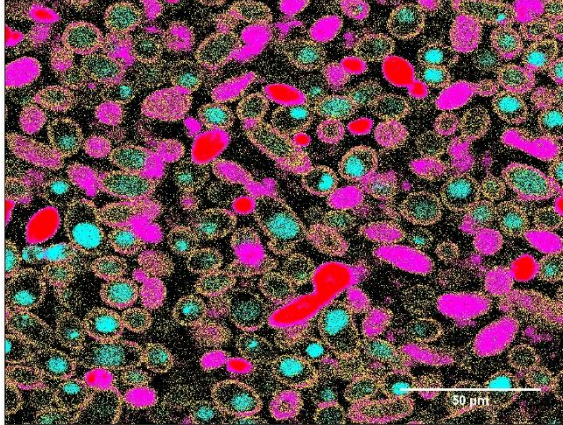
(b)



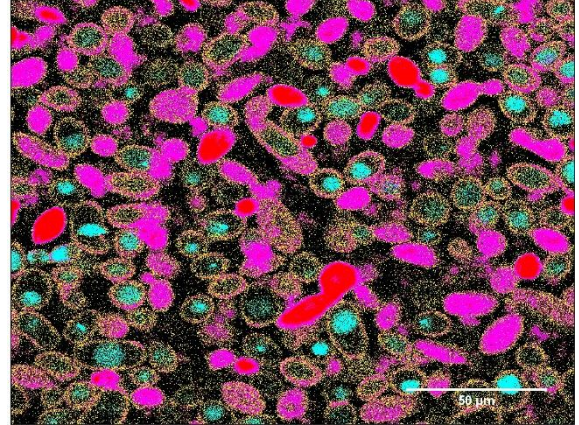
continua

continuação

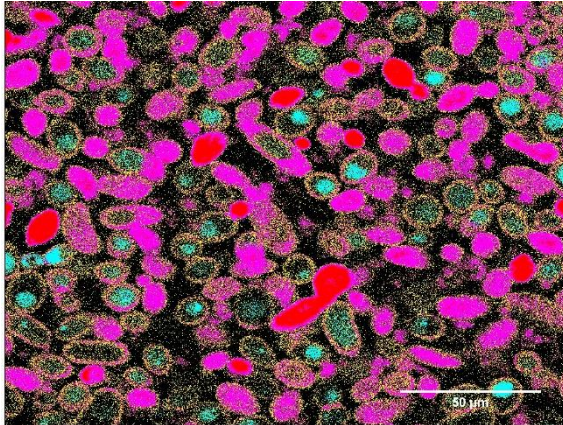
(c)



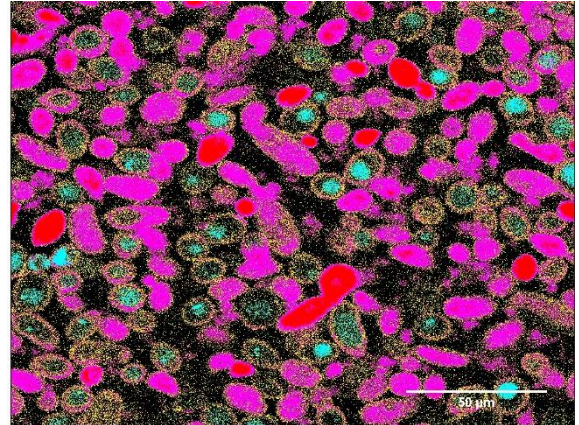
(d)



(e)



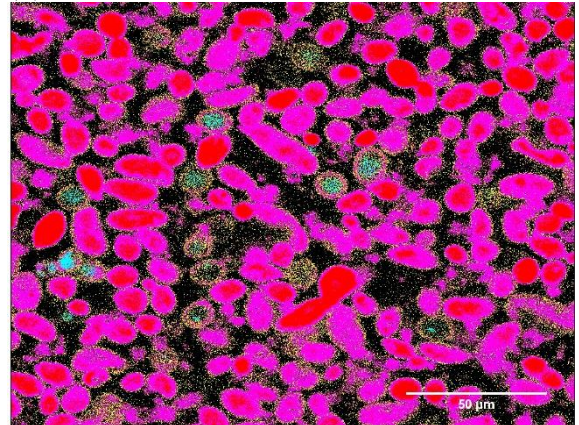
(f)



(g)



(h)



