

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RAPHAEL ANTONIO CAFACE

Caracterização da interação e incorporação de fotossensibilizadores em células
de *Candida albicans* para inativação fotodinâmica

São Carlos
2020

RAPHAEL ANTONIO CAFACE

Caracterização da interação e incorporação de fotossensibilizadores em células de *Candida albicans* para inativação fotodinâmica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

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

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)
São Carlos
2020

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.

Caface, Raphael Antonio

Caracterização da interação e incorporação de fotossensibilizadores em células de *Candida albicans* para inativação fotodinâmica / Raphael Antonio Caface; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães - versão corrigida -- São Carlos, 2020.

128 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Iluminação seriada. 2. Microscopia confocal. 3. Photodithazine. 4. Curcumina. I. Guimarães, Francisco Eduardo Gontijo, orient. II. Título.

à minha família.

AGRADECIMENTOS

A meus pais Clovis e Rose, por todos os ensinamentos e todo o apoio que recebi e ainda recebo.

Aos meus irmãos Clovis e Isis, minha avó Maria que me apoiaram durante todos esses anos.

Ao professor Francisco Guimarães, pelos ensinamentos que contribuíram para à minha formação profissional e principalmente amizade que teve comigo durante todo o doutorado.

Ao grupo de CEPOF, pelos suportes técnico e de infraestrutura.

À equipe da Biblioteca, especialmente a bibliotecária Cristina, a Gráfica e todo o suporte do IFSC bem como ao programa de Pós- Graduação em Física Aplicada, principalmente aos secretários Silvio e Ricardo.

Aos amigos de sala, Fábio Junior, Bruno Ono, Iram Awan, Gáston Lozano, Woner Mion, Leandro Zago, Rebeca Vieira, José Huaman.

Aos amigos Simone Reis, Tiago Santiago, Ricardo (Jere) Afonso, Iann, Amanda Zangirolami, Amanda Reginaro, Fabiana Lara, Nayanne, Assis, Vicente Matos, Fernando Mazur.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – brasil (capes) código de financiamento 88882.328717/2019-01.

Meu muito obrigado a todos!

*Nem a mais densa escuridão
Pode resistir a luz de uma vela
(autoria desconhecida).*

RESUMO

CAFACE, R. A. **Caracterização da interação e incorporação de fotossensibilizadores em células de *Candida albicans* para inativação fotodinâmica**. 2020. 128p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020

Métodos para o controle microbiológico vem se tornando um desafio atualmente, pois muitos microrganismos apresentam resistência aos medicamentos convencionais, como é o caso da *Candida albicans*, uma levedura presente no organismo humano que pode ocasionar patologia em mucosas. A inativação fotodinâmica é uma técnica utilizada na descontaminação microbiana e tratamento de infecções. Esta inativação consiste na utilização de um agente fotossensibilizante, luz no comprimento adequado e oxigênio para desencadear a geração de agentes citotóxicos. Neste trabalho foram realizadas análises espectroscópicas, quantificação do crescimento através da absorbância, interação e a ação da molécula *Photodithazine*[®] (PDZ) e quatro formulações de curcuminas para internalizar com células de *C. albicans*. A proposta deste trabalho é caracterizar as células de *C. albicans* por meios espectroscópicos e estudar a interação com fotossensibilizante com baixas doses de luz, até 20 J.cm^{-2} e propor um protocolo de iluminação seriado para que torne mais eficiente a aplicação da inativação fotodinâmica. A interação e a ação dos fotossensibilizadores em *C. albicans* foram estudadas temporalmente através da microscopia de fluorescência confocal com excitação por 1 (1P) e 2 fótons (2P) nos modos canal e espectral e imagens de tempo de vida. Este trabalho demonstra que uma alta internalização pode ser induzida pela luz de excitação para ambos fotossensibilizadores. Esta internalização induzida pode ser realizada em baixas doses de radiação luminosa por 1P e 2P e favorece uma internalização homogênea dos fotossensibilizadores em grandes áreas. Apenas a incorporação induzida com luz intercalada (seriada) levou à morte das células na área iluminada por iluminação 1P e por 2P. Para iluminação em PDZ com laser em 800 nm, a dose de irradiação média necessária para induzir a internalização foi de 8 J.cm^{-2} , enquanto para o laser contínuo de 405 nm, a dose média foi de 9 J.cm^{-2} . Assim, os resultados indicam que realizar uma iluminação seriada com doses baixas (até $1,0 \text{ J.cm}^{-2}$) durante a irradiação de luz induz a internalização acumulativa da concentração do FS através da produção de pequenos danos na parede celular.

Palavras-chaves: Iluminação seriada. Microscopia confocal. *Photodithazine*[®]. Curcumina.

ABSTRACT

CAFACE, R. A. **Characterization of the interaction and incorporation of photosensitizers in *Candida albicans* cells for photodynamic inactivation.** 2020. 128p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Methods for microbiological control are becoming a challenge today, as many microorganisms are resistant to conventional drugs, as is the case of *Candida albicans*, a yeast present in the human body that can cause mucosal pathology. Photodynamic inactivation is a technique used in microbial decontamination and treatment of infections. This inactivation consists of the use of a photosensitizing agent, light of the appropriate length and oxygen to trigger the generation of cytotoxic agents. In this work, spectroscopic analyzes, growth quantification through absorbance, interaction and the action of the Photodithazine® (PDZ) molecule and four curcumin formulations to internalize with *C. albicans* cells were performed. The purpose of this work is to characterize *C. albicans* cells by spectroscopic means and to study the interaction with photosensitizers with low doses of light, up to 20 J.cm⁻² and to propose a serial lighting protocol to make the application of inactivation more efficient. photodynamics. The interaction and action of photosensitizers in *C. albicans* were studied temporally through confocal fluorescence microscopy with excitation by 1 (1P) and 2 photons (2P) in channel and spectral modes and life time images. This work demonstrates that a high internalization can be induced by the excitation light for both photosensitizers. This induced internalization can be performed in low doses of light radiation by 1P and 2P and favors homogeneous internalization of photosensitizers in large areas. Only the incorporation induced with intercalated (serial) light led to the death of the cells in the area illuminated by 1P and 2P illumination. For lighting in PDZ with laser at 800 nm, the average irradiation dose required to induce internalization was 8 J.cm⁻², while for the 405 nm continuous laser, the average dose was 9 J.cm⁻². Thus, the results indicate that performing serial illumination with low doses (1.0 J.cm⁻²) during an irradiation of light induces the cumulative internalization of the FS concentration through the production of small damages in the cell wall.

Keywords: Serial illumination. Confocal microscopy. Photodithazine®. Curcumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema ilustrativo dos principais componentes ópticos da microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser.	52
Figura 2 -	Diagrama de Jablonski. Quando uma molécula absorve um determinado comprimento de onda, representado pela seta amarela, a molécula absorverá esta energia e excitará como representada pela seta vermelha. A seta azul indicando para baixo representa a fluorescência, a seta verde aponta para baixo representa a fosforescência e as linhas pretas mostram os sistemas sendo S_1 , o estado singleto excitado e T_1 , o estado tripleto, e a seta marrom sinaliza o cruzamento inter sistemas, ou relaxamentos, que envolve estados singletos e tripletos.	39
Figura 3 -	Quando um fóton é absorvido pelo fotossensibilizador, o elétron passa de um estado singleto de baixa (S_0) energia para um estado singleto de alta energia (S_1 ou S_2). Este estado excitado pode perder energia emitindo um fóton (fluorescência) ou por conversão interna (decaimento não radiativo). O processo conhecido como cruzamento inter sistemas envolve a inversão do spin de alta energia, permitindo uma excitação prolongada para o estado tripleto (T_1). Na presença do O_2 excitado são formados os mecanismos tipo I e II que danificam biomoléculas.	40
Figura 4 -	Espectro de absorvância do PDZ no intervalo do comprimento de onda no visível, indicando os três principais picos, em 403 nm, 504 nm e 655 nm.	42
Figura 5 -	Estrutura química do PDZ	42
Figura 6 -	Estrutura química dos elementos curcuminóides.....	44
Figura 7 -	As interações proteína-curcumina que são facilitadas pelos oxígenos que aceitam ligações de hidrogênio da curcumina dicetônica (em cima) e curcumina enólica (em baixo).....	45
Figura 8 -	Imagem do equipamento utilizado para emissão de luz em comprimento de onda de interesse. A esquerda, figura A, mostra a Biotable 450 nm (azul) desligada (esquerda em A) e ligado (direita de A) com um anteparo protetor. A direita, figura B, mostra a Biotable 660 nm (vermelho) desligada (esquerda em A) e ligado (direita de A) com um anteparo protetor.	47
Figura 9 -	(A) exemplo de um crescimento a partir da concentração de candida medida em 0,67 de absorvância, e (B) exemplo esquemático do processo de diluição para a contagem de unidades formadores de colônias (plaqueamento).	49
Figura 10 -	Cary UV-Vis 50 – Varian.	54

Figura 11 -	Esquema do preparado da <i>C. albicans</i> para casa experimento, podendo ser medida espectroscopia através da absorvância ou visualizada pela microscopia confocal.....	55
Figura 12 -	Crescimento teórico esperado quando se aplicada toxicidades diferentes ao crescimento microbiológico.	57
Figura 13 -	Exemplo da entrega da dose para a dose continua (identifica como A) e dose seriada (identificada como B). A dose de interesse é entregue continuamente na suspensão de <i>C. albicans</i> , já a dose seriada é apenas entregue 1,0 J.cm ⁻² , intervalado por 2,0 min de escuro e uma nova irradiação com 1 J.cm ⁻² é aplicado, até a soma ser de uma dose de interesse.	58
Figura 14 -	(a) Medidas de absorvância na região UV-Vis e infravermelho próximo de disperções diluídas sucessivas de células de <i>C. albicans</i> em PBS. O gráfico semi-log foi usado para evidenciar valores pequenos de absorvância. (b) Os espectros seguem um comportamento funcional de espalhamento <i>Mie</i> proporcional a $\lambda^{-0,3}$ (curva pontilhada e laranja), típico para partículas com dimensões da ordem de 1-10 μm	60
Figura 15 -	Comparação entre os valores da absorvância para amostras de <i>C. albicans</i> em suspensões de PBS de concentrações numéricas obtidas pelo método de diluições sucessivas (círculos abertos vermelhos) e através do padrão ouro de plaqueamento (quadrados abertos pretos, UFC.mL ⁻¹), considerando que alíquotas de amostras em triplicata com absorções idênticas foram utilizadas em ambos os casos. A linha reta contínua verde descreve a dependência que representa a média entre as retas que descrevem os dados obtidos com os dois métodos.....	62
Figura 16 -	Microscopia confocal por varredura utilizando diferentes modos de imagem: a) imagem de um corte confocal com ampliação de 63x da auto fluorescência de <i>C. albicans</i> produzida com excitação por 2P em 800 nm no modo canal superposto ao modo de transmissão; b) imagem espectral e c) celular por excitação por 2P.	64
Figura 17 -	Imagem de microscopia confocal no modo canal superposta à imagem não confocal por transmissão de células de <i>C. albicans</i> em PBS depositadas sobre a base de vidro em um monopoço circular de área de 1cm ² considerando volume de solução conhecido de 300 μL . O valor da absorvância dessa amostra é de 0,58.	65
Figura 18 -	Curva de crescimento de <i>C. albicans</i> durante um intervalo de tempo de 13 horas cujo foi possível correlacionar a concentração numérica de células contada pelo método de plaqueamento e a absorvância medida a cada hora durante este crescimento.	66

- Figura 19 - a) Seção de choque de absorção ($\sigma_a = \text{Abs}/dN$) obtida das medidas de absorvância para o PDZ em PBS na concentração molar de 10 μM . Nesse gráfico é mostrado a emissão do PDZ para excitação em 405 nm. O espectro de fluorescência do PDZ é mostrado para comparação; b) Dependência da absorvância para a banda de Souret em 405 nm e para a band Q mais intensa em 655 nm para concentrações molares variando de 48 nM a 12,3 μM 69
- Figura 20 - Espectros de absorvância do PDZ após sofrer efeito de diferentes doses de luz de comprimento de onda: a) de 660 nm e b) em 450 nm em uma *biotable*. 71
- Figura 21 - a) Acompanhamento temporal do PDZ no intervalo de zero a 30 minuto seriado em intervalos de 5 min e um tempo extrapolado de 60 min, mostrando que em PBS esta clorina é bastante estável. b) acompanhamento térmico do PDZ, cuja estabilidade é preservada até 50°C, como a intenção é futuramente utiliza-la em teste in vivo esta clorina se mantém constante dentro da temperatura média humana..... 72
- Figura 22 - Monitoramento do pico da intensidade de absorvância para o PDZ no comprimento de onda de 654 nm, para as concentrações, em μM (em PBS), de 49,5; 24,7; 12,4 e 6,2, utilizando fonte de luz difusa de LED (660 nm) nas doses de 1, 5 e 20 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 74
- Figura 23 - a) Microscopia confocal no modo canal de um corte confocal produzida com excitação por 2P em 800 nm e com ampliação de 63x da fluorescência do PDZ interagindo com *C. albicans*. As células na concentração de $\sim 10^7 \text{ cm}^{-3}$ foram incubadas com FS a 10 μM no escuro. A cor falsa em verde (canal 1) representa a autofluorescência provinda do núcleo das células, enquanto a cor avermelhada (canal 2) representa a fluorescência do PDZ. b) Perfil da intensidade da fluorescência ao longo da seta branca passando por uma célula viável da Figura 23a. O perfil da intensidade para o PDZ (canal 2) foi ajustado por duas gaussianas nas paredes (linha contínua vermelha). somado a uma intensidade de fundo constante (linha tracejada cinza). Já a autofluorescência do núcleo foi ajustada com uma única gaussiana (canal 1, linha verde). 76
- Figura 24 - Comparação entre imagens e características espectrais de emissão da *C. albicans* em solução de PDZ para excitação 1P (a, a') e 2P (b, b', c), bem como concentrações molares de 10 μM (b, b') e 25 μM (a, a',c). As regiões de interesse nas imagens que foram utilizadas para a avaliação da emissão foram a solução de PDZ (círculo laranja), o meio intercelular de uma célula viável (círculo rosa), o meio intercelular de uma célula não viável (círculo verde) e a parede celular (círculo em azul). O espectro de emissão do PDZ (linha preta) depositado sobre a lâmina de vidro do poço foi utilizado para comparação. As mesmas condições experimentais da Figura 23 foram utilizadas nesse experimento, em relação a óptica necessária e densidade de células analisadas. 77

- Figura 25 - a) Comparação da absorbância do PDZ em solução aquosa ($\epsilon=1,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em função da concentração molar C_M para duas outras situações não convencionais podem que produzem um comportamento fora daquele linear esperado pela lei Beer-Lambert no gráfico log-log (reta contínua vermelha). A curva contínua preta é a situação em que uma fração das moléculas em solução depositam nas paredes da cubeta formando uma monocamada. A outra é aquela em que uma fração das moléculas é subtraída da solução de PDZ por interação com a parede celular de *C. albicans* ou pela internalização em um número fixo de células adicionada a cada solução de PDZ de concentração nominal C_M 79
- Figura 26 - Acompanhamento da internalização induzida por luz (laser 2P em 800 nm) d PDZ na concentração de 40 μM . As imagens foram feitas depois de aplicações de doses: (a) 0 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$, (b) 4 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$; (c) 7 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$; (d) 12 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ e (e) 20 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$. A imagem expandida (f) mostra a área iluminada comparada à área mantida no escuro após a entrega de dose final de 22 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ na área irradiada. As identificações R1, R2 e R3 são as áreas analisadas na Figura 27. 84
- Figura 27 - Comportamento da fluorescência do PDZ nas regiões destacadas durante o período de iluminação (2P). As marcações “a”, “b”, “c” e “e” representa a região irradiada mostradas na Figura 26, indicando a intensidade referente ao aumento de PDZ nas células. 84
- Figura 28 - Imagem de microscopia confocal associada com a irradiação por laser de 1P. A identificação Área T representa o perímetro da toda a ares da imagem da microscopia, as identificações R1, R2, R3 e R4 são as áreas que foram analisadas na Figura 29. No canto superior esquerdo de cada imagem de microscopia está a identificação da dose de luz irradiada, sendo I, II, III e IV as doses de luz de a) 0 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$, b) 9 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$, c) 21 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$, d) 30 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ e e) 42 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectivamente. A imagem expandida f) mostra a área iluminada comparada à área mantida no escuro após a entrega de dose final de 22 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ na área irradiada. 86
- Figura 29 - Comportamento da fluorescência do PDZ nas regiões destacadas durante o período de iluminação (1P). As marcações “a”, “b”, “c” e “e” representa a região irradiada mostradas na Figura 28, indicando a intensidade referente ao aumento de PDZ nas células. 86
- Figura 30 - a) Comportamento da fluorescência do PDZ da área irradiada durante o período de iluminação para três concentrações diferentes com laser pulsado em 800 nm. b) Comportamento da fluorescência do PDZ da área irradiada durante o período de iluminação para três concentrações diferentes com laser contínuo em 405 nm. 88

- Figura 31 - Acompanhamento sistemático da aplicação de doses sucessivas aplicadas em células de *C. albicans* em solução de PDZ a 40 μM em PBS através de excitação por 1P em 405 nm até atingir um valor $D=13 \text{ J/cm}^2$. Esta dose é pouco acima da dose de 4 J/cm^2 em que a intensidade do PDZ começa a aumentar no interior das células (parte 1). As imagens são da área iluminada para a) doses zero e b) 13 J/cm^2 e da área com campo de visão ampliado feita no final da serie temporal (parte 2) após 20 min mostrando a área irradiada no centro; d) gráfico da evolução da intensidade da emissão do PDZ dentro da área irradiada para a primeira parte (círculos fechados cinzas) e para a segunda parte (círculos abertos) em função do tempo. A linha tracejada foi utilizada para indicar que, no intervalo de tempo entre a primeira e a segunda parte do experimento foi interrompido para se estabelecer as condições de medida necessárias para a parte 2..... 89
- Figura 32 - a) Imagem de microscopia de fluorescência no modo canal, adquiridas de 415 a 620 nm, com marcadores LA e BE. A área destacada em ciano representa a área irradiada, e as áreas destacadas em azul e amarelo representam áreas de interesse em que foi obtido seus espectros; (b) Espectro de emissão referentes as regiões destacadas em azul e amarelo. As células com cor em verde representam as células viáveis, enquanto as avermelhadas representam as células comprometidas..... 91
- Figura 33 - Células de *C. albicans* incubadas com 20 μM de PDZ e pré-iluminações com LED em 450 nm e doses de: (a) 0 J.cm^{-2} ; (b) 1 J.cm^{-2} ; (c) 5 J.cm^{-2} 92
- Figura 34 - Viabilidade celular de *C. albicans* com interação com o PDZ iluminado com LED em comprimento de onda de 660 nm, com dose exposta de forma contínua (barras azuis) e seriada (barras amarelas), as barras verdes são os controles (sem luz e sem FS) e (sem luz e com FS). 93
- Figura 35 - a) Decaimento temporal da emissão do PDZ em escala monolog e b) histograma de tempos de vida obtidos em diferentes ambientes. À direita, imagens de tempo de vida, FLIM, relacionadas aos gráficos à direita, c) a parede celular; as regiões irradiadas interna e não irradiada externa, d) região ampliada para evidenciar que apenas onde a irradiação ocorreu há uma maior presença de PDZ e) superfície do vidro; f) imagem de imagem de microscopia confocal no modo canal para comparação com a imagem d). A concentração nominal utilizada do PDZ foi de 20 μM 96
- Figura 36 - a) Decaimento temporal da emissão do PDZ em escala monolog e b) histograma de tempos de vida obtidos dentro de células presentes na área irradiada por laser 2P após aplicar diferentes doses. Os dois gráficos também mostram decaimento e histograma na mesma área, porém medidos após esperar incorporação por 20 min da aplicação da última dose de 30 J/cm^2 (linha cinza). Para comparação, foi incluído o decaimento e o histograma avaliados na parede da célula de *C. albicans* na área ampliada não irradiada depois do experimento. A concentração nominal utilizada do PDZ foi de 20 μM . As curvas contínuas em vermelho são os decaimentos obtidos pelo ajuste biexponencial. 98

Figura 37 -	Medidas de série temporal de microscopia confocal com exposição seriada utilizando luz laser (a) e b)) e de medidas da recuperação da fluorescência após fotodegradação, FRAP (c) e d)). Os dois experimentos foram realizados utilizando a mesma área da amostra contendo 10^7 células de <i>C. albicans</i> em PBS contendo PDZ a 20 μ M. A mesma configuração experimental foi estabelecida nas duas séries temporais utilizadas no experimento para as quais imagens foram feitas a cada 30 segundos para acompanhar a incorporação do PDZ após entregar 8 doses seriadas (marcadas pelas barras verticais), cada uma de 20 J/cm^2 no primeiro experimento. A dose entregue durante a fotodegradação (marcadas pelas barras verticais) no segundo experimento foram estabelecidas para produzir uma queda de 20% na intensidade de fluorescência do PDZ.	100
Figura 38 -	Acompanhamento da interação e incorporação da PDZ em uma célula de <i>Candida albicans</i> apresentando que a incorporação acontece após toda a parede ser preenchida com o FS.....	102
Figura 39 -	Acompanhamento temporal de uma célula sadia que recebe um substrato de uma outra célula comprometida que induz uma incorporação do PDZ. ...	103
Figura 40 -	Espectro de absorvância para as quatro formulações de curcumina utilizada, curcumina Alfa (preto), Beta (vermelho), Gama (azul) e Sigma (rosa).....	106
Figura 41 -	(a) Acompanhamento temporal da curcumina Gama, indicando a estabilidade térmica em um intervalo de 30 minutos, variando de 5 °C. (b) Acompanhamento térmico da curcumina Gama dentro de um intervalo de temperatura de 25 °C a 70 °C.	107
Figura 42 -	(a) Acompanhamento soluções de pH no tempo de 30 minutos da curcumina Sigma, indicando a estabilidade em relação ao nível de acidez da solução. (b) Coeficiente de decaimento da curva de pH em 5,0; 6,0; 7,4; 8,0 e 9,0.	108
Figura 43 -	Comparação do sobrenadante, analisado em 560 nm, de uma irradiação única (quadrado preto) e seriada (círculo vermelho) para as doses de luz de 0, 5, 20 $J.cm^{-2}$ utilizando luz LED em 450 nm para as formulações de curcumina de a) Alfa, b) Beta, c) Gama e d) Sigma.	111
Figura 44 -	Viabilidade de <i>C. albicans</i> com a aplicação de IFD de forma única e seriada, para as doses de luz de 0, 5, 10 e 20 $J.cm^{-2}$ para as formulações de curcuminas a) Alfa, b) Beta, c) Gama e Sigma.	113
Figura 45 -	Microscopia confocal para as formulações de curcumina a) Alfa, b) Beta, c) Gama e d) Sigma aplicando laser de 2P. A área central é uma região onde é visto a ação da IFD a partir de utilização do marcado vivo/morto.	114

Figura 46 -	Curva de recuperação da curcumina em uma região externa (sem aplicar IFD) e interna (aplicado IFD) em um intervalo de tempo de 30 minutos com medidas a cada um minuto, para as formulações de curcumina a) Alfa, b) beta, c) Gama e d) Sigma.	115
Figura 47 -	Modelo proposto para explicar o carreamento de FS para a célula microbiana a parte de doses seriadas de luz.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

1P	Excitação de 1 fóton
2P	Excitação por 2 fótons
ABS	Absorbância
BE	Brometo de etídio
CEPOF	Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FLIM	Imagem de microscopia de fluorescência por tempo de vida, do inglês - <i>Fluorescence-lifetime imaging microscopy</i>
FRAP	Fluorescência após fotodegradação
FS	Fotossensibilizadores
FWHM	Largura à meia altura, do inglês - <i>Full Width at Half Maximum</i>
HCl	Cloreto de hidrogênio
IFD	Inativação fotodinâmica
ISC	Cruzamento intersistemas
LA	Laranja de acridina
LED	Diodo emissor de luz, do inglês - <i>Light-Emitting Diode</i>
N	Concentração do número de células
NaOH	Hidróxido de sódio
NDD	<i>Non-descanned detector</i>
No	Concentração inicial de células
PDT	Terapia fotodinâmica, do inglês - <i>Photodynamic Therapy</i>
PDZ	<i>Photodithazine</i>
RGB	Padrão de cores vermelho, verde e azul, do inglês - <i>Red, Green e Blue</i>
ROS	Espécie reativa de oxigênio, do inglês - <i>reactive oxygen species</i>
TCSPC	Correlação temporal de fótons único, do inglês - <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	Introdução	25
1.1	Estrutura do trabalho.....	26
2	Objetivos.....	27
2.1	Objetivos Geral	27
2.2	Objetivos específicos -Microorganismo	27
2.3	Objetivos específicos -PDZ	27
2.4	Objetivos específicos – Curcumina	27
3	Referencial bibliográfico	29
3.1	Gênero <i>Candida</i>	29
3.2	Cultivo da cultura microbiológica	30
3.3	Tratamentos convencionais	31
3.4	Espectroscopia	31
3.4.1	Espalhamento <i>Rayleigh</i>	33
3.4.2	Espalhamento <i>Mie</i>	33
3.5	Microscopia Confocal.....	34
3.5.1	Fluorescência por tempo de vida	35
3.6	Fundamentos da inativação fotodinâmicas	36
3.6.1	Absorção óptica e fluorescência	36
3.6.2	Transferência de energia entre estados	38
3.6.3	Reações fotodinâmica.....	40
3.7	Fotossensibilizadores	41
3.8	Fotossensibilizador – PDZ.....	41
3.8.1	Aplicações – PDZ	43
3.9	Curcumina.....	43
3.9.1	Aplicações - Curcumina	44
4	Metodologia.....	47
4.1	Biotable.....	47
4.2	Cultivo das células	48
4.3	Contagem unidades formadoras de colônia	48
4.4	Quantificação óptica e viabilidade <i>Candida albicans</i>	49
4.5	Medidas de interação PDZ – parede celular	51
4.6	Microscopia Confocal.....	51
4.7	Tempo de vida – FLIM.....	53
4.8	Equipamento	54
4.9	Software	54

4.10	<i>Candida Albicans</i>	54
4.10.1	Lavagem da <i>C. albicans</i>	55
4.11	Experimento de interação FS com a cultura microbiológica	56
4.12	Experimento de viabilidade.....	57
4.13	Protocolo de irradiação por Biotable.....	58
5	Resultados - Caracterização Óptica <i>C. albicans</i>	59
5.1	Microrganismo	59
5.2	Quantificação celular através da absorbância	59
5.3	Microscopia confocal	63
5.3.1	Caracterização morfológica das células	63
5.3.2	Contagem células	65
6	Resultado - Interação do PDZ com <i>C. albicans</i>	69
6.1.1	Caracterização óptica do fotossensibilizador PDZ.....	69
6.1.2	Fotodegração PDZ por LED	73
6.1.3	Interação do PDZ com a <i>Candida albicans</i> sem luz	73
6.1.4	Internalização do PDZ induzida por luz em <i>C. albicans</i>	82
6.1.5	Tempo de vida de fluorescência PDZ	94
6.1.6	Recuperação da fluorescência após fotodegradação (FRAP)	99
6.1.7	Propagação ação PDZ	101
7	Resultado - Interação do curcumina com <i>C. albicans</i>	105
7.1	Caracterização espectroscópica da curcumina	105
7.2	Incorporação de curcumina	109
7.3	Microscopia <i>C. albicans</i>	114
7.4	Modelo proposto de internalização	117
8	Conclusão	119
	Referências	121

1 Introdução

As aplicações da luz estão presentes no dia a dia nas mais diversas áreas, de uma simples sinalização de semáforo até a cirurgias corretivas oculares. Uma crescente aplicação para a luz, principalmente no intervalo conhecido como luz visível, 380 nm a 740 nm, é a inativação fotodinâmica mediante a um agente fotossensibilizante.¹⁻³

Um problema que a sociedade vem enfrentando é devido ao aumento da resistência de bactérias⁴⁻⁸ e fungos,⁹⁻¹² decorrentes de usos prolongados de tratamentos convencionais com antibióticos e antifúngicos, respectivamente.

Neste cenário, a inativação fotodinâmica (IFD) apresenta-se como um tratamento alternativo para controle microbiológico, sendo este tratamento de fácil utilização e mostrando ser eficiente no controle microbiológico.¹³⁻¹⁶

Um patógeno que causa infecções em humanos é a *Candida albicans*, sendo esta está espécie mais comum do gênero *Candida*. Devido a crescente grande resistência da levedura aos antifúngicos como fluconazol, anfotericina B e caspofungina,¹⁷⁻²¹ a inativação fotodinâmica mostra-se como uma proeminente e eficaz alternativa para conter esse microrganismo.

A utilização de luz para combater enfermidades já é conhecida há muitos séculos atrás, os gregos e os egípcios já conheciam as propriedades da luz de forma curativa,²² contudo somente no século XX que a ativação com luz voltou a ser usada na pesquisa, tendo como Marco o trabalho de Niels Ryberg Finsen, agraciado com o prêmio Nobel em 1903, pelo trabalho de tratamento da *Lupus vulgaris* ou tuberculose luposa, a forma mais comum de tuberculose cutânea concomitantemente com a sua descoberta da terapia com luz.²²⁻²³

A IFD caracteriza-se por um conjunto de fatores químicos, físicos e biológicos, que ocorrem com a administração de fotossensibilizadores (FS), seguido de radiação de luz em comprimento de onda específico.¹⁻³ O mecanismo de aplicação da técnica é irradiar com doses de luz podendo variar da ordem de 50 a 200 J.cm⁻², dependendo do FS e suas concentrações pode variar da ordem de centenas de microgramas.^{12, 22-24}

A proposta deste trabalho é otimizar a utilização dos FS, clorina e curcumina, e diminuir a exposição da luz necessária para ocorrer uma inativação fotodinâmica mais eficiente, sem a utilização de fatores ou equipamentos diferentes dos já usados na IFD.

1.1 Estrutura do trabalho

Este trabalho foi dividido em 5 seções, sendo a primeira a Introdução que abordou resumidamente os principais tópicos que serão abordados neste trabalho.

A segunda seção será o capítulo “Objetivos” que apresentará as propostas de experimentos e metodologias aplicadas no decorrente trabalho e quais os resultados esperados.

A terceira seção será o capítulo “Referencial Teórico” embasamento teórico sobre os mecanismos, compostos e aplicações publicados em trabalhos acadêmicos. Nesta seção aprofundará os conhecimentos das áreas envolvidas neste trabalho.

A quarta seção, o capítulo “Metodologia”, apresentará os compostos em metodologias aplicadas para a realização desse trabalho, bem como esta descrição os protocolos utilizados.

Quinta seção, capítulo “Resultados e Discussões”, discutirá os resultados e análises das interações os compostos FS com a levedura de *C. albicans*, apresentando as observações a partir das medidas espectroscópicas e microscópicas confocal, das interações dos FS em condições escuras, IFD, viabilidade celular.

Na última seção, capítulo “Conclusão”, concluirá os resultados compilados e analisados neste trabalho indicando os pontos fortes e ações necessárias para realizar maiores investigações.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Geral

Estudar a interação de dois FS sendo um de composto formado por clorina, de nome comercial *Photodithazine*® (PDZ) e um de origem de curcumina, com as células de *C. albicans* (CA) com duas exposições de doses de luz diferentes para melhorar a inativação fotodinâmica.

2.2 Objetivos específicos -Microorganismo

- i. Quantificar através de microscopia confocal as células de *C. albicans*
- ii. Identificar a densidade de células que permita uma análise da interação do FS com as células que estejam próximas de condições metabólicas *in vivo*.

2.3 Objetivos específicos -PDZ

- i. Caracterizar o PDZ.
- ii. Estudar a interação do FS em célula de *C. albicans* por meio das imagens de microscopia confocal de fluorescência e das imagens de tempo de vida de fluorescência.
- iii. Avaliar o efeito da iluminação seriada no aumento da internalização de PDZ em células de *C. albicans*.
- iv. Verificar a morte celular.

2.4 Objetivos específicos – Curcumina

- i. Caracterizar os compostos de curcumina.
- ii. Estudar as interações dos FS nas células de *C. albicans* por meio de imagens de microscopia confocal de fluorescência e de imagens de tempo de vida de fluorescência.

- iii. Avaliar o efeito da pré-iluminação no aumento da internalização de curcuminas em células de *C. albicans*.
- iv. Verificar a morte celular.

3 Referencial bibliográfico

3.1 Gênero *Candida*

Os fungos e leveduras são células eucariontes e apresentam parede celular, em sua maioria. A maquinaria celular é a mesma apresentada em células animais e que correspondem a um problema para aplicação a tratamentos antifúngicos comumente utilizadas, pois afetam as vias correspondentes tanto as células fúngicas como as células animais, desta forma, sendo tóxicos para as células animais.^{19-20, 25}

A candidíase ou candidose é a mais frequente micose oportunista, sendo o agente causador a *Candida sp.*²⁰ Uma levedura capaz de desenvolver doenças em diversos níveis teciduais, como: superficial, cutânea, subcutânea ou sistêmica.²⁰ As condições do hospedeiro são importantes na patologia provocada por estas leveduras, desta forma qualquer órgão pode ser atingido por esta levedura.¹⁹⁻²⁰

A candidíase é uma doença difícil de ser diagnosticada devido ao seu amplo quadro de variações na apresentação clínica e ao grande número de variedade de espécies potencialmente patológicas, entre as espécies conhecidas de *Candida sp* são catalogadas 80 espécies de *Candida* como a: *C. albicans*, *C. guillerrmondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoide*, *C. tropicalis*, *C. keftyr*, *C. lusitaniae*, *C. pseudotropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*.²⁰ Das espécies patogênicas a *C. albicans* é a mais comumente encontrada nas mucosas respiratórias, digestivas e genitais.^{18, 20-21}

A espécie mais prevalente do gênero *Candida* é a *C. albicans*²⁶⁻²⁸. Outras espécies de *Candida* estão se tornando a causa mais comum de infecções mucocutaneas e sistêmica em pacientes, ou modelos, imunocomprometidos.²⁹⁻³²

As leveduras são fungos unicelulares, sendo a maioria classificada como ascomícito. As células das leveduras são geralmente esféricas, ovais ou cilíndricas e a divisão celular geralmente ocorre por brotamento. No processo de brotamento, uma nova célula é formada como uma pequena protuberância na célula antiga, o broto geralmente aumenta de tamanho e então se separa.²⁰

Embora a maioria das leveduras reproduza-se apenas como células individuais, algumas leveduras podem formar filamentos sob certas condições. Por exemplo a fase filamentosa é essencial para a patogenicidade de *C. albicans*, uma levedura capaz de causar

infecções vaginais, orais ou pulmonares, e em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida, *SIDA*, ou do inglês *AIDS – Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*.²⁰

3.2 Cultivo da cultura microbiológica

A *C. albicans* apresenta uma cinética de crescimento que compreende tipicamente cinco fases: fase de latência ou fase de aceleração; fase logarítmica ou fase *log*; fase de desaceleração; fase estacionária e fase de morte.¹⁹ Fase de latência: a primeira parte da curva corresponde a fase de latência, chamada também fase de adaptação ou *lag*, durante a qual o fungo se adapta as novas condições físico-químicas do meio, pH, temperatura, salinidade, presença de inibidores, nutrientes.¹⁹ Neste período, o fungo modifica seu metabolismo para poder crescer no meio fresco. Geralmente, ocorre uma fase *lag* por medida em que as células do inóculo provenham de uma cultura que tenha deixado de crescer, entrando da fase estacionária devido ao esgotamento de substrato ou à acumulação de tóxicos metabólicos. Essas células necessitam de um certo tempo para recompor seu metabolismo e para se adaptar ao novo meio.¹⁹

A duração da fase *lag* se relaciona com o tempo em que as células inoculadas estiverem na fase estacionária ou enquanto o meio novo diferir do anterior. A fase *log* pode ser reduzida se o inóculo vier de uma cultura em fase de crescimento exponencial ou quando existir uma pré-adaptação as novas condições ambientais. Assim, o fungo se encontrará em um período de crescimento ativado ao se pôr em contato com as novas condições.¹⁹

Depois da fase *lag*, o breve período na qual a velocidade de crescimento aumenta até alcançar a fase seguinte, que será a fase exponencial, ou *log* ou fase de aceleração.

A fase exponencial é a fase de crescimento na qual a população celular se duplica de forma exponencial com o tempo. O crescimento é expresso pelo incremento da biomassa, fungos filamentosos e levuriformes, ou pelo número de células, fungos levuriformes, em função do tempo. O crescimento da população é proporcional, pode-se ser expresso matematicamente por

$$\frac{d}{dt}x = \mu x \quad (3.1)$$

Onde: x é a concentração de biomassa, em g.L^{-1} , ou concentração de células do número de células. L^{-1} , t é o período temporal no qual se mede o crescimento, em horas, e μ é a velocidade específica do fungo.