continua

conclusão

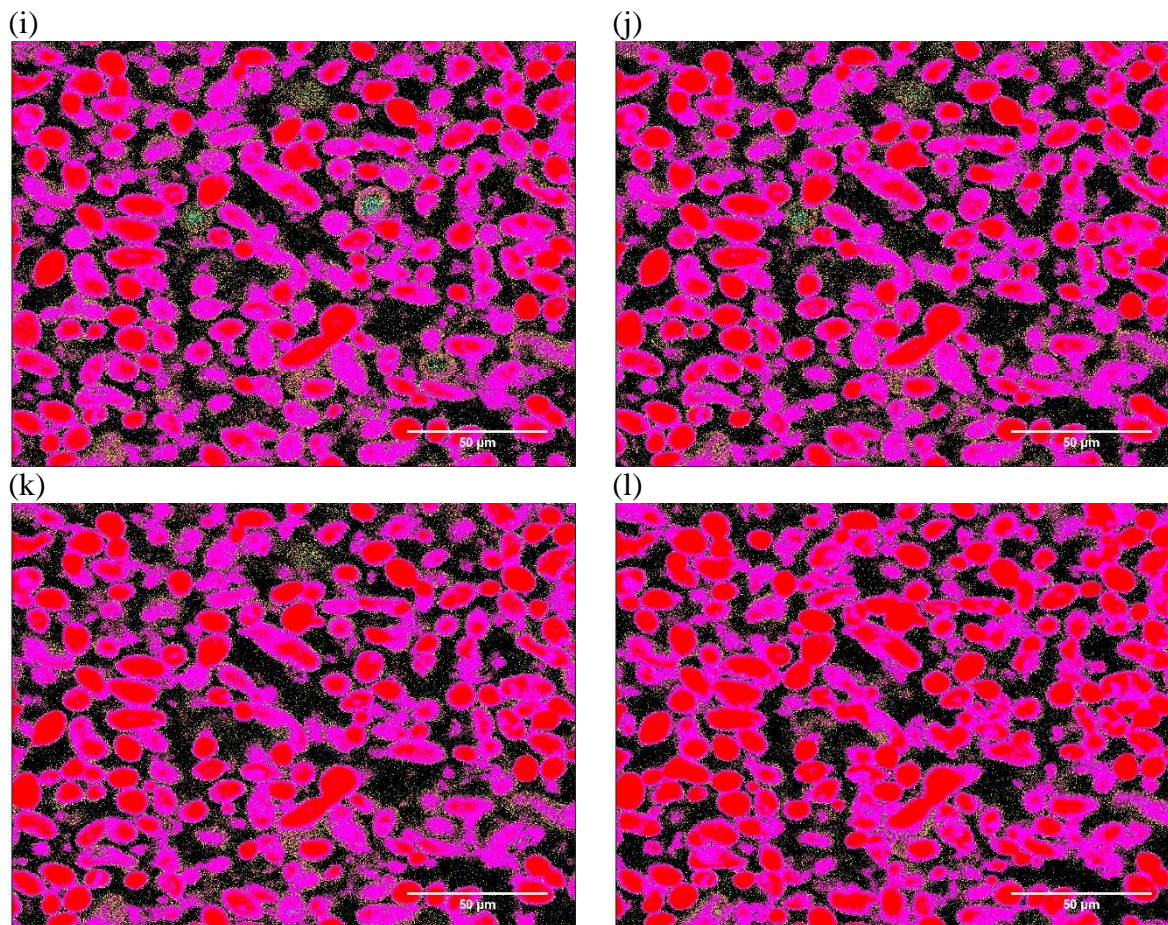
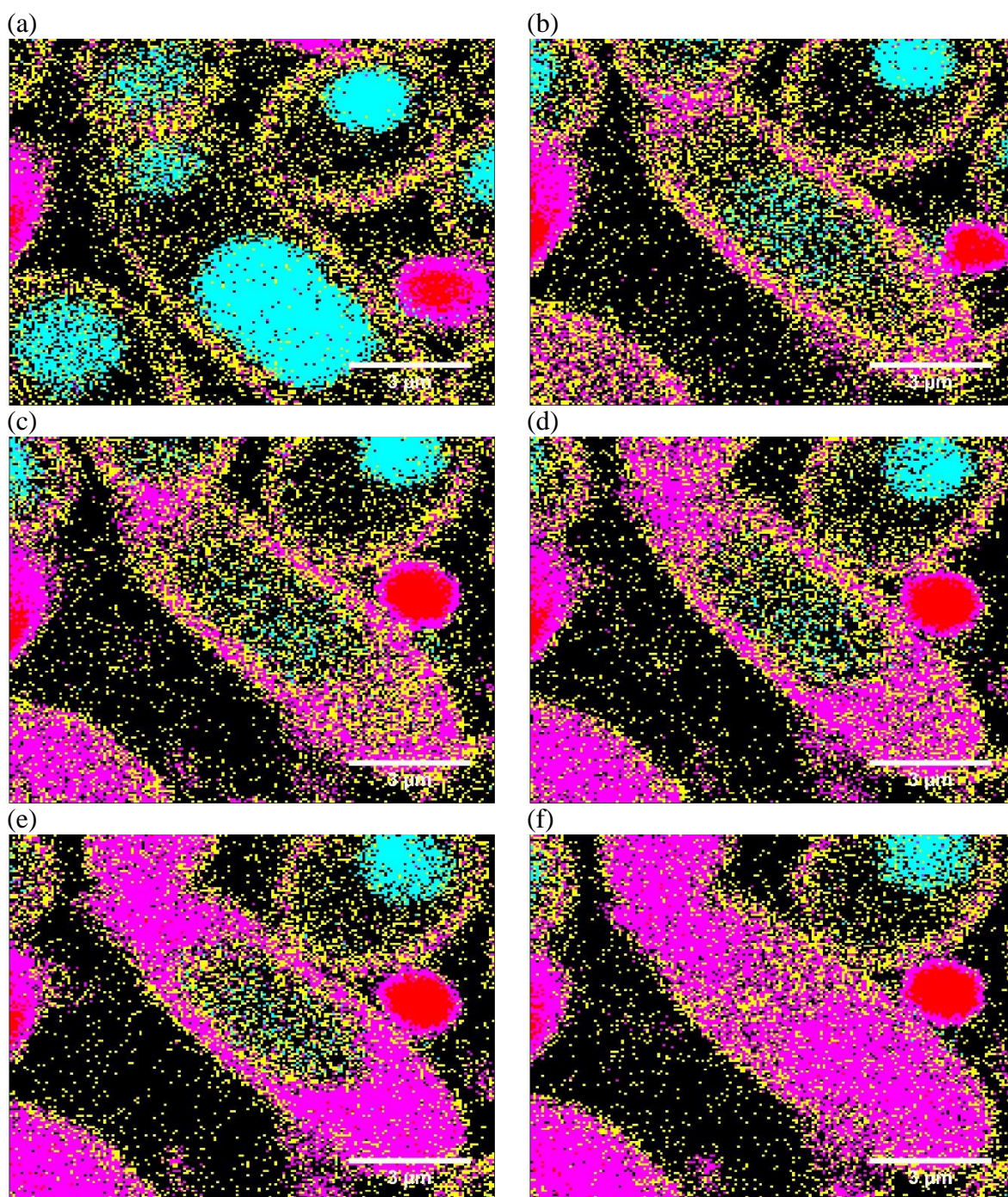