3.3 Tratamentos convencionais

A candidíase no humano ocorre na mucosa do hospedeiro, com isso o diagnóstico de candidíase é essencialmente clínico e baseia-se no reconhecimento da lesão pelo profissional especializado.³³ O tratamento para uma recuperação eficiente é ter um diagnóstico precoce da infecção. Para tal, são aplicados antifúngicos para inibir o crescimento ou a proliferação da levedura. Como ambas as células fúngicas e humana são células eucarióticas, possuem mecanismos metabólicos, síntese proteica parecidos e divisão celular semelhante entre as células, são poucos os alvos que os antifúngicos atuam sem maiores complicações nas células humanas.³³

Portanto, um tratamento conhecido para lesões fúngicas é a quimioterapia antifúngica que se utiliza como alvo principal o ergosterol, um esterol similar ao colesterol em células mamíferas, presente em células fúngicas. Estes tratamentos baseiam-se na utilização de fármacos antifúngicos azóis que bloqueiam a síntese do ergosterol.³³ Destes medicamentos encontra-se o cetoconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol, que já mostram estudos de resistências da *C. albicans* a estes fármacos.³³ Outro alvo deste tratamento é a proteína estrutural glucano, presente na parede fúngica e que é inexistente em células mamíferas. O tratamento utilizado, são fármacos como o equinocandinas que inibem a síntese de β (1,3)-D-glucano e conseqüentemente, inibem a produção da parede celular.³³⁻³⁴

Antifúngicos poliênicos como a nistatina e anfotericina B são frequentemente utilizados no tratamento de candidíase, principalmente a candidíase oral. Para fungos, a resistência a estes fármacos são raras porém existe uma resistência considerável a *C. albicans*.³⁰

A ação deste fármaco acontece ligando-se ao ergosterol da membrana plasmática do fungo ou levedura e, desta forma, aumentando a permeabilidade da membrana através de poros, permitindo o vazamento de componentes celulares essenciais conduzindo a morte celular.³⁵⁻³⁷

3.4 Espectroscopia

A espectroscopia óptica estuda a emissão e a absorção de luz pela matéria.³⁸ Correlacionando a transição entre os estados energéticos da matéria, desta forma quando o sistema se encontra no estado com energia fundamental (estado energético estacionário) e é

exposto a uma radiação eletromagnética por um determinado tempo este estado absorve energia que o permite estar em um estado mais energético (estado excitado).³⁹

Um aspecto fundamental da espectroscopia de fluorescência é a medição da absorção de luz. Vários fatores podem resultar nas medições de absorção de luz. A partir da relação de Beer- Lambert, que permite descrever as razões dos desvios desta lei. Considerando uma placa fina de solução de espessura dx que contém N (moléculas.cm⁻²) que absorvem luz por centímetro cúbico (figura 1). Seja σ a seção de choque transversal efetiva para absorção (em cm²).³⁹ A intensidade da luz (dl) absorvida por espessura dx é proporcional à intensidade da luz incidente I como para σ e N , como dado pela relação abaixo

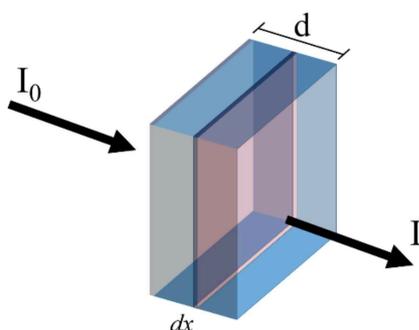


Figura 1 - Esquema do caminho que a luz absorvida quando atravessa uma solução, a luz incidente tem intensidade inicial I_0 e quando atravessa amostra de espessura d a luz transmitida tem intensidade final igual a I .

Fonte: Adaptada de LAKOWICK.⁵⁶

Considerando uma placa fina de solução de espessura dx que contém N (moléculas.cm²) que absorvem luz por centímetro cúbico (figura 1). Seja σ a seção de choque transversal efetiva para absorção (em cm²). A intensidade da luz (dl) absorvida por espessura dx é proporcional à intensidade da luz incidente I como para σ e N , como dado pela relação abaixo

$$\frac{dl}{dx} = -I\sigma N \quad (3.2)$$

Reorganizando a relação e integrando os termos, temos a relacionando a espessura da solução

$$\ln \frac{I_0}{I} = \sigma N d \quad (3.3)$$

Sendo d a espessura da amostra, esta é a equação de Beer-Lambert, que é normalmente utilizado com uma forma alternativa, em função de ϵ e c , que representa o coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) e concentração ($M \cdot L^{-1}$), respectivamente

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon cd = \textit{densidade óptica} \quad (3.4)$$

Combinando as relações (3.3) e (3.4) é possível correlacionar o coeficiente de extinção (ϵ) com a seção de choque transversal para a absorção da luz.³⁹ Desta forma, será possível caracterizar com precisão centros espalhadores, como exemplo, as células de microrganismos por medidas espectroscópicas.

3.4.1 Espalhamento *Rayleigh*

Quando uma onda eletromagnética cai sobre uma partícula isolada, a mesma é absorvida ou espalhada. Se a frequência da onda ω é removida de qualquer frequência ressonante η , a absorção da onda é desprezada, e somente o espalhamento é necessário e pode ser considerado.⁴⁰

O espalhamento *Rayleigh* ocorre quando o tamanho da partícula é muito menor que o comprimento de onda, o campo de onda neste caso é essencialmente uniforme.⁴⁰

3.4.2 Espalhamento *Mie*

O espalhamento causado por uma partícula esférica de tamanho arbitrário foi descrito analiticamente por Mie em 1908,^{13, 41} a partir das equações de Maxwell, deduzindo como ondas eletromagnéticas de comprimento de onda λ são perturbadas ao interagem com esferas homogêneas de raio r .⁴¹⁻⁴² A radiação que atinge e atravessa a partícula gera fenômenos distintos, genericamente denominados espalhamento;

Reflexão e refração as ondas eletromagnéticas que atingem a superfície da partícula podem ser parcialmente refletidas e parcialmente refratadas. A distribuição angular da luz espalhada depende da conformação do objeto. Na reflexão, a onda retorna ao meio com o mesmo ângulo da onda incidente com relação à normal à superfície da partícula. A refração é causada pela diferença entre os índices de refração do ar e da partícula.⁴³⁻⁴⁴

Difração há desvio da direção retilínea da radiação eletromagnética ao interagir com um obstáculo (fenda ou partícula). O obstáculo atua como uma fonte de radiação. A radiação emergente, com o mesmo comprimento de onda da radiação incidente, pode interferir com esta construtivamente ou não, gerando as franjas de difração. A distribuição angular da radiação espalhada depende apenas da forma e tamanho da partícula. Independe de sua composição química ou índice de refração. É responsável pelo espalhamento frontal (ângulos de espalhamento próximos de zero).^{13, 41, 46}

3.5 Microscopia Confocal

A microscopia confocal é uma técnica que aumenta o contraste em uma imagem de microscopia, mesmo para amostras espessas. Reduzindo o volume de observação, a técnica de microscopia confocal impede que sinais dispersos ou sobreposto contribuam para o sinal detectado⁴⁷ como pode ser visto na figura 2.

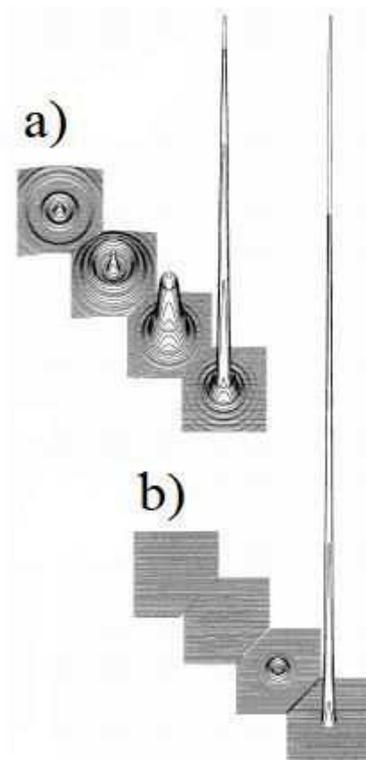


Figura 2 – Função de dispersão de ponto de um plano focal a) para um padrão de difração convencional e b) para o caso do confocal.

Fonte: Adaptada de WEBBER.⁴⁷

A microscopia confocal de varredura utiliza como fonte de luz a proveniente de lasers para excitar as amostras, sendo a objetiva esta posiciona de forma a separa a fonte de luz e dos fotodetectores. Para tal, é acoplado múltiplos emissores de lasers com comprimentos de onda que possam cobrir o intervalo do espectro visível. Outros componentes como sistemas ópticos como divisores de feixes, combinadores de feixe, prismas, filtros e espelhos dicróicos estão combinados com elementos eletrônicos que permitem uma varredura mais precisão com coleta de dados mais pontuais.⁴⁷

Deste os componentes ópticos citados o *pinhole* exerce uma função central dentro esta arquitetura óptica, pois sua função é controlar a abertura e fechamento que afeta diretamente a espessura do plano focal da amostra.⁴⁸

A associação do *pinhole* e a resolução espacial, nos eixos x - y como em z , permite a aquisição de imagens de alta qualidade as amostras observadas, porém tais características depende da região e profundidade e como a amostra está para que se possa observar em uma microscopia confocal.

A aquisição da imagem confocal é dado de forma digital, ou seja, a imagem será formada por informações digitais do espaço observado denominados pixels.⁴⁹ Cada pixel possui informações do espectro independente do pixel próximo, com isso é possível extrair dados como, além do próprio espectro, do tempo de decaimento e evolução temporal quando um FS é inserido na amostra.

3.5.1 Fluorescência por tempo de vida

A fluorescência das moléculas não é diferenciada apenas pelo seu espectro de emissão, mas assim pelo seu tempo de vida. Qualquer transferência de energia entre a molécula excitada e o meio em que está inserida altera o tempo de vida da fluorescência.⁴⁸⁻⁴⁹

O método *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)* é uma técnica de fluorescência, não invasiva, que permite a identificação da fluorescência endógena da molécula, onde o contraste da imagem se baseia com relação ao tempo de vida de fluoróforos individuais⁵⁰⁻⁵¹ e é produzido com base nas diferenças nas taxas de decaimento exponencial da fluorescência a partir de uma amostra fluorescente.⁵⁴

O tempo de vida da fluorescência é o tempo médio em que uma molécula fluorescente permanece no estado excitado antes de emitir um fóton, logo, o tempo de vida da fluorescência é o período de latência entre a excitação e a emissão do fóton.³⁹

O tempo de vida da fluorescência é adquirido pelo equipamento de fluorescência resolvido no tempo, esta técnica de contagem de fóton único correlacionado ao tempo, do inglês *Time-Correlated Single-Photon Counting – TCSPC*, que mede o tempo decorrido entre a excitação da amostra por um laser ou flash de luz e a detecção do primeiro fóton que atinge um detector.⁵⁴⁻⁵⁶

O histograma de tempo de vida da fluorescência registra o número de fótons em relação ao tempo do atraso da emissão do fóton é baseado no registro repetitivo e cronometrado do sinal de fluorescência de fótons individuais obtidos.⁵⁷⁻⁵⁹

As técnicas atuais mais desenvolvidas são multidimensionais. Não medem apenas o tempo decorrido entre excitação e detecção mas também o comprimento de onda e a localização da emissão na amostra.⁴⁹⁻⁵⁰ *FLIM* é uma ferramenta diferenciada por ter uma alta sensibilidade e uma alta resolução utilizada para a aquisição da imagem por tempo de vida da fluorescência.⁶¹

3.6 Fundamentos da inativação fotodinâmicas

O princípio da inativação fotodinâmica (IFD) é utilizar um agente molecular não-tóxico, em condições sem luz, chamado FS, que ao ser irradiado com luz em um determinado comprimento de onda na presença de oxigênio, produz espécies citotóxicas que levam à morte celular.^{15, 62} As vantagens em relação às outras técnicas são, principalmente, a seletividade, pois apenas a região irradiada sofrerá dano, diminuindo efeitos colaterais,^{3, 62} e quando aplicada à inativação microbiana, mostra-se pouco provável levar ao desenvolvimento de microrganismos resistentes, pois a reação de oxigênio com moléculas orgânicas não é específica, o que significa que qualquer macromolécula dentro da célula microbiana pode ser um alvo.⁶³

3.6.1 Absorção óptica e fluorescência

No processo de absorção de radiação por uma molécula,⁶⁴ a energia a ser absorvida deve ser relacionada com a frequência da radiação (ν) incidente:

$$E = h\nu \quad (3.5)$$

Onde h é a constante de Plank ($6,626 \times 10^{-34} \text{ m}^2.\text{Kg}.\text{s}^{-1}$) conferindo o aspecto corpuscular da radiação. Como envolve transferência de energia, nesse sistema é necessário respeitar as exigências na mecânica quântica que diz que os níveis de energia são discretos.⁶⁵ O foco deste trabalho não é deduzir de forma aprofundada.

Desta forma, a luz incidente em uma molécula pode ser absorvida ou espalhada. A radiação espalhada possui um comprimento de onda bastante próximo da radiação incidente enquanto a radiação emitida após o processo de absorção possui um comprimento de onda muito diferente do excitado, conhecidos como espalhamento e luminescência, respectivamente.^{2, 65}

Em condições de laboratório, com temperatura em volta de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a maioria das moléculas encontram-se em seu estado fundamental, ou seja, em um estado energético de menor energia, conhecido como estado fundamental.⁶⁵

Contudo, as estruturas eletrônicas dessas moléculas podem absorver fótons alterando a energia do estado quântico, promovendo a um estado quântico excitado e menos estável. Para estas moléculas voltarem ao seu estado fundamental é necessário que ocorra a dissipação desta energia extra acumulada.⁶⁵

Os meios de dissipação acontecem por dois processos de decaimento, sendo um não-radiativo e outro radiativo, luminescência. Para o processo não-radiativo a energia é liberada através de relaxações vibracionais ou por transferência de energia, enquanto o decaimento radiativo é liberado por meio da emissão de fóton.^{2, 64-65}

Para os processos de decaimento luminescentes há dois tipos: a fluorescência, que ocorre de um estado excitado discreto do tipo singleto, onde os spins dos elétrons encontram-se antiparalelos e a fosforescência, cujo decaimento ocorre de estados excitados discretos do tipo tripleto, onde os spins dos elétrons encontram-se paralelos. Desta forma, existe uma multiplicidade alterada devido ao cruzamento inter sistemas antes da emissão do fóton.^{2, 67}

Para o processo de luminescência deve-se antes fazer uma aproximação, assumindo que os movimentos nucleares e eletrônicos possam ser separados pela aproximação Born-Oppenheimer considerando o hamiltoniano do sistema cujo o núcleo encontra-se mais estático que o elétrons e este apresenta uma massa muito menor e com maior velocidade em relação ao núcleo em uma molécula, desta forma.⁶⁸

Juntamente com a aproximação de Borh-Oppenheimer, o princípio de Franck-Condon que descreve que quando uma molécula sofre uma transição eletrônica, absorção de fóton, a configuração nuclear não tem mudanças significativas. Esta afirmação é devida não apenas ao

fato do núcleo ser muito maior do que o elétron como também a velocidade mais rápida da transição eletrônico para que o núcleo possa interagir.⁶⁹

Este princípio define também que o espectro de absorção é formado por várias linhas energéticas e não apenas por um único nível eletrônico. Esta característica deve-se ao fato que os núcleos sofrem forças de Coulomb de todos os elétrons e núcleos de outros átomos presentes nas moléculas. Quando é aplicado uma força coulombiana novos alinhamentos energéticos são conhecidos como níveis vibracionais.³⁹

3.6.2 Transferência de energia entre estados

Com os processos de decaimentos e as aproximações de Born-Oppenheimer e o princípio de Franck-Condon, o diagrama de Jablonski permite observar os processos de relaxação e decaimento e associar com os processos envolventes da inativação fotodinâmica.^{53,67}

O diagrama de Jablonski representa uma molécula isolada ideal, que permite explicar os processos de luminescências descritos na seção 3.6.1. O estado fundamental singleto (S_0), o primeiro estado excitado singleto (S_1), e o estado tripleto (T_1) estão indicados por linhas pretas horizontais.

Neste estado, os fluoróforos podem existir em diferentes níveis de energia vibracionais, as retas verticais representam as transições entre os estados e o comprimento de onda associado a cada seta estão representados pela mesma cor.^{39,70}

As transições para absorções de energias ocorrem em intervalos de tempo da ordem de 10^{-15} s, princípio de Franck-Condon⁷¹, com o fluoróforo excitado pode estar no nível eletrônico excitado S_n ($n > 1$), com n sendo o níveis de energia, para voltar ao estado fundamental, S_0 , deve perder a energia por processos não-radiativos, de estados maiores que 0. Em outras palavras, a energia absorvida é dissipada por vibrações moleculares, colisões de moléculas e transferência de energia entre moléculas, regra de Kasha.^{39,64,72}

Ainda neste nível eletrônico, ocorre um processo de relaxação interna entre os subníveis vibracionais e rotacionais ao qual se denomina conversão interna, em um tempo da ordem de 10^{-12} s. Desta forma, o elétron ainda tende a permanecer neste estado até retornar ao estado fundamental, S_0 , com a emissão de um fóton, após um tempo da ordem de 10^{-9} s, caracterizando a emissão fluorescente.⁷³

Caso o fluoróforo ainda tenha energia após o processo de relaxação vibracional é possível que esta energia migre para outro estado singlete, como exemplo S_2 para S_1 ambos estados excitados, conhecido como conversão interna.^{39, 64}

Neste processo a molécula passa para outro estado, ainda excitado, mas com energia inferior a inicial e sem alterar a multiplicidade do spin, no caso, singlete-singlete ou tripleto-triplete, esta conversão é eficiente quando os níveis energéticos, S, são próximos de tal modo que os estados vibracionais se sobreponham.^{39, 74}

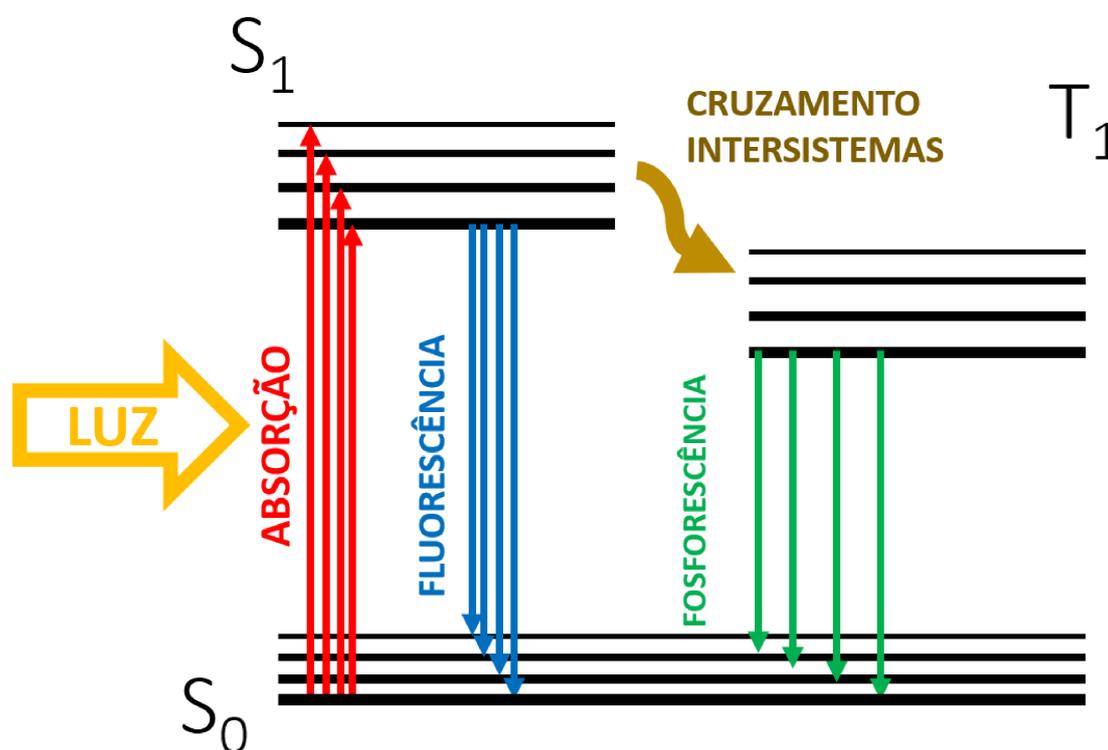


Figura 3 – Diagrama de Jablonski. Quando uma molécula absorve um determinado comprimento de onda, representado pela seta amarela, a molécula absorverá esta energia e excitará como representada pela seta vermelha. A seta azul indicando para baixo representa a fluorescência, a seta verde aponta para baixo representa a fosforescência e as linhas pretas mostram os sistemas sendo S_1 , o estado singlete excitado e T_1 , o estado triplete, e a seta marrom sinaliza o cruzamento inter sistemas, ou relaxamentos, que envolve estados singletos e tripletos.

Fonte: Adaptada de DAI, *et al.*²⁹

A outra via de transferência de energia é a partir do cruzamento inter sistemas (transição singlete S_1 para o triplete T_1). Diferentemente da transição singlete-singlete, dipolo-dipolo $\Delta s = 0$, neste caso ocorre uma variação não nula no valor do spin total do fluoróforo, $\Delta s = 1$. Emissões desta natureza são proibidas pela regra de seleção, sendo possível via interação quadrupolo elétrica, $\Delta s = 0$, este decaimento é denominado fosforescência e possui um tempo de vida na ordem de 10^{-3} s.³⁹

3.6.3 Reações fotodinâmica

As reações fotodinâmicas envolvem a interação de luz com FS na presença do oxigênio no momento, estas reações levam a morte de células por meio de espécies reativas, *EROS* ou do inglês – *reactive oxygen species, ROS*, geradas através do fotossensibilizador. Os principais mecanismos que podem causar a morte celular são conhecidos como mecanismo tipo I e tipo II.⁷⁴⁻⁷⁵

O mecanismo tipo I ocorre através da geração de radicais livres extremamente reativos, sendo que o fotossensibilizador no estado excitado interage diretamente com uma biomolécula ou outra molécula, produzindo radicais livres e transferências de cargas.⁷⁷ A maioria desses radicais reagem instantaneamente com o O_2 , gerando uma mistura complexa de ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais ânion de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila ($HO\bullet$), os quais podem oxidar biomoléculas.⁷⁷⁻⁷⁸

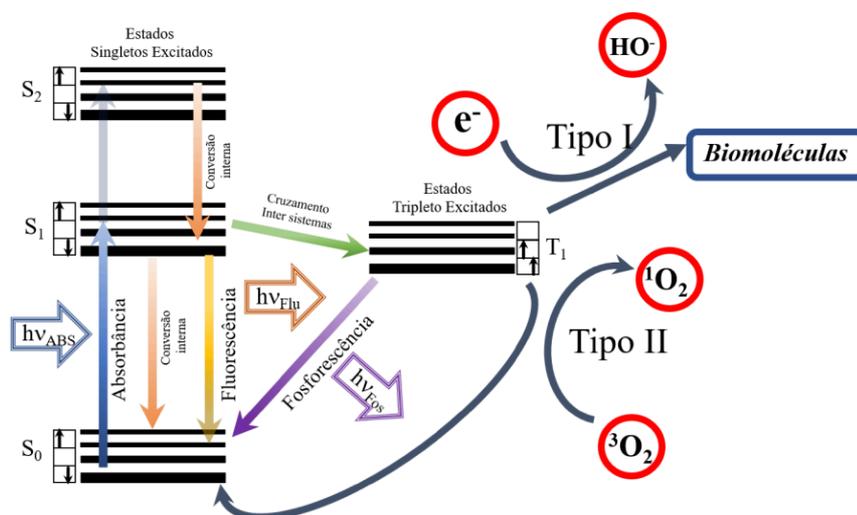


Figura 4 – Quando um fóton é absorvido pelo fotossensibilizador, o elétron passa de um estado singlete de baixa (S_0) energia para um estado singlete de alta energia (S_1 ou S_2). Este estado excitado pode perder energia emitindo um fóton (fluorescência) ou por conversão interna (decaimento não radiativo). O processo conhecido como cruzamento inter sistemas envolve a inversão do spin de alta energia, permitindo uma excitação prolongada para o estado tripleto (T_1). Na presença do O_2 excitado são formados os mecanismos tipo I e II que danificam biomoléculas.

Fonte: Adaptada de ABRAHAMSE.⁷⁰

O mecanismo tipo II é caracterizado pela formação do oxigênio singlete (1O_2), altamente reativo, através da transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o oxigênio presente nas proximidades da molécula.⁷⁹ O 1O_2 pode reagir biomoléculas, principalmente as constituintes das membranas e paredes celulares biológicas. As reações

fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido e levando a célula à morte por apoptose ou necrose.⁷⁷⁻⁷⁸

A Figura 4 apresenta o diagrama de Jablonski com os mecanismos tipo I e II presente da inativação fotodinâmica.

3.7 Fotossensibilizadores

A função destes fotossensibilizadores (FS) é promover a geração de espécies reativas através dos mecanismos I e II com a incidência de luz em comprimento de onda específico. Cada fotossensibilizador apresenta um intervalo na região do espectro visível que aumenta a sua absorção de energia. Para o PDZ o comprimento de onda em 660 nm é melhor absorvido e para as curcuminas o comprimento de onda em 450 nm apresenta uma. A escolha destes comprimentos é devido a banda de absorção de cada composto que interage com mais eficiência com essas fontes de luz e, desta forma, promover a inativação fotodinâmica no controle microbiológico de *C. albicans*.

3.8 Fotossensibilizador – PDZ

O PDZ é o nome comercial da clorinas e₆, produzido na Rússia a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*,⁸⁰ uma classe de FSs pertencentes à segunda geração,³¹ são porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam uma banda de absorção na região do vermelho (entre 640 e 700 nm)⁸⁰ e vários dos FS's mais importantes usados clinicamente fazem parte dessa classe.⁷⁰ Com alta estabilidade do composto em solução aquosa⁸¹ e apresenta vantagens em relação a outra formulação de hematoporfirina, conhecida por Photogem® que já aprovado no Brasil.⁸⁰ A Figura 23 mostra a linha espectral do PDZ no intervalo da luz visível.

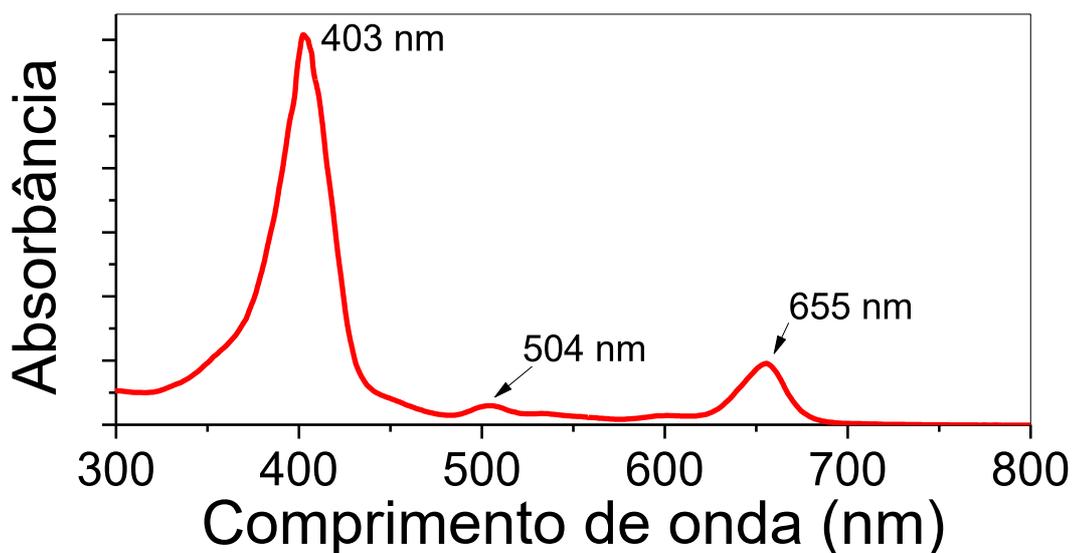


Figura 5 - Espectro de absorvância do PDZ no intervalo do comprimento de onda no visível, indicando os três principais picos, em 403 nm, 504 nm e 655 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Clorinas e_6 são derivadas de clorofila natural⁷⁰ e apresentam características importantes que fazem com que sejam potenciais FSs.⁸⁰ O PDZ tem em sua estrutura química a adição de N-metil-D-glicosamina 0,5%, que a torna mais hidrossolúvel em relação a outras clorinas (Figura 6), apresenta baixa toxicidade no escuro, é estável ao armazenamento e apresenta absorção relativamente alta em aproximadamente 660 nm, o que o torna um FS promissor.⁸⁰ Clorinas são eliminado rapidamente pelo organismo, sendo que 94% da eliminação ocorre em 24 horas e 98% em 48 horas.⁸²

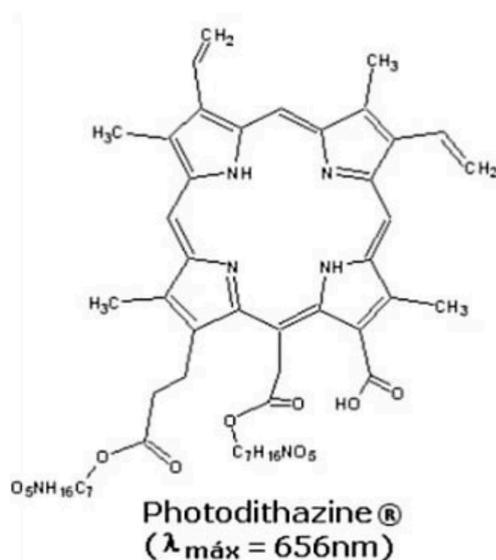


Figura 6 - Estrutura química do PDZ

Fonte: SILVA.⁸³

3.8.1 Aplicações – PDZ

Sua aplicação na IFD se apresenta na fase de testes clínicos na Rússia no tratamento de cânceres,⁸⁴ mas apesar da maioria dos estudos com o PDZ se concentrarem nesse tipo de tratamento, seus efeitos na inativação de microrganismos, como a *C. albicans*, têm sido positivos.³¹

A aplicação do PDZ para a inativação, como a terapia, fotodinâmica é bastante estudada e com resultados promissores no controle microbiológico,⁸⁴⁻⁸⁵ como no tratamento de câncer.⁸⁶⁻⁸⁷

O PDZ apresenta resultados significativos no controle microbiológico para cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol, apresentando inativações parecidas comparadas com cepas não resistentes a este antifúngico.⁸⁸⁻⁸⁹

3.9 Curcumina

A utilização de alimentos na prevenção de doenças ou até mesmo seu tratamento é considerado há milhares de anos. Entretanto, apenas no final do século passado ocorreu renovação acentuada no interesse por esse assunto, e o termo “alimentos funcionais” tornou-se amplamente utilizado.^{22, 90-92}

Sendo considerado um alimento funcional, atualmente, a *Curcuma Longa L.*, também conhecida como curcumina, gengibre dourado ou açafrão da Índia, é uma espécie originária do sudeste asiático, pertencente à família das Zangiberaceas, é uma planta de pequeno porte que mede aproximadamente 1 metro e amplamente cultivada nos países asiáticos.⁹³⁻⁹⁴

Tem sido utilizada há tempo como alimento na forma de especiaria, devido ao seu forte sabor e a sua coloração amarelada marcante com propriedades terapêuticas.⁹⁵⁻⁹⁸ Os componentes químicos da *curcuma Longa L.* possuem atividades antimicrobiana e antioxidante significativas.⁹⁹⁻¹⁰¹ Sua alta atividade antioxidante está relacionada ao número de grupos hidroxilas na estrutura do seu anel aromático.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Em relação aos pigmentos curcuminóides a planta é considerada mistura de curcumina, outros curcuminóides, como a desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, estes compostos são responsáveis pela coloração do rizoma do açafrão, o composto majoritário, no entanto, é a curcumina.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

3.9.1 Aplicações - Curcumina

Pertence-se a classe dos polifenóis que são substâncias que possuem hidroxilas ligadas a anéis aromáticos. São extraídos dos curcuminóides da planta: a curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹

Isolado pela primeira vez em 1842, por Vogel, a curcumina foi descrita como um pó cristalino e amarelo. A estrutura química aceita desde 1910, proposta por Lampe e Milobedeska, é de um diferoilmetano com a fórmula $C_{21}H_{20}O_6$, com peso molecular de 368,4 gramas, sendo que o composto comercial tem por padrão 77 % de curcumina, 17 % de demetoxicurcumina e 3 % de bisdemetoxicurcumina, e o restante de curcuminóides conforme a Figura 7. Juntos, estes curcuminóides tem por padrão uma cor alaranjada por absorver num comprimento de onda entre 420 a 430 nm.^{83, 111}

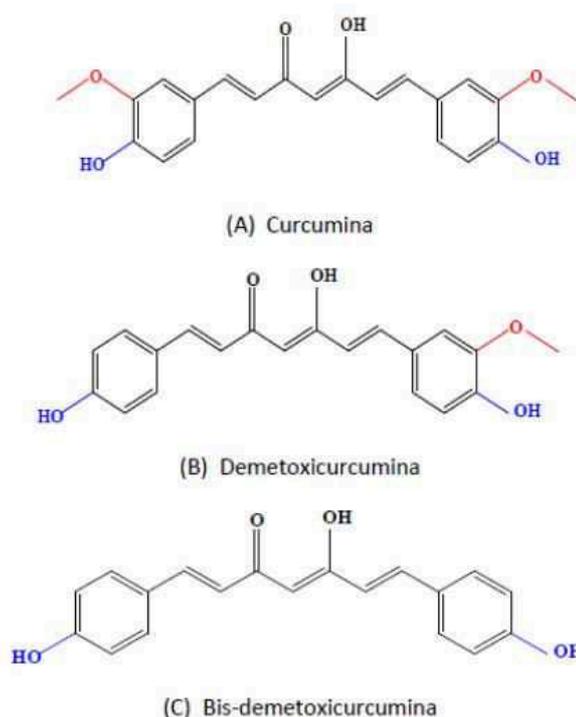


Figura 7 - Estrutura química dos elementos curcuminóides.
Fonte: SILVA⁸³

Estudos comprovam que a curcumina possui várias propriedades biológicas, como: imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, antibacteriana e antifúngicas. A curcumina pode ser utilizada como fotossensibilizador na inativação fotodinâmica. Como um tratamento bactericida e antifúngica alternativo, atuando em infecções superficiais localizadas.^{85, 117-118}

Existem relatos de seu uso como fotossensibilizador como fotossensibilizador na inativação de cepas meticelina- resistentes de *Staphylococcus aureus*,¹¹⁴ na inativação de fungos da onicomicose,^{3, 83} no estudo de incorporações em bactérias gram-positivas e gram-negativas,¹¹⁵ controle do vetor *Aedes* transmissor da dengue e Zika.¹²⁰⁻¹²¹

A curcumina tem seu pico de absorção máxima no comprimento de onda 430 nm e espectro de fluorescência de excitação em 434 nm e de emissão em 520 nm. Sabe-se que por ser um composto fenólico ela é insolúvel em água e éter, mas solúvel em etanol e em dimetilsulfóxido.³

Do ponto de vista químico, é uma dicetona α , β -insaturada exibindo tautomerismo de ceto-enol (Figura 8).

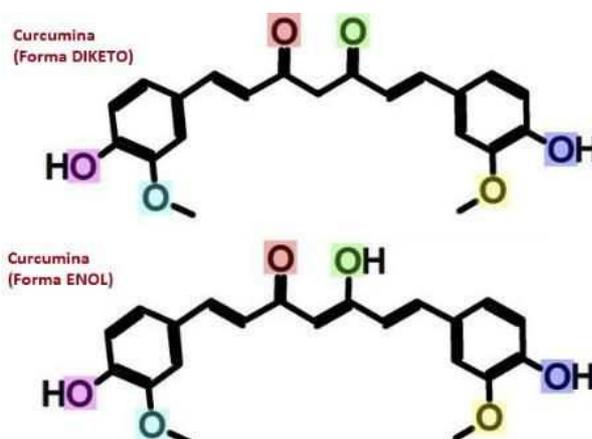


Figura 8 - As interações proteína-curcumina que são facilitadas pelos oxígenos que aceitam ligações de hidrogênio da curcumina dicetônica (em cima) e curcumina enólica (em baixo).

Fonte: HEGER, *et al.*¹¹⁸

Devido a esses fatores altamente benéficos da curcumina, ela vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa aqui no Brasil como uma forte candidata de agente FS, e, com isso, ser aplicada nos tratamentos de pele, desinfecção bucal, eliminação dos mosquitos causadores da dengue e no tratamento de onicomicose. Sendo todos estes citados e trabalhados ao longo dos últimos anos pelo Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos.

4 Metodologia

4.1 Biotable

Como fonte de luz de excitação foi empregado o uso de *Biotable*, um equipamento composto por 24 fontes de diodos emissores de luz, conhecido comumente como LED's, do inglês – *light emitting diodes*.

Este equipamento foi desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – LAT/USP, no Instituto de Física de São Carlos, atualmente há várias *Biotables* desenvolvidas para determinados comprimentos de onda, porém neste trabalho foram utilizadas as *Biotables* 450 nm e 660 nm, para excitação dos FS curcumina e clorina, respectivamente.

A Figura 9 mostra as duas *Biotables* utilizadas, a *Biotable* 450 nm emite uma radiação centrado no comprimento de onda de 450 nm (azul), com irradiância média de cada LED de 40 mW.cm^{-2} na base do semicírculo superior, já a *Biotable* 660 nm apresenta uma irradiação centrada no comprimento de onda de 660 nm, vermelho, com irradiância média de cada LED de 30 mW.cm^{-2} .



Figura 9 - Imagem do equipamento utilizado para emissão de luz em comprimento de onda de interesse. A esquerda, figura A, mostra a *Biotable* 450 nm (azul) desligada (esquerda em A) e ligada (direita de A) com um anteparo protetor. A direita, figura B, mostra a *Biotable* 660 nm (vermelho) desligada (esquerda em A) e ligada (direita de A) com um anteparo protetor.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os experimentos é utilizado para unidade de dose de luz o Joules. cm^{-2} para, desta forma é preciso transformar a irradiância irradiada da *Biotable*, de mW.cm^{-2} , para J.cm^{-2} através do controle temporal da irradiação.

$$\text{Potência (W)} = \frac{\text{Energia (J)}}{\text{tempo (s)}} \quad (4.1)$$

Portanto,

$$\frac{\text{Potência (W)}}{\text{área (cm}^2\text{)}} = \frac{\text{Energia (J)}}{\text{área (cm}^2\text{)} \cdot \text{tempo (s)}} \quad (4.2)$$

$$\frac{\text{Energia (J)}}{\text{área (cm}^2\text{)}} = \text{PotBiotable} \cdot \text{tempo (s)} \quad (4.3)$$

Onde o *PotBiotable* é a potência medida através do potenciômetro Fieldmaster™ (Coherent, USA), com área de coleta de 2,5 cm² posicionado a uma altura sobre o spot de cada LED, similar a altura do poço contendo a solução experimental.

4.2 Cultivo das células

Os fungos podem crescer uma cultura em três padrões básicos: em forma de batelada (batch), que corresponde a um sistema fechado ou descontínuo; em um sistema aberto ou contínuo ou na forma de batelada alimentada (feed batch).¹⁹

No primeiro caso, o fungo cresce na presença da totalizada do meio constituindo um meio fechado no qual não há suprimento de meio fresco. No cultivo se acrescenta meio fresco continuamente durante o crescimento, mas também há uma remoção concomitante do meio usado contendo as células em suspensão e finalmente. No cultivo em batelada alimentada, determinados nutrientes são adicionados as cultuas com a finalidade de incrementá-la em distintos momentos durante o crescimento. Neste caso, não há remoção do meio usado.

4.3 Contagem unidades formadoras de colônia

Para a realização dos experimentos, a concentração celular inicial foi de 10⁶ células/mL para a cultura de *C. albicans* foi utilizado o protocolo de contagem em placa de meio de cultura conhecido como plaqueamento.

O procedimento utilizado para correlacionar a quantidade de UFC foi diluir a solução de candida em PBS em diversas absorbâncias mensuráveis que foram de, inicialmente, 2,46; até 0,02 e cada solução passou pelo processo de diluições seriadas de 10⁻¹ até 10⁻⁷ que se sucedia de uma solução de 900 µL de PBS com 100 µL de suspensão do microrganismo, dessa solução de 1000 µL, 25 µL era pipetado na placa de petri com meio de cultura ágar

Sabouraud e espalhada em um quadrante da placa, e 100 μL era adicionada no próximo microtubo para obter as diluições da ordem de 10^{-1} até 10^{-7} todas as soluções eram agitadas para homogeneizar a solução, a Figura 10 apresenta um exemplo da placa com as diluições -0, vinda diretamente da concentração com absorvância conhecida, e as posteriores diluições de -1, -2 e -3 (imagem A) e a imagem B exemplifica o processo de diluição para a contagem das unidades formadora de colônia.

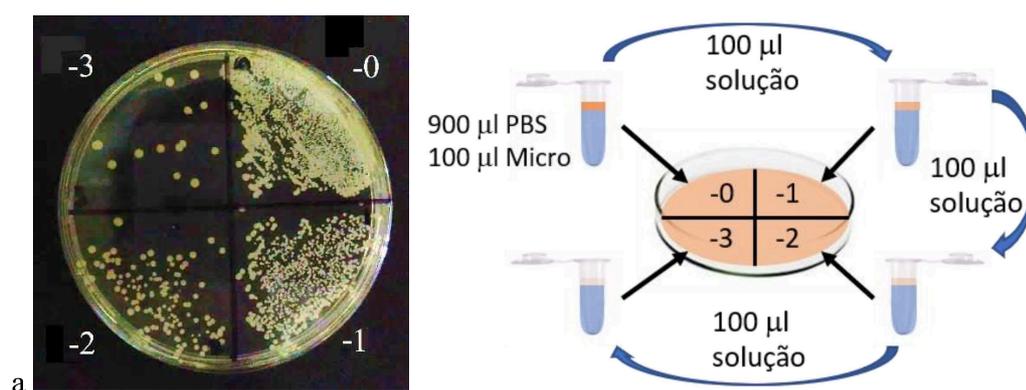


Figura 10 - (A) exemplo de um crescimento a partir da concentração de candida medida em 0,67 de absorvância, e (B) exemplo esquemático do processo de diluição para a contagem de unidades formadores de colônias (plaqueamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Cada crescimento foi realizado em triplicata e a contagem foi realizada após 48h, a partir da contagem das colônias formadas foi calculado a média e o desvio padrão de cada placa correlata e o número de colônias foi por mL foi dado através da relação abaixo:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de colonias} \times \text{número de diluições}}{\text{volume utilizado (mL)}} \quad (4.4)$$

Desta forma, a quantidade de unidades formadoras de colônia contada em uma determinada diluição multiplicada pela ordem desta diluição dividido pelo volume utilizado no plaqueamento infere a quantidade de células por mL presente na suspensão.

4.4 Quantificação óptica e viabilidade *Candida albicans*

Para uma medida mais rápida da quantidade de células existentes dentro do volume contendo células microbiológicas com PBS foi desenvolvido uma relação entre a absorvância da solução de interesse com a concentração de células contidas na solução.⁴⁸ Esta correlação

se baseia na lei de Lambert-Beer que a absorvância depende da concentração da solução e do caminho óptico que é percorrido, esta lei é definida como:

$$A = \epsilon dC \quad (4.5)$$

Onde A é a absorvância da solução, ϵ é a absorvividade molar ou coeficiente de extinção molar e d é o caminho óptica percorrido pela luz através da solução.

Essa medida é utilizada as características de espalhamento de luz do que a *C. albicans* em relação à luz, ou seja, a luz será desviada do caminho óptico inicial. Para obter essa dispersão de células. Inicialmente, as células foram crescidas 24 horas antes meio de cultura específico, tipo ágar *Sabouraud*, foi feita a coleta dessas células e transportadas para uma solução meio líquido realizado uma centrifugação em 3000 rpm (1409 x g), durante 10 minutos, repetir esse processo, mais 3 vezes em solução PBS.

A primeira dispersão de células é coletada por um volume de 2,0 mL, em cubeta de plástico, é analisado tem espectrofotômetro, que pode ser visto Figura 16. Após a primeira análise que foi identificada por N_0 , a próxima medida foi realizada com 1,0 mL essa dispersão inicial i adicionado 1,0 mL solução PBS, outro 1,0 mL será utilizado para realizar o plaqueamento celular.

Portanto, as sucessivas diluições da suspensão inicial foram classificadas pela razão a diluição em relação à inicial ($N_0 \cdot 2^n$), cujo parâmetro N_0 é a concentração da suspensão inicial de células e o parâmetro n é a quantidade diluições realizadas, para esse experimento foram realizadas 8 diluições sequenciais.

O espectrofotômetro disponível no grupo de Óptica (CEPOF) é um espectrofotômetro de Uv-Vis da marca Varian, Cary 50, e este foi utilizado para as leituras de absorvância das soluções de candida. A Figura 16 é visto vários espectro do espalhamento da candida para diferentes diluições que foi feito no modo *fast* (80 nm por segundo) no Cary 50, para concentrações que estão abaixo da absorvância 1,0 a leitura não apresenta ruídos na medida pois para estas concentrações a consistência da lei de *Lambert- Beer* é válida para, pois para esta condição é encontrado apenas uma célula dentro do caminho óptico.

4.5 Medidas de interação PDZ – parede celular

Este experimento consiste em identificar a quantidade de PDZ é assimilado pela célula do microrganismo. Para tal é realizado uma diluição sequencial de PDZ de 50 até 0,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em uma alíquota de 500 μL e que foram em 1500 μL de suspensão de *C. albicans* com uma quantidade de células na ordem de 10^6 células por mL.

Esta solução PDZ com células foi reservado por 10 minutos em escuro e, cada microtubo com soluções com concentração de PDZ distinta foram centrifugadas com uma rotação de 3000 rpm durante 10 min. Após este tempo é coletado o sobrenadante e medido em espectrofotômetro para analisar o PDZ residual.

4.6 Microscopia Confocal

O microscópio de fluorescência confocal de varredura a laser invertido (Zeiss – LSM780) utilizado e presente no Instituto de Física de São Carlos possui 2 lasers para imagens de 1 fóton, sendo um laser de diodo que emite no comprimento de onda de 405 nm e outro laser de argônio (Ar^+) que emite nas linhas 488, 514, 528 nm e para emissões de 2 fótons o microscópio conta com um laser pulsado em femtossegundos de titânio safira (Ti:Sa) (Chameleon Vision II) podendo sintonizar os comprimento de onda contidos entre 690 a 1080 nm.

A principal característica da microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser (*laser scanning confocal microscope, LSCM*) é que somente os feixes de fotoluminescência da amostra que estão em foco são detectados. Para isso utiliza-se um anteparo com um pequeno orifício, denominado *pinhole*. Com isso, é possível, não só obter imagens de alta resolução como obter imagens em diferentes planos focais da amostra.^{120, 121}

A Figura 11 mostra o diagrama esquemático dos principais componentes da microscopia confocal de fotoluminescência de varredura a laser. A partir da figura é visto que radiação proveniente de um laser é utilizada para excitar a amostra. O feixe de laser passa inicialmente pela abertura de um *pinhole* e é direcionado para a amostra por um espelho dicromático que também possui a função de direcionar a radiação da fotoluminescência da amostra.

A varredura do feixe de laser na amostra é feita por dois espelhos de varredura que podem rotacionar em torno de um eixo fixo. Estes espelhos são localizados entre a amostra e

a objetiva. Um dos espelhos percorre em alta velocidade o eixo x e outro um pouco mais lento ao longo do eixo y, varrendo assim toda a área xy.

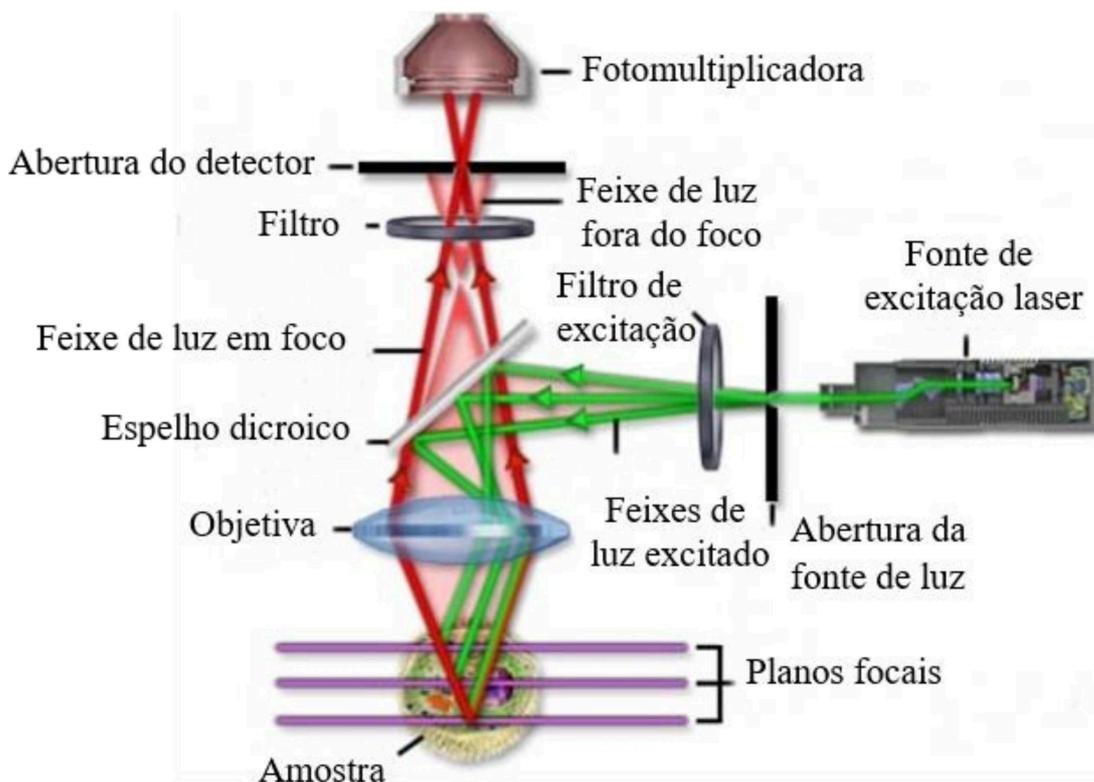


Figura 11 - Esquema ilustrativo dos principais componentes ópticos da microscopia confocal de fluorescência de varredura a laser.

Fonte: Adaptada de ZEISS.¹²¹

A radiação de excitação é focada na amostra por uma lente objetiva localizada na próxima a amostra. A fotoluminescência da amostra retorna passando pela objetiva e é direcionada para o detector. O *pinhole* localizado próximo do detector seleciona somente os feixes de fotoluminescência em foco para serem detectados. Controlando a distância da amostra em relação à objetiva é possível obter planos focais na amostra, tendo desta forma estrutura 3D.

Para este trabalho, o microscópio confocal de fluorescência de varredura a laser utilizado foi o *LSM 780* da marca *Zeiss* para obter imagens das células de *C. albicans*, bem como a interação do FS com a parede microbiana. O *software* para aquisição e tratamento das imagens foi o *Zen 2.3 SP1 versão Black e Blue (64 bits)*.

Este microscópio também contém um sistema de redes de difração acoplado próximo de um arranjo de 34 fotomultiplicadores que permitem a obtenção de imagens nas quais cada ponto, ou *pixel*, da imagem corresponde a um espectro dentro da região de 400 a 750 nm.

Esses espectros podem ser superpostos formando uma única imagem com a qual é possível medir a fotoluminescência ao longo da área da amostra. Este procedimento é conhecido como modo espectral e as imagens são denominadas de imagens espectrais.

4.7 Tempo de vida – FLIM

O microscópio é equipado com detectores GaAsP de alta sensibilidade para imagem espectral (400-700 nm), detectores NDD - *Non-Descanned Detector* operando nos modos de reflexão e transmissão apropriados para imagens por excitação de dois fótons e de emissão de segundo e terceiro harmônicos e dois detectores de avalanche para espectroscopia e imagem de tempo de vida da fluorescência (*Fluorescence-lifetime imaging microscopy* - FLIM) com resolução temporal de 75 ps.

O tempo de vida de fluorescência é um indicador direto da taxa de transferência de energia de moléculas excitadas para o meio ou para outros fluoróforos. Um mesmo fluoróforo pode ter diferentes tempos dependendo das condições de interações com o meio ou com outras moléculas. Por isso, o decaimento pode ser escrito como a soma de um número N de decaimentos exponenciais (Equação 4.6), 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 da exponencial.¹²²

$$f(t) = \sum_{i=1}^N a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (4.6)$$

Para fazer as imagens de FLIM foi utilizado o método conhecido como contagem de fótons únicos correlacionados no tempo, TCSPC – do inglês *Time-Correlated Single Photon Counting*, em que é utilizado um laser de pulsos curtos para excitar a amostra, e desta forma a fluorescência detectada é enviada para detectores rápidos, de forma que somente um fóton seja detectado por pulso. O sinal de fluorescência foi analisado baseando na função resposta do sistema (IRF – do inglês *Instrument Response Function*) para deconvoluir o sinal associado à subida da excitação com o laser da curva de decaimento e, com isso, é possível calcular os tempos de vida de fluorescência.¹²²

4.8 Equipamento

O equipamento utilizado para as medidas de absorbância foi o espectrofotômetro Cary UV-Vis 50, Varian (Figura 12), com sensibilidade no intervalo do espectro visível de 200 a 1000 nm, com uma taxa de leitura de 4800 nm por minuto, utilizando cubetas de poliestireno transparente para a análises das amostras.



Figura 12 - Cary UV-Vis 50 – Varian.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.9 Software

Para a análise de todos os dados provenientes do espectrofotômetro assim como a produção de todos os gráficos foi utilizado o software *Origin®* da *Origin Lab Corporation* licenciado pela Universidade de São Paulo.¹¹⁹⁻¹²⁰

4.10 *Candida Albicans*

O microrganismo estudado foi a levedura *C. albicans*, ATCC 90028 (Rockille, MD USA) cedidas pela fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A cultura *C. albicans* era mantida em cultivo batelada em meio nutritivo *Sabouraud* ágar em estufa incubadora a 37 °C +/- 2 °C para preservar a linhagem.

O protocolo experimental utilizando a *C. albicans* segue o fluxograma abaixo, para determinar qual experimento foi realizado.

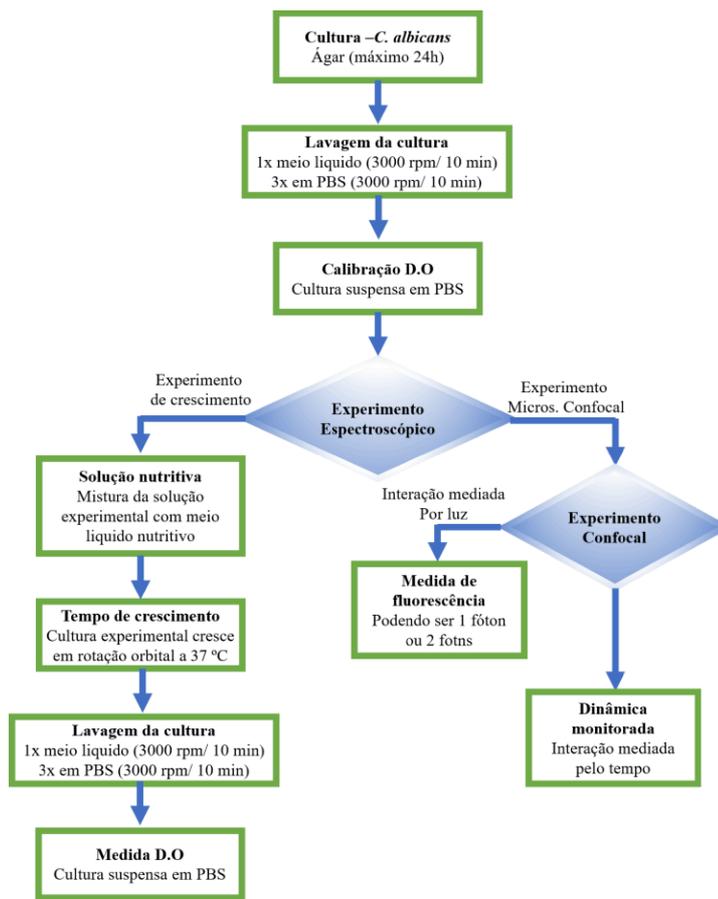


Figura 13 - Esquema do preparado da *C. albicans* para casa experimento, podendo ser medida espectroscopia através da absorbância ou visualizada pela microscopia confocal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para qualquer experimento utilizando a *C. albicans*, inicialmente é preparado uma placa de ágar com meio nutritivo Sabouraud com no mínimo 24 horas antes dos experimentos, esta etapa é para garantir que as células estejam em um estado metabólico estável, ou seja, já adaptado ao novo ambiente.

4.10.1 Lavagem da *C. albicans*

Esta placa recém cultivada será utilizada para os ensaios experimentais, mas antes de utilizadas, todo o conteúdo da placa de cultura é transferida do meio ágar para um meio líquido Sabouraud e esta solução, padronizada em um volume de 10 mL é centrifugada durante 10 minutos a uma rotação de 3000 rpm, etapa realizada um primeiro arraste de subprodutos metabólicos, o solvente é descartado e ressuspendidos em uma nova solução tampão salina, PBS do inglês *Phosphate Buffered Saline*.

Após esta primeira centrifugação, um ciclo de três novas centrifugações a, novamente, 3000 rpm durante 10 minutos, porém a solução utilizada é o PBS de volume total 10 mL, a cada troca de solvente é descartado o sobrenadante e uma nova solução de PBS é recolocada e ressuspendidos a cultura microbiológica.

Ao final destes 4 ciclos de lavagem a solução contendo a cultura microbiológica está pronta a ser utilizada. O comprimento de onda utilizado para análise da suspensão do microrganismo será 560 nm oriundo do espalhamento da levedura quando analisada pelo espectrofotômetro. O motivo da escolha deste comprimento de onda é que dentro da janela de 500 a 600 nm, é devido a este comprimento em 560 nm não ser um comprimento de onda de absorção para os fotossensibilizadores utilizados neste trabalho, clorina e curcumina.

Foi necessário realizar uma curva de calibração da suspensão do microrganismo que consiste na etapa de lavagem da suspensão com densidade óptica superior a absorção em 2,0 no comprimento de onda de 560 nm, neste caso é adicionado PBS para diminuir a densidade de células por volume para uma densidade óptica em 0,6. A escolha de um padrão de densidade óptica (D.O) em 560 nm foi de 0,6 (que é na ordem de 10^6 células. mL⁻¹) é devido a uma observação empírica que ao utilizar o monopoço confocal de 1 cm² a densidade celular quando decantada para a área, gera uma monocamada de células, facilitando os ensaios para a microscopia confocal.

Até este ponto o protocolo é o mesmo independentemente qual experimento será realizado que utilize o microrganismo de interesse. Abaixo segue o protocolo de cada experimento realizado:

4.11 Experimento de interação FS com a cultura microbiológica

O protocolo utilizado para este experimento consistiu em utilizar uma suspensão microbiológica, com uma absorbância 0,6, com volume igual a 1,5 mL distribuídos nos poços de uma placa de 24 poços, e adicionada uma solução com uma concentração do FS de interesse em uma solução de 0,5 mL, totalizando uma solução de 2,0 mL.

Para deixar a solução com uma fase apenas foi necessário aplicar uma homogeneização que consistiu em 10 ciclos de sucções com uma micropipeta de 1,0 mL para obter tal sistema, esta solução é mantida no escuro por durante 10 min.

Neste ponto pode-se dividir o experimento, sendo um destinado a interação no escuro e toxicidade do FS com a cultura microbiana e verificação da quantidade assimilada de FS e um outro experimento que utiliza a Biotable como agente catalisador de inativação.

O estudo da interação no escuro é finalizado medindo a solução sobrenadante contendo FS e inferindo uma relação de composto assimilado pela *C.albicans*. Para o estudo da interação mediada por luz segue um protocolo que será explicado em detalhes no próximo item, 4.13, e finaliza-se medindo a absorbância.

4.12 Experimento de viabilidade

Este experimento consiste em verificar a toxidade ou dano ocasiona na interação do FS com a cultura microbiológica. Esta etapa do experimento sempre ocorreu após o experimento de interação FS com a cultura microbiológica (item 4.11 desta secção).

O crescimento foi realizado através de um tubo falcon de 15,0 mL contendo 9,0 mL de meio nutritivo Sabouraud dextrose Broth (Kasvi®) e 1,0 mL da solução experimento (FS + *C.albicans*), totalizando um solução final de 10,0 mL, esta etapa é realizado em triplicata e repetidas em dias diferentes, juntamente com soluções controles.

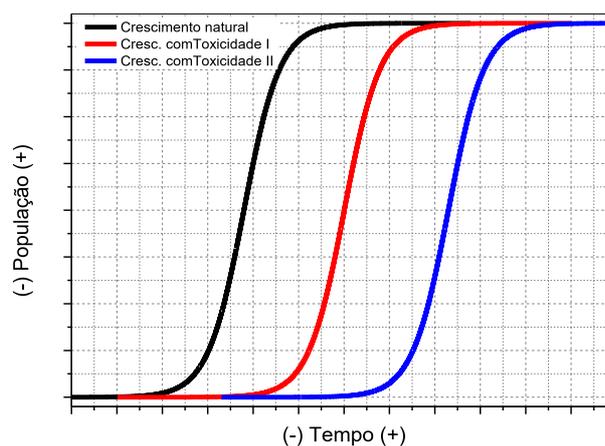


Figura 14 - Crescimento teórico esperado quando se aplicada toxicidades diferentes ao crescimento microbiológico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes tubos eram deixados em incubadoras orbitais com rotação de 150 rpm a uma temperatura de 37 °C +/- 2 °C, durante um período de 24 horas. Após este tempo, solução é centrifuga para realização da lavagem da cultura microbiológica, como descrito na página 55

(4.10.1. Lavagem da *C. albicans*), após lavado a suspensão é analisada por espectrofotômetro para identificar a D.O em 560 nm e inferir qual letal foi a interação do FS (com e sem luz).

Espera-se que com a ação da inativação fotodinâmica (IFD) aplicando luz no comprimento de onda específico para a clorina e/ou curcumina contribua para a demora do crescimento, ou permanência na fase lag do crescimento, como teórico na Figura 14 e por fim, erradicar a cultura microbiológica.

4.13 Protocolo de irradiação por Biotable

A inativação fotodinâmica consiste na presença do oxigênio, FS e luz específica. Para este trabalho foi utilizado Biotable com emissões nos comprimentos de ondas de 450 nm e 660 nm, e uma forma de entregar uma dose de luz por área é administrar a forma que a dose de luz é disponibilizada.

Neste trabalho a administração da dose de luz foi dividida em duas: dose contínua, que consiste na entrega total da mesma e dose seriada que é entregue de intervalos alternados de exposição e ausência de luz. A Figura 15 exemplifica como é entregue cada dose administrada neste trabalho.

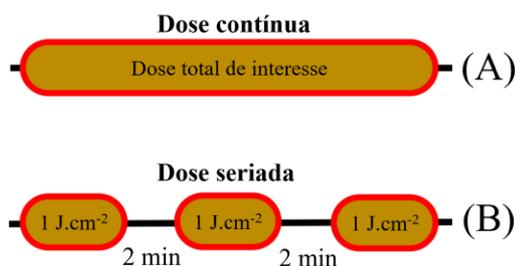


Figura 15 - Exemplo da entrega da dose para a dose contínua (identificada como A) e dose seriada (identificada como B). A dose de interesse é entregue continuamente na suspensão de *C. albicans*, já a dose seriada é apenas entregue 1,0 J.cm⁻², intervalado por 2,0 min de escuro e uma nova irradiação com 1 J.cm⁻² é aplicado, até a soma ser de uma dose de interesse.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A finalidade de utilizar uma dose de luz de 1,0 J.cm⁻¹ é para minimizar a fotodegradação do FS utilizado, e a espera de um intervalo de 2,0 min, para que um FS nativo (ou não excitado) se aproxime de uma biomolécula para aumentar a efetividade da IFD.

5 Resultados - Caracterização Óptica *C. albicans*

5.1 Microrganismo

Nessa seção serão apresentados os resultados obtidos da caracterização da levedura *C. albicans*, através de técnicas espectroscópicas como a análise da absorvância resultante do espalhamento de luz pela levedura na região espectral no UV, no visível e no infravermelho próximo, 300 a 800 nm, e a viabilidade celular através do acompanhamento temporal do seu crescimento. Também serão correlacionados o valor da absorvância em 560 nm como a quantidade de células presentes em dispersões celulares.

A caracterização óptica e estabilidade temporal e térmica do fotossensibilizador PDZ serão apresentadas a seguir, bem como a caracterização da interação do PDZ com a parede celular de *C. albicans* e da internalização desse fotossensibilizador no meio intracelular pela técnica de arraste molecular por absorvância, por microscopia confocal e FLIM.

Finalmente, as mesmas análises para o fotossensibilizador curcumina serão apresentadas. Diferentes formulações de curcumina serão estudadas, sendo uma formulação de curcumina como curcuminóides, outras duas formulações como extrações químicas distintas e por último uma formulação comercial, para utilização de padrão de experimentos.

5.2 Quantificação celular através da absorvância

Inicialmente, a primeira análise realizada foi através da quantificação do número de células considerando o espalhamento de luz a partir da técnica de absorvância. *C. albicans* é uma célula, em sua maioria, ovas de dimensões médias de 5 μm que apresenta parede celular densa, formada por oligossacarídeos e glucanos, bem como por proteínas e quitina, que interagem de forma efetiva a luz através do espalhamento *Mie*. A perda de fótons por espalhamento é proporcional ao número de células suspensas em solução e que pode ser avaliado indiretamente por medidas de absorvância.

A Figura 16a mostra espectros de absorvância na região UV-Vis e infravermelho próximo de suspensões de *C. albicans* obtidas de diluições sucessivas de uma solução original de concentração numérica de células $N_0 = 2 \times 10^8$ células/mL (UFC). O gráfico semi-log foi usado para evidenciar valores pequenos de absorvância. Os espectros seguem um comportamento funcional de espalhamento *Mie* proporcional a $\lambda^{-0,3}$ (curva pontilhada e

laranja) entre 400-800 nm, típico para partículas com dimensões da ordem de 1-10 μm . Pode-se ver que as intensidades espectrais diminuem com o decréscimo da concentração de células na suspensão em PBS, já que o espalhamento depende linearmente do número de células na solução.

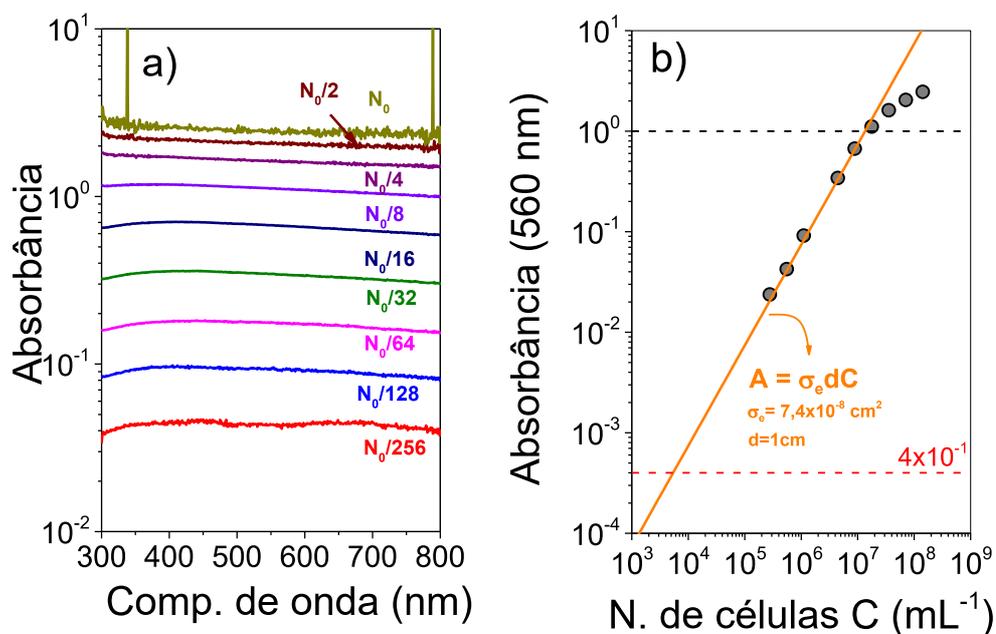


Figura 16 - (a) Medidas de absorvância na região UV-Vis e infravermelho próximo de dispersões diluídas sucessivas de células de *C. albicans* em PBS. O gráfico semi-log foi usado para evidenciar valores pequenos de absorvância. (b) Os espectros seguem um comportamento funcional de espalhamento *Mie* proporcional a $\lambda^{-0,3}$ (curva pontilhada e laranja), típico para partículas com dimensões da ordem de 1-10 μm .

Fonte: Elaborada pelo autor.

O valor da absorvância avaliado na Figura 16a em 560 nm é mostrado em escala log-log na Figura 16b em função da concentração numérica de células nominal C obtidas a partir 8 diluições sucessivas $N_0/2^n$ ($1 \leq n \leq 8$). Os pontos nesse gráfico representam a variação espectral de duas ordens de grandeza da Figura 16a com as diluições sequenciais das células. O comportamento linear para valores de absorvância menores que 1 (linha pontilhada horizontal preta da Figura 16) é descrito pelas perdas de fótons por espalhamento dado pela expressão $\sigma_e d C$ para uma seção de choque de espalhamento $\sigma_e = 7,4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$ e um comprimento do caminho óptico $d = 1 \text{ cm}$.

O gráfico log-log desse comportamento é descrito por uma reta (linha contínua laranja da Figura 16) de coeficientes angular igual a 1 e linear igual a volume $\sigma_e d$. Nesse caso, um aumento da seção de choque σ_s é representado por um deslocamento do comportamento linear

esperado para menores concentrações. A concentração $N=1/\sigma_e d= 1,4 \times 10^7 \text{ cm}^{-3}$ para $A=1$ (linha contínua vertical preta) corresponde ao número de células máximo para o qual existe, em média, apenas uma célula dentro do volume $\sigma_e d$, probabilidade de espalhamento 100%, do cilindro com área da base σ e caminho óptico $d=1 \text{ cm}$ da cubeta, ou seja, cada célula não faz sombra à outra abaixo dessa concentração $1/\sigma_e d$. Pode-se observar que os valores medidos da absorvância se desviam da reta $\sigma_e d C$ para concentrações maiores que $1/\sigma_e d$, uma vez que mais que uma célula passa a ocupar o volume $\sigma_e d$, na sombra de outra célula no mesmo caminho óptico, e que não serão contabilizadas pela medida de absorvância.

Do resultado acima, é interessante comparar o quanto a seção de choque σ_e difere da seção geométrica $\sigma_g = \pi(D/2)^2$, considerando aqui, por simplicidade, a célula *C. albicans* como sendo uma partícula esférica de diâmetro D . Assumindo $D \cong 5 \text{ }\mu\text{m}$ pode-se estimar $\sigma_g = 2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$. Assim, $\sigma_e/\sigma_g \cong 0,4$ dá a probabilidade de espalhamento; ou seja, 60% dos fótons que passam pela seção geométrica σ_g da célula são espalhados. Os outros 40% dos fótons que não são espalhados poderiam ser subtraídos por absorção óptica por moléculas que formam o meio intercelular. Porém, a seção de choque de absorção molecular, σ_a , é muito pequena, da ordem de 10^{-16} cm^2 . Para produzirmos contribuição de absorção nos espectros da Figura 16a, precisamos ter concentrações numéricas de metabólitos moleculares de, no mínimo, 10^8 moléculas por célula. No entanto, as concentrações típicas de metabólitos são da ordem de 10^6 - 10^7 moléculas por célula de *C. albicans* (~mMolar). Por isso não observamos contribuição de absorção superposta à contribuição do espalhamento na Figura 16a. As perdas de fótons por espalhamento são muito mais expressivas do que aquela produzida pela absorção molecular nas células de *C. albicans*. Outro aspecto importante pode ser visto na Figura 16b. Esse gráfico demonstra que concentrações numéricas de células de *C. albicans* maiores que 3 ordens de magnitude de células de *C. albicans* podem ser determinadas de forma precisa e menos dispendiosa através de uma medida de absorvância (sensibilidade de 4×10^{-4} , linha pontilhada horizontal da Figura 17) se o valor de σ_e para essa célula é conhecido.

Para melhor demonstrar a importância desse método, a Figura 17 faz uma comparação entre os valores da absorvância para amostras de *C. albicans* em suspensões de PBS de concentrações numéricas obtidas pelo método de diluições sucessivas (círculos abertos vermelhos) e através do padrão ouro de plaqueamento (quadrados abertos pretos, UFC.mL^{-1}), considerando que alíquotas de amostras em triplicata com absorções idênticas foram utilizadas em ambos os casos. Pode-se ver que os dados obtidos pelo padrão ouro também apresentam dependência $\sigma_e d C$ para valores de absorção menores que 1. Os dois resultados

estão deslocados um do outro pelo fato do padrão ouro considerar apenas células viáveis e, portanto, obter valores menores de concentração numérica. Já a diluição sequencial realizada no presente trabalho contém também a contribuição de células não viáveis, que são contabilizadas no espalhamento óptico medido pela técnica de absorvância.

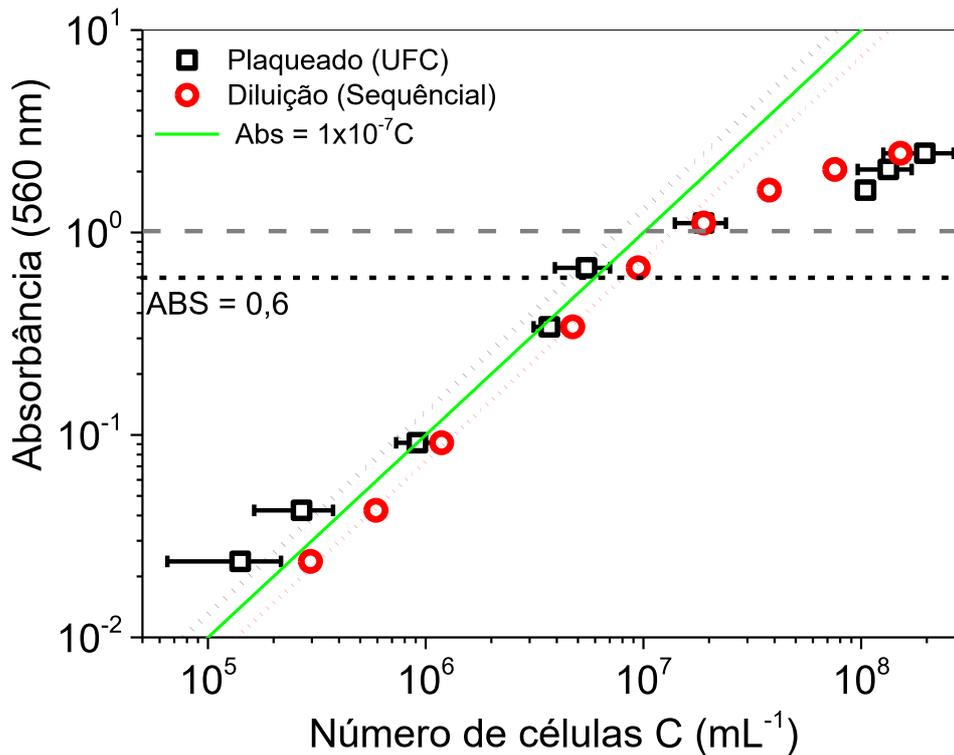


Figura 17 - Comparação entre os valores da absorvância para amostras de *C. albicans* em suspensões de PBS de concentrações numéricas obtidas pelo método de diluições sucessivas (círculos abertos vermelhos) e através do padrão ouro de plaqueamento (quadrados abertos pretos, UFC.mL⁻¹), considerando que alíquotas de amostras em triplicata com absorções idênticas foram utilizadas em ambos os casos. A linha reta contínua verde descreve a dependência que representa a média entre as retas que descrevem os dados obtidos com os dois métodos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A relação que melhor descreve a dependência foi escolhida como aquela que representa a média (linha reta contínua verde) entre as retas que descrevem os dados obtidos através do padrão ouro (linha pontilhada preta) e através do método de diluição sequencial (linha pontilhada vermelha) na Figura 17, que é dada por:

$$ABS = (1 \times 10^{-7} \text{ cm}^3) C \quad (5.1)$$

Em que ABS representa a absorvância e C o número de células por cm^3 com uma precisão avaliada no gráfico de aproximadamente 20%. Desta forma é possível caracterizar de maneira rápida e com uma precisão aceitável o número de células de uma suspensão através da absorvância relacionada ao espalhamento de luz.