Figura 6.31 – Série temporal de imagens espectrais coloridas com cores falsas de acordo com os grupos. Os tempos referentes às figuras (a) até (l) são 0 minutos (inicial); 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 35 minutos respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dessa figura pôde-se inferir que o fotoproduto só começa a aparecer dentro das células de forma representativa após 10 minutos de pré iluminação (Figura 6.31 (h)), tornando-se predominante a partir de 17,5 minutos de iluminação (Figura 6.31 (k)). É possível ainda notar nesta figura que o caminho do FS se inicia na membrana que ao sofrer pequenos danos perde sua estrutura de regulação, permitindo assim a entrada do Photogem[®], após isso observa-se que apenas após a completa difusão do FS pelo citoplasma da célula o núcleo desta é atingido. Além disso, através da contagem de células com FS internalizado inicialmente e após certo tempo de iluminação, pôde-se inferir ainda que com 7,5 minutos de pré-iluminação (Figura 6.31 (g)), ou seja, antes do início da formação do fotoproduto, cerca de 80% das células presentes no meio tinham internalizado o Photogem[®]. Este tempo corrobora com o tempo característico calculado pelos ajustes nas imagens de modo canal do ítem 6.4.1.

Para melhor demonstração a Figura 6.32 mostra um aumento da imagem anterior destacando uma única célula, as cores e os tempos de pré iluminação para cada imagem são os mesmos do anterior, ou seja, 0 minutos (inicial); 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 35 minutos respectivamente. Nesta é possível notar que a AF marcada com a cor ciano deixa de aparecer a partir do momento que o Photogem[®] entra na célula, isso pode ser em decorrência da transferência de energia das moléculas da célula para as moléculas de FS.



continua

conclusão

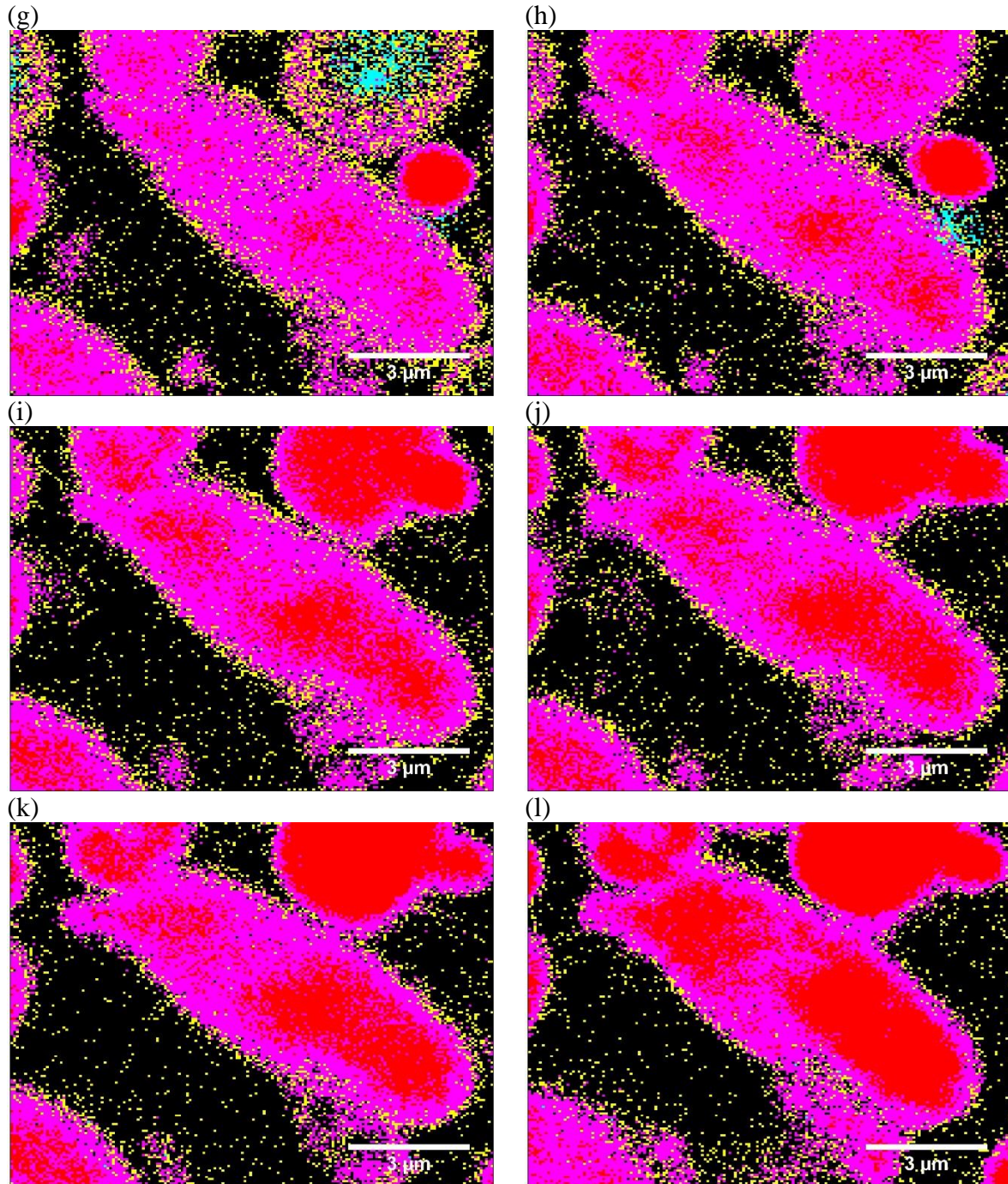


Figura 6.32 – Destaque para uma célula da série temporal de imagens espectrais coloridas com cores falsas de acordo com os grupos. Os tempos referentes às figuras (a) até (l) são 0 minutos (inicial); 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 35 minutos respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após este período de iluminação a mesma região de campo amplo da Figura 6.29 foi observada, utilizando esta imagem espectral como entrada no algoritmo K-means foram selecionados sete grupos espectrais. Estes grupos são mostrados na Figura 6.33, nela a linha

preta refere-se ao fundo da imagem, a linha de cor ciano é a AF da levedura, a linha azul mostra a fluorescência da membrana da levedura, já as linhas vermelha, magenta, alarajada e amarela fazem referencia ao Photogem[®]. Dentre estas últimas, o fotoproduto está bastante presente na linha vermelha, enquanto as outras cores mostram menor intensidade de fluorescência do FS, mas com forma de linha semelhante.

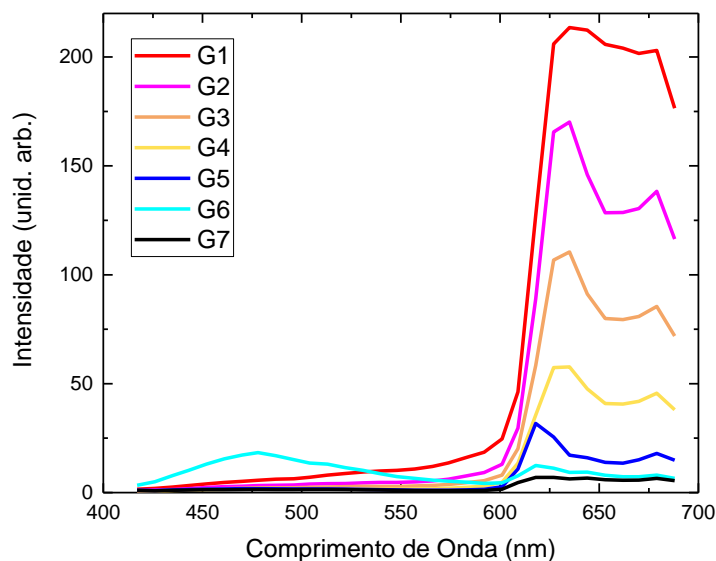


Figura 6.33 – Grupos espectrais extraídos pelo método K-Means de imagem após ter seu centro irradiado apresentado em cores falsas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 6.34 (a) mostra esta região colorida com as cores falsas relativas aos sete grupos espectrais, para facilitar a observação a Figura 6.34 (b) mostra um aumento na região da interface entre as áreas irradiada e não irradiada. Na última pode-se inferir que existem dentro das células irradiadas anéis de diferentes cores onde da membrana para dentro é possível observar os grupos 4; 3; 2; e 1 respectivamente.

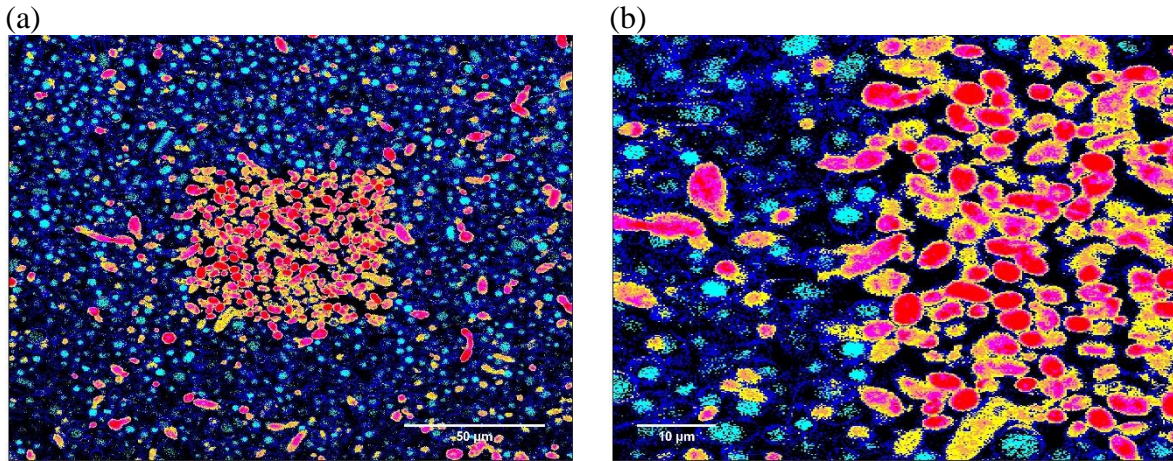


Figura 6.34 – Imagem de cores falsas de acordo com cada um dos sete grupos espectrais. Na figura (a) é mostrada a região de campo amplo, na figura (b) é mostrada a interface entre a região irradiada e a região externa mantida no escuro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

De modo a melhor compreender a distribuição de cada um dos grupos nesta figura, um histograma com o número de pixels de cada um dos grupos foi construído (Figura 6.35). Neste histograma pode-se notar que o grupo espectral de fundo é o que tem maior predominância, seguido do grupo da membrana celular não irradiada, e pela AF da célula. Os grupos ligados à área irradiada tem menores valores, já que sua área é menor, e mostra que a maior concentração de fotoproduto é ainda pequeno em comparação com as outras classes.