A absorvância com valor 0,6 (40% da absorvância $A=1$) é destacado pela linha pontilhada preta horizontal na Figura 17. Esse valor corresponde à concentração de células de *C. albicans* de seção geométrica σ_s ($\sigma_s/\sigma_g \cong 0,4$) obtida diretamente da relação 5.1 acima e que produz o preenchimento completo de uma superfície de uma lâmina de microscopia de área de 1 cm^2 em que as células estão posicionadas lado a lado uma das outras. Esta condição restringe em muito a mobilidade das células, o que favorece a obtenção de imagens estáticas das células por microscopia confocal de varredura para estudos os estudos *in-vitro* realizados neste trabalho. Maiores detalhes desse procedimento serão mostrados na seção que se segue.

5.3 Microscopia confocal

Nesta seção será apresentado os resultados de microscopia confocal de células de *C. albicans* para caracterização morfológica das células quanto para quantificar o número de células por área analisada.

5.3.1 Caracterização morfológica das células

O presente trabalho trata de aspectos quantitativos envolvendo as propriedades morfológicas da *C. albicans*. Nessa seção, será considerado a caracterização desta célula por microscopia confocal por varredura utilizando diferentes modos de imagem (Figura 18). A Figura 18a dá exemplo de uma imagem de um corte confocal com ampliação de 63x da auto fluorescência de *C. albicans* produzida com excitação por 2P em 800 nm no modo canal superposto ao modo de transmissão. A cor falsa em verde evidencia a autofluorescência intensa do núcleo. A imagem por transmissão não confocal evidencia os limites da célula que possui baixa emissão no citoplasma. Essa condição de alto contraste é propícia para estudos da interação de fotossensibilizadores com a parede celular. As células foram depositadas sobre uma lâmina de vidro de um poço de área de 1 cm^2 com concentração numérica de células $C = 7 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ ($Abs=0,6$). Como foi explicado acima, as células suspensas em solução de PBS depositam sobre a lâmina em poucos minutos formando uma monocamada

densa de células que restringem a mobilidade das mesmas, condição propícia para se fazer estudos *in vitro* com dependência temporal. Pode-se ver nessa imagem que as células possuem formato ovalado com dimensões em torno de 5 μm .

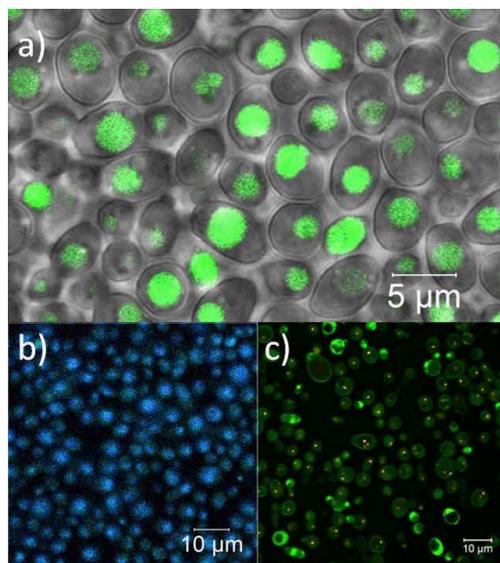


Figura 18 - Microscopia confocal por varredura utilizando diferentes modos de imagem: a) imagem de um corte confocal com ampliação de 63x da auto fluorescência de *C. albicans* produzida com excitação por 2P em 800 nm no modo canal superposto ao modo de transmissão; b) imagem espectral e c) celular por excitação por 2P.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma imagem de *C. albicans* no modo espectral pode ser visto na Figura 18b. Essa imagem de autofluorescência foi produzida com uma objetiva de 20 x com excitação por 1P em 405 nm mostra emissão do núcleo intensa na faixa do azul e outra menos intensa esverdeada provinda do citoplasma. Este contraste de cor se deve ao fato de que cada pixel de imagem conter informação espectral na faixa de 400-700 nm que sofre processamento através de decomposição RGB para se formar a imagem.

A viabilidade das células pode ser avaliada por microscopia confocal através de marcadores celulares de processos envolvendo a morte celular. A Figura 18c mostra imagem no modo canal de *C. albicans* marcadas com o LIFE/DEADTM obtida com excitação por 2P em 800 nm com ampliação por uma objetiva de 63x. A cor verde foi associada ao brometo de etídio que marca parede e citoplasma e a cor vermelha ao laranja de acridina marca núcleo em células viáveis. Já células não viáveis são marcadas preferencialmente o citoplasma de vermelho pela laranja de acridina. Portanto, a cor verde predominante na parede mostra que as células são viáveis, que é a condição necessária para os estudos quantitativos de interação,

internalização do fotossensibilizador e de morte celular por fotoinativação com *C. albicans* no presente trabalho.

5.3.2 Contagem células

Como foi visto na seção 5.2, o espalhamento de luz foi utilizado de forma rápida e precisa para se determinar várias ordens de grandeza da concentração numérica C de *C. albicans* em suspensão aquosa pelo método espectroscópico de absorvância. Esta metodologia realizada para imagem de microscopia confocal foi confrontada com o padrão ouro de contagem por UFC e se provou eficaz para a contagem de *C. albicans* para valores de absorvância menores que 1 ou para concentrações numéricas menores que 10^7 cm^{-3} , considerando seções de choque de espalhamento $\sigma_e = 7,4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$ para essa célula.

A presente seção descreve um terceiro método para contagem de células por microscopia confocal. Nessa técnica, a área de varredura é estabelecida de forma precisa ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$) na produção da imagem em acordo com o aumento dado pela objetiva escolhida. Como muito dos experimentos neste trabalho foram realizados por microscopia confocal, foi feito concomitantemente a contagem de células a partir das imagens obtidas pelo microscópio a partir de rotinas do programa IMAGE J.

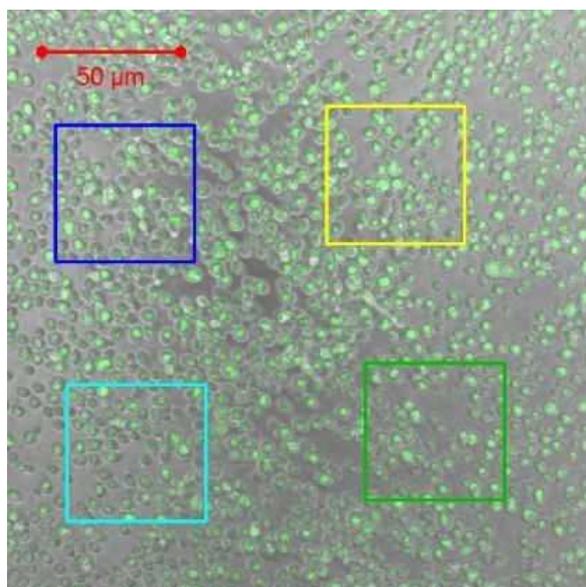


Figura 19 - Imagem de microscopia confocal no modo canal superposta à imagem não confocal por transmissão de células de *C. albicans* em PBS depositadas sobre a base de vidro em um monopoço circular de área de 1cm^2 considerando volume de solução conhecido de $300 \mu\text{L}$. O valor da absorvância dessa amostra é de 0,58.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um exemplo de uma dessas imagens no modo canal e superposto ao modo de transmissão pode ser visto na Figura 19. A contagem de células foi realizada através da análise estatística da intensidade da fluorescência natural das células na imagem analisada. Nessa imagem foram selecionadas 4 regiões de interesse (quadrados coloridos de área $2500 \mu\text{m}^2$) que serviram de espaço amostral de células. Após realizado a média do número de células por área de imagem analisada, tal contagem foi calculada para a área de 1cm^2 do monopoço circular utilizado para imagem de amostras em solução de volume conhecido de $300 \mu\text{L}$ utilizado para preencher o mesmo. Este volume foi utilizado para se determinar a densidade de células através do valor estabelecido na contagem de células e pelo fato de todas as células estarem decantadas sobre a lâmina de vidro na base do monopoço, condição necessária para se fazer a microscopia confocal por varredura das amostras de *C. albicans*.

Uma comparação entre os três métodos de contagem de células utilizados no presente trabalho podem ser vistos na Figura 20 para alíquotas de amostras obtidas durante o crescimento de 13 h da levedura de *C. albicans* após lavagem da solução do meio de cultura utilizando centrifugação. A concentração numérica inicial utilizada foi aquela dada para o valor de absorbância igual a 0,1, ou de 10^6 células/ cm^3 dada pela relação 5.1.

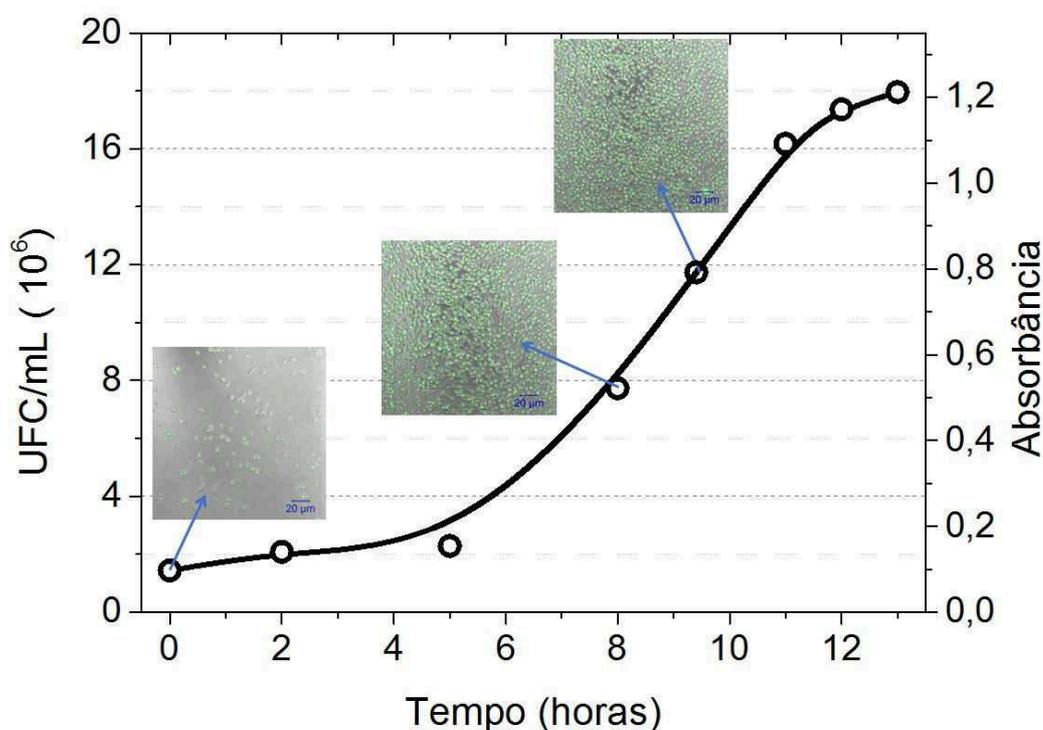


Figura 20 - Curva de crescimento de *C. albicans* durante um intervalo de tempo de 13 horas cujo foi possível correlacionar a concentração numérica de células contada pelo método de plaqueamento e a absorbância medida a cada hora durante este crescimento.

Fonte: Elaborada pelo autor

Com esta correlação será possível acompanhar uma aplicação de IFD e verificar quão eficiente foi a combinação fotossensibilizador com dose de luz. Desta forma, se tal aplicação foi significativa para a morte celular a levedura precisará de um tempo maior para alcançar a mesma quantidade de células em relação ao crescimento descrito na Figura 20.

Para este estudo foi considerado que a aplicação da IFD no microrganismo é irreversível, como poderá ser constatado mais a frente neste trabalho por imagens de microscopia confocal acompanhando a aplicação da IFD, neste caso é esperado que a curva de crescimento seja mais lenta em relação a uma curva sem IFD, pois apenas as células não internalizadas pelo FS terá atividade metabólica ativa.

A vantagem de se utilizar a imagem da microscopia confocal para contagem de células de *C.albicans* foi a praticidade de se obter uma estimativa rápida, visual, da quantidade de células. Porém, para validar este procedimento é necessário que as células estejam depositadas na concentração menor aquela para se formar uma única monocamada microbiana fechada sobre a lâmina do poço, ou seja, não pode haver sobreposição de células, algo que acontece para absorvâncias maiores que 0,6 para a *C. albicans*. Como já estabelecemos, a concentração máxima limite nesse valor de absorvância é de $C = 7 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$.

A Tabela 1 mostra alguns valores comparativos entre as formas de contagem através do método de plaqueamento e através do método de contagem estatística pela imagem de microscopia confocal. Contagens por microscopia confocal se encontram subestimadas para valores de absorvância maiores que 0,6. Como a contagem estimada por microscopia confocal pode ser utilizada para se ter uma avaliação mais visual da ordem de grandeza da concentração das células, os valores obtidos para absorvância menores que 0,6 pode se inferir uma relação entre a contagem via microscopia confocal com resultados do padrão ouro de plaqueamento.

Tabela 1 - Comparativa da quantidade de células contadas pelo método do plaqueamento (unidade formadora de colônia) método de contagem estatística por imagem obtida pela microscopia confocal.

Absorvância de referência	Plaqueamento (células/ml)	Imagem confocal (cel/ml)
0,38	$(3,7 \pm 0,3) \times 10^6$	$(1,6 \pm 0,8) \times 10^6$
0,58	$(5,5 \pm 0,1) \times 10^6$	$(9,4 \pm 0,7) \times 10^6$
1,25	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^7$	$(1,23 \pm 0,7) \times 10^7$

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 Resultado - Interação do PDZ com *C. albicans*

6.1.1 Caracterização óptica do fotossensibilizador PDZ

Nessa seção será apresentada a caracterização do fotossensibilizador PDZ em termos de suas propriedades ópticas. A importância de se caracterizar essa molécula é devido à necessidade de se ter uma determinação prévia do seu estado molecular, agregado ou livre, em solução aquosa, de sua estabilidade térmica nessa solução e da capacidade de excitação óptica e de emissão dessa molécula para depois escolher os melhores parâmetros para a realização da inativação microbiana e também para analisar com mais clareza os dados de microscopia confocal por fluorescência.

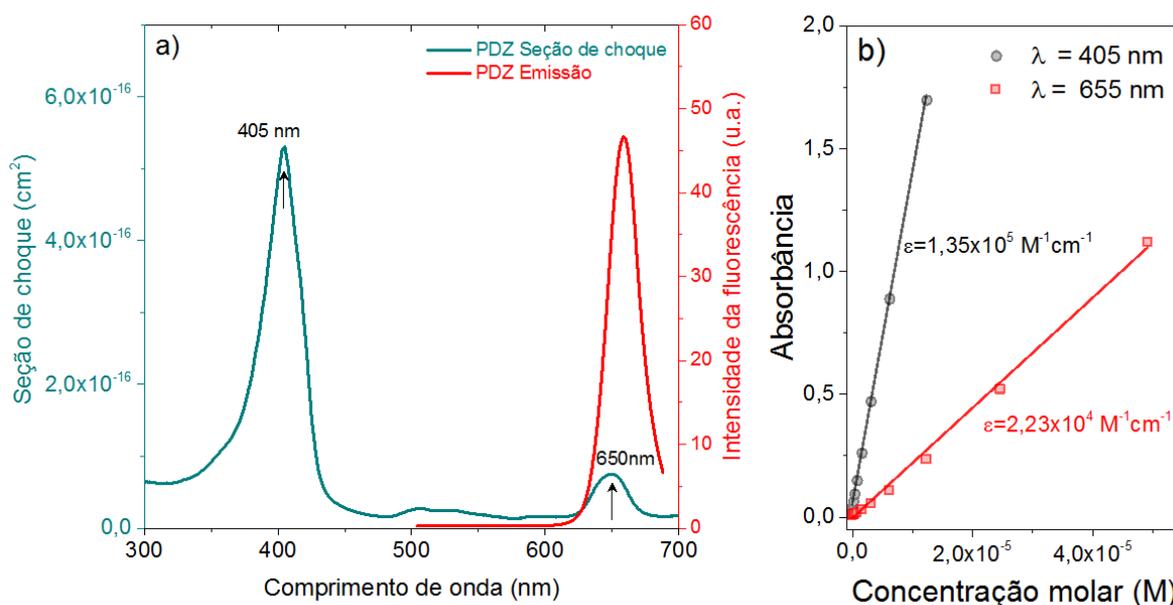


Figura 21 - a) Seção de choque de absorção ($\sigma_a = \text{Abs}/dN$) obtida das medidas de absorvância para o PDZ em PBS na concentração molar de 10 μM . Nesse gráfico é mostrado a emissão do PDZ para excitação em 405 nm. O espectro de fluorescência do PDZ é mostrado para comparação; b) Dependência da absorvância para a banda de Soret em 405 nm e para a band Q mais intensa em 655 nm para concentrações molares variando de 48 nM a 12,3 μM .

Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectro de absorção do PDZ apresenta uma banda muito intensa em 403 nm, chamada banda de Soret, e outras bandas de absorção de menor intensidade em 504 nm, 600 nm e 655 nm, chamadas bandas Q. Em especial, a banda em 655 nm é bastante importante por estar dentro do intervalo da janela terapêutica (600-1000 nm),⁶² ideal para a realização de

IFD, já que nesse intervalo a luz penetra mais profundamente na pele,⁸⁰ e para alguns tumores.

A caracterização da absorção óptica do PDZ foram feitas através do espectrofotômetro de UV-visível (Varian, Cary 50). As medidas dos espectros do PDZ foram feitas em diferentes concentrações diluídas em PBS, conforme mostra a Figura 21. A capacidade de absorção de luz do PDZ na região espectral entre 300 e 700 nm pode ser vista na Figura 19a através da seção de choque de absorção ($\sigma_a = \text{Abs}/dN$). Esta propriedade independe da concentração dessa molécula em PBS conforme mostra a Figura 19b, que mostra a variação da absorbância segue a lei de Beer-Lambert para a banda de Soret em 405 nm e para a banda Q mais intensa em 655 nm para concentrações molares variando de 48 nM a 12,3 μM . Pode-se ver que a banda de *Soret* possui um grande coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), o que se reflete na alta capacidade de absorver fótons medida através do alto valor da seção de choque $\sigma_a = 5,3 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$.

A partir do gráfico $A \times C$, sendo A a absorbância e C a concentração em μM e conhecendo o peso molecular do PDZ que é 1011 g/mol é possível estimar os coeficientes de extinção nos comprimentos de onda de 403 nm e 655 nm que foram obtidos a partir da lei de Lambert-Beer onde o coeficiente de extinção molar (ϵ) é o coeficiente angular do gráfico $A \times C$. O coeficiente de extinção molar da molécula foi determinado para a banda de Soret, em 403 nm e para a banda Q em 655 nm através da medida do valor de pico da absorbância para estes comprimentos de onda em função da concentração molar, utilizando a relação.

Para a banda de Soret, o coeficiente de extinção molar obtido foi $(1,35 \pm 0,09) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e para a banda Q, o coeficiente de extinção molar foi $(2,24 \pm 0,04) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Seus coeficientes de extinção são altos em relação a outros fotossensibilizadores (FS), o que significa que ele absorve mais energia, e desta forma se tem um interesse como FS. Este alto coeficiente de extinção é incompatível com a baixa eficiência de emissão da PDZ em solução aquosa, o que será discutido a seguir através de medidas de tempo de vida através da formação de agregados moleculares.

Moléculas orgânicas possuem seção de choque típicas da ordem de 10^{-16} cm^2 . Considerando o tamanho médio dessa clorina da ordem de $D = 1,7 \text{ nm}$, pode-se estimar a seção geométrica dessa molécula ($\sigma_g = \pi(D/2)^2$) como sendo $\sigma_g = 2,3 \times 10^{-14} \text{ cm}^2$. Assim, a razão $\sigma_a/\sigma_g \cong 0,023$ dá a probabilidade de 2,3% dos fótons incidentes na seção σ_g serem absorvidos. Para maior parte das porfirinas, 1 fóton é absorvido para 100 fótons incidentes. A Figura 21a também mostra espectro de fluorescência do PDZ para comparação que se encontra na região

do vermelho, com máximo em 662 nm. Tal espectro é importante principalmente para os experimentos em que a interação do FS com as células é estudada por meio do microscópio de fluorescência confocal.

A fotoinativação de micro-organismos requer o entendimento da estabilidade fotoquímica do fotossensibilizador, ou seja, de sua capacidade de sofrer fotodegradação. Um bom fotossensibilizador é aquele que tem capacidade de produzir alta concentração de ROS, ou seja, ele deve possuir alta taxa de transferência, ISC ou cruzamento intersistemas, do estado excitado singlete para os estados moleculares tripleto. Porém, a alta produção de espécies reativas é refletido na autodegradação da molécula fotossensibilizadora que gera a ROS.

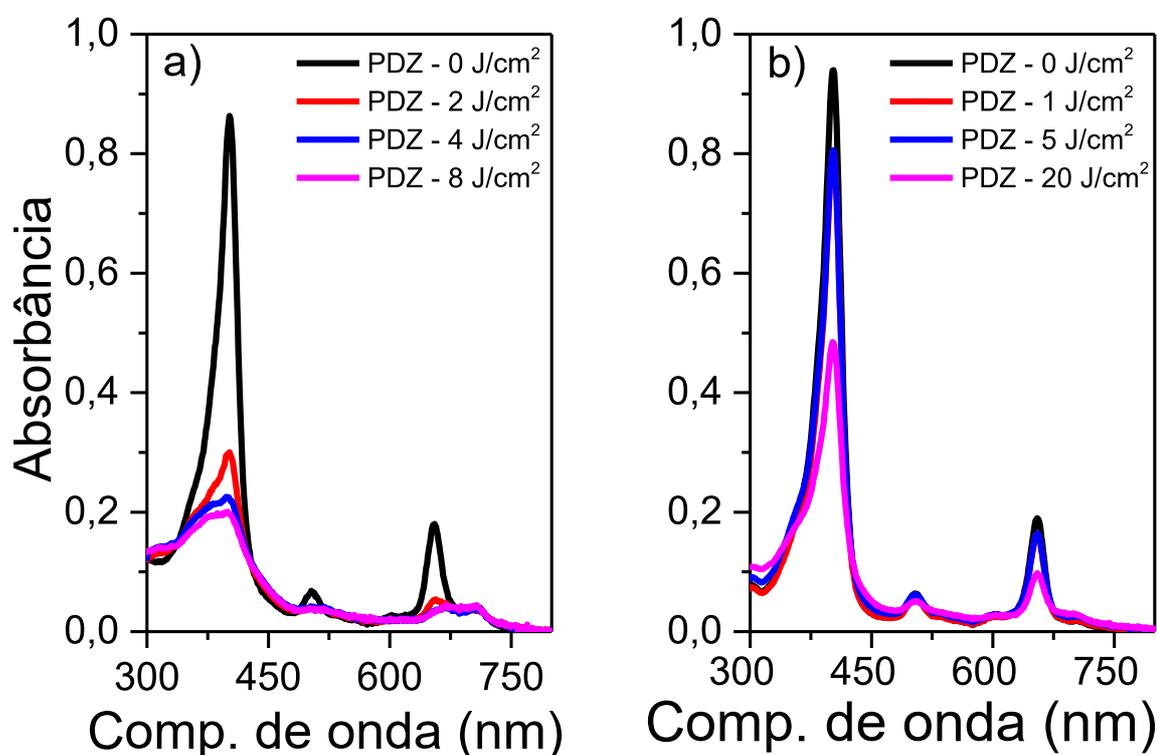


Figura 22 - Espectros de absorvância do PDZ após sofrer efeito de diferentes doses de luz de comprimento de onda: a) de 660 nm e b) em 450 nm em uma *biotable*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 22 mostra espectros de absorvância do PDZ na concentração 10 μM após serem irradiadas por diferentes doses de luz de comprimento de onda de 660 nm (Figura 22a) e 450 nm (Figura 22b) por *biotable*. Pode-se ver que uma dose de 2 J/cm^2 é suficiente para produzir forte fotodegradação do PDZ. Este resultado se deve não só à alta seção de choque de absorção dessa molécula, mas também à eficiente produção de ROS. Estes resultados

refletem a alta capacidade dessa molécula de atuar como fotossensibilizador. Porém, novas estratégias devem ser planejadas para compensar a fotodegradação durante a IFD, como a de fomentar a reposição das espécies fotodegradadas por moléculas não danificadas, de melhorar a seletividade e de atingir alvos específicos para produzir morte celular de forma mais eficaz. Estas considerações serão o foco do presente estudo a ser tratado mais adiante.

Outro aspecto importante é a estabilidade do fotossensibilizador quanto à formação de agregados moleculares em solução aquosa através de ligações Coulombianas fracas como pontes de hidrogênio e de Van der Waals. Agregados moleculares possuem baixa eficiência de emissão e de geração de ROS por causa da forte competição com processos não radiativos como a migração do estado excitado entre as moléculas que formam o agregado.¹¹⁵ A cinética de formação de agregados moleculares depende fortemente da concentração inicial destas moléculas, do meio em que estão e do pH em soluções aquosas.

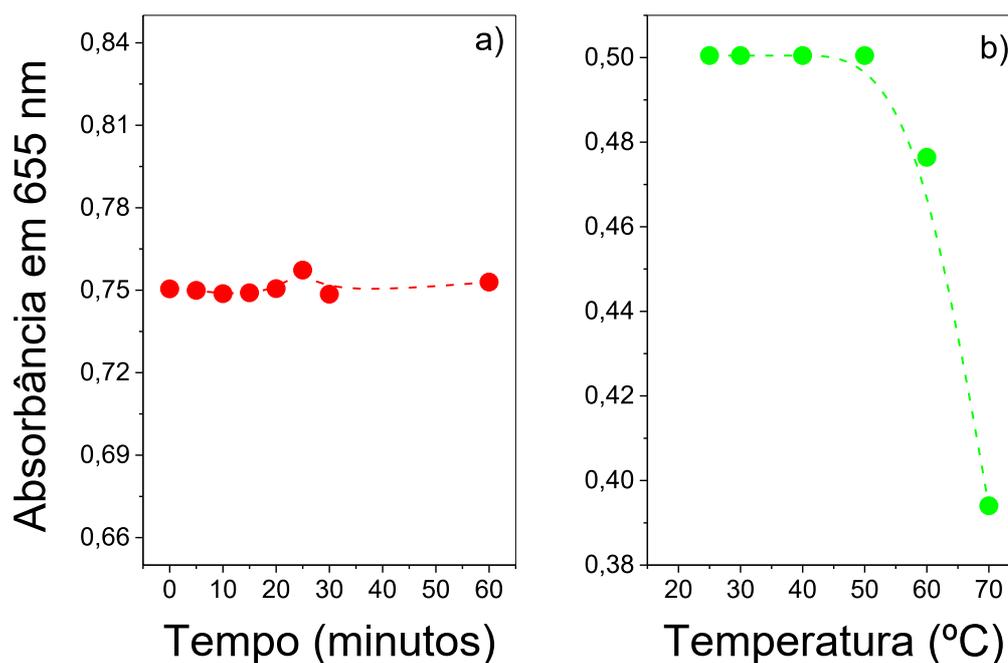


Figura 23 - a) Acompanhamento temporal do PDZ no intervalo de zero a 30 minutos seriado em intervalos de 5 min e um tempo extrapolado de 60 min, mostrando que em PBS esta clorina é bastante estável. b) acompanhamento térmico do PDZ, cuja estabilidade é preservada até 50°C, como a intenção é futuramente utilizá-la em teste in vivo esta clorina se mantém constante dentro da temperatura média humana.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 23a mostra o valor absorvância em 655 nm do PDZ para tempos típicos dentro do período de incubação em células para uma solução de 40 μ M em PBS à temperatura ambiente. As medidas foram realizadas em intervalos de 5 min e foi constatado que no tempo

de 30 min absorvância do PDZ se mantém inalterada. A mesma estabilidade é garantida para um intervalo não contínuo de uma hora mesmo nas altas concentrações molares utilizadas. Valores de absorvância são alterados pela formação de agregados moleculares produz estados moleculares de agregados que se distinguem espectralmente daqueles de molécula livre e pelo aumento da probabilidade de espalhamento do tipo *Reyleigh* e *Mie*. O comportamento estável da absorvância do PDZ em PBS indica que essa molécula é estável nas condições utilizada no experimento.

A estabilidade térmica da molécula PDZ em solução aquosa deve ser considerada de igual importância no presente trabalho. A Figura 23b mostra os valores absorvância em 655 nm do PDZ para uma solução de 40 μM em PBS para várias temperaturas acima da temperatura ambiente. As medidas de absorvância mostram que o PDZ é estável para temperaturas até 50 °C. O decréscimo do valor da absorvância acima desta temperatura se deve à formação de resíduos moleculares com absorção acima de 680 nm (não mostrado).

6.1.2 Fotodegração PDZ por LED

Exposição do PDZ com luz difusa de LED no comprimento de onda de 660 nm de forma contínua, para identificar qual dose de luz apresenta menor dano na molécula do PDZ. Para tal foi utilizado as doses de 1, 5 e 20 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, a dose 0 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ representa o FS sem exposição com a luz, aplicado nas concentrações de FS de 49,5; 24,7; 12,4 e 6,2 μM diluídas em PBS.

Para as soluções de PDZ diluídas em PBS, para todas as exposições de luz em 660 nm houve uma supressão da intensidade da absorvância do FS, devido a degradação da molécula devido aos efeitos da transferência de energia fornecida pelo fóton incidente.

No entanto, para a dose de 1 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ a supressão da intensidade foi menor em relação as doses de 5 e 20 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ indicando que o emprego da exposição de 1 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ pode ser utilizado como alternativa para a exposição seriada.

6.1.3 Interação do PDZ com a *Candida albicans* sem luz

Os estudos da interação do PDZ com as células de *C. albicans* foram feitos por meio de microscopia confocal de fluorescência. Além de diferentes modos de imagem e de excitação, a microscopia confocal diminui o efeito de fotodegradação do FS, já que apenas

uma pequena área do plano focal é irradiada, enquanto o restante da solução é mantida no escuro ou sob condição de baixa fluência luminosa, garantindo assim uma reposição constante do FS que não sofreu fotodegradação por difusão molecular para a região iluminada.

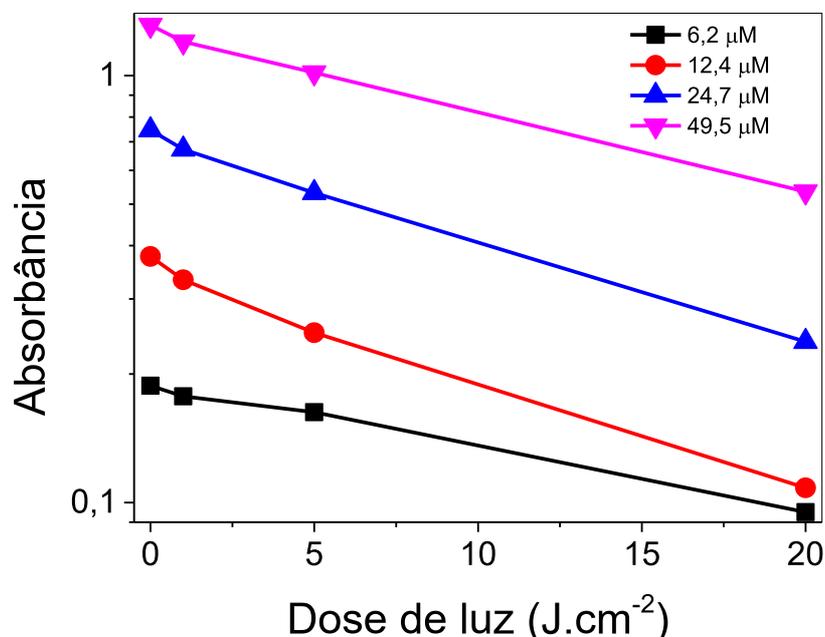


Figura 24 - Monitoramento do pico da intensidade de absorbância para o PDZ no comprimento de onda de 654 nm, para as concentrações, em μM (em PBS), de 49,5; 24,7; 12,4 e 6,2, utilizando fonte de luz difusa de LED (660 nm) nas doses de 1, 5 e 20 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi adicionado a uma solução de PBS de 300 μL de *C. albicans* ($\text{Abs}=0,6$ ou $C=7\times 10^6$ células/ cm^3) de um volume de PDZ necessário para atingir concentrações finais de FS de 10, 20 e 40 μM . As soluções foram homogeneizadas e colocadas em uma placa contendo poço com janela de vidro para análise. Após o processo de decantação das células sobre a placa e da incubação do FS, os estudos foram iniciados.

Dois lasers com características distintas foram utilizados para se fazer as imagens por 1P ou por 2P: um laser de diodo de iluminação contínua que produz excitação através da absorção de 1 fóton (1P) em 405 nm e outro laser pulsado com taxa de repetição de 80 MHz e que promove a transição eletrônica em torno de 400 nm através da absorção de 2 fótons (2P) em 800 nm no infravermelho. A potência média de cada laser foi ajustada para se ter uma fluência de fótons de emissão por pixel suficiente para se fazer a mesma imagem. A resolução fixada pela objetiva de 63x é de 200 nm e a velocidade de varredura determinada pelo tempo de permanência em cada pixel de 12 μs , o que equivale aproximadamente à entrega de uma dose luminosa nominal de aproximadamente 0,5 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ por pixel de imagem.

A Figura 25a mostra imagem de um corte confocal medido no modo canal com excitação por 2P em 800 nm de células incubadas com FS a 10 μM no escuro. A cor falsa em verde (canal 1) representa a autofluorescência provinda do núcleo das células entre 420 e 579 nm, enquanto a cor avermelhada (canal 2) representa a fluorescência do PDZ captada entre 652 e 758 nm. É possível observar que o FS interage preferencialmente com a parede das células. As poucas áreas com coloração branca uniforme com intensidade de fluorescência saturada correspondem à fração de células mortas e que já contêm a parede celular comprometida, o que favorece uma grande internalização do PDZ no meio intracelular. É interessante observar a variação da intensidade ao longo de uma célula.

O perfil da intensidade da fluorescência ao longo da seta branca passando por uma célula viável da Figura 25a é apresentado na Figura 25b. Para melhor visualização, a variação da intensidade para o PDZ foi ajustada por duas gaussianas nas paredes (linha contínua vermelha) somado a uma intensidade de fundo constante (linha tracejada cinza) em todo o perfil, independente da presença do núcleo (autofluorescência verde). Este resultado é uma indicação de que a concentração do PDZ dentro da célula é a mesma que aquela fora da célula e que o PDZ não acumula em organelas distintas no interior da célula. Pode-se observar também que, nessas condições, a intensidade da emissão do PDZ nas paredes é quase 5 vezes maior que a intensidade de fundo nas células viáveis. Além disso, esta célula possui um diâmetro de 5,3 μm e espessura da parede de aproximadamente de 1 μm .

A Figura 26 compara as características espectrais de emissão da *C. albicans* em solução de PDZ para diferentes condições de excitação e concentração molar. A imagem espectral da Figura 24a foi excitada por 1P em 405 nm utilizando uma concentração de 7×10^6 células/ cm^3 e as mesmas foram incubadas no escuro com PDZ a 25 μM em PBS. É importante salientar que a imagem de 1P não evidencia a emissão da PDZ na parede celular, devido à baixa concentração do PDZ que interage com a parede celular.

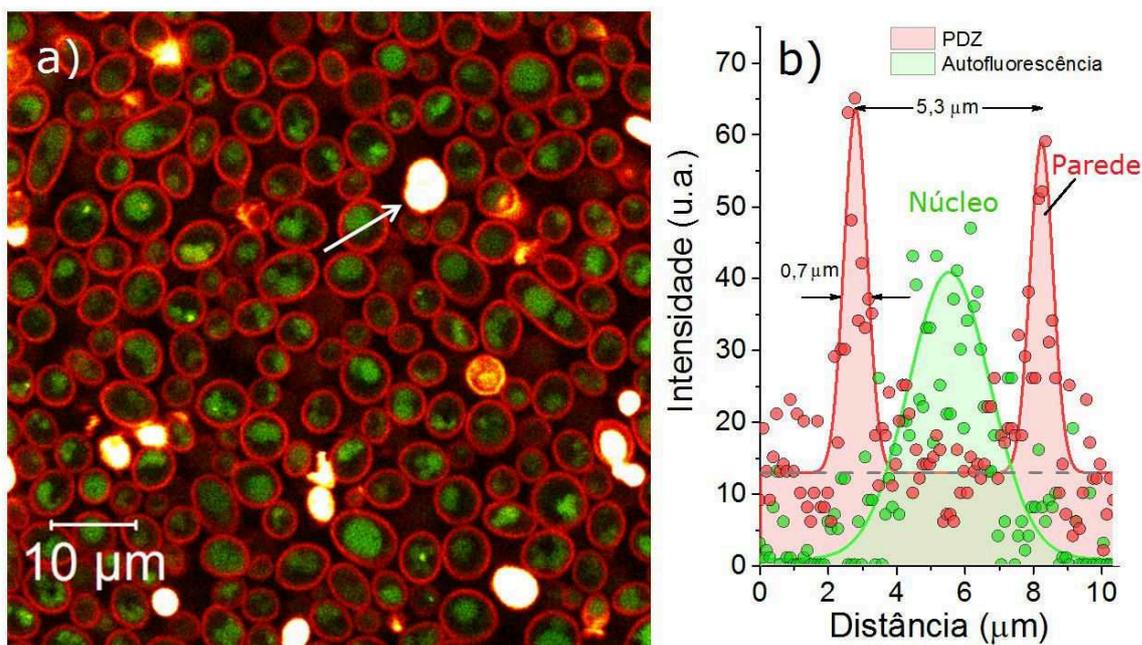


Figura 25 - a) Microscopia confocal no modo canal de um corte confocal produzida com excitação por 2P em 800 nm e com ampliação de 63x da fluorescência do PDZ interagindo com *C. albicans*. As células na concentração de $\sim 10^7 \text{ cm}^{-3}$ foram incubadas com FS a 10 μM no escuro. A cor falsa em verde (canal 1) representa a autofluorescência provinda do núcleo das células, enquanto a cor avermelhada (canal 2) representa a fluorescência do PDZ. b) Perfil da intensidade da fluorescência ao longo da seta branca passando por uma célula viável da Figura 23a. O perfil da intensidade para o PDZ (canal 2) foi ajustado por duas gaussianas nas paredes (linha contínua vermelha), somado a uma intensidade de fundo constante (linha tracejada cinza). Já a autofluorescência do núcleo foi ajustada com uma única gaussiana (canal 1, linha verde).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Porém, espectros de fluorescência (Figura 26a') avaliados nas regiões de interesse dentro da célula (círculo em vermelho-rosado) e na solução (círculo laranja) apresentam emissão fraca do PDZ entre 650 e 700 nm, muito menor que a fluorescência do meio intercelular (cor verde-azulada) entre 430 e 600 nm. Já o uso do laser de 2P favorece a excitação do PDZ, como pode ser visto na imagem espectral da Figura 26b, mesmo utilizando uma concentração de PDZ 2,5 vezes menor. Nessa imagem, quatro regiões de interesse foram utilizadas para a avaliação da emissão: a solução de PDZ (círculo laranja), o meio intercelular de uma célula viável (círculo rosa), o meio intercelular de uma célula não viável (círculo verde) e a parede celular (círculo em azul). Na imagem, a fração de células não viáveis é de $\sim 10\%$. Pode-se ver no gráfico da Figura 24b' que a intensidade do PDZ em solução é praticamente a mesma do meio intercelular de uma célula viável, corroborando o resultado anterior da figura 24. Nessa imagem, a intensidade da autofluorescência é 3 vezes maior que a do PDZ no meio intercelular. Já a intensidade do FS na parede é maior 3,5 vezes maior que o da solução e comparável com a autofluorescência da célula.