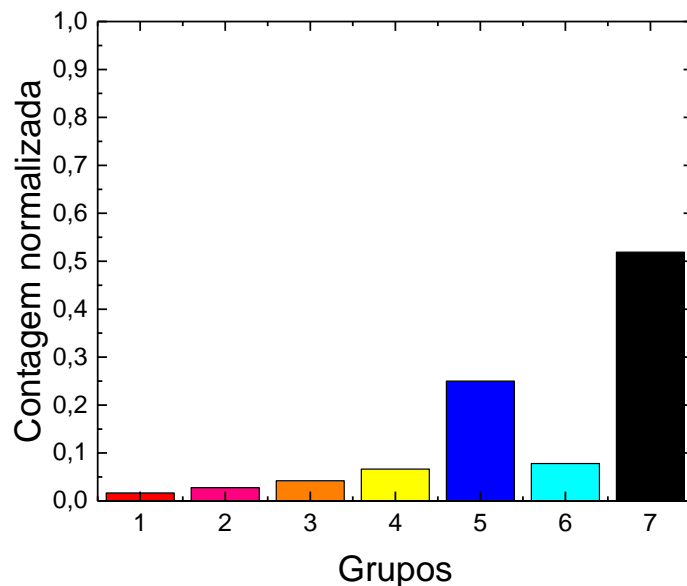


Figura 6.35 – Histograma do número de pixels de cada grupo normalizado pelo número total de pixels da imagem. As cores vermelha, magenta, alaranjada, amarela, azul, ciano e preto são respectivas aos grupos 1 até 7.

Fonte: Elaborada pelo autor.

7 CONCLUSÕES

Torna-se evidente a potencialidade da pré-iluminação não só para auxiliar a captação de FS pelas células mas também selecionar quais destas terão maior concentração interna de FS, através da qual o dano celular pode ser maior. Além disso, tomando vantagem da fluorescência do FS e acoplando imagens espectrais de microscopia confocal com algoritmos estatísticos multivariados foi possível monitorar em tempo real a captação do FS pela célula.

As matrizes emissão excitação dos FSs mostraram as diferentes bandas de absorção e auxiliaram na escolha das fontes de luz utilizadas tanto para pré-iluminação em experimentos de microbiologia e microscopia, como para estudos de *photobleaching*.

O experimento de quantificação de captação de FS pelas células através da medida da absorção do sobrenadante mostra que as células pré-irradiadas tiveram maior entrada de FS do que as que foram mantidas no escuro sob o mesmo tempo de incubação. Através deste experimento foi possível estimar que as células pré-irradiadas tiveram captação de até 10^6 moléculas a mais do que as células não irradiadas. Além disso, este experimento mostra que a partir de 20 minutos de incubação já é apresentado certa estabilização da entrada de moléculas dentro das células, corroborando assim com os tempos de incubação utilizados na IFD tradicional.

Através dos ensaios de viabilidade celular pôde-se inferir que apesar de que doses de pré-iluminação de 4 J/cm^2 já acarretarem a diminuição de aproximadamente uma ordem de grandeza das unidades formadoras de colônia, as células que tiveram pré-iluminação sofreram maiores danos com a IFD, no caso das doses de IFD de 8 J/cm^2 e 17 J/cm^2 as amostras pré-iluminadas apresentaram reduções de até quatro e seis ordens de grandeza as unidades formadoras de colônia respectivamente. Este experimento corrobora com o experimento de quantificação de captação de FS pelas células, pois através da maior concentração intracelular de FS maior o dano produzido pela IFD nas células. Isso pode ser devido ao fato de que ao fazer a iluminação de baixa dose quando as moléculas do FS já se apresentam ligadas à membrana, estas paredes celulares sofrem pequenos danos auxiliando assim a entrada do FS. Outra hipótese para este comportamento é a eletroporação induzida por luz, onde o campo elétrico do laser induz a abertura dos poros das células, auxiliando assim a entrada das moléculas de FS nas células. Deste modo, é possível inferir que através de uma pequena mudança no protocolo de incubação de FS foi possível aumentar representativamente a eficiência da IFD.

As imagens de microscopia confocal mostram o resultado da pré-iluminação de baixa dose em duas condições diferentes, a primeira onde havia reservatório de FS enquanto no segundo as células foram lavadas e esse reservatório retirado. Nos experimentos de iluminação de baixa dose nas amostras que continham o reservatório de FS, foi mostrado um grande aumento da fluorescência da área irradiada, bem como através da seleção de células de interesse foi possível estimar um tempo característico de aumento da fluorescência, tanto para excitação por um fóton quanto por dois fótons, o tempo médio obtido foi de $6,2 \pm 0,6$ minutos. Além disso, foi mostrado ainda que as amostras que foram lavadas não tiveram esse aumento de fluorescência, demonstrando assim que este aumento não se trata de melhor eficiência quântica de fluorescência do FS devido ao meio intracelular, mas sim confirmam que a concentração de FS foi maior na região irradiada. É mostrado também que pelo menos dois comprimentos de onda de iluminação acarretam aumento de captação de FS pelas células, estes foram 405 nm (excitação por um fóton) e 800 nm (excitação por dois fótons).