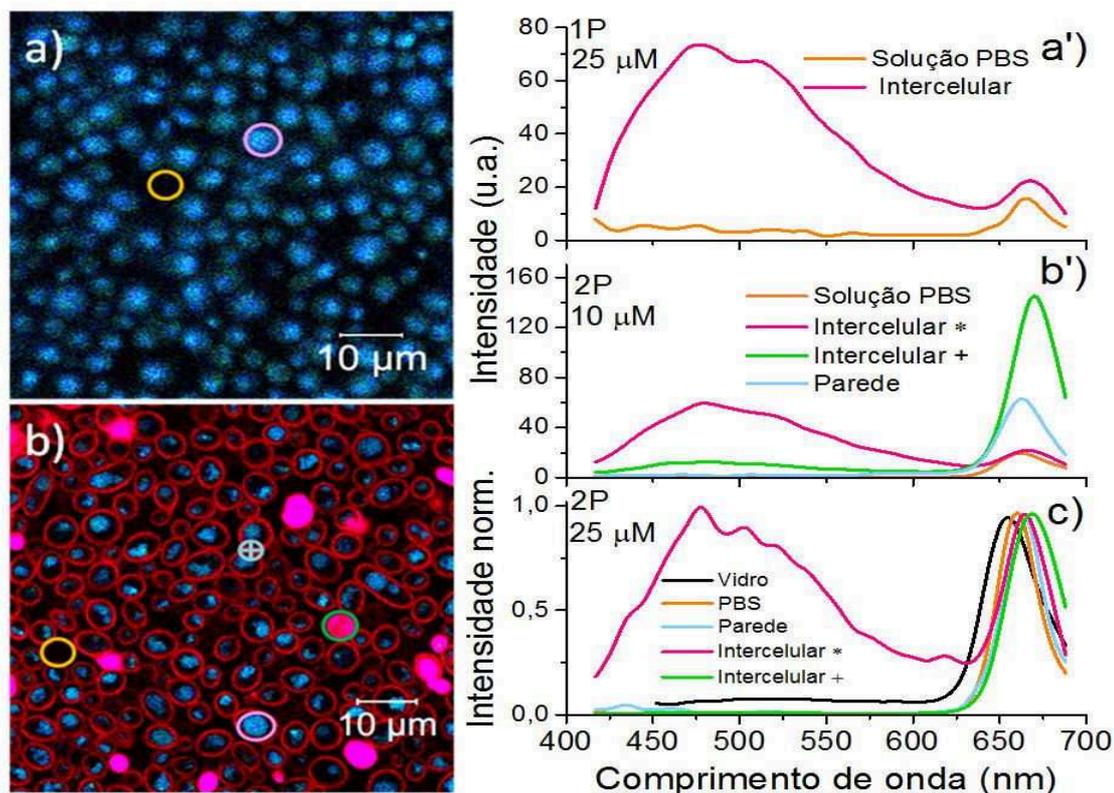


Figura 26 - Comparação entre imagens e características espectrais de emissão da *C. albicans* em solução de PDZ para excitação 1P (a, a') e 2P (b, b', c), bem como concentrações molares de 10 μM (b, b') e 25 μM (a, a',c). As regiões de interesse nas imagens que foram utilizadas para a avaliação da emissão foram a solução de PDZ (círculo laranja), o meio intercelular de uma célula viável (círculo rosa), o meio intercelular de uma célula não viável (círculo verde) e a parede celular (círculo em azul). O espectro de emissão do PDZ (linha preta) depositado sobre a lâmina de vidro do poço foi utilizado para comparação. As mesmas condições experimentais da Figura 23 foram utilizadas nesse experimento, em relação a óptica necessária e densidade de células analisadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A mesma avaliação espectral utilizando excitação por 2P foi feita Figura 26c para concentração molar maior de PDZ de 25 μM . Nessa figura, os espectros foram normalizados na emissão do PDZ para evidenciar mudanças na forma e na posição espectral. O espectro de emissão do PDZ (linha preta) que deposita sobre a lâmina de vidro do poço foi medido através do posicionamento prévio do plano confocal sobre essa superfície e foi utilizado aqui para comparação. Pode-se observar que a intensidade do PDZ para uma região de interesse no interior de células viáveis é comparável à intensidade da autofluorescência para a concentração molar de PDZ de 25 μM , indicando que a internalização dessa molécula é proporcional à sua concentração nominal na solução fora da célula e que a parede celular é permeável à difusão molecular do PDZ.

No entanto, a forte variação da posição da emissão dessa molécula indica perturbações distintas da estrutura eletrônica molecular pelas diferentes interações entre a molécula e o

meio (solvente, parede e meio intercelular) ou entre moléculas do FS, formando agregados quando acumuladas na superfície do vidro ou quando se encontram em altas concentrações no interior das células não viáveis. No entanto, as interações moleculares acima promovem modificações que pode ser analisada pelas mudanças espectrais.

O tipo de arranjo molecular pode ser inferido se a dinâmica do estado excitado for considerada, por exemplo, em medidas do decaimento temporal da emissão, denominadas normalmente por medidas de tempo de vida que serão apresentadas através de imagens de tempo de vidas das amostras acima, como será tratado na próxima seção. O comportamento temporal desse decaimento pode ser profundamente pela competição entre o processo radiativo e outros processos não radiativos como, por exemplo, a migração rápida e efetiva do estado excitado entre moléculas em um agregado molecular.

É interessante estimar o quanto de PDZ sendo acumulado na parede celular da *C. albicans* e o quanto internalizou nessa célula durante o processo de incubação sem luz. Para isto, foi utilizado o método desenvolvido em nossos laboratórios envolvendo medidas de absorvância, que analisa a solução sobrenadante após centrifugar as células incubadas por um dado tempo em solução de PDZ com uma concentração molar C_M conhecida.

O que se espera deste experimento é simulado na Figura 27a para diversas condições. Esta figura basicamente é um gráfico log-log da absorvância do PDZ em solução aquosa ($\epsilon=1,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) em função da concentração molar C_M . O caminho óptico da cubeta de quartzo utilizada no experimento é $d=1\text{cm}$. Em um experimento convencional, a absorvância segue a lei de Beer-Lambert que é dada em termos da concentração mola por $\epsilon d C_M$. No gráfico log-log este comportamento é descrito por uma reta (linha contínua vermelha) de coeficiente angular 1 e coeficiente linear $\log(\epsilon d)$. Segundo essa lei, $\text{Abs}=1$ é obtida para a concentração numérica N do PDZ $d\epsilon/\sigma_a$ ou concentrações molares $C_M=1/\epsilon d=7,7 \mu\text{M}$. Para concentrações maiores que este valor, as medidas de absorvância ficam limitadas pela razão sinal/ruído do detector e pela qualidade da eletrônica do espectrofotômetro.

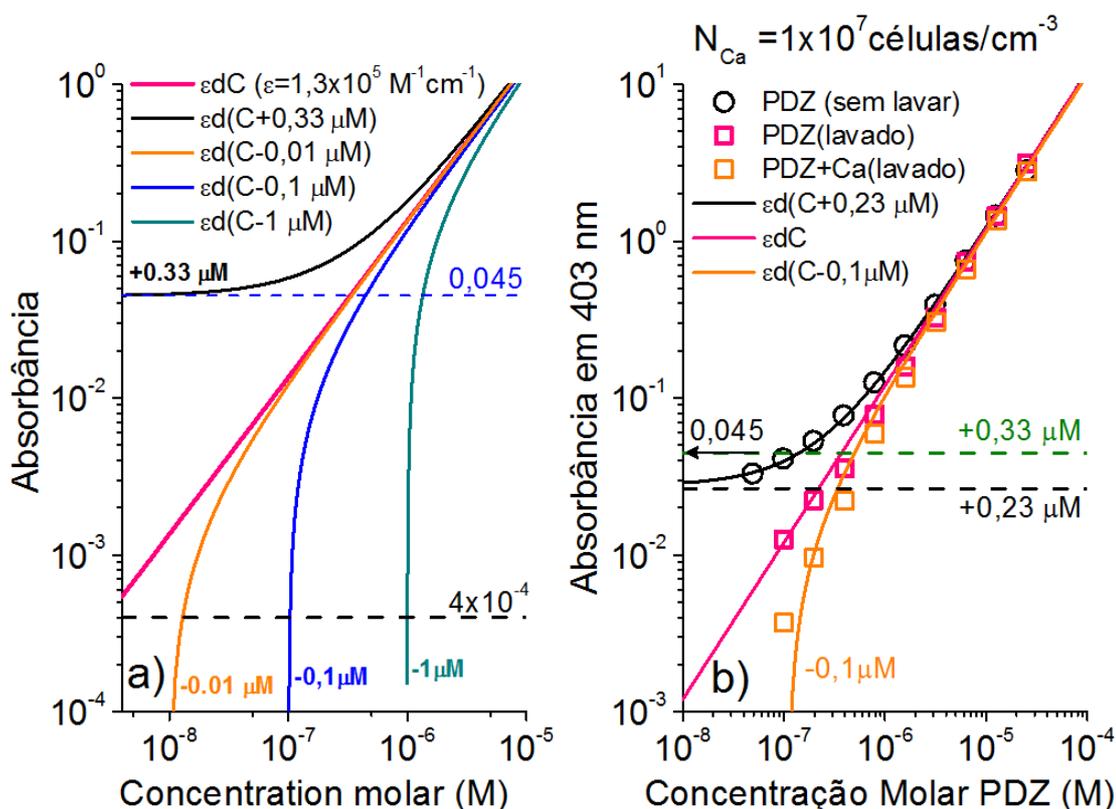


Figura 27 - a) Comparação da absorbância do PDZ em solução aquosa ($\epsilon=1,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em função da concentração molar C_M para duas outras situações não convencionais podem que produzem um comportamento fora daquele linear esperado pela lei Beer-Lambert no gráfico log-log (reta contínua vermelha). A curva contínua preta é a situação em que uma fração das moléculas em solução depositam nas paredes da cubeta formando uma monocamada. A outra é aquela em que uma fração das moléculas é subtraída da solução de PDZ por interação com a parede celular de *C. albicans* ou pela internalização em um número fixo de células adicionada a cada solução de PDZ de concentração nominal C_M .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para concentrações menores que $1/\epsilon d$, duas outras situações não convencionais podem ocorrer no experimento e produzir um comportamento fora daquele linear esperado pela lei Beer-Lambert no gráfico log-log. Uma situação que pode ocorrer é aquela em que uma fração das moléculas em solução depositam nas paredes da cubeta. A outra é aquela em que uma fração das moléculas é subtraída da solução pela interação ou internalização com a *C. albicans* adicionada a uma concentração numérica fixa de células a cada solução de PDZ de concentração nominal C_M . No caso, a fração de fotossensibilizador que restou na solução sobrenadante é analisada após a centrifugação das células.

Na simulação da Figura 27a será assumido que uma fração constante de moléculas C_s de PDZ será subtraída do volume analisado de $V=1,5 \text{ mL}$. No caso das moléculas depositadas sobre a parede da cubeta estão no caminho óptico apenas nas duas faces perpendiculares ao feixe luminoso e se adicionam à absorbância das moléculas na solução. Se as moléculas de

PDZ se depositarem deitadas lado a lado formando uma monocamada molecular compacta e estável sobre a parede interna da cubeta e que esta monocamada impede a superposição de uma segunda camada uma vez que a primeira neutraliza completamente interação molecular com a superfície de quartzo. Nesta condição, o número de moléculas depositadas na parede da cubeta pode ser calculado assumindo que as clorinas possuem diâmetro $D=1,7$ nm e a área geométrica do PDZ $\sigma_s=\pi(D/2)^2=2,6\times 10^{-14}$ cm² e que a área total depositada nessa condição compacta será de 7 cm² para a cubeta de área da base de 1 cm² e volume analisado de 1,5 cm³.

Assim, o número de moléculas depositadas sem empacotamento será $7\text{ cm}^2/2,6\times 10^{-14}$ cm² ou 3×10^{14} moléculas. A concentração molar equivalente destas moléculas em 1,5 mL é $C_s=0,33$ μM na faixa submicromolar. O valor da absorvância para essa concentração molar equivalente será $Abs=1,35\times 10^5\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1\text{ cm} \times 0,33\times 10^{-6}\text{ M}=0,045$. Qualquer medida de absorvância de uma solução de PDZ de concentração C_M em uma cubeta contendo moléculas empacotadas em uma única monocamada nas paredes verá uma concentração maior C_M+C_s , ou seja $Abs=\epsilon d(C_M+0,33\text{ }\mu\text{M})$. No gráfico log-log da absorvância pela concentração molar C_M nominal será representado por $\log(Abs)=\log(C_M+0,33\text{ }\mu\text{M})+\log(\sigma_a d)$ representada pela curva contínua preta. Para $C_M \gg 0,33\text{ }\mu\text{M}$, esta dependência se aproxima da reta descrita pela lei de Beer-Lambert e se aproxima do valor 0,045 para $C_M \ll 0,33\text{ }\mu\text{M}$.

Nas condições de deposição acima, o raio de luz que passa através da cubeta vai ver duas moléculas, uma em cada face da cubeta, dentro do volume do cilindro $\sigma_s d$. A concentração numérica equivalente de moléculas pode ser avaliada por $N=2/\sigma_s d=8,7\times 10^{13}$ cm³ e a absorvância das moléculas depositadas na parede da cubeta pode ser calculada por $Abs=\sigma_a d N=0,045$ (linha tracejada horizontal azul da Figura 27). Outra forma equivalente de se calcular a absorvância destas duas moléculas pode ser feita utilizando a probabilidade destas duas moléculas absorverem um fóton que é $Abs=2\sigma_a/\sigma_g=2\times 0,023=0,046$. A hipótese de deposição de uma monocamada compacta e inerte de moléculas de PDZ sobre a parede da cubeta é razoável e será verificada experimentalmente com será visto abaixo.

Um comportamento oposto é observado para a situação em que a solução sobrenadante é analisada após uma fração C_s da concentração nominal C_M de fotossensibilizador interagir com um número fixo de células N_{Ca} de *C. albicans* no volume analisado. Esta fração C_s pode ser fixa como no exemplo da parede da cubeta no caso da saturação de sítios de interação na parede ou no interior das células. Neste caso, a concentração da solução sobrenadante será C_M-C_s e sua absorvância $Abs=\epsilon d(C_M-C_s)$, que vai a zero no gráfico linear quando $C_M=C_s$. A dependência desta absorvância com a concentração

C_M pode ser vista no gráfico log-log da Figura 24a pelas curvas laranja, azul e verde para três valores da concentração C_s iguais a 0,01, 0,1 e 1 μM , respectivamente. Neste gráfico da Figura 27, a solução estará livre de moléculas para valores de concentrações C_M abaixo de C_s ($\log(C_M - C_s)$ não definido).

A Figura 27 mostra ainda o limite típico inferior de sensibilidade de aproximadamente 4×10^{-4} (linha pontilhada preta horizontal) um espectrômetro de absorvância. Assim, frações de moléculas interagentes C_s maiores que 50 nM podem ser estabelecidas em um experimento de interação, como será demonstrado abaixo. Este experimento é uma maneira simples de se determinar a dose necessária ativa de fotossensibilizadores visando otimizar a fotoinativação e verificar eficiência de um tratamento.

A Figura 27b apresenta medidas de absorvância do PDZ para diferentes diluições molares em PBS utilizando cubeta de quartzo ($d=1$ cm). Foram feitas 10 diluições $C_M = C_0/2^n$, a partir de uma concentração $C_0 = 25$ μM . As medidas foram realizadas começando pela solução mais concentrada. Três dependências são apresentadas. Os círculos abertos pretos descrevem as absorvâncias do PDZ em que a cubeta não foi lavada ao longo de todo o experimento. Este comportamento é descrito por $\text{Abs} = \epsilon d(C_M + 0,21 \mu\text{M})$ para o caso em que uma fração estável ($C_s = 0,21 \mu\text{M}$, linha tracejada preta horizontal) da concentração nominal do PDZ é depositada na parede da cubeta já no início do experimento. A fração depositada é um pouco menor que o caso da deposição de uma monocamada completa de PDZ sobre as paredes da cubeta sem considerar efeitos das duas cadeias laterais. É de se esperar que estas cadeias causam impedimento estérico na deposição em que as moléculas estão deitadas lado a lado, produzindo uma compactação menor sobre a superfície das paredes da cubeta de quartzo e, conseqüentemente, um C_s 1,5 vezes menor.

No outro caso descrito pelos quadrados abertos vermelhos, a cubeta foi lavada com etanol e secada em fluxo de nitrogênio antes da medida de absorvância do PDZ para cada diluição. Neste caso, o comportamento esperado da lei de Beer-Lambert $\text{Abs} = \epsilon d C_M$ é observado através da reta contínua vermelha.

O último comportamento é descrito pelos quadrados abertos laranja da Figura 27 em que a solução sobrenadante é analisada após interação do fotossensibilizador com um número fixo de células $N_{Ca} = 10^7$ células/cm³ de *C. albicans*. Nesse caso, o procedimento de lavagem e secagem da cubeta também foi realizado. A dependência da absorvância neste experimento pode ser descrito por $\text{Abs} = \epsilon d(C_M - 0,1 \mu\text{M})$ para a qual uma fração das moléculas com concentração no volume de $C_s = 0,1 \mu\text{M}$ ou 9×10^{13} moléculas de PDZ em 1,5 cm³ vai interagir

com sítios na parede ou no interior das células. Assim, cada célula vai interagir em média com 6×10^7 moléculas de PDZ considerando o número de células de $1,5 \times 10^7$ nesse volume.

Desconsiderando efeitos da eficiência de emissão em meios distintos, os resultados anteriores revelaram que a intensidade da emissão do PDZ nas paredes é quase 5 vezes maior que a intensidade de fundo no citoplasma de células viáveis. Assim, 20% destas moléculas estarão no meio intracelular e os outros 80% na parede celular. A concentração molar estimada do PDZ no interior das células é 0,25 mM considerando o volume celular médio de 8 femtolitros, o que é uma dose de fotossensibilizador muito alta. Esta concentração é da mesma ordem de magnitude do que os metabólitos mais abundantes no meio intercelular. Já na parede celular se encontram em média $4,8 \times 10^6$ moléculas fixas.

Como a área média da parede celular de uma célula de *C. albicans* é $A_{Ca} \sim 78 \mu\text{m}^2 = 7,8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$, a área total ativa para interação será de 12 cm^2 para $1,5 \times 10^7$ células. Isto significa que a densidade superficial de moléculas de PDZ é praticamente igual a da superfície da cubeta, para um empacotamento compacto de moléculas deitadas sobre a superfície e posicionadas lado a lado. Além disso, a saturação desta superfície por uma monocamada indica que o PDZ não interage consigo própria formando agregados moleculares do tipo H. Como a parede celular é espessa, estas moléculas vão estar isoladas nesse meio ocupando os sítios interação até a saturação.

6.1.4 Internalização do PDZ induzida por luz em *C. albicans*

Na seção anterior foi possível determinar que o PDZ interage preferencialmente com a parede celular das células de *C. albicans*, enquanto 20% desse FS que interage com a célula internaliza no meio intracelular. Nessa seção, será demonstrado que a internalização dessa molécula pode ser facilitada através aplicação de baixas doses de luz. Este resultado é importante, pois evita fotodegradação excessiva e reduz tempos de tratamento. Um novo protocolo utilizando esse procedimento na IFD de microrganismos será discutido no final desta seção.

A internalização induzida por luz do PDZ em células de *C. albicans* foi feito por microscopia confocal de fluorescência. Esta metodologia por si só reduz os efeitos de fotodegradação do FS, já que apenas as moléculas na área do plano focal são excitadas por 2P ou, para o caso de excitação por 1P, as moléculas são excitadas apenas na região do foco, enquanto o restante da solução é mantida no escuro ou sob condição de baixa fluência

luminosa, garantindo assim uma reposição de FS que não sofreu fotodegradação por difusão molecular para a região iluminada.

O acompanhamento da internalização induzida por luz do PDZ em células de *C. albicans* foram realizados no modo de série temporal. As dispersões 300 μL contendo 10^6 células foram adicionadas em uma placa contendo poço com janela de vidro para análise contendo um volume de PDZ necessário para atingir concentrações finais de FS de 10, 20 e 40 μM em PBS. Com esta quantidade de células se garante o recobrimento toda a superfície do monopoço de área de base de 1 cm^2 evitando, com isso, a movimentação das células durante os experimentos. Após o processo de decantação das células sobre a placa, as séries temporais foram iniciadas imediatamente após incubação do FS. Os lasers utilizados para este experimento foram de 405 nm (1P) e de 800 nm (2P) com potência fixa de modo a entregar uma dose nominal de aproximadamente $0,5\text{ J/cm}^2$ por pixel de imagem de modo a não produzir fotodegradação mensurável durante a varredura da imagem com 1050 pixels em cada eixo, enquanto o restante da amostra foi mantido no escuro. As imagens foram obtidas no modo canal, em que a cor falsa verde representa a autofluorescência provinda do núcleo das células captadas entre 420 e 579 nm e a cor vermelha representa a fluorescência do PDZ captada entre 652 e 758 nm. Nessas condições, a varredura foi ajustada de modo que imagens foram tomadas a cada 30 segundos por 20 minutos.

A Figura 28 de (a) a (e) mostra imagens no mesmo plano confocal de uma série temporal de uma área iluminada $106\text{ }\mu\text{m} \times 106\text{ }\mu\text{m}$ um laser de excitação por 2P (800 nm) contendo células em solução com concentração de 40 μM de PDZ após aplicação de doses de luz de (a) 0 J.cm^{-2} ; (b) 4 J.cm^{-2} ; (c) 7 J.cm^{-2} ; (d) 12 J.cm^{-2} e (e) 20 J.cm^{-2} . É possível ver que a luz induz a internalização do FS nas células e que cada célula leva um tempo distinto no aumento da fluorescência do FS em seu interior.

Ao final do experimento, a imagem foi expandida (Figura 28f) de modo a mostrar a área iluminada e uma área da sua vizinhança mantida no escuro. É possível ver que a região irradiada se destaca em vermelho, indicando maior concentração de PDZ em relação à área não irradiada que apresenta predominância da autofluorescência na cor verde. Além disso, é possível ver uma homogeneidade de FS na área irradiada e que o FS permanece no interior das células após a iluminação, condições importantes para a aplicação de IFD.

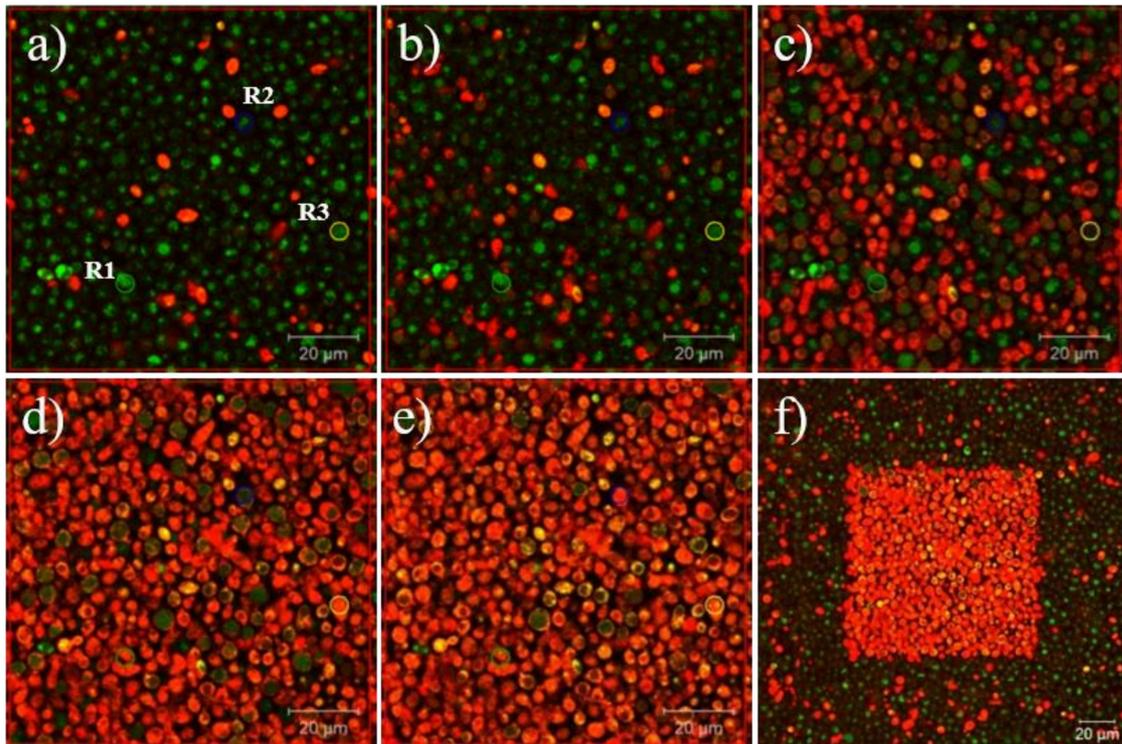


Figura 28 - Acompanhamento da internalização induzida por luz (laser 2P em 800 nm) d PDZ na concentração de 40 μM . As imagens foram feitas depois de aplicações de doses: (a) 0 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, (b) 4 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$; (c) 7 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$; (d) 12 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ e (e) 20 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$. A imagem expandida (f) mostra a área iluminada comparada à área mantida no escuro após a entrega de dose final de 22 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ na área irradiada. As identificações R1, R2 e R3 são as áreas analisadas na Figura 29.

Fonte: Elaborada pelo autor.

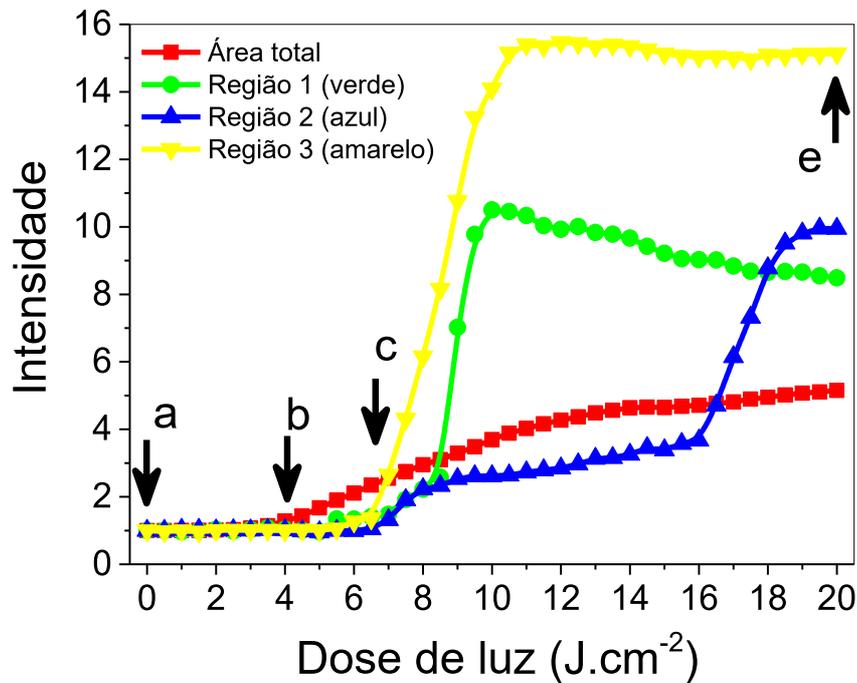


Figura 29 - Comportamento da fluorescência do PDZ nas regiões destacadas durante o período de iluminação (2P). As marcações “a”, “b”, “c” e “e” representa a região irradiada mostradas na Figura 28, indicando a intensidade referente ao aumento de PDZ nas células.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas imagens da figura 27 estão destacadas quatro regiões de interesse: a área total iluminada, destacada em vermelho, e células individuais, destacadas em azul, verde e amarelo. O aumento da fluorescência do FS normalizado pela área das regiões de interesse foi acompanhado temporalmente e pode ser visto na Figura 26. As quatro setas indicam as doses correspondentes às imagens da Figura 28a-e. O aumento da intensidade do PDZ é repentino, mas diferente para cada célula, porém a dose média de iluminação necessária para iniciar a internalização foi em torno de 4 J.cm^{-2} , tendo um aumento de aproximadamente 5 vezes na área total, e de 10,5; 10 e 15 vezes nas regiões em verde, azul e amarelo, respectivamente, e tende a uma saturação. O decréscimo da fluorescência após a saturação pode estar relacionado com a saída gradual da célula da região de interesse verde. Já a região de interesse em azul apresenta dois estágios de internalização durante o experimento.

O mesmo procedimento foi realizado, mas agora a irradiação foi feita com um laser contínuo em 405 nm (1P). A Figura 28a-e mostra imagens no mesmo plano confocal de uma série temporal de uma área $106 \mu\text{m} \times 106 \mu\text{m}$ que contém de células em solução com concentração de $40 \mu\text{M}$ de PDZ após aplicação de doses de luz de (a) 0 J.cm^{-2} ; (b) 9 J.cm^{-2} ; (c) 21 J.cm^{-2} ; (d) 30 J.cm^{-2} e (e) 42 J.cm^{-2} . Mais uma vez, a internalização foi induzida por luz através do laser de 1P. Na Figura 28f se pode ver a imagem expandida que compara a fluorescência da área irradiada com a área não irradiada. Como anteriormente, a área irradiada apresentou maior intensidade relacionadas ao PDZ (em vermelho) indicando maior concentração de fotossensibilizador no interior das células em relação à fluorescência natural das células (em verde) da área mantida no escuro.

Também, cinco regiões de interesse foram destacadas para acompanhar o processo de internalização da variação da intensidade da fluorescência na série temporal: a área total irradiada, em vermelho, e células individuais em verde, azul, amarelo e ciano. O aumento da fluorescência nas áreas destacadas pode ser observado na Figura 31. Para esse caso, o acréscimo da fluorescência começou a partir de doses de aproximadamente $9,0 \text{ J.cm}^{-2}$, tendo um aumento de aproximadamente 7 vezes na área total, e de 16, 19, 17 e 19 vezes nas regiões em verde, azul, amarelo e ciano, respectivamente. O acréscimo da fluorescência nesse caso através da excitação por 1P em 405 nm foi maior que para o laser 2P em 800 nm, porém a internalização começou para doses mais baixas para este laser. Estas doses de luz são baixas quando comparadas às doses entregues na IFD,^{2, 125} mesmo considerando o processo pontual de varredura e a entrega de doses variáveis após cada imagem devido ao movimento, mesmo que pequeno, das células. Mesmo assim, detalhes deste experimento mostrados a seguir demonstram que os danos causados pela luz ocorre na parede celular.

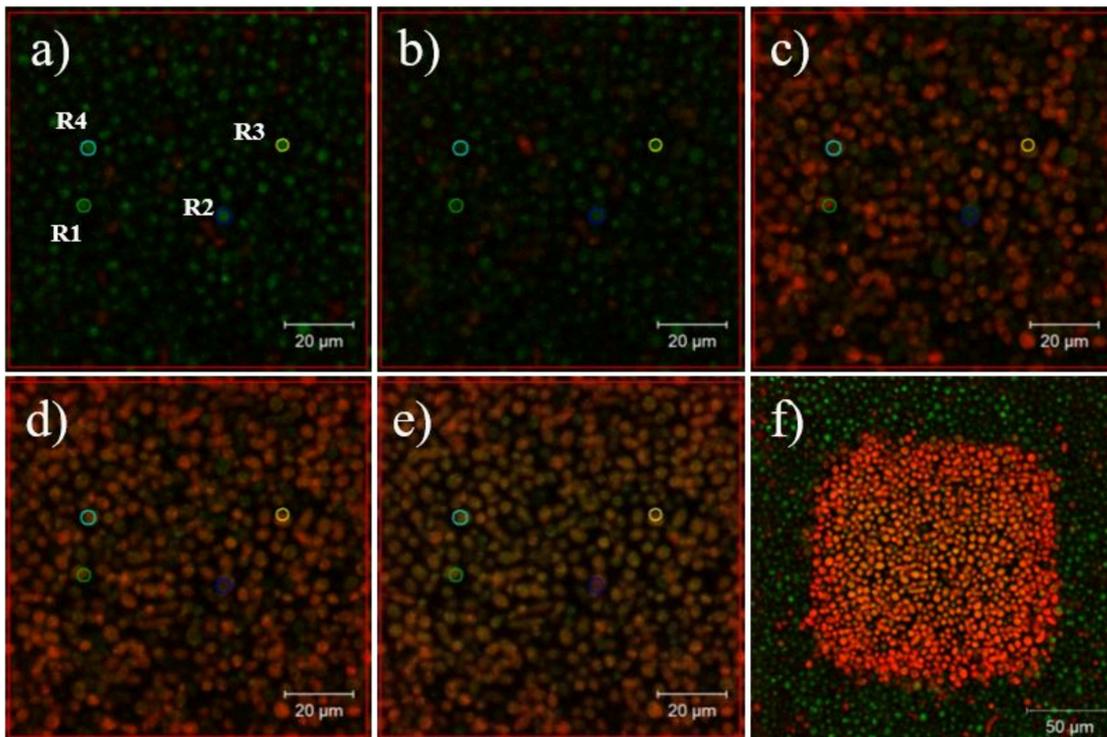


Figura 30 - Imagem de microscopia confocal associada com a irradiação por laser de 1P. A identificação Área T representa o perímetro da toda a ares da imagem da microscopia, as identificações R1, R2, R3 e R4 são as áreas que foram analisadas na Figura 31. No canto superior esquerdo de cada imagem de microscopia está a identificação da dose de luz irradiada, sendo I, II, III e IV as doses de luz de a) 0 $J.cm^{-2}$, b) 9 $J.cm^{-2}$, c) 21 $J.cm^{-2}$, d) 30 $J.cm^{-2}$ e e) 42 $J.cm^{-2}$, respectivamente. A imagem expandida f) mostra a área iluminada comparada à área mantida no escuro após a entrega de dose final de 22 $J.cm^{-2}$ na área irradiada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

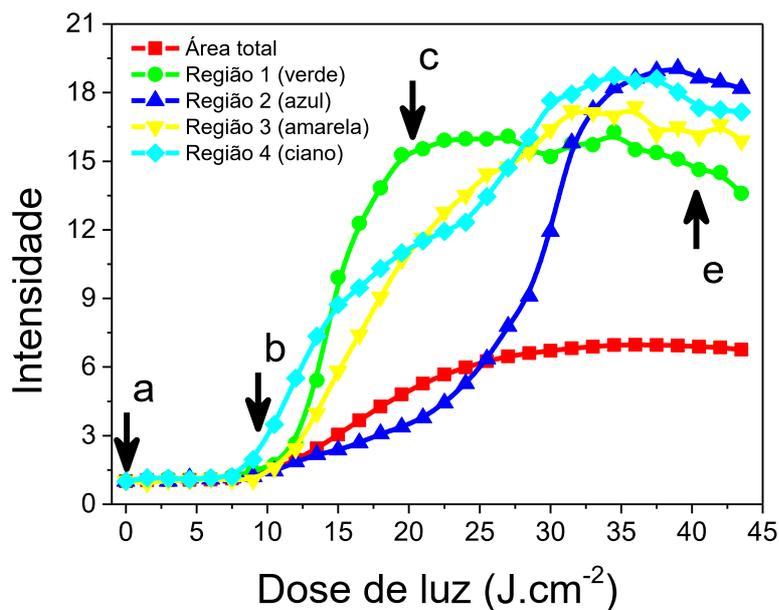


Figura 31 - Comportamento da fluorescência do PDZ nas regiões destacadas durante o período de iluminação (1P). As marcações “a”, “b”, “c” e “e” representa a região irradiada mostradas na Figura 30, indicando a intensidade referente ao aumento de PDZ nas células.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os mesmos experimentos foram realizados para concentrações nominais de PDZ de 10, 20 e 40 μM em PBS, nas mesmas condições de iluminação. É possível comparar o aumento fluorescência do PDZ nas áreas irradiadas para as três concentrações com os lasers de excitação de 2P na Figura 32a e de 1P na Figura 32b.

As intensidades foram normalizadas para a dose de luz inicial nos dois casos para efeito de comparação. O aumento da intensidade da fluorescência do PDZ iniciou para o mesmo valor de dose em torno de $5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ e da mesma forma gradual para as três concentrações com a excitação por 2P em 800 nm (Figura 32a). Já para a irradiação com laser 1P em 405 nm (Figura 29b) e, o processo de internalização se inicia para doses torno de $5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ e depende fortemente da concentração nominal de FS.

O aumento da fluorescência na área irradiada foi mais rápido e de aproximadamente 7 vezes para a concentração de 40 μM de PDZ, 3,5 vezes para a concentração de 20 μM e 2,7 vezes para 10 μM . Esses últimos resultados podem indicar que a saturação da concentração final no interior das células se deve à concentração de PDZ disponível na solução. É importante notar que a intensidade de luz por pulso para 2P é muito maior do que para a excitação contínua por 1P.

Porém, a probabilidade de excitação 2P é muito menor do que a excitação 1P.¹²⁶ Nos experimentos acima, no entanto, as doses por pixels foram definidas para serem equivalentes para os dois tipos de excitação. Por outro lado, resultados recentes obtidos em nosso grupo demonstram que o uso de laser 2P é eficaz na excitação de agregados moleculares.⁶¹

O experimento a seguir pretende entender melhor aspectos associados às diferentes incorporações do PDZ em células de *C. albicans* pela ação da luz nos regimes de excitação por 1P e 2P envolvendo a internalização com aumento da emissão e sua saturação posterior. Aqui é importante determinar a dose de luz mínima necessária para produzir inativação rápida das células através da produção de danos permanentes associados principalmente à parede celular.

O experimento é composto por duas partes. Na primeira parte, microscopia confocal foi utilizada para aplicar e fazer o acompanhamento sistemático da aplicação de doses sucessivas através de excitação por 1P em 405 nm até atingir um valor $D=13 \text{ J}/\text{cm}^2$ pouco acima da dose em que a intensidade do PDZ começa a aumentar no interior das células ($D=4 \text{ J}/\text{cm}^2$). Doses sequenciais de luz de aproximadamente $0,5 \text{ J}/\text{cm}^2$ foram aplicadas para cada pixel de imagem em uma região do corte confocal de células de *C. albicans* conforme descrito acima contendo PDZ a 40 μM em PBS. As imagens da área iluminada para doses zero e 13

J/cm^2 estão inseridas nas Figura 33a e Figura 33b. Espera-se produzir pouco danos às células neste intervalo.

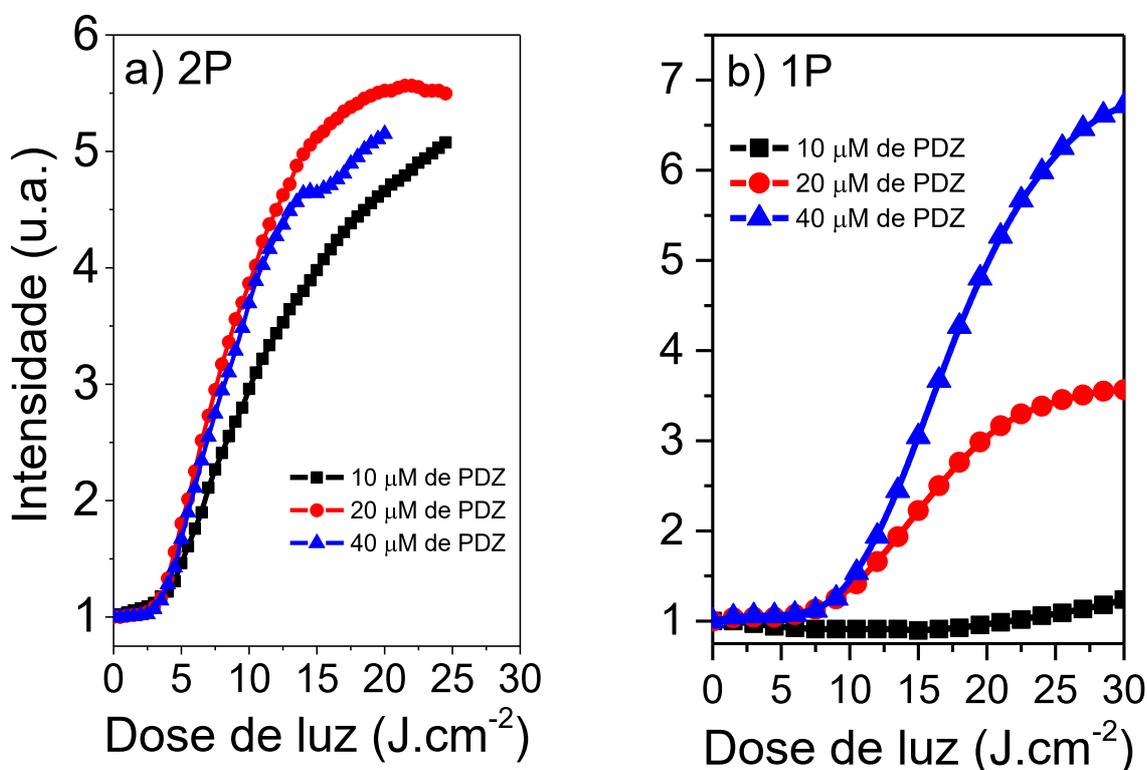


Figura 32 - a) Comportamento da fluorescência do PDZ da área irradiada durante o período de iluminação para três concentrações diferentes com laser pulsado em 800 nm. b) Comportamento da fluorescência do PDZ da área irradiada durante o período de iluminação para três concentrações diferentes com laser contínuo em 405 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A segunda parte do experimento teve objetivo somente acompanhar a evolução da emissão no interior da área em que foi aplicada a dose total através de uma série temporal de imagens por microscopia confocal utilizando baixa dose ($D < 0,5 J/cm^2$), sem produzir danos ou fotodegradação mensuráveis. Duas imagens com campo de visão ampliado foram obtidas, uma após a aplicação da dose de $13 J/cm^2$ e outra antes de se iniciar a evolução temporal da intensidade, para se obter os valores proporcionais das intensidades entre as áreas não irradiadas nas duas partes. A Figura 33c mostra a imagem ampliada no final da série temporal após 20 min. Já a Figura 33d apresenta o gráfico da evolução da intensidade da emissão do PDZ dentro da área irradiada para a primeira parte (círculos fechados cinzas) e para a segunda parte (círculos abertos) em função do tempo. Primeiramente, pode-se ver que não há evidência de fotodegradação do PDZ na primeira parte do experimento quando doses efetivas de luz são aplicadas em cada pixel de imagem com objetivo de produzir dano celular.

O aumento da intensidade da emissão do PDZ para doses de luz acima 4 J/cm^2 é um indicativo de que a parede celular sofreu danos mensuráveis que permitiram a internalização desta molécula para o citoplasma celular.

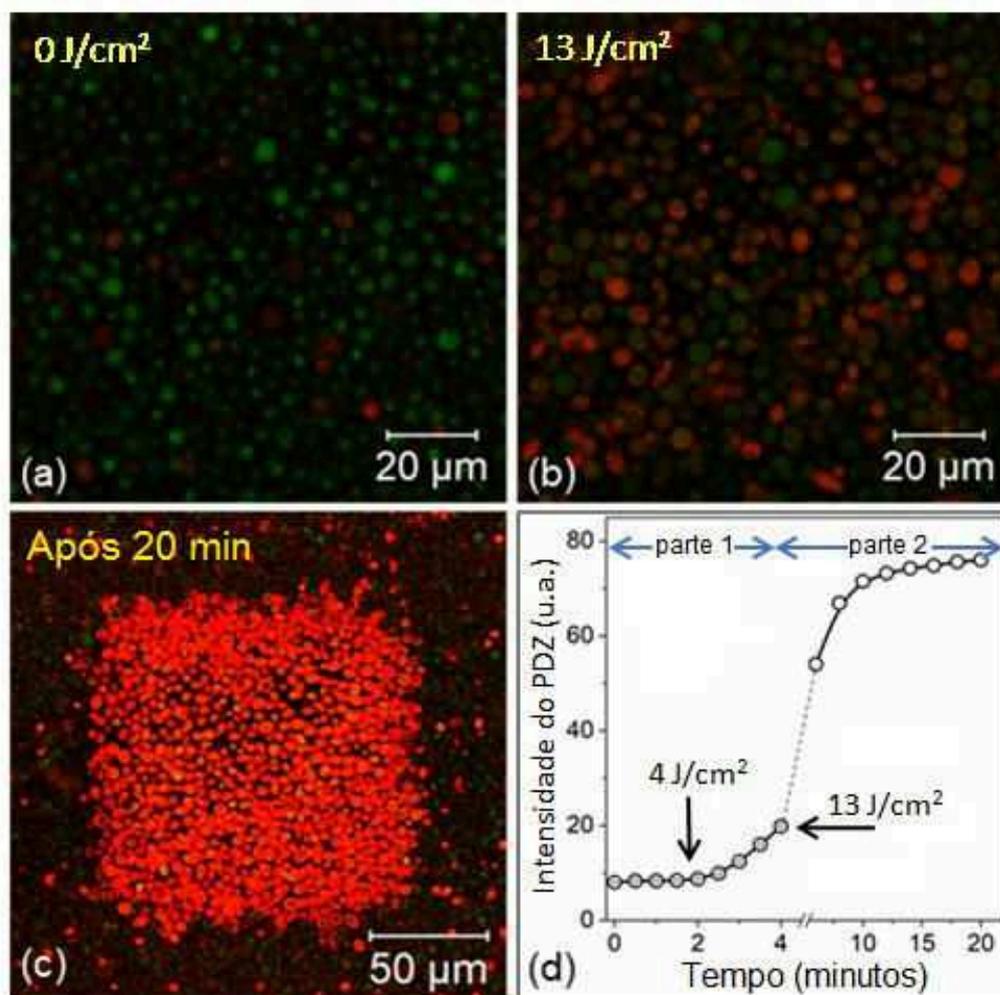


Figura 33 - Acompanhamento sistemático da aplicação de doses sucessivas aplicadas em células de *C. albicans* em solução de PDZ a $40 \mu\text{M}$ em PBS através de excitação por 1P em 405 nm até atingir um valor $D=13 \text{ J/cm}^2$. Esta dose é pouco acima da dose de 4 J/cm^2 em que a intensidade do PDZ começa a aumentar no interior das células (parte 1). As imagens são da área iluminada para a) doses zero e b) 13 J/cm^2 e da área com campo de visão ampliado feita no final da serie temporal (parte 2) após 20 min mostrando a área irradiada no centro; d) gráfico da evolução da intensidade da emissão do PDZ dentro da área irradiada para a primeira parte (círculos fechados cinzas) e para a segunda parte (círculos abertos) em função do tempo. A linha tracejada foi utilizada para indicar que, no intervalo de tempo entre a primeira e a segunda parte do experimento foi interrompido para se estabelecer as condições de medida necessárias para a parte 2.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esse comportamento descreve o acúmulo gradativo do PDZ no interior da célula que atravessa a membrana através de eventuais defeitos (nano fissuras) produzidos na parede celular. Após a aplicação da última dose efetiva de 13 J/cm^2 , a intensidade da emissão do PDZ nas células continua aumentar de forma exponencial crescente (não mostrado) até atingir

a saturação tempo característico de aproximadamente 3 min. A intensidade da emissão aumenta 9x após 20 min em relação ao seu valor inicial. A intensidade aumenta 7x no experimento de aplicação de doses contínuas em células de *C. albicans* mostrado na Figura 33d para PDZ na concentração de PDZ a 40 μM em PBS. Este experimento demonstra que não é preciso aplicar doses excessivas para produzir danos na parede celular e induzir a internalização do FS em células de *C. albicans*.

A viabilidade das células na área que sofreu irradiação no experimento acima pode ser avaliada por marcadores que caracterizam o dano na membrana produzido pela combinação entre luz, FS e geração de espécies reativas. Marcadores do tipo LIVE/DEADTM são soluções que contém uma mistura de dois corantes fluorescentes que marcam diferentemente células vivas e mortas. Aqui, o corante de células vivas laranja de acridina (LA) é altamente lipofílico e altamente permeante de membranas citoplasmáticas de células intactas e viáveis e rotula as mesmas com emissão no verde em 515 nm. Já o corante brometo de etídeo (BE) é impermeabilizante à membrana de células, mas rotula células com membranas plasmáticas comprometidas não viáveis com emissão em 617 nm, no vermelho. Uma vez ligado ao DNA, a sua fluorescência aumenta 30 vezes.¹⁴

Dessa forma, é possível observar de forma qualitativa se a dose aplicada foi suficiente para causar danos que levam a morte celular, comparada com a região não irradiada. O resultado pode ser visto na Figura 31a. Esta figura mostra a imagem no modo canal, em que a fluorescência foi captada entre 415 a 540 nm para o LA (verde), e entre 580 e 620 nm para o BE (vermelho). Esta região é a mesma utilizada na Figura 33c e que foi corada com LIVE/DEAD após o experimento.

A Figura 34b mostra os espectros em duas regiões destacadas, uma em azul, fora da região irradiada, e outra em amarelo, dentro da região irradiada. Como é possível ver, na área mantida do escuro, prevalecem células verdes, indicando que a maioria das células estão vivas, podendo indicar uma baixa citotoxicidade do FS no escuro. Já a região irradiada, prevalecem células avermelhadas, indicando que a maioria das células foram mortas.

O espectro confirma os resultados, mostrando que a região mantida no escuro emite majoritariamente em torno de 520 nm e a região irradiada, apesar de apresentar emissão em torno de 520 nm, emite também perto de 617 nm. Assim, pode-se concluir que uma dose mínima de 13 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ com laser contínuo de 450 nm (microscópio confocal) é suficiente para causar dano celular. Este resultado levou ao estabelecimento de um novo protocolo para IFD em células de *C. albicans*.

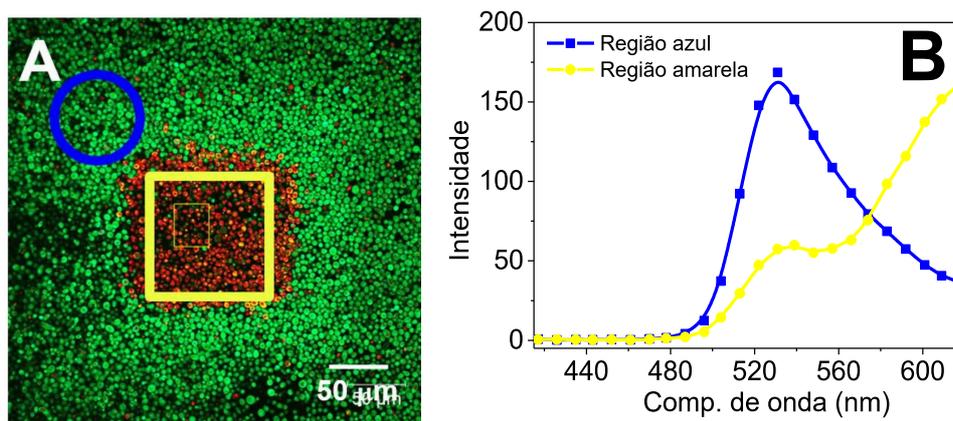


Figura 34 - a) Imagem de microscopia de fluorescência no modo canal, adquiridas de 415 a 620 nm, com marcadores LA e BE. A área destacada em ciano representa a área irradiada, e as áreas destacadas em azul e amarelo representam áreas de interesse em que foi obtido seus espectros; (b) Espectro de emissão referentes as regiões destacadas em azul e amarelo. As células com cor em verde representam as células viáveis, enquanto as avermelhadas representam as células comprometidas

Fonte: Elaborada pelo autor.

A seguir, Figura 36, será mostrado que uma pequena dose de luz LED comercial de potência 30 mW, típico de *Biotables*, é suficiente para induzir danos à membrana celular de *C. albicans* e promover rápida internalização do PDZ no meio intracelular. Este processo foi denominado de etapa de pré-iluminação e foi realizada com luz LED difusa em 450 nm com largura de banda de aproximadamente 20 nm. Assim, nesse faixa de comprimento de onda, apenas uma fração da cauda de menor energia da banda de Soret em 403 nm está sendo excitada, ou seja, de seções de choque entre 0,2 e $0,5 \times 10^{-16}$ cm² do PDZ estão sendo vistas pela luz incidente, com eficiência de excitação 10 vezes menor que aquela feita no máximo dessa banda. Mesmo assim, a luz nesse comprimento de onda foi utilizada, induzindo danos celulares irreversíveis que levam internalização rápida do PDZ.

Assim, a intenção desse experimento é verificar se uma pequena dose de luz durante o período de incubação pode aumentar a interação do FS com as células, em um comprimento de onda de 450 nm em que o FS não é muito pouco fotoexcitado, para posteriormente aplicar a iluminação de PDT em 660 nm em baixa dose para causar a morte celular. Para visualizar a internalização após a aplicação de doses baixas de luz, irradiadas em condições nominais de de 0, 1 e 5 J.cm⁻², foi utilizado o microscópio confocal para fazer imagem das células previamente incubadas com 20 μM de PDZ, como mostrado nas Figuras 32a, b e, respectivamente. As imagens foram feitas no modo canal e transmissão, sendo que a faixa espectral entre 415-535 nm é associada a autofluorescência (verde) e entre 622-692 nm à emissão do PDZ (vermelho).

Através das imagens feitas, na amostra incubada no escuro (Figura 35a), não foi possível observar interação do PDZ com as células, em que é visto apenas as células com fluorescência em verde, provinda da autofluorescência de seu núcleo. Porém, a fluorescência do PDZ já pode ser detectada na amostra que sofreu pré-iluminação de 1 J.cm^{-2} (Figura 35b), sobrepondo a autofluorescência. Esta pequena dose já foi suficiente para promover a internalização do FS nas células. Na amostra que sofreu dose de 5 J.cm^{-2} , todas as células apresentaram FS em seu interior, também de forma mais homogênea.

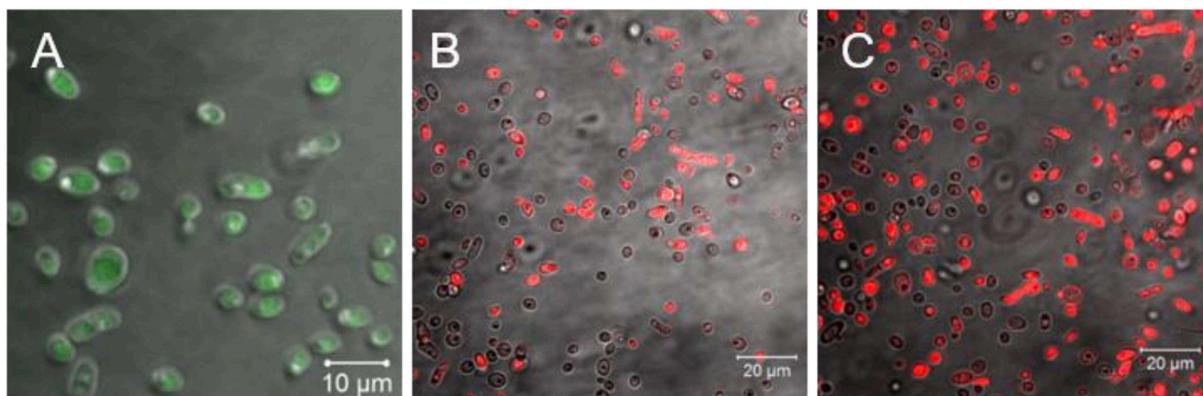


Figura 35 - Células de *C. albicans* incubadas com $20 \mu\text{M}$ de PDZ e pré-iluminações com LED em 450 nm e doses de: (a) 0 J.cm^{-2} ; (b) 1 J.cm^{-2} ; (c) 5 J.cm^{-2} .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses resultados indicam que uma pré-iluminação de baixa dose com LED em 450 nm durante o período de incubação causa pequenos danos à parede celular, aumentando a internalização do FS nas células. Após sofrerem a etapa de pré-iluminação, as células podem receber a iluminação de IFD no comprimento de onda mais adequado em 660 nm e, em baixa dose, promover na sequência morte celular mais efetiva com uma concentração maior de PDZ no meio intracelular. Este resultado pode ser utilizado como um protocolo para IFD mais eficaz. A proposta é realizar a incubação do FS e ao mesmo tempo fazer as sequências de pré-iluminação da amostra através da aplicação de uma dose mínima, mas que seja suficiente para induzir danos à membrana celular, seguida de um intervalo de tempo curto de 2 min , suficiente para a internalização efetiva do FS no meio intracelular. Finalmente, as amostras estão aptas para receber IFD em baixa dose. Com isso, aplica-se baixa dose de luz e de fármaco, economizando FS e tempo de tratamento.

Ensaio de viabilidade celular utilizando o protocolo convencional sem pré-iluminação de dose única e aplicando somente pré-iluminações seriadas do protocolo sugerido acima foram realizadas para confirmar se há um aumento na eficácia do tratamento utilizando o

segundo protocolo sugerido nesse trabalho. Na iluminação seriada, doses de $1,0 \text{ J.cm}^{-2}$ seguidas de um intervalo sem iluminação de 2 min para a internalização do PDZ foram aplicadas em série até atingir a dose utilizada no protocolo convencional. Aqui foi utilizada iluminação por LED's no comprimento de onda de 660 nm com exposição de forma contínua e seriada, para das doses de luz finais de 5 J.cm^{-2} , 10 J.cm^{-2} e 20 J.cm^{-2} .

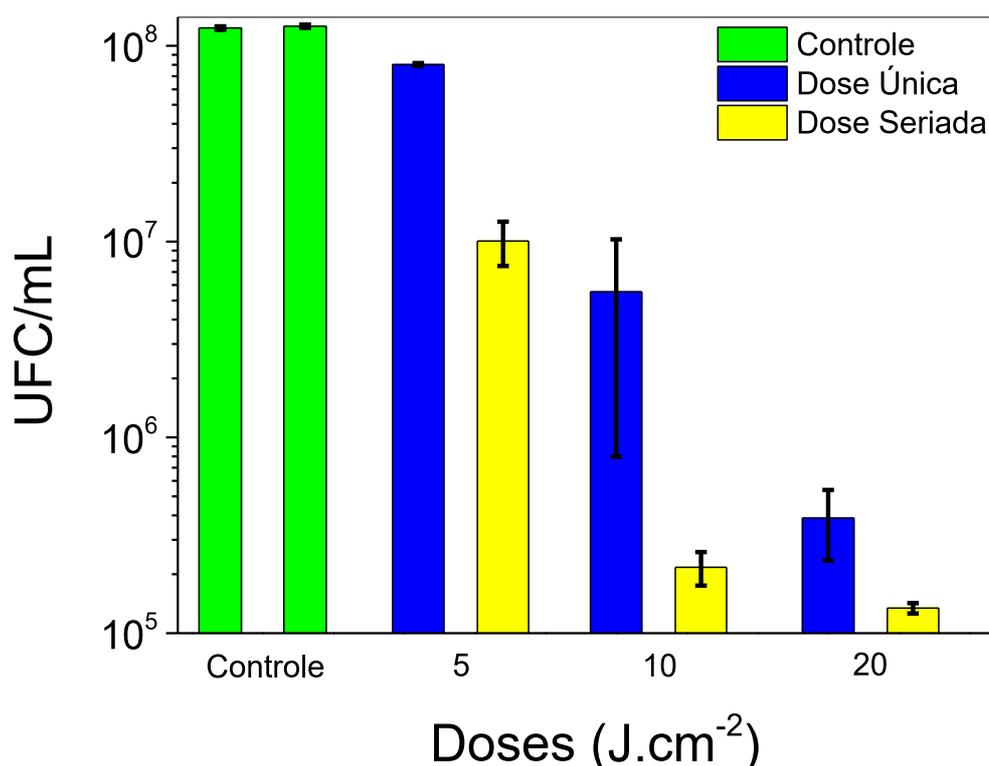


Figura 36 - Viabilidade celular de *C. albicans* com interação com o PDZ iluminado com LED em comprimento de onda de 660 nm, com dose exposta de forma contínua (barras azuis) e seriada (barras amarelas), as barras verdes são os controles (sem luz e sem FS) e (sem luz e com FS).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico de barras apresentado na Figura 36 compara a contagem UFC de células em função da dose aplicada para a aplicação seriada e única. O resultado indica que para a mesma dose de luz, a exposição seriada de pré-iluminação apresentou uma supressão na viabilidade celular bem maior do que a exposição contínua da fonte de luz. Para a dose de 5 J.cm^{-2} a exposição seriada apresentou uma supressão na viabilidade em uma ordem no UFC/mL, enquanto a exposição contínua suprimiu pouco a viabilidade. O mesmo padrão de supressão se manteve para as outras doses, 10 e 20 J.cm^{-2} , cuja a supressão para a exposição seriada foi de 2 ordens no UFC/mL para ambas as doses, já para a exposição contínua apenas para a dose de 20 J.cm^{-2} houve uma supressão de 2 ordens no UFC/mL.

Vários aspectos desse experimento envolvendo o valor da dose de luz e de FS, o intervalo para incorporação e a fotodegradação do FS devem ser considerados para aumentar a eficiência da fototerapia. Imagens de tempo de vida (FLIM) e medidas da recuperação da fluorescência após fotodegradação mostradas a seguir podem ajudar a entender melhor os resultados de presente seção.

6.1.5 Tempo de vida de fluorescência PDZ

O decaimento temporal da fluorescência do PDZ pode dar informação do arranjo molecular e da influência do ambiente sobre as propriedades da molécula através da comparação direta entre os tempos de vida avaliados da dependência temporal. Como nas imagens espectral, a microscopia confocal por varredura permite obter imagens em que cada pixel está associado a um decaimento temporal da emissão. Em vez de contraste espectral, as imagens de tempo de vida, FLIM, possuem contraste por tempo de vida, o que é bastante interessante, pois cada interação do fotossensibilizador com o ambiente e com sua vizinhança pode alterar fortemente o tempo de decaimento.

Para o caso do PDZ, as imagens de tempo de vida de emissão forneceram informações distintas para quatro ambientes a serem considerados na análise: em solução aquosa; depositado em uma monocamada compacta sobre vidro (tomado para comparação), incorporado à parede celular (área não irradiada) e internalizado no citoplasma das células (área irradiada) para diferentes concentrações do PDZ.

No primeiro experimento mostrado na Figura 37, as imagens FLIM foram feitas em uma região que contém a área irradiada de 106 nm x 106 nm central e a área não irradiada externa para comparação. As medidas foram feitas após o processo de internalização descrito na seção anterior irradiando com laser 2P pulsado em que se utilizou uma concentração nominal de 20 μ M de PDZ e foi medido apenas fluorescência do FS entre 640 e 670 nm.

As Figura 37a e b destacam os decaimentos temporais da emissão do PDZ em escala monolog e os histogramas de tempos de vida, respectivamente, obtidos para o FS a partir das imagens FLIM à esquerda para ambientes distintos, a saber: solução aquosa de PBS; depositado sobre o vidro em solução aquosa; na parede celular na região não irradiada; e no interior das células na região irradiada. Nesta figura podem ser vistas as imagens de tempo de vida FLIM c) da parede celular em destaque na região não irradiada; d) a imagem ampliada contendo a região irradiada central e a não irradiada mais externa; e) da superfície do vidro

contendo depósito de PDZ. Uma imagem de microscopia confocal no modo canal pode ser vista também (f) para comparação com a imagem d. Nas imagens FLIM, o contraste de cor falsa representam tempos de vida de fluorescência menores para regiões mais azuladas, enquanto as regiões mais avermelhadas apresentam tempos de vida de fluorescência maiores, conforme a escala mostrada abaixo das imagens.

O decaimento da emissão em cada pixel da imagem teve tempos de vida mensurados através de ajuste dado pela superposição de duas exponenciais ($N=2$ na equação (4.6) com tempos de decaimento distintos. Na Tabela 1 é possível ver os resultados de tempo de vida médio em cada situação analisada, obtidos a partir das curvas de decaimento e calculado com a Equação 4.6. Também foi avaliado o tempo de vida médio para cada pixel, que foram usados para fazer os histogramas de tempos de vida avaliados para todos os 1024×1024 pixels da imagem. Os histogramas foram normalizados para comparação de forma que o seu máximo tivesse valor igual a uma unidade.

A Figura 37a destaca os decaimentos típicos encontrados nos ambientes analisados descritos acima. O decaimento é monoexponencial com tempo de decaimento em torno de 3,75 ns para o PDZ interagindo com a parede celular. Moléculas isoladas normalmente possuem decaimento da emissão através de um único processo descrito pelo tempo de vida natural da molécula. Já nos outros ambientes vistos pela molécula, o decaimento é biexponencial descrito por um tempo curto entre 0,6-0,6 ns, mas que diferem pelo tempo longo, que varia entre 2,0-3,8 ns. Os tempos curtos são dados por processos não radiativos que suprimem rapidamente o estado excitado devidos às interações moleculares.^{61, 125} Os tempos longos estão associados aos decaimentos dos estados excitados do PDZ que sobreviveram à aniquilação rápida dos processos não radiativos envolvendo agregados moleculares do FS. Nesse caso, as variações do tempo de decaimento se devem às perturbações dos estados moleculares do FS por diferentes interações nos distintos ambientes em que ele se encontra. Estas diferentes interações produziram as variações na posição espectral da emissão do PDZ na Figura 37c.

Na Figura 37b se encontram os histogramas para os ambientes estudados e que representam de forma mais fidedigna a distribuição de todos os tempos de vida médios nessas regiões. Nas paredes celulares estes tempos de vidas se distribuem em torno de 3,8 ns (curva contínua em azul). O tempo de vida médio cai para valores em torno de 2 ns no interior das células após sofrerem irradiação e posterior internalização do PDZ.

Na Figura 37b se encontram os histogramas para os ambientes estudados e que representam de forma mais fidedigna a distribuição de todos os tempos de vida médios nessas

regiões. Nas paredes celulares estes tempos de vidas se distribuem em torno de 3,8 ns (curva contínua em azul). O tempo de vida médio cai para valores em torno de 2 ns no interior das células após sofrerem irradiação e posterior internalização do PDZ. Nestas condições, a concentração de PDZ é, como foi visto, bastante alta na faixa de mM o que equivale a 1 molécula por 160 nm^3 , ou dentro de uma de um volume esférico de raio $r \approx 3,5 \text{ nm}$, a uma distância média de 7 nm uma das outras. A estas distâncias, uma molécula excitada passa a ver outra no estado fundamental por interação de dipolares antes do processo de emissão, o que permite a transferência de energia do tipo Foerster ¹²³⁻¹²⁴ eficiente entre a molécula de PDZ excitada doadora para a molécula não excitada aceitadora no ambiente intracelular.

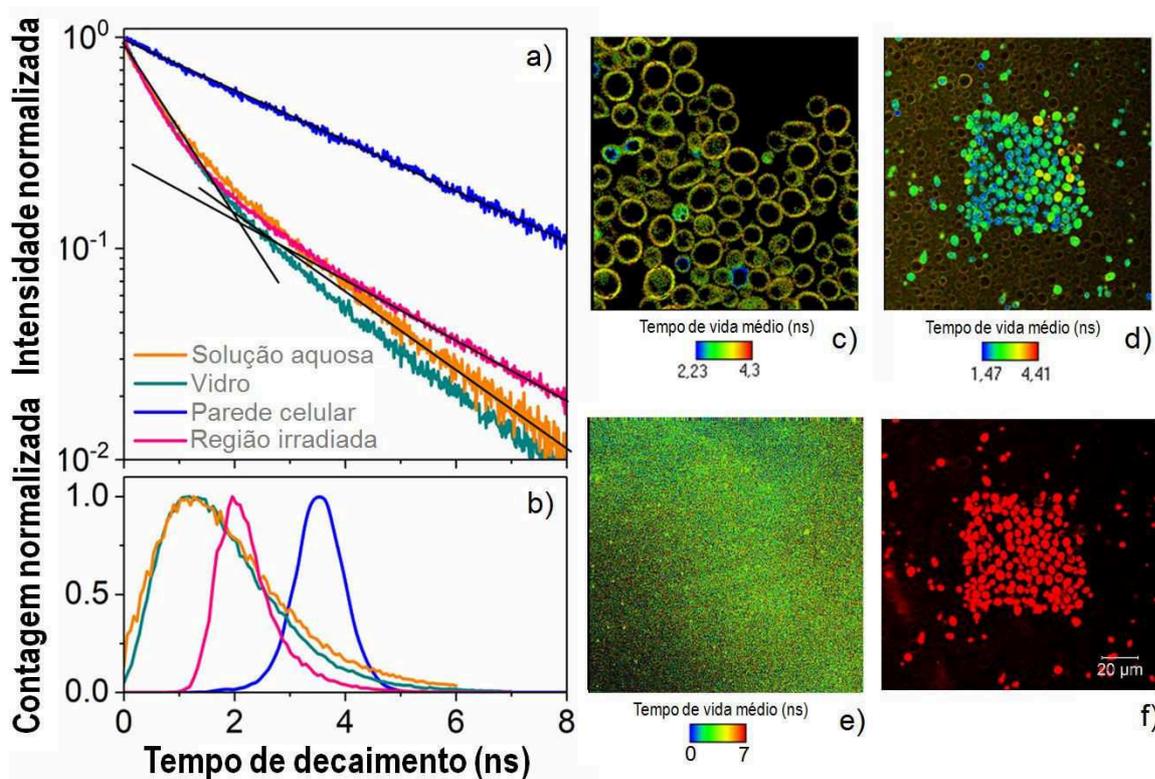


Figura 37 - a) Decaimento temporal da emissão do PDZ em escala monolog e b) histograma de tempos de vida obtidos em diferentes ambientes. À direita, imagens de tempo de vida, FLIM, relacionadas aos gráficos à direita, c) a parede celular; as regiões irradiadas interna e não irradiada externa, d) região ampliada para evidenciar que apenas onde a irradiação ocorreu há uma maior presença de PDZ e) superfície do vidro; f) imagem de imagem de microscopia confocal no modo canal para comparação com a imagem d). A concentração nominal utilizada do PDZ foi de $20 \mu\text{M}$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os tempos de vida médios do PDZ caem mais ainda e se distribuem em torno de 0,5 ns para o PDZ em solução de PBS fora das células e para o PDZ depositado sobre a superfície do vidro do poço para a microscopia. No caso do vidro, ficou demonstrado que estas moléculas formam uma monocamada densa devido a interações dipolares fracas do tipo

ponte de hidrogênio entre os hidrogênios dos grupamentos metila PDZ com as hidroxilas do vidro ou quartzo.

Esta estrutura formada por um empacotamento lateral denso do tipo J permite uma transferência de energia não radiativa eficiente entre as moléculas excitadas e aquelas no estado fundamental nas vizinhas, o que produz fortemente o tempo de vida do estado excitado. Agregados do tipo J devem estar presentes no caso do PDZ em solução aquosa fora das células e que também reduz os tempos de vida para a faixa de 0,5 ns. Estes agregados devem se desfazer quando em contato com a parede celular lipofílica das células através da desestabilização da interação dipolar entre as moléculas do agregado, aumentando consideravelmente o tempo de vida do PDZ nesse ambiente.

Tabela 2 - Tempo de vida de fluorescência do PDZ em diferentes situações como: sobre o vidro, solução aquosa, área irradiada, parede celular

Localização do PDZ	Tempo de decaimento curto (ns)	Tempo de decaimento longo (ns)
Sobre o vidro	0,58	2,07
Solução aquosa	0,55	2,12
Área irradiada	0,54	2,72
Parede celular	-	3,74
Área total	2,11	3,52

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados de tempo de vida da Figura 37a mostram uma grande dependência do tempo de vida do PDZ com o ambiente para o qual está molécula está interagindo. É interessante, no entanto, fazer imagem de tempo de vida durante a incorporação do FS descrito na seção 6.1.4, uma vez que a concentração do PDZ no interior das células irradiadas sofre grande aumento durante este processo. Além disso, os processos não radiativos são efetivos quando essa molécula agrega em solução aquosa ou quando forma monocamada densa sobre o vidro e quando está em alta concentração após a internalização induzida por luz.

Nas Figura 38a e b se pode ver os decaimentos temporal da emissão do PDZ em escala monolog e os respectivos histogramas obtidos dentro de células presentes na área irradiada por laser 2P após aplicar diferentes doses. Os dois gráficos também mostram o decaimento e o histograma avaliados na mesma área, porém medidos após esperar por 20 min a incorporação no escuro depois da aplicação da última dose de 30 J/cm² (linha cinza). Para comparação, foram incluído o decaimento e o histograma avaliados na parede da célula de *C. Albicans* na área ampliada não irradiada depois do experimento (linha preta). A concentração nominal

utilizada do PDZ foi de 20 μM . As curvas contínuas em vermelho são os decaimentos obtidos pelo ajuste biexponencial.

Pode-se ver nas Figura 38a e b que o tempo de decaimento da emissão do PDZ diminui com a dose de luz aplicada e continua caindo no escuro após 20 min da aplicação da última dose de 30 J/cm^2 . Estas reduções no tempo de vida já ocorrem com 3 J/cm^2 , a dose de luz que está no limiar daquela que produz dano suficiente para promover a internalização induzida por luz.