Através dos experimentos de *photobleaching* este estudo também comprovou que as moléculas do FS estão livres dentro das células da levedura, entretanto a difusão da Curcumina é mais lenta do que a do Photogem[®], isso é mostrado pelo tempo recuperação da fluorescência que teve valores de $39,0 \pm 0,6$ s e $25,2 \pm 0,6$ s respectivamente, mostrando assim que a curcumina tem tempo difusão média 1,5 vezes maior que o Photogem[®]. Além disso, existem ainda dois regimes para as amostras que continham o reservatório do FS. O primeiro onde a fluorescência do FS é recuperada ao mesmo nível inicial após o *photobleaching*, nele a constante K de velocidade de recuperação de fluorescência obtida através de uma equação empírica foi da ordem de $1,4 \pm 0,5 \mu\text{m}^3$. Enquanto no segundo regime onde esta intensidade de fluorescência é maior após o *photobleaching* do que o inicial, a constante K obtida tem o valor de $11,0 \pm 1,5 \mu\text{m}^3$, podendo assim inferir que diferentemente do primeiro regime, na segunda condição a célula perde a regulação de entrada e saída de FS do seu interior. Com estes experimentos também foi possível demonstrar que nas amostras que tiveram reservatório de FS removido não houve recuperação da intensidade de fluorescência, isso se deve ao fato de que não havia moléculas no exterior para substituir as moléculas degradadas.

Já a técnica de microscopia de tempo de vida de fluorescência demonstrou que o tempo médio de decaimento da fluorescência do FS depende não só da condição pela qual esse FS passou, ou seja, se ele foi ou não irradiado, como também da sua localização intracelular ou na membrana das células. O FS presente nas células irradiadas tiveram tempo de decaimento da fluorescência de aproximadamente $2,59 \pm 0,01$ ns enquanto o presente nas células que

foram mantidas no escuro mostraram tempo de vida de $3,88 \pm 0,03$ ns, enquanto o tempo de decaimento da AF nessas regiões são respectivamente $0,59 \pm 0,01$ ns e $2,23 \pm 0,06$ ns. Ao observar apenas as células da região irradiada, foi possível inferir que ao estar ligado na membrana das células o FS teve tempo de vida médio bastante diferente do FS que estava dentro das células, estes apresentaram ainda dois picos no histograma de tempo de vida. O primeiro pico teve tempo de decaimento de $1,92 \pm 0,05$ ns e $1,81 \pm 0,20$ ns enquanto para o segundo pico os tempos foram $3,30 \pm 0,01$ ns e $3,25 \pm 0,02$ ns respectivamente ao FS ligado à membrana da célula e ao intracelular. Ao FS ligado à membrana das células não irradiadas foi possível ainda notar que havia um único pico no histograma, este com valor de $3,98 \pm 0,02$ ns. Para as amostras que foram lavadas, ou seja, o reservatório de FS foi removido, o tempo de vida de ambos picos do FS na região irradiada e na região mantida no escuro não teve grande alteração, sendo estes $1,50 \pm 0,05$; $1,67 \pm 0,09$; $3,35 \pm 0,03$ ns; e $3,27 \pm 0,03$ ns respectivamente aos picos de tempos mais curtos e mais longos.

Através do acoplamento das imagens espectrais provenientes do microscópio confocal com os algoritmos multivariados K-Means e de redes neurais artificiais foi possível monitorar em tempo real não só a entrada do Photogem[®] como também a formação dos fotoprodutos nas células. Foi demonstrado então que o FS primeiramente está alocado na membrana das células, com a iluminação, estas células perdem o controle de regulação e as moléculas de FS adentram às estas células, por fim, antes de atingir o núcleo, o FS se difunde por todo o citoplasma da levedura e apenas depois de um certo tempo ele adentra o núcleo. A formação do fotoproduto se inicia em geral após de cerca de 10 minutos de iluminação, tornando-se predominante após cerca de 17,5 minutos. Foi mostrado também que com 7,5 minutos de iluminação, ou seja, antes da formação de fotoproduto, já haviam cerca de 80% das células desta região com o FS internalizado, corroborando com os tempos característicos estimados pelos ajustes da fluorescência do FS nas imagens de modo canal.

Este trabalho abre caminho para muitos outros estudos que visam aumentar a eficiência das reações fotodinâmicas, pois mostra que uma pequena mudança no protocolo de incubação acarreta aumento representativo de dano às células alvo. Este novo protocolo pode ainda ser estudado de diversas maneiras, podendo variar os FSs, as fontes de luz de pré-iluminação, e também as células alvo, tendo a possibilidade de ser aplicado ainda tanto em IFD quanto em TFD.