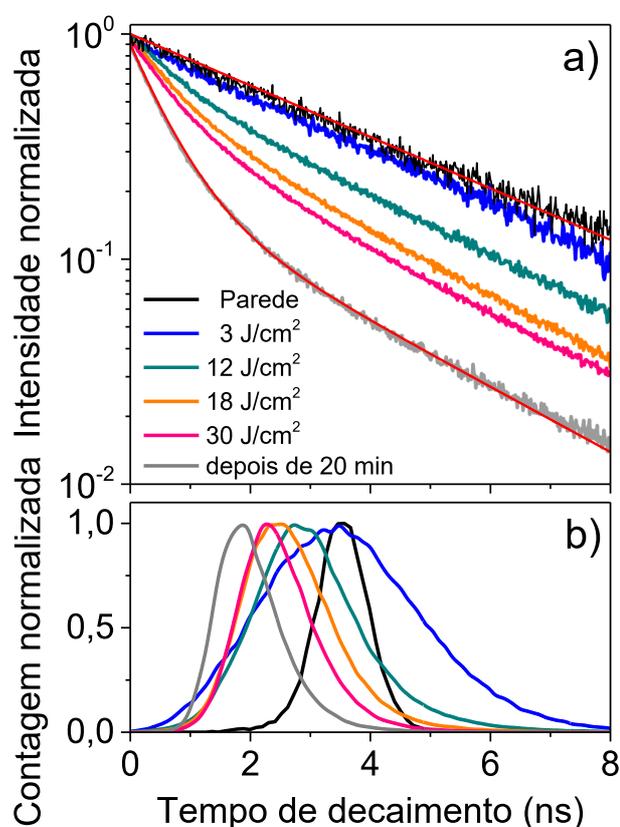


Figura 38 - a) Decaimento temporal da emissão do PDZ em escala monolog e b) histograma de tempos de vida obtidos dentro de células presentes na área irradiada por laser 2P após aplicar diferentes doses. Os dois gráficos também mostram decaimento e histograma na mesma área, porém medidos após esperar incorporação por 20 min da aplicação da última dose de 30 J/cm^2 (linha cinza). Para comparação, foi incluído o decaimento e o histograma avaliados na parede da célula de *C. albicans* na área ampliada não irradiada depois do experimento. A concentração nominal utilizada do PDZ foi de 20 μM . As curvas contínuas em vermelho são os decaimentos obtidos pelo ajuste biexponencial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A incorporação aumenta com o aumento da dose, elevando a concentração do FS no meio intracelular. Esse aumento da concentração na faixa de mM pode promover a agregação molecular que gera canais não-radiativos adicionais e que competem com a emissão

reduzindo o tempo de vida na mesma proporção. Além disso, a taxa de transferência de elétrons singletos excitados para estados tripleto é reduzida por causa desta competição, diminuindo a probabilidade de gerar espécies reativas. Assim, aumentar a concentração no meio intracelular acima de um dado valor pode não ser vantajoso quando taxas das perdas não radiativas superarem as taxas de formação de espécies reativas com formação de agregados moleculares.

É importante ver que a forte redução do tempo de vida com o aumento da dose não está associada com o processo de fotodegradação molecular e sim com o aumento da concentração do PDZ no meio intracelular. A internalização continua a aumentar no escuro durante o intervalo de tempo de 20 min após a aplicação da dose de 30 J/cm^2 . A concentração mais alta no término dos 20 min foi demonstrada na Figura 38a. Já o tempo de vida cai proporcionalmente para os valores altos de concentração do PDZ após o intervalo de 20 min.

6.1.6 Recuperação da fluorescência após fotodegradação (FRAP)

A Figura 39 mostrou que a exposição de forma seriada utilizando iluminação LED produziu morte celular de forma mais eficaz. Na presente seção, serão apresentadas medidas de microscopia confocal com exposição seriada utilizando luz laser (Figuras 36a e b) e de medidas da recuperação da fluorescência após fotodegradação, FRAP (Figura 39c e d), para melhor entender os resultados daquela seção.

No primeiro experimento, que envolve a entrega de doses rápidas seriadas, as intensidades das fluorescências avaliadas na ROI1 (área exposta às doses) e na ROI 2 (célula) (Figura 39b) sofrem pouco aumento após a primeira dose (intervalo I), mas sofrem aumento brusco após a aplicação da segunda dose (intervalo II). As doses posteriores não foram efetivas para produzir dano na membrana celular, porém produziram uma pequena fotodegradação durante a entrega da dose antes dos intervalos IV, V e VI. É de se esperar que a maior parte dos danos na parede celular tenha ocorrido na entrega das duas primeiras doses. O aumento contínuo da fluorescência avaliada na ROI 1 após a segunda dose se deve à internalização do PDZ através dos defeitos produzidos nas paredes celulares na primeira e na segunda dose para a maioria das células irradiadas. A queda na intensidade avaliada na ROI 3 (célula) se deve ao vazamento do material intracelular para o exterior da célula mostrado a seguir. A intensidade constante da emissão do PDZ avaliada na ROI 2 fora da região iluminada demonstra a estabilidade durante os 40 min de experimento.

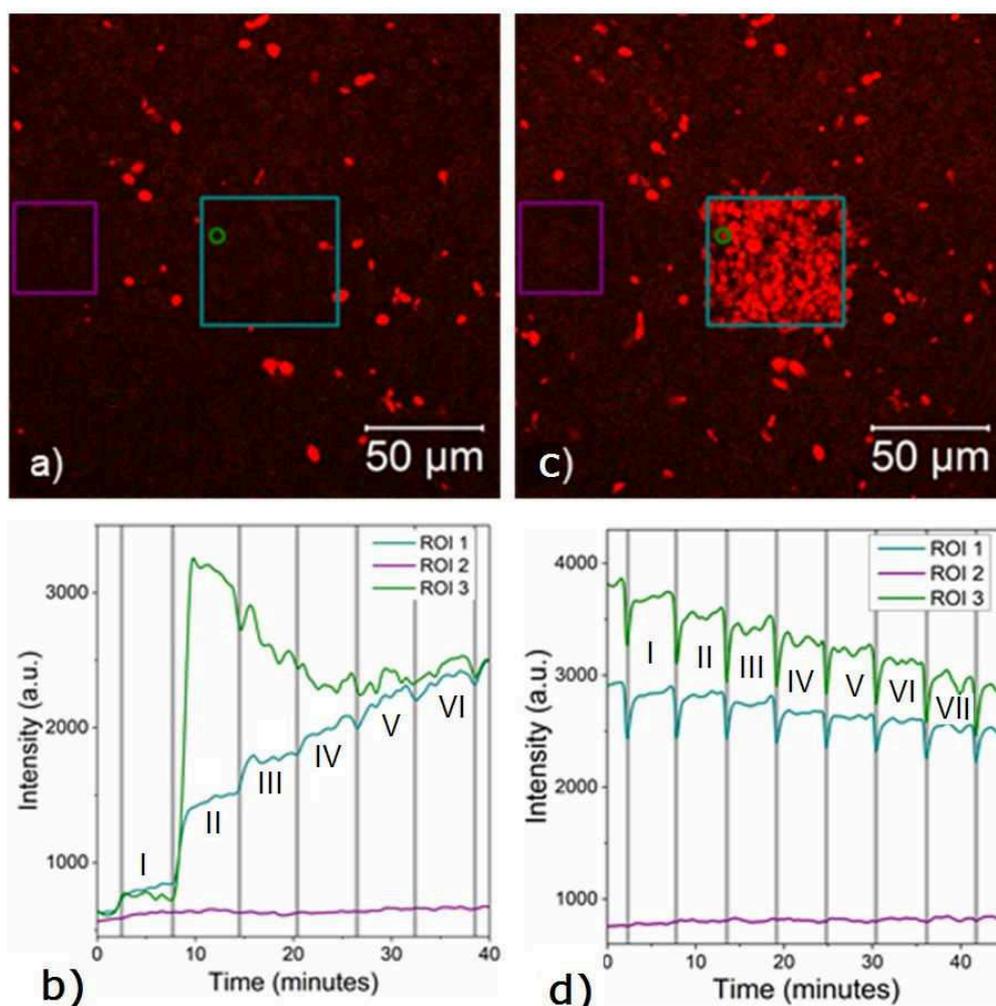


Figura 39 - Medidas de série temporal de microscopia confocal com exposição seriada utilizando luz laser (a) e b)) e de medidas da recuperação da fluorescência após fotodegradação, FRAP (c) e d)). Os dois experimentos foram realizados utilizando a mesma área da amostra contendo 10^7 células de *C. albicans* em PBS contendo PDZ a 20 μM. A mesma configuração experimental foi estabelecida nas duas séries temporais utilizadas no experimento para as quais imagens foram feitas a cada 30 segundos para acompanhar a incorporação do PDZ após entregar 8 doses seriadas (marcadas pelas barras verticais), cada uma de 20 J/cm² no primeiro experimento. A dose entregue durante a fotodegradação (marcadas pelas barras verticais) no segundo experimento foram estabelecidas para produzir uma queda de 20% na intensidade de fluorescência do PDZ.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O segundo experimento (Figura 39c e d) envolveu as mesmas áreas e a mesma configuração estabelecida da série temporal utilizadas no experimento anterior para a qual imagens foram feitas a cada 30 segundos. Porém, as regiões de interesse foram utilizadas para acompanhar a recuperação da intensidade do PDZ após uma série de fotodegradações (na posição temporal das barras verticais) realizadas em intervalo de tempo muito curto. O intervalo de tempo para acompanhar a recuperação foi de 6 min (12 imagens) entre duas doses. A dose de luz durante cada fotodegradação foi estabelecida para produzir uma queda

de 20% na intensidade de fluorescência do PDZ. Figura 36c mostra a imagem no tempo zero contendo a área da ROI 1 (cor ciano) onde foram feitas as fotodegradações seriadas e o acompanhamento da recuperação da intensidade da fluorescência após cada fotodegradação; a ROI 2 (cor magenta) foi utilizada como referência para avaliar a estabilidade temporal durante os 40 min de experimento; e a ROI 3 na qual a recuperação da fluorescência foi acompanhada em uma única célula.

Na Figura 39d se observa a queda acentuada da fluorescência do PDZ no plano confocal no interior das células após cada etapa de fotodegradação (marcadas pelas barras verticais) e o processo rápido de recuperação da emissão tanto para a área irradiada (ROI 1) quanto para a área de uma única célula (ROI 3). Apenas 2/3 da fluorescência é recuperada em aproximadamente 1 min através da troca das moléculas fotodegradadas no plano confocal com aquelas não degradadas fora desse plano. Este resultado indica que 33% do PDZ está interagindo fortemente com organelas do meio intracelular. As outras moléculas de PDZ (66 %) estão livres e estão continuamente sendo trocadas com aquelas provindas da solução de PBS fora das células. A queda contínua da intensidade da fluorescência do PDZ avaliada no interior das células dentro da ROI 1 e de uma célula na ROI 3 ao longo do experimento se deve à recuperação da fluorescência não ser 100% após cada etapa de fotodegradação. A intensidade constante da emissão do PDZ avaliada na ROI 2 demonstra a estabilidade durante os 40 min de experimento.

6.1.7 Propagação ação PDZ

A internalização do PDZ induzida por luz se processa em três etapas: a interação efetiva desse FS com a parede celular, geração eficiente de espécies reativas nesse ambiente celular e produção de dano irreversível na parede. Medidas de tempo de vida revelaram que o PDZ se encontra na forma de agregado molecular do tipo J em solução aquosa através de interações fracas do tipo pontes de hidrogênio. Estas ligações são desestabilizadas na parede celular e nas superfícies de vidro ou quartzo. No primeiro ambiente as moléculas estão livres e, portanto, na forma ideal para a geração de oxigênio singleto. Na segunda superfície de vidro utilizada como referência, o PDZ uma forma monocamada estável através de arranjo lateral compacto de moléculas deitadas cuja interação por ligações de hidrogênio maximiza a estabilidade da camada. Porém, essa configuração não é ideal devido a competição com

processos de migração não-radiativos entre moléculas que compete com o canal que resulta na geração de espécies reativas.

No entanto, a eficiência na produção de danos na parede celular pode ser melhorada por processos cooperativos entre células., como será mostrado abaixo através da análise das imagens de séries temporais feitas por microscopia confocal.

O primeiro exemplo de efeitos cooperativos entre células pode ser visto na sequência de três imagens geradas por microscopia confocal (Figura 40a, b e c) utilizando laser 2P em 800 nm que mostram detalhes de três momentos do acompanhamento desse processo. A primeira imagem (Figura 40 a), o círculo azul delimita a região em que a célula central que não sofreu internalização, mas que está em contato com outra que possui PDZ internalizado em alta concentração. No segundo momento (Figura 40 b), o PDZ internalizado passa para a parede celular da célula central através de processos que se assemelham com a difusão através de membrana osmótica pelo r contato celular. Finalmente, é possível ver na imagem (Figura 40 c) que o PDZ se encontra incorporado em alta concentração no citoplasma da célula central. Uma irradiação posterior poderá produzir dano celular que torna a célula inviável partir desse instante.

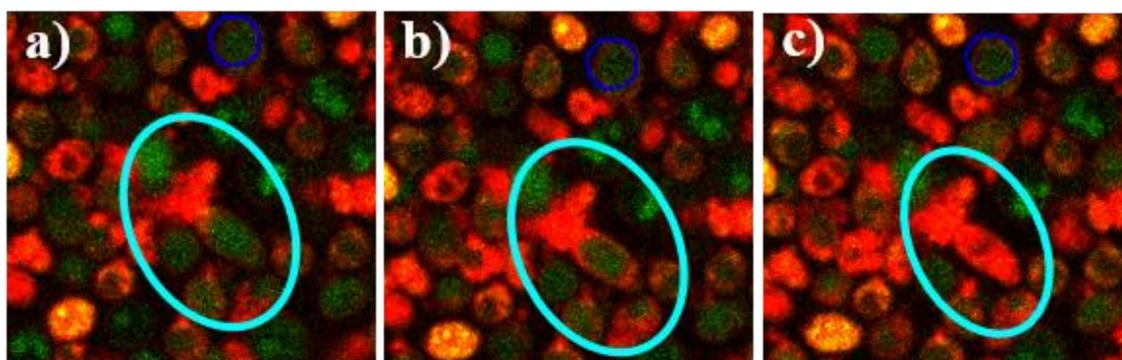


Figura 40 - Acompanhamento da interação e incorporação da PDZ em uma célula de *Candida albicans* apresentando que a incorporação acontece após toda a parede ser preenchida com o FS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma outra via envolvendo processos cooperativos entre células se processa, sem haver contato, através de material intracelular expelido por uma célula e que transfere uma fração de PDZ livre e em alta concentração nesse meio para outras células presentes em sua vizinhança. Este processo se transmite em cadeia para outras células como pode ser visto nas imagens tomadas temporalmente em sequência da Figura 41. Inicialmente, a imagem da Figura 41a contém uma célula central indicada pela seta branca e que contém PDZ na parede, mas que ainda não possui PDZ internalizado. Em um segundo momento (Figura 41b), uma

célula na vizinhança sofre rápida internalização e expelle material intracelular (seta verde) que internaliza parcialmente na célula central. A sequência mostra imagem (Figura 41c) com o PDZ totalmente internalizado no citoplasma da célula central que, por sua vez, expelle material citoplasmático (seta amarela na Figura 41d) que passa PDZ para a célula vizinha (Figura 41d). A imagem da Figura 41e mostra o possível conteúdo expelido pela celular microbiana após a IFD, e finalmente, a Figura 40f mostrando o conteúdo expelido sendo diluído na solução aquosa.

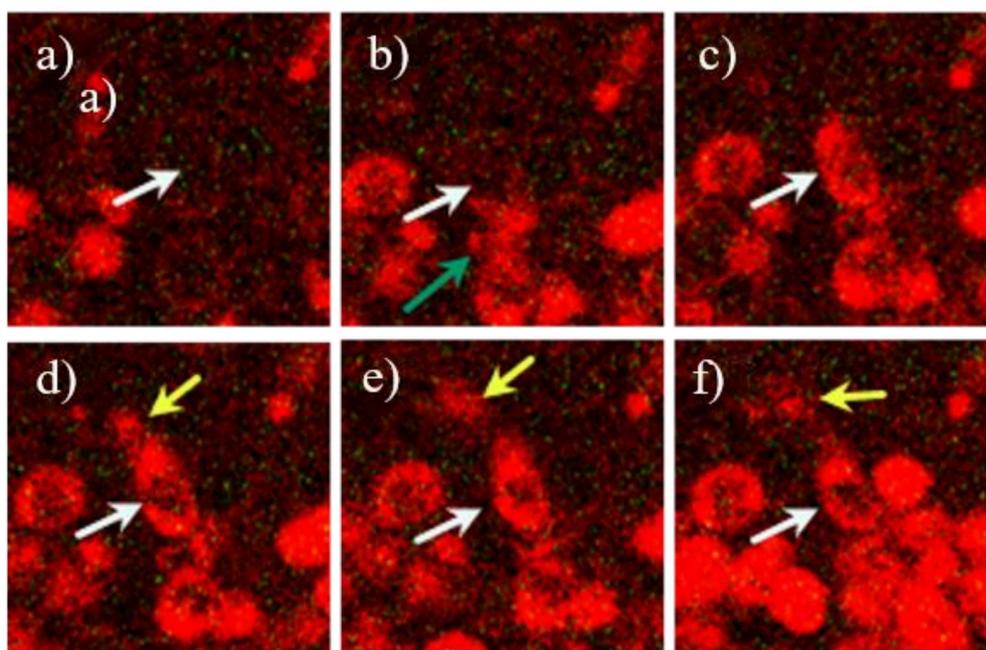


Figura 41 - Acompanhamento temporal de uma célula sadia que recebe um substrato de uma outra célula comprometida que induz uma incorporação do PDZ.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A suposição inicial da inativação celular a partir de moléculas de PDZ provinda do meio aquoso em *Candida albicans* pode ser importante em um primeiro estágio da internalização. Porém, o aumento brusco da intensidade da emissão do PDZ observado na seção anterior durante a iluminação de grandes áreas e as imagens sequenciais apresentadas na presente seção sugerem que o contato entre células e/ou o resíduo de citoplasma expelido por células contendo PDZ internalizado em alta concentração podem atuar como um agentes secundários que atuam em cadeia para comprometer células próximas e promover a internalizações em células vizinhas. Estes processos cooperativos podem aumentar a eficiência da inativação em *Candida albicans* e outros sistemas celulares. Este resultado é inédito na literatura e poderá ser útil para inativar estruturas densas de células de *C. Albicans* em biofilmes, por exemplo.

7 Resultado - Interação do curcumina com *C. albicans*

Nesta seção será apresentado os resultados de incorporação curcumina. com *C. albicans*, os experimentos que seguiram foram de acompanhamento da incorporação por meios escuros, ou seja, sem a presença de luz e experimentos de incorporação mediados por luz de forma seriada e por luz única.

7.1 Caracterização espectroscópica da curcumina

A caracterização espectroscopia das 4 formulações de curcumina são em relação a sua absorvância em solução PBS. Seguida de uma caracterização de sua estabilidade temporal, térmica e com variação de pH, para a curcumina Sigma.

O primeiro experimento realizado foi obter o espectro de absorvância das formulações utilizadas no intervalo do espectro visível (300 a 800 nm). Todas as formulações estavam com uma concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-2}$ dissolvido em 2 mL de solução PBS, em temperatura ambiente de $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mesmo com processos diferentes de obtenção as absorvâncias características são preservadas.

Pela Figura 42 ilustra o espectro das quatro formulações utilizadas, a curcumina Alfa apresenta uma banda de absorvância em 420 nm e uma segunda banda em 350 nm com uma FWHM entre os comprimentos de onda de 317 nm e 482 nm, a curcumina Beta apresenta uma banda de absorção em 420 nm, porém a banda mais intensa é em 360 nm e com FWHM entre os comprimentos de onda de 300 nm e 481 nm, a curcumina Gama apresenta uma única banda de absorção em 415 nm, com FWHM entre os comprimentos de onda de 358 nm e 470 nm e a curcumina Sigma apresenta uma banda de absorção em 425 nm e uma segunda banda de absorção de menor intensidade em 360 nm e com FWHM entre os comprimentos de onda de 307 nm e 481 nm.

Através da Figura 42 é possível verificar que todos os espectros de absorvância têm um pico de absorção em 420 nm, e uma pico de absorção em 370 nm apenas para as curcuminas Beta e Sigma. A banda de absorção para todas as curcuminas em estudo estão entre 350 e 550 nm, sendo excitada pela luz azul em 450 nm. Para os experimentos de

incorporação foi necessário verificar a estabilidade em solução salina PBS e estabilidade térmica para identificar os limitantes da utilização da curcumina.

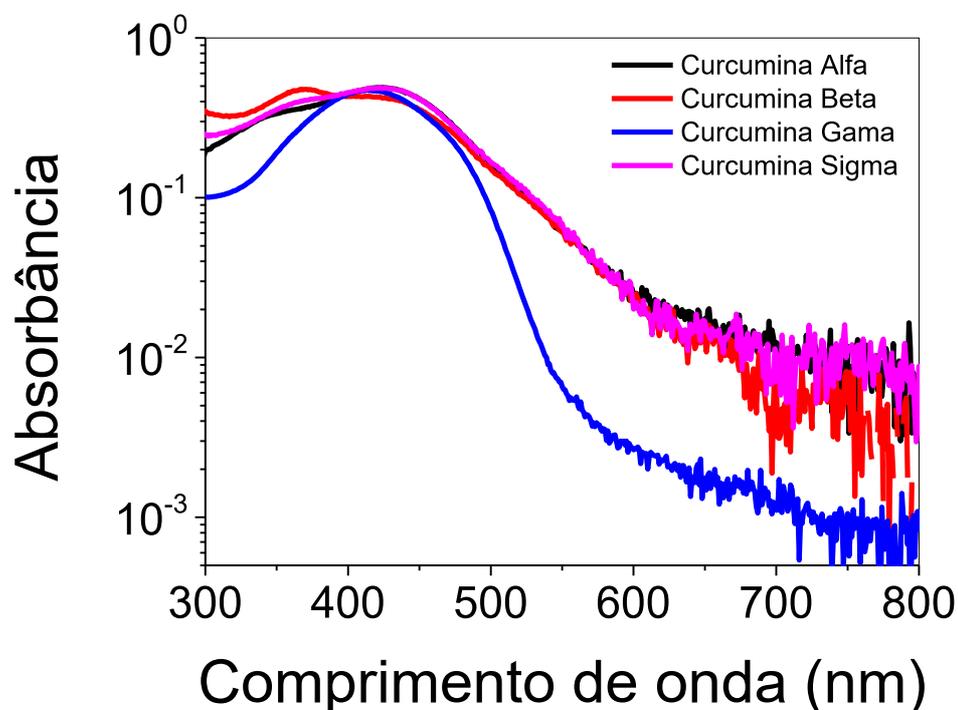


Figura 42 - Espectro de absorvância para as quatro formulações de curcumina utilizada, curcumina Alfa (preto), Beta (vermelho), Gama (azul) e Sigma (rosa).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os acompanhamentos térmicos utilizaram a curcumina Gama para identificar as condições limite de trabalho para a incorporação com as células da *C. albicans*, o motivo desta escolha foi devido ao fato desta curcumina apresentar uma única banda de absorvância, e conseqüentemente, podendo ser utilizada como padrão para as demais curcuminas do estudo.

Visto pela Figura 43a a curcumina Gama apresenta uma estabilidade temporal no intervalo de 30 minutos com uma variação na intensidade da absorvância em 415 nm de 0,16 ABS. Mostrando que a curcumina Gama tem uma boa estabilidade em uma temperatura média de 25°C.

Quando a solução é aquecida até 70 °C já é possível verificar que uma variação considerada de 5°C prejudica a absorção em 415 nm, como pode ser verificado na Figura 43b, a intensidade é decrescida em 0,3 ABS, que diminui continuamente até a temperatura de 70°C, com intensa redução até 40°C. Este experimento possibilita correlacionar a quantidade de moléculas de curcumina viável, pois para aplicações clínicas é esperado uma temperatura de trabalho em torno de 35°C.

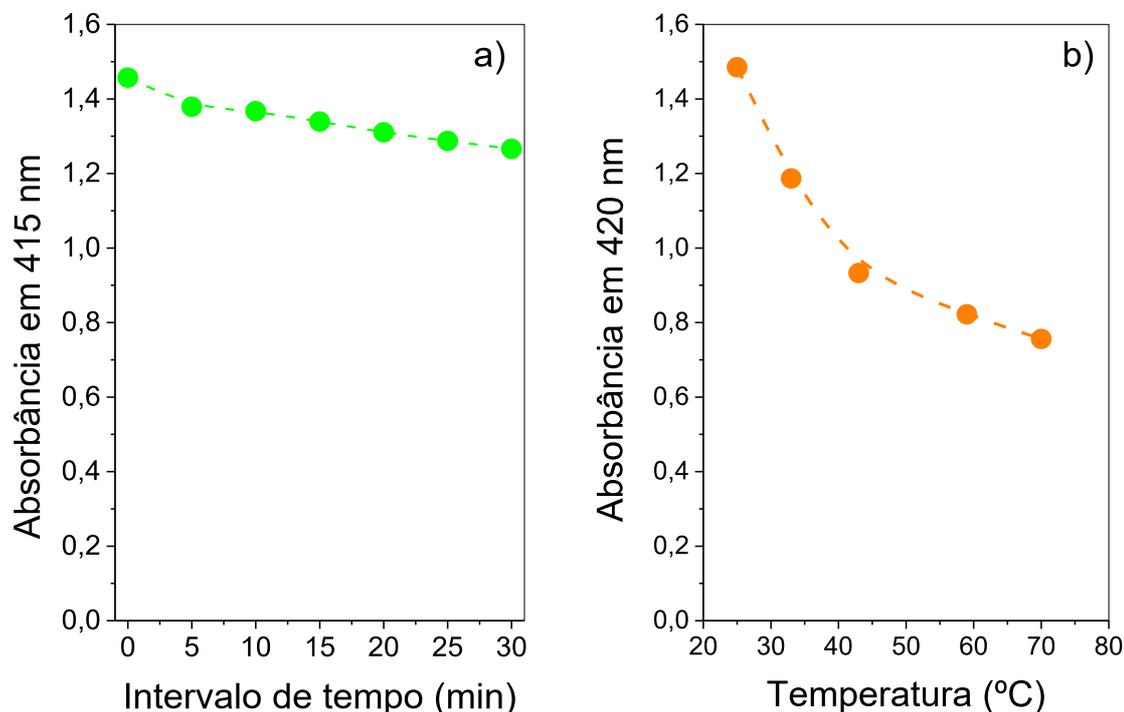


Figura 43 - (a) Acompanhamento temporal da curcumina Gama, indicando a estabilidade térmica em um intervalo de 30 minutos, variando de 5 °C. (b) Acompanhamento térmico da curcumina Gama dentro de um intervalo de temperatura de 25 °C a 70 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outra estabilidade analisada foi em relação ao pH que a solução de PBS se encontrava, o pH padronizada para os experimentos é de 7,4, uma solução neutra. Contudo, foi observado que a curcumina em contato com as células de levedura apresentava uma forma livre de suas moléculas, ou seja, não havia formação de agregados que diminuam a eficiência da molécula de curcumina.

Como a parede celular tem características mais ácidas devido a presença de lipídeos e polissacarídeos na formação em sua estrutura, foi levantado a hipótese de que o pH poderia alterar a estabilidade da curcumina em solução, uma vez que, a molécula esteja livre ela pode ser utilizada em uma ação fotodinâmica se estiver próxima de uma biomolécula.

Utilizando esta premissa foi realizado um experimento alterando o pH original de uma solução PBS padronizada em 7,4. Para elevar o pH foi utilizado para a titulação uma solução básica de NaOH a 1 molar e para diminuir o pH foi utilizado para a titulação uma solução ácida de HCl a 3 molar.

Este experimento utilizou soluções de PBS com valores de pH de 5,0; 6,0; 7,4; 8,0 e 9,0 e uma solução de etanol 99,8% P.A. O álcool é utilizado como solução referência, pois é

um solvente de curcumina. Após padronizar as soluções tituladas com o auxílio de um phmetro foi adicionado curcumina dissolvida em etanol a partir de uma solução de 5,0 mg.mL⁻¹ (solução estoque) curcumina Sigma, que ao final cada solução teria um volume final de 2,0 mL com uma concentração de curcumina Sigma de 20 µg.mL⁻¹.

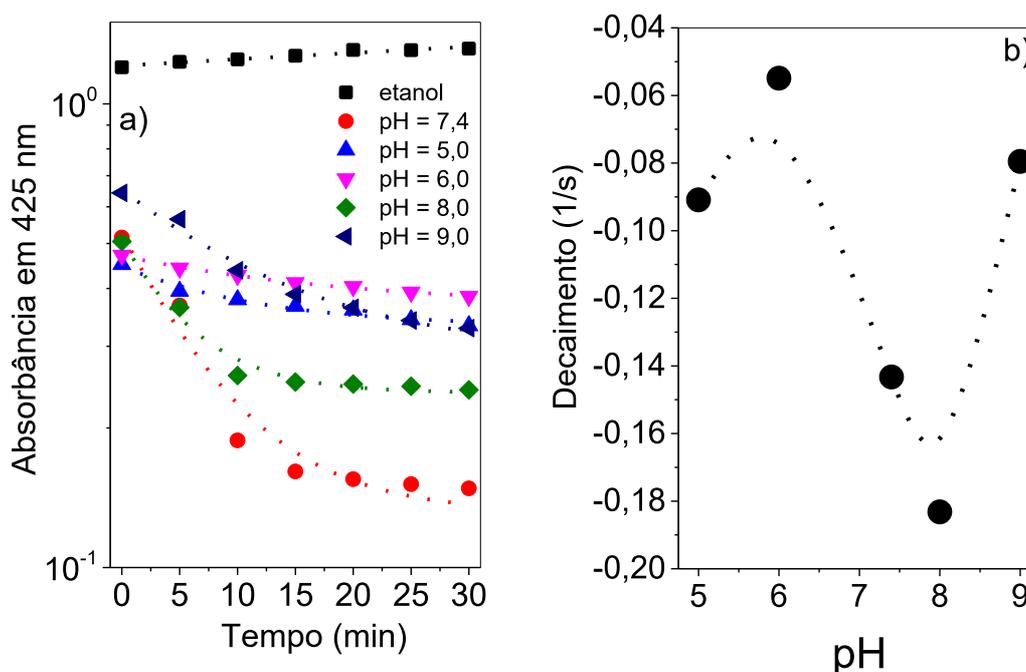


Figura 44 - (a) Acompanhamento soluções de pH no tempo de 30 minutos da curcumina Sigma, indicando a estabilidade em relação ao nível de acidez da solução. (b) Coeficiente de decaimento da curva de pH em 5,0; 6,0; 7,4; 8,0 e 9,0.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir das Figura 44a. é visto que para as soluções fracamente ácidas de pH 5,0 e 6,0 e para a solução básica de pH 9,0 a curcumina Sigma apresentou um decaimento na absorbância em 425 nm mais lento em relação ao decaimento de uma solução de pH neutro, pH = 7,4, indicando que para uma solução contendo íons H⁺ a curcumina se mantém por mais tempo na sua forma livre, ou seja, com formação mais lenta de agregados moleculares.

O decaimento visto em Figura 44b é obtido de forma empírica a partir da curva de decaimento que descreve a função de cada pH (Figura 44b), o ajuste de cada função foi dado pela equação abaixo:

$$f(t) = \alpha + \beta e^{\tau t} \quad (7.1)$$

Com t sendo o tempo medido em segundos, α o coeficiente linear de $f(t)$, β o coeficiente angular e τ o decaimento temporal com unidade de s^{-1} . Cada ajuste forneceu um τ característico para cada decaimento da absorbância em relação ao pH.

Valores de τ menores, ou próximos de zero, representam que o decaimento é mais lento em relação ao tempo, com isso identifica que a curcumina não está sofrendo mudanças em sua formação, permanecendo por mais tempo na sua forma livre. Já τ maiores mostra que a curcumina sofre modificações em sua estrutura, tornando a sua forma agregada mais presente.

Os pH de 5,0 e 6,0 apresentaram tempo de decaimento de $-0,091 s^{-1}$ e $-0,055 s^{-1}$, respectivamente, estes tempo de decaimento foram menores do que o tempo de solução em pH 7,4 ($\tau = -1,183 s^{-1}$), desta forma soluções ácidas permitem que a curcumina se mantenha por mais tempo em sua forma livre.

Comparando com trabalhos de PINTO Jr.¹¹⁵ que caracterizou as estabilidades em PBS com as curcuminas Alfa, Beta e Sigma, indicou que para as curcuminas Beta e Sigma a estabilidade temporal em pH neutro (pH = 7,4) havia a formação de agregados com pouco tempo dissolvido em solução, apenas para a curcumina Alfa apresentou uma estabilidade temporal mais longa.

Como as curcuminas Beta, Gama e Sigma são parecidas é provável que o efeito da solução acida permita que estas curcuminas diluídas em solução PBS possam permanecer na sua forma livre por mais tempo.

7.2 Incorporação de curcumina

O primeiro experimento utilizando curcumina com células de *C. albicans* foi realizado utilizando a absorbância pela banda de absorção em torno de 420 nm e aplicando luz difusa de LED de comprimento de onda em 450 nm, cada amostras foi realizada em triplicada e utilizado um volume de 2,0 mL contendo a suspensão das células do microrganismo, na ordem de 10^6 células.mL⁻¹. As formulações de curcuminas utilizadas estavam em uma concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, partindo de uma solução estoque de 5,0 mg.mL⁻¹ dissolvido em etanol 99,8% P.A.

As irradiações realizadas foram de 0, 5, 20 J.cm⁻² aplicadas de formas únicas e seriadas, para identificar a incorporação da curcumina na célula de *C. albicans*. O experimento consistiu em aplicar um volume de curcumina de 0,5 mL em uma suspensão de

microrganismo de 1,5 mL, com homogeneização e resguardo em ambiente escuro durante 10 minutos, após este tempo é aplicado a dose de luz e a forma de interesse. Após a aplicação a suspensão é centrifugada durante 10 minutos em rotação de 3000 rpm, depois foi coletado o sobrenadante e analisado a absorvância comparando a doses de luz aplicadas de formas única e seriadas.

A Figura 45 ilustra a comparação do sobrenadante de cada formulação de curcumina aplicando a dose de luz de forma única e seriada. Com isso indicando que após a aplicação de luz a quantidade de curcumina que permanecer na solução pode ser sido incorporada, fotodegradada ou aglomerada.

Como o intuito deste experimento é comparar a eficiência na irradiação única e seriada a quantidade de curcumina aglomerada e fotodegradada será semelhante entre as aplicações correlatas, portanto a principal diferença considerado será na incorporação das moléculas de curcuminas

Portanto a comparação entre as incorporações apresentadas em Figura 45 para as 4 formulações estudados neste trabalho são comparando as doses de 0, 5, 10 e 20 J.cm⁻² aplicados de forma única e seriada para a) Curcumina Alfa, b) Curcumina Beta, c) Curcumina Gama e d) Curcumina Sigma. Em Figura 45a a absorvância relacionada a aplicação da doses de luz seriadas é menor em relação a aplicação dose aplicada de forma única, com diferença perceptíveis em 10 e 20 J.cm⁻² com valores de 0,05 e 0,1 ABS, respectivamente. Indicando que a dose seriada possui uma rota de assimilação a curcumina alfa mais eficiente para aplicações de 10 e 20 J.cm².

A curcumina Beta (Figura 45b) apresenta um valor inicial menor em relação a curcumina Alfa (Figura 45a) devido a efeitos de aglomeração da molécula, como este efeito se permanece nas duas aplicações o mesmo não será considerado nesta análise. A aplicação de doses de luz seriadas apresentou um menor valor de absorvância comparado com a mesma dose de luz aplicado de forma única, indicando que a incorporação pela dose seriada foi mais eficiente neste caso, já para doses de 5 J.cm⁻² é possível ver uma diferença de 0,2 ABS, seguindo de 0,1 ABS (10 J.cm⁻²) e 0,06 ABS para 20 J.cm⁻² indicando que a seriada para a curcumina Beta apresentou uma incorporação maior nas células de *C. albicans*.

A incorporação da curcumina Gama (Figura 45c) apresentou também em doses de 5 J.cm⁻² uma diferença de 0,2 ABS para uma incorporação maior para a aplicação das doses de luz de forma seriadas, seguido de diferenças em 10 e 20 J.cm⁻² de 0,14 e 0,17 ABS, respectivamente. Mostrando que a aplicação de luz em doses seriadas foi mais eficiente em comparação a aplicação de dose única.

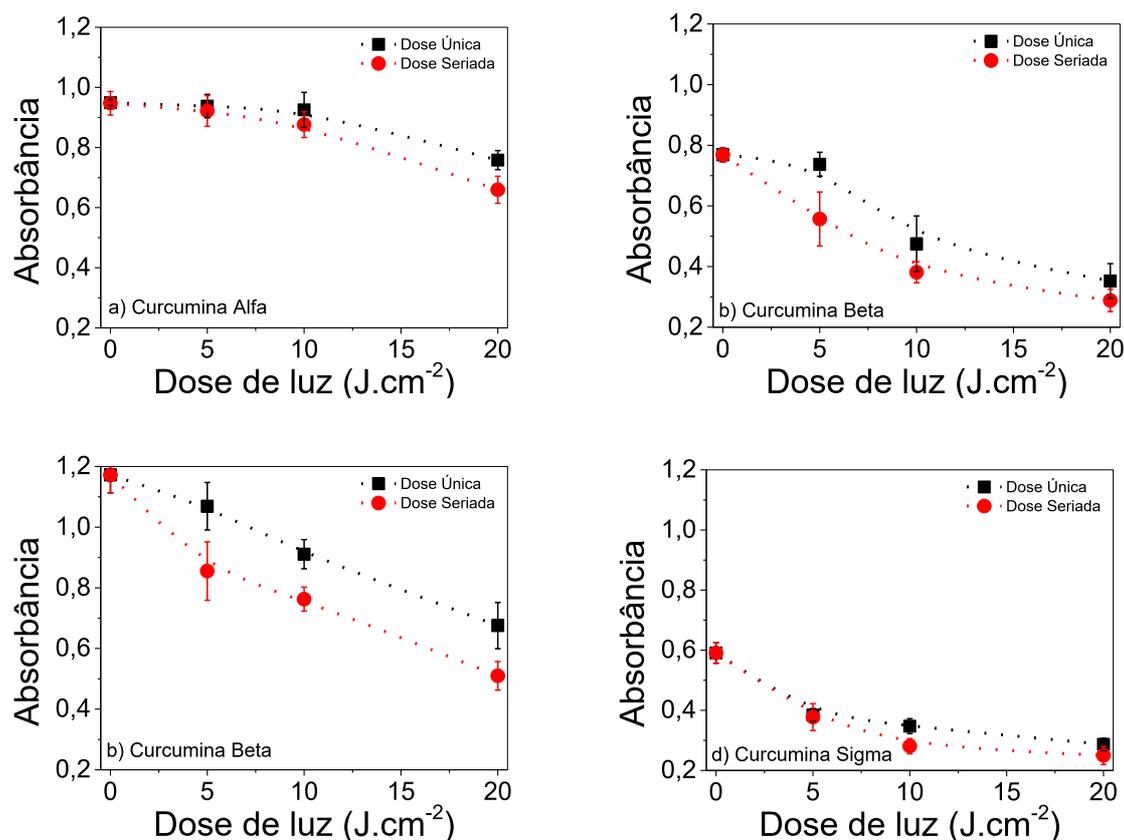


Figura 45 - Comparação do sobrenadante, analisado em 560 nm, de uma irradiação única (quadrado preto) e seriada (círculo vermelho) para as doses de luz de 0, 5, 20 J.cm⁻² utilizando luz LED em 450 nm para as formulações de curcumina de a) Alfa, b) Beta, c) Gama e d) Sigma.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A curcumina Sigma (Figura 45d) apresentou diferença significativa apenas para as doses de 10 J.cm⁻², com diferença de 0,07 ABS (560 nm) e para 20 J.cm⁻² uma diferença de 0,04 ABS (560 nm). Indicando, mesmo que com pouca diferença, as aplicações seriadas apresentaram uma melhor incorporação para a aplicação de doses seriadas.