REFERÊNCIAS

- 1 MARINHO, A. Controvérsia - o sistema de saúde brasileiro é eficiente. *Revista Desafios e Desenvolvimento*, v. 6, n. 50, 2009. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=2248:catid=28&Itemid=23>. Acesso em: 5 maio 2016.
- 2 BAGNATO, V. S. **Terapia fotodinâmica dermatológica: programa TFD Brasil**. São Carlos, Compacta Gráfica e Editora, 2015.
- 3 DOUGHERTY, T. J.; GRINDEY, G. B.; FIEL, R.; WEISHAUPT, K. R.; BOYLE, D. G. Photoradiation therapy. II. cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 55, n. 1, p. 115–121, 1975.
- 4 DOUGHERTY, T. J. Photosensitization of malignant tumors. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 2, n. 1, p. 24-37, 1986.
- 5 HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145–157, 1992.
- 6 DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.
- 7 TANG, H. M.; HAMBLIN, M. R.; YOW, C. M. N. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, n. 2, p. 87–91, 2007.
- 8 DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 245–254, 2004.
- 9 WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 412–418, 2004.
- 10 NSEYO, U. O. et al. Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long term experience. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, n. 1, p. 61–68, 1998.
- 11 USUDA, J. et al. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 1, n. 5, p. 489–493, 2006.
- 12 OVERHOLT, B. F. et al. Five-year efficacy and safety of photodynamic therapy with Photofrin in Barrett's high-grade dysplasia. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 66, n. 3, p. 460–468, 2007.
- 13 GOLD, M. H. et al. The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 5, n. 2, p. 140-152, 2006.

14 TSCHEN, E. H. et al. Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. **British Journal of Dermatology**, v. 155, n. 6, p. 1262–1269, 2006.

15 BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 8, p. 497–508, 2004.

16 IBANEZ SIMPLICIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002.

17 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 9, p. R61–R109, 2008.

18 BONNEAU, S.; MORLIÈRE, P.; BRAULT, D. Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 7, p. 1443–1452, 2004.

19 HATZ, S.; LAMBERT, J. D. C.; OGILBY, P. R. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 10, p. 1106–1116, 2007.

20 LIM, S. H. et al. In vitro and in vivo photocytotoxicity of boron dipyrromethene derivatives for photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2865–2874, 2010.

21 KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H. New trends in photobiology: endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 14, n. 4, p. 275–292, 1992.

22 GOLD, M. H. et al. Treatment of sebaceous gland hyperplasia by photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and a blue light source or intense pulsed light source. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 3, n. 6 p. S6–S9, 2003. Supplement.

23 MORTON, C. A. et al. Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basal cell carcinoma. **Archives of Dermatology**, v. 137, n. 3, p. 319–324, 2001.

24 HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 4, n. 3, p. 283–293, 2005.

25 BIEL, M. A. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia. **Laryngoscope**, v. 108, n. 9, p. 1259–1268, 1998.

26 MUROYA, T. et al. Photodynamic therapy (PDT) for early cervical cancer. **Cancer & Chemotherapy**, v. 23, n. 1, p. 47–56, 1996.

27 MUSCHTER, R. Photodynamic therapy: a new approach to prostate cancer. **Current Urology Reports**, v. 4, n. 3, p. 221–228, 2003.

- 28 ORTNER, M.-A. Photodynamic therapy in cholangiocarcinoma: an overview. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 85–92, 2004.
- 29 MOGHISSI, K. Role of bronchoscopic photodynamic therapy in lung cancer management. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 10, n. 4, p. 256–260, 2004.
- 30 BEN-HUR, E. Inactivation of pathogens in blood and blood products. **Medicine and Health, Rhode Island**, v. 81, n. 12, p. 396, 1998.
- 31 SNOEK, E. M. et al. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 8, p. 918–922, 2008.
- 32 CARVALHO, P. T. C. et al. Photodynamic inactivation of in vitro bacterial cultures from pressure ulcers. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, p. 32–35, 2006. doi: 10.1590/S0102-86502006001000008.
- 33 GOLD, M. H. Acne and PDT: new techniques with lasers and light sources. **Lasers in Medical Science**, v. 22, n. 2, p. 67–72, 2007.
- 34 SILVA, A. P. et al. Development and comparison of two devices for treatment of onychomycosis by photodynamic therapy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 6, p. 61109, 2015.
- 35 SILVA, A. P. et al. A promising strategy for the treatment of onychomycosis with curcumin and photodynamic therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, p. 434–437, 2015. doi: 10.17265/2328-2150/2015.09.005.
- 36 LILGE, L.; PORTNOY, M.; WILSON, B. C. Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 8, p. 1110, 2000.
- 37 CHEN, J. et al. New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. **Cancer Journal**, v. 8, n. 2, p. 154–163, 2002.
- 38 SAMUEL, I. Light fantastic-light-emitting sticking plasters to treat skin cancer. **Materials World**, v. 15, n. 8, p. 28–30, 2007.
- 39 GRECCO, C. **Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimentos de onda**. 2013. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 40 SPANGLER, C. W. et al. Synthesis, characterization and preclinical studies of two-photon-activated targeted PDT therapeutic triads. **Proceedings SPIE**, v. 6139, 2006. doi:10.1117/12.646312.
- 41 SMITH, G. et al. An efficient oxygen independent two-photon photosensitization mechanism. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 2, p. 135–139, 1994.

- 42 MIR, Y.; HOUDE, D.; LIER, J. E. Two-photon absorption of copper tetrasulfophthalocyanine induces phototoxicity towards Jurkat cells in vitro. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 11, p. 1024–1030, 2006.
- 43 MIR, Y.; HOUDE, D.; LIER, J. E. Photodynamic inhibition of acetylcholinesterase after two-photon excitation of copper tetrasulfophthalocyanine. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 1, p. 19–25, 2008.
- 44 FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161–171, 2005.
- 45 WILSON, B. C. Photonic and non-photonic based nanoparticles in cancer imaging and therapeutics. **NATO Science Series**, v. 239, p. 121-157, 2006. doi: 10.1007/978-1-4020-5523-2_6.
- 46 LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1990–2042, 2015.
- 47 KOVALEV, D.; FUJII, M. Silicon nanocrystals: photosensitizers for oxygen molecules. **Advanced Materials**, v. 17, n. 21, p. 2531–2544, 2005.
- 48 YU, C. et al. Efficiency of singlet oxygen production from self-assembled nanospheres of molecular micelle-like photosensitizers FC 4 S. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 18, p. 1857–1864, 2005.
- 49 ORIEL, S.; NITZAN, Y. Mechanistic aspects of photoinactivation of *C. albicans* by exogenous porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 604–612, 2012.
- 50 FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 499–511, 1996.
- 51 CARMELLO, J. C. et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *C. albicans*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 7, p. 1319–1328, 2015.
- 52 DOVIGO, L. N. et al. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by Photogem®. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 42–49, 2010.
- 53 LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *C. albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026–2034, 2005.
- 54 CORMICK, M. P. et al. Photodynamic inactivation of *C. albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1592–1599, 2009.
- 55 DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *C. albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 2011.

56 PELLISSARI, C.V.G. et al. Cytotoxicity of antimicrobial photodynamic inactivation on epithelial cells when co-cultured with *C. albicans*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, n. 5, p. 682-690, 2016.

57 MIMA, E. G. O. et al. Susceptibility of *C. albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 109, n. 3, p. 392–401, 2010.

58 TEICHERT, M. C. et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 93, n. 2, p. 155–160, 2002.

59 TIME AERIALS. *C. albicans*. Disponível em: <<http://www.rkm.com.au/FUNGI/Candida.html>>. Acesso em: 7 jun 2016.

60 SISTEMA Raiz da Vida: além da inteligência nutricional. *C. albicans* – o fungo comum das imunodeficiências Disponível em: <<http://www.raizdavid.com.br/site/portugues/candida-albicans-o-fungo-comum-das-imunodeficiencias/>>. Acesso em: 7 jun. 2016.

61 VOLLET-FILHO, J. D., **Correlação de fluorescência superficial e profundidade de necrose em terapia fotodinâmica: possibilidade de dosimetria em tempo real**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012

62 PAN, L.; LIU, J.; SHI, J. Intranuclear photosensitizer delivery and photosensitization for enhanced photodynamic therapy with ultralow irradiance. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 46, p. 7318–7327, 2014.

63 GLIDDEN, M. D. et al. Image-based quantification of benzoporphyrin derivative uptake, localization, and photobleaching in 3D tumor models, for optimization of PDT parameters. **Theranostics**, v. 2, n. 9, p. 827–839, 2012.

64 GOLLMER, A. et al.. Real-time imaging of photodynamic action in bacteria. **Journal of Biophotonics**, v. 7, p. 1-7, 2016. doi: 10.1002/jbio.201500259

65 FARHADI, A. et al. Nano-enabled SERS reporting photosensitizers. **Theranostics**, v. 5, n. 5, p. 469–76, 2015.

66 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer c2006.

67 UCDAVIS CHEMWIKI. **Electronic spectroscopy: theory**. Disponível em: <http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Theory>. Acesso em: 4 maio 2016.

68 SEMWOGERERE, D.; WEEKS, E. R. Confocal microscopy. 2005. Disponível em: <<http://www.physics.emory.edu/faculty/weeks/lab/papers/ebbe05.pdf>>. Acesso em 23 jan. 2016.

- 69 TRIESSCHEIJN, M. et al. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034–44, 2006.
- 70 ROBERTS, D. J.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 6, p. 360–370, 1995.
- 71 MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- 72 PAWLEY, J. B. **Handbook of biological confocal microscopy**. New York: Springer c2006.
- 73 BECKER, W. et al. **Advanced time-correlated single photon counting technique for spectroscopy and imaging of biological systems**. 2004. Disponível em: <<http://www.becker-hickl.de/pdf/tcspcpw04bh.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- 74 MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 158, p. 212–218, 2016. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004.
- 75 MENEZES, P. F. C. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 76 SILVA, A. P. **Inativação dos micro-organismos causadores da onicomiose por terapia fotodinâmica** - estudo in vitro e clínico. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013
- 77 FERREIRA, J. et al. Comparative study of photodegradation of three hematoporphyrin derivative: Photofrin®, Photogem®, and Photosan®. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 10, p. 743, 2007.
- 78 BOTTOU, L.; BENGIO, Y. **Convergence properties of the k-means algorithms**. 1995. Disponível em: <<https://papers.nips.cc/paper/989-convergence-properties-of-the-k-means-algorithms.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- 79 YEGNANARAYANA, B. **Artificial neural networks**. New Delhi: Prentice-Hall of India, 2009.
- 80 VALLEY, J. K. et al. Parallel single-cell light-induced electroporation and dielectrophoretic manipulation. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 12, p. 1714–1720, 2009.
- 81 YEH, S. C. A. et al. Monitoring photosensitizer uptake using two photon fluorescence lifetime imaging microscopy. **Theranostics**, v. 2, n. 9, p. 817–826, 2012.
- 82 ZIMMERMANN, T. Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 95, p. 245–265, 2005. doi: 10.1007/b102216

83 ZIMMERMANN, T.; RIETDORF, J.; PEPPERKOK, R. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. **FEBS Letters**, v. 546, n. 1, p. 87–92, 2003.

84 LANSFORD, R.; BEARMAN, G.; FRASER, S. E. Resolution of multiple green fluorescent protein color variants and dyes using two-photon microscopy and imaging spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics** v. 6, n. 3, p. 311–318, 2001.

85 MENEZES, P. F. C. et al. Correlation of cytotoxicity and depth of necrosis of the photoproducts of photogem®. **Laser Physics**, v. 17, n. 4, p. 461–467, 2007.