Contudo, apenas a incorporação não é suficiente para identificar se a IFD com curcumina em *C. albicans*, apenas indica que houve uma maior utilização de moléculas de curcumina no processo, um indicativo que mais moléculas podem ter sido excitadas e liberado oxigênio singlete na solução.

Portanto, um experimento que garante a eficácia da aplicação de doses seriadas é transferir as células participantes do processo para um meio nutritivo e verificar se elas estão aptas para continuar suas atividades biológicas. É esperado que a quantidade de células viáveis de cada aplicação seja menor do que suspensão de células sem aplicação da IFD, como teorizada na Figura 14 (pág. 57) que as células microbiológicas precisarão de um tempo maior para atingir a fase estacionária de crescimento.

Para comprovar se uma maior incorporação também resulta em uma maior IFD foi realizado o experimento de viabilidade celular como irradiação de luz de forma única e seriada. O processo de crescimento foi realizado através da coleta da suspensão de *C. albicans* com curcumina em uma alíquota de 1 mL que foram adicionados a uma solução de 9 mL de meio líquido nutritivo (*Sabouraud*) que foram colocados em estufa com rotação orbital (150 rpm) qual a temperatura de 37 °C +/- 2 °C durante 24 horas.

Para este crescimento, além da utilização das suspensões que sofreram IFD, foi crescido nas mesmas condições suspensões controle, sendo um controle negativo para curcumina e luz e um outro controle apenas negativo para a luz (controle I), este segundo controle é para verificar se a curcumina apenas possui ação inibitória sem a presença da luz ao fungo e como solução foi preparada em etanol é previsto que na solução final de crescimento tenha 0,02% de álcool (controle II), portanto uma garantia que a solução utilizada na suspensão tenha contribuído para a inibição microbiológica.

A Figura 46 apresenta a viabilidade celular da *C. albicans* para as curcuminas Alfa, Beta, Gama e Sigma aplicadas as doses de luz única e seriada em 0, 5, 10 e 20 J.cm⁻². Após o crescimento em meio líquido as células antes de serem analisadas pelo espectrofotômetro, elas foram centrifugadas e ressuspensas em solução PBS com volume de 10 mL por três ciclos.

Para todos os casos mostrados na Figura 46 os controles I, negativo curcumina e luz, e controles II, negativo curcumina, foram semelhantes e sem diferenças entre estes crescimentos. Os cálculos de quantidade de células por volume utilizaram a equação 7.2 relacionada a Figura 17 (pág. 62) para inferir a quantidade de células presente na solução a partir da absorbância obtida em cada processo de inativação.

Em Figura 46a apresenta o crescimento do microrganismo que foi inativado pela curcumina Alfa, comprando inicialmente entre das doses aplicadas, em todos os casos a aplicação seriada foi mais eficiente na IFD em relação a aplicação de dose de luz única, com diferença de mais de uma ordem de grandeza para a dose de 20 J.cm⁻², a dose de 10 J.cm⁻² apresentou um inativação superior a dose única e a dose 5 J.cm⁻² foram semelhantes a ação fotodinâmica. Contudo em relação a inativação em relação ao controle a dose única apresentou uma redução de uma ordem para a dose de 10 J.cm⁻² e 20 J.cm⁻², já a dose seriada apresentou para as mesmas doses citadas acima uma redução de 2 ordens e 3 ordens respectivamente, mostrando que a aplicação seriada foi mais eficiente na inativação fotodinâmica da levedura.

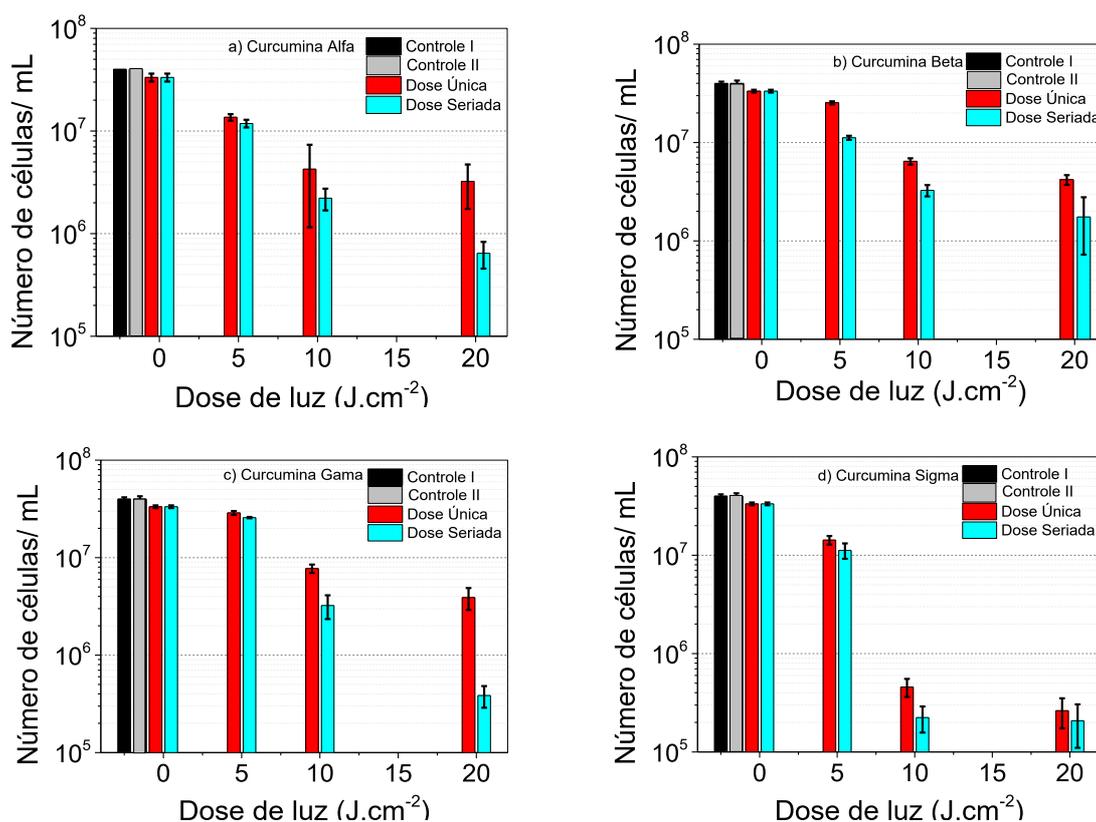


Figura 46 - Viabilidade de *C. albicans* com a aplicação de IFD de forma única e seriada, para as doses de luz de 0, 5, 10 e 20 J.cm^{-2} para as formulações de curcuminas a) Alfa, b) Beta, c) Gama e Sigma.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A curcumina Beta (Figura 46b) semelhante a ação da curcumina Alfa apresentou uma inativação maior para aplicação seriadas em relação a aplicação única, já para a dose de 5 J.cm^{-2} a aplicação seriada foi mais eficiente quase reduziu em uma ordem a quantidade de células, uma redução semelhante também se repetiu para as doses de 10 e 20 J.cm^{-2} , indicando uma maior eficiência quando se aplicado uma dose de luz seriada. Comparando as inativações com o controle I a redução foi de 2 logs para as doses de 10 e 20 J.cm^{-2} e a dose de 5 J.m^{-2} aplicado de forma seriada reduziu a praticamente uma ordem também, as doses únicas apenas obtiveram um redução semelhante para as dose de 10 e 20 J.cm^{-2} apenas.

A curcumina Gama (Figura 46c) apresentou uma redução melhor para a aplicação seriada em relação a aplicação única, para a dose de luz de 5 J.cm^{-2} ambas obtiveram uma inativação semelhante, porém para a dose de 10 J.cm^{-2} apresentou uma redução eficiente para a aplicação seriada e para a dose de 20 J.cm^{-2} a redução da aplicação seriada foi de 1 ordem em relação a aplicação única de mesma dose de luz. Comparando com o controle, a aplicação seriada obteve melhores inativações em relação a única sendo de 2 ordens e 3 ordens de grandeza para as doses de luz de 10 e 20 J.cm^{-2} , respectivamente, enquanto que para a dose de

luz única apenas obtive uma redução de 2 ordens de grandeza tanto para a dose de luz em 10 e 20 J.cm⁻².

Para a curcumina Sigma (Figura 46d) apresentou as maiores reduções em relação as outras formulações de curcuminas utilizadas neste trabalho, e a aplicação seriada sempre teve uma redução maior em relação a aplicação única de mesma dose de luz. As reduções mais significativas foram para as doses de 10 e 20 J.cm⁻² que tiveram uma redução de 3 logs em relação ao controle.

7.3 Microscopia *C. albicans*

Nesse experimento foi utilizado a microscopia confocal para obter uma caracterização da letalidade das formulações de curcumina aplicando a luz de um feixe de laser em 2F (800 nm). Para identificar as células comprometidas foi utilizado um marcado vivo/morto.

Para esse experimento foi utilizado uma densidade de célula de 10⁶.cm⁻² e uma concentração de curcumina de 10 ug.mL⁻¹. A varredura do feixe de do laser foi de 1,58 μs por segundo com a potência de 0,02 W.

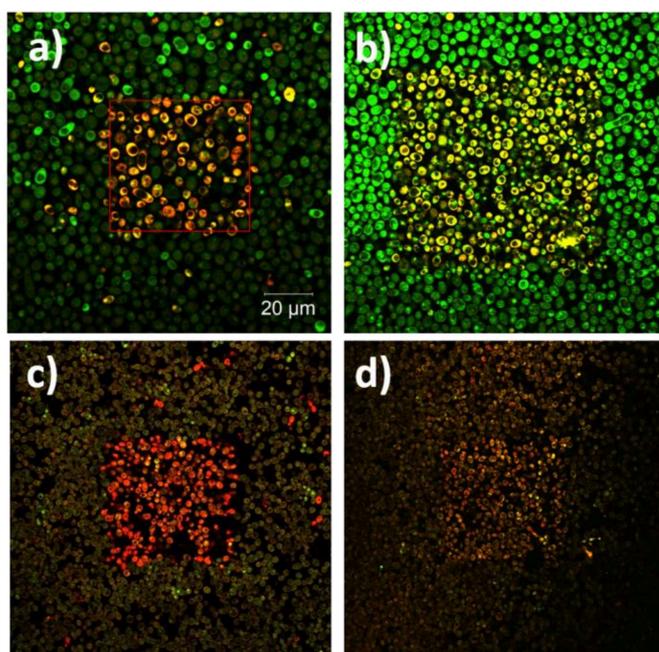


Figura 47 - Microscopia confocal para as formulações de curcumina a) Alfa, b) Beta, c) Gama e d) Sigma aplicando laser de 2P. A área central é uma região onde é visto a ação da IFD a partir de utilização do marcado vivo/morto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a aplicação da dose de luz de 2P com 10 J.cm^{-2} foi acompanhando a recuperação após *photobleaching* da curcumina que foi fotodegradada pela ação da IFD, a Figura 48 mostra a entrada de curcumina comparando a quantidade de emissão de uma região externa, fora da área que foi aplicado a IFD e uma região interna, onde foi aplicado a IFD.

Pela Figura 48 é possível verificar que a curcumina Alfa apresenta maior mobilidade das moléculas curcumina após uma aplicação luz para a IFD, as demais curcuminas apresentaram uma mobilidade semelhante entre elas. A curcumina Alfa apresenta uma maior mobilidade para as moléculas de curcumina como pode ser visto na Figura 48a, a evolução temporal de emissão correspondente as moléculas de curcumina permanece constante durante os 30 minutos de experimento para a região externa (linha azul) e para o acompanhamento temporal da emissão da curcumina na região onde ocorreu o *photobleaching* (linha preta) é possível verificar um aumento de 16x, considerando o tempo de 30 minutos, da quantidade de moléculas de curcumina Alfa. Portanto, pode se inferir que a quantidade de moléculas de curcumina após IFD continua a ser incorporada pelas células de *C. albicans*.

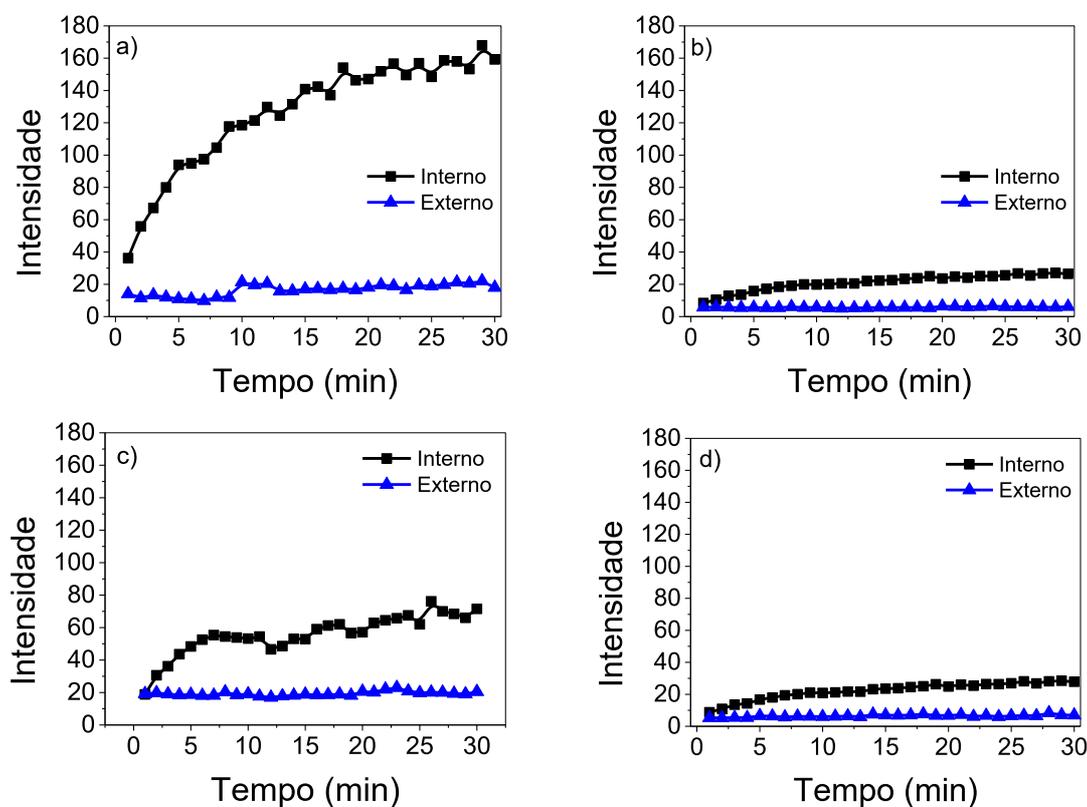


Figura 48 - Curva de recuperação da curcumina em uma região externa (sem aplicar IFD) e interna (aplicado IFD) em um intervalo de tempo de 30 minutos com medidas a cada um minuto, para as formulações de curcumina a) Alfa, b) beta, c) Gama e d) Sigma.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma possível explicação para esta diferença entre a curcumina Alfa com as demais formulações pode ser devido ao fato que na formulação a razão curcumina e curcuminóides é menor em relação as formulações de curcumina Beta, Gama e Sigma que apresenta uma maior quantidade de moléculas de curcuminas em relação a quantidade de curcuminóides.

A mobilidade para as formulações Beta e Sigma foram praticamente iguais, considerando, com um aumento da emissão de moléculas de curcumina em 2x, considerando o tempo de 30 min. A formulação de curcumina Gama apresentou uma incorporação maior em relação a formulação Beta e Sigma, considerando o intervalo de tempo em 30 minutos a incorporação para a formulação de curcumina Gama foi de 3,5 x maior em comparação a emissão de curcumina que não sofreu *photobleaching*.

Comparando as Figura 46 e Figura 48 que possibilita relacionar a incorporação com a letalidade da IFD da curcumina em células de *C. albicans* é possível identificar que para a curcumina Alfa que possui alta mobilidade permitindo que mais moléculas de curcumina estejam presentes e próximas, principalmente, das biomoléculas constituintes da parede celular. Desta forma, a utilização de uma dose seriada permite que mais curcumina ativa possa ser incorporada nas células do microrganismo.

Para a incorporação da curcumina Beta é possível verificar que há uma IFD deste composto com a luz em 450 nm para inibir o crescimento da levedura. Porém como a mobilidade das moléculas não é alto, visto em Figura 48b, mas é suficiente para que doses seriadas sejam mais eficiente na inativação, como foi comparado com a dose única, Figura 46c, indica que mesmo que baixa a dose seriada permite uma letalidade maior.

A incorporação de curcumina Gama apresenta um rápido aumento na incorporação (Figura 48c) que cresce mais lentamente após 5 minutos podendo inferir a alta inativação no crescimento visto em Figura 46c. Indicando que a associação de doses baixar com intervalos de recuperar de 2 minutos permitiram uma inativação de 3 ordem de grandeza comparada com o crescimento controle.

A última incorporação, de curcumina Sigma, apresentou uma inativação similar entre as doses 10 e 20 J.cm⁻² (Figura 46d) e mesmo apresentando uma mobilidade baixa de moléculas, visto em Figura 4d, indica que a ação fotodinâmica utilizando curcumina Sigma acontece, majoritariamente, no primeiro contato da molecula fotossensível com as biomoleculas da parede celular da levedura. Neste caso, mesmo o dose seriada apresenta melhores resultados em relação às doses unicas, a curcumina Sigma tem um efeito mais eficiente no primeiro contato e as futuros sessões de IFD não aumentam, significativamente, a inativação das células do microrganismo.

7.4 Modelo proposto de internalização

A ação fotodinâmica utilizando FS com diferentes princípios de inativação, um de origem de clorina (PDZ) e de origem curcumina com mudanças na forma de aplicação da luz permitiram um aumento da eficiência na inativação. Para o PDZ e duas formulações de curcumina (Alfa e Gama) e parcialmente para a curcumina Beta, a mudança na entrega na dose de luz já melhorou a IFD para celular de *C. albicans*.

Analisando os resultados de incorporação do FS com as células microbiológicas e imagens de microscopia confocal é possível propor um modelo que permite explicar este fenômeno é que ilustrado na figura 47, cuja a luz não apenas irá excitar a molécula fotossensibilizante, mas também permitirá que aplicando doses pequenas (até 1 J.cm^{-2}) mas permitirá que as moléculas de curcuminas possam se ligar antes a biomoléculas sem sofrerem uma fotodegradação intensa a ponto de fotodegrada-las antes de gerar um oxigênio singlete que alcance uma biomolécula alvo.

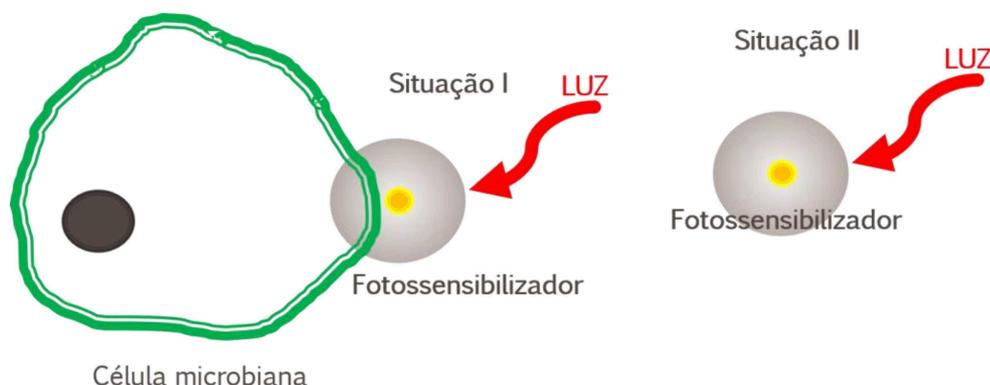


Figura 49 - Modelo proposto para explicar o carregamento de FS para a célula microbiana a partir de doses seriadas de luz.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Segundo o modelo proposto exemplificado em Figura 49, o FS independentemente se ele tem origem em clorina ou curcumina, terá sua estrutura molecular inativa quando liberar o oxigênio singlete, portanto uma dose alta de luz pode acarretar essa perda de moléculas, como ilustrado na situação II da Figura 49. Porém, utilizando doses baixas de luz, poucas moléculas serão inativadas enquanto estiverem em solução PBS. Mesmo que a ação inicialmente, possa ser baixa para doses inferiores a 5 J.cm^{-2} de forma seriada, com o aumento de sucessivas irradiações a inativação fotodinâmica torna-se mais inibitória.

8 Conclusão

Foi possível correlacionar a espectroscopia de absorvância ao espalhamento de luz em células de *C. albicans*, possibilitando uma associação da absorvância com o número de células presente na em uma dispersão celular. Desta forma, permite uma leitura rápida da quantidade de microrganismos presente na amostra. Associando com a lei de Beer-Lambert foi possível caracterizar com precisão a dispersão celular associada até uma absorvância igual a 1,0, para valores maiores foi possível inferir uma quantidade esperada. Bem como associar o espalhamento com o crescimento celular do microrganismo. A contagem via microscopia confocal é possível de ser realizada para estimar a quantidade de células para uma ABS próximas ao valor 0,6.

A caracterização do PDZ por absorvância permitiu identificar valores de coeficiente de extinção, estabilidade em meio tampão e térmico, bem como a fotodegradação gerada por irradiação por luz LED de 450 nm e 660 nm.

Imagens de microscopia confocal permitiram identificar o mecanismo de atuação do PDZ interagindo como as células de *C. albicans* correlacionando imagens de espectro de emissão como valores de tempo de vida associada a cada interação (vidro, solução e parede celular).

O tempo de vida associado ao PDZ mostrou que a irradiações com doses baixas ($< 4\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) o FS tem uma afinidade alta com a parede celular.

A evolução da internalização induzida de PDZ por luz mostrou que as células após uma dose de luz ($10\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ para 1P e $4\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ para 2P) aumentavam muito a quantidade de moléculas de PDZ em seu interior. Indicando que letalidade na célula permitiu uma maior entrada do FS, que promove uma maior IFD.

A morte celular por irradiação de LED mostrou se eficiente para doses seriadas com irradiações de $1\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ aumentaram a inativação do microrganismo. Abrindo, possibilidades de aplicar este protocolo para outras culturas microbiológicas, como bactérias e outros fungos.

Uma questão que precisa ser analisa com estudos mais aprofundados é entender se célula comprometida pode inativar uma célula próxima com sinalização biológicos próprios ou se o material expelido há resíduos ativos de ROS que desencadeia uma cascata de inativações.

A caracterização das formulações estudas indicaram que todas tem uma ação fotodinâmica para inativar celular de *C. albicans*. Porém algumas formulações apresentaram

uma insolubilidade a solução tampão neutro que pode diminuir a ação fotodinâmica. Contudo, acidificando a solução para pH próximos a 6,0 permite que as curcuminas estejam em sua forma livre, ideal para a aplicação da IFD.

A incorporação de curcumina via luz apresentou resultados bons quando alternava a irradiação com doses baixa de luz ($< 1 \text{ J.cm}^{-2}$) e incrementava com sucessivas doses. Porém, investigações mais profundas são necessárias para elaborar um protocolo mais eficiente para cada formulação de curcumina e estratégia de entrega de luz.

Por imagem de microscopia confocal, um processo de incorporação após uma irradiação de curcumina corrobora com a estratégia de entregas de doses menores, porém com mais aplicações, desta forma permite um maior aproveitamento das moléculas de curcumina.

Uma proposta de mecanismo pode sugerir que uma entrega de luz baixa permita que a molécula de FS (PDZ e curcumina) se mantenha excitadas por mais tempo aumenta a probabilidade esta molécula encontrar uma biomolécula do microrganismo para inativá-lo e permitindo gerar um efeito acumulativo iniciais possam ser inexpressível, porém com sucessivas doses baixas se torna mais eficiente do que uma aplicação de dose única.

Referências

- 1 PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.
- 2 ROMANO, R. A. **Aumento da eficiência da inativação fotodinâmica pela incorporação de fotossensibilizador induzida por luz em Candida Albicans**. 2016. 115p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 3 SILVA, A. P. **Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica**. 2018. 197p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 4 BASAK, S.; SINGH, P.; RAJURKAR, M. Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: a study. **Journal of Pathogens**, v. 2016, p. 1–5, 2016.
- 5 SCHWARTZ, K. L.; MORRIS, S. K. Travel and the spread of drug-resistant bacteria. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 9, p. 29, 2018.
- 6 KORTRIGHT, K. E. *et al.* Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 2, p. 219–232, 2019.
- 7 GUPTA, A. *et al.* Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 415–427, 2019.
- 8 WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature**, v. 543, n. 7643, p. 15–15, 2017.
- 9 WALTIMO, T. M. T. *et al.* Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 30, n. 2, p. 96–101, 1997.
- 10 MCCARTHY, M. W. *et al.* Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, suppl.3, p. S474–S483, 2017.
- 11 WANG, J. *et al.* Combating drug-resistant fungi with novel imperfectly amphipathic palindromic peptides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 9, p. 3889–3907, 2018.
- 12 HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436, 2004.
- 13 SUDIARTA, I. W.; CHYLEK, P. Mie-scattering formalism for spherical particles embedded in an absorbing medium. **Journal of the Optical Society of America A**, v. 18, n. 6, p. 1275, 2001.
- 14 ARAÚJO, N. C. *et al.* Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 2, p. 629–635, 2014.
- 15 DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy target to pathogens. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 245–254, 2004.
- 16 TAVARES, A. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. **Marine Drugs**, v. 8, n.1, p. 91–105, 2010.

- 17 VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.49, n.3, p.235-237, 2017.
- 18 DOUGLAS, H.; COUTINHO, M.; GEDEON, C. C. Mecanismos de resistência da *Candida* sp. **Infarma**, v. 18, n. 9/10, p. 30–35, 2006.
- 19 ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. J. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Educs, 2010. ISBN: 978-85-7061-562-6.
- 20 MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10th. ed. Tradução de Cynthia Maria Kyaw e Andréa Queiroz Maranhão. Porto Alegre: ArtMed, 2008.
- 21 CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, MMBR, v. 72, n. 3, p. 495–544, 2008.
- 22 ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; SIBATA, C. H. Clinical PD/PDT in North America: an historical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 263–277, 2004.
- 23 MOLLER, K. I. *et al.* How Finsen's light cured lupus vulgaris. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 118–124, 2005.
- 24 OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 39, n. 1, p. 1–18, 1997.
- 25 FUKUDA, E. K. *et al.* Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117. 2009.
- 26 ODDS, F.C *et al* Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. *In*: MITCHELL, A. P. *et al.* **Molecular principles of fungal pathogenesis**. New York: American Society of Microbiology, 2006. cap 22, p. 305–319.
- 27 PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, Jan. 2007.
- 28 PANIZO, M. M. *et al.* *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. **Medical Mycology**, v. 47, n. 2, p. 137–143, 2009.
- 29 DAI, T. *et al.* Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–16, 2012. PMID:22514547
- 30 SAMARANAYAKE, L. P.; KEUNG LEUNG, W.; JIN, L. Oral mucosal fungal infections. **Periodontology 2000**, v. 49, n. 1, p. 39–59, 2009.
- 31 CARMELLO, J. C. *et al.* In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. **Photochemical & Photobiological Sciences**: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, v. 14, n. 7, p. 1319–28, 2015.
- 32 CARMELLO, J. C. *et al.* Treatment of oral candidiasis using photodithazine®- mediated photodynamic therapy in vivo. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156947, 2016.
- 33 VAN DER PLAS, R. **Candidíase oral: manifestações clínicas e tratamento**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2016.

- 34 SHABAAN, A. E. *et al.* Role of serum (1,3)- β -d-glucan assay in early diagnosis of invasive fungal infections in a neonatal intensive care unit. **Jornal de Pediatria**, v. 94, n. 5, p. 559–565, 2018.
- 35 MEUNIER-CARPENTIER, F. Chemoprophylaxis of fungal infections. **The American Journal of Medicine**, v. 76, n. 4, p. 652–656, 1984.
- 36 KRAKOWKA, P. *et al.* Local treatment of aspergilloma of the lung with a paste containing nystatin or amphotericin B. **Tubercle**, v. 51, n. 2, p. 184–191, 1970.
- 37 OSHAUGHNESSY, E. *et al.* Amphotericin B: polyene resistance mechanisms. *In*: MAYERS, D. L. *et al* **Antimicrobial drug resistance**. Cham: Springer International Publishing, 2017. chap. 25, p. 387–395.
- 38 LEVINE, I. N. **Molecular spectroscopy**. New York, NY. Springer US, 1975.
- 39 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006. v. 33
- 40 LIPSON, A.; LIPSON, S. G.; LIPSON, H. **Optical physics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- 41 FU, Q.; SUN, W. Mie theory for light scattering by a spherical particle in an absorbing medium. **Applied Optics**, v. 40, n. 9, p. 1354, 2001.
- 42 ROBERTSON, B. R.; BUTTON, D. K.; KOCH, A. L. Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3900–3909, Oct. 1998.
- 43 HAMMER, M. *et al.* Single scattering by red blood cells. **Applied Optics**, v. 37, n. 31, p. 7410, Nov. 1998.
- 44 BASSAN, P. *et al.* RMieS-EMSC correction for infrared spectra of biological cells: Extension using full Mie theory and GPU computing. **Journal of Biophotonics**, v. 3, n. 8–9, p. 609–620, Abr. 2010.
- 45 KUGA, Y.; ISHIMARU, A. Retroreflectance from a dense distribution of spherical particles. **Journal of the Optical Society of America A**, v. 1, n. 8, p. 831, Aug. 1984.
- 46 YIN, J.; PILON, L. Efficiency factors and radiation characteristics of spherical scatterers in an absorbing medium. **Journal of the Optical Society of America A**, v. 23, n. 11, p. 2784, Nov. 2006.
- 47 WEBB, R. H. Confocal optical microscopy. **Reports on Progress in Physics**, v. 59, n. 3, p. 427–471, March 1996.
- 48 HIBBS, A. R. **Confocal microscopy for biologist.** Boston, MA: Springer US, 2004.
- 49 BIRCH, D. J. S.; IMHOF, R. E. Time-domain fluorescence spectroscopy using time-correlated single-photon counting. *In*: **Topics in fluorescence spectroscopy**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2013. v.3,p. 1–95.
- 50 PRICE, R. L.; JEROME, W. G. **Basic confocal microscopy**. New York: Springer New York, 2011.
- 51 EFTINK, M.R. E. Fluorescence quenching: theory and applications. *In*: LAKOWICZ, J.R.(ed.) **Topics in fluorescence spectroscopy**. 2nd. ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.v.2, p. 53–126.

- 52 CERUSSI, A. E. *et al.* Experimental verification of a theory for the time-resolved fluorescence spectroscopy of thick tissues. **Applied Optics**, v. 36, n. 1, p. 116, Jan. 1997.
- 53 MAYER, R. H.; REYNOLDS, J. S.; SEVICK-MURACA, E. M. Measurement of the fluorescence lifetime in scattering media by frequency-domain photon migration. **Applied Optics**, v. 38, n. 22, p. 4930, Aug.. 1999.
- 54 PAITHANKAR, D. Y. *et al.* Imaging of fluorescent yield and lifetime from multiply scattered light reemitted from random media. **Applied Optics**, v. 36, n. 10, p. 2260, Apr. 1997.
- 55 BOENS, N. *et al.* Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 5, p. 2137–2149, March 2007.
- 56 SAVARESE, M. *et al.* Fluorescence lifetimes and quantum yields of rhodamine derivatives: new insights from theory and experiment. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 116, n. 28, p. 7491–7497, July 2012.
- 57 GOPICH, I. V.; SZABO, A. Theory of the energy transfer efficiency and fluorescence lifetime distribution in single-molecule FRET. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 7747–7752, May 2012.
- 58 GUNewardene, M. S. *et al.* Superresolution imaging of multiple fluorescent proteins with highly overlapping emission spectra in living cells. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 6, p. 1522–1528, Sept. 2011.
- 59 BEREZHKOVSII, A. M.; SZABO, A.; WEISS, G. H. Theory of single-molecule fluorescence spectroscopy of two-state systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 110, n. 18, p. 9145–9150, May 1999.
- 60 BIRCH, D. J. S. Multiphoton excited fluorescence spectroscopy of biomolecular systems. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 57, n. 11, p. 2313–2336, Sept. 2001.
- 61 COLETTA, V. C. *et al.* Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 43, 2013.
- 62 MACHADO, A. E. DA H. Terapia fotodinamica: principios, potencial de aplicação e perpesctivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 1999.
- 63 OLIVEIRA, B. P.; AGUIAR, C.M.; CAMARA, A. C. Photodynamic therapy in combating the causative microorganisms from endodontic infections. **European Journal od Dentistry**, v. 6, p. 424–430, 2007.
- 64 SILVERTEIN, R. M.; WEBSTR, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th. ed. New Jersey: John Wiley, 2005.
- 65 EISBERG, R. M.; RESNICK, R. **Fisica quantica: atomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas**. New York: Elsevier, 1979.
- 66 WEBER, W. H.; LAMBE, J. Luminescent greenhouse collector for solar radiation. **Applied Optics**, v. 15, p. 2299, 1976.
- 67 TAKARA, M. **Propriedades ópticas de absorção e emissão fluorescente do ácido orto-aminobenzóico e seus derivados em meio solvente**. 2006. 132p. Tese(Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Riberirao Preto, 2006.

- 68 SCHERRER, A. *et al.* On the mass of atoms in molecules: Beyond the born-oppenheimer approximation. **Physical Review X**, v. 7, n. 3, p. 1–23, 2017.
- 69 MARLETTA, A. **Propriedades ópticas de semicondutores orgânicos à base de polímeros emissores de luz**. 2001. 185p. Tese (Doutorado em Ciências) -Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- 70 ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, Febr. 2016.
- 71 WEBER, J.; HOHLNEICHER, G. Franck—Condon factors for polyatomic molecules. **Molecular Physics**, v. 101, n. 13, p. 2125–2144, 10 July 2003.
- 72 SCHMIERER, T. *et al.* Kasha or state selective behavior in the photochemistry of ortho-nitrobenzaldehyde? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 1313, 2012.
- 73 DE SOUZA, E. S. *et al.* End-to-end distance distribution in bradykinin observed by Förster resonance energy transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): general subjects**, v. 1474, n. 2, p. 251–261, 2000.
- 74 STIPE, B. C.; REZAEI, M. .; HO, W. Single-molecule vibrational spectroscopy and microscopy. **Science**, v. 280, n. 5370, p. 1732–1735, June 1998.
- 75 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physical Medicine Biology**, v. 53, n. 9, p. R61, 2008.
- 76 TRIESSCHEIJN, M. *et al.* Photodynamic therapy in oncology. **The Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034–1044, Oct. 2006.
- 77 ZHU, J. *et al.* Potential roles of chemical degradation in the biological activities of curcumin. **Food & Function**, v. 8, n. 3, p. 907–914, 2017.
- 78 ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**, v. 35, n. 7, p. 3127–3136, June 2008.
- 79 ZHU, Z. *et al.* Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 33, p. 10856–10857, Aug. 2008.
- 80 CORREA, J. C. **Fotodegradação do photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 81 FERREIRA, J. *et al.* Photostability of different chlorine photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 5, n. 2, p. 156–161, 2008.
- 82 IVANOV, A. V.; RESHETNICKOV, A. V.; PONOMAREV, G. V. One more PDT application of chlorin e6. *In: DOOHERTY, T, J. SPIE Proceedings in Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy*. 2000.v.3909, DOI 101117112.379890.
- 83 SILVA, A. P. **Inativação dos micro-organismos causadores da oncomicosose por terapia fotodinâmica - estudo in vitro e clínico**. 2012. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 84 SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

- 85 CARMELLO, J. C. *et al.* In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.14, n.7, p.1319,2015
- 86 QUISHIDA, C. C. C. *et al.* Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and {LED} light. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 997–1009, 2016.
- 87 ROMANKO, Y. S. *et al.* Effect of photodynamic therapy with photodithazine on morphofunctional parameters of M-1 sarcoma. **Bulletin in Experimental Biology and Medicine**, v. 138, n. 6, p. 584–589, 2004.
- 88 ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 817–840, 2013.
- 89 ALVES, F. *et al.* Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 4, p. 815–826, May 2017.
- 90 - ALVES, F. *et al.* Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. **Medical Mycology**, v. 57, n. 5, p. 609–617, July. 2019.
- 91 SANTOS-PARKER, J. R. *et al.* Curcumin supplementation improves vascular endothelial function in healthy middle-aged and older adults by increasing nitric oxide bioavailability and reducing oxidative stress. **Aging**, v. 9, n. 1, p. 187–208, Jan. 2017.
- 92 GHOSH, S. S. *et al.* Curcumin-mediated regulation of intestinal barrier function: The mechanism underlying its beneficial effects. **Tissue Barriers**, v. 6, n. 1, p. e1425085, Jan. 2018.
- 93 KARIMIAN, M. S. *et al.* Curcumin and endothelial function: evidence and mechanisms of protective effects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 17, p. 2462–2473, July. 2017.
- 94 ESATBEYOGLU, T. *et al.* Curcumin-from molecule to biological function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, May 2012.
- 95 ALI, B. H. *et al.* Curcumin ameliorates kidney function and oxidative stress in experimental chronic kidney disease. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 122, n. 1, p. 65–73, Jan. 2018.
- 96 BHAT, A. *et al.* Benefits of curcumin in brain disorders. **BioFactors**, v. 45, n. 5, p. 666–689, Sept. 2019.
- 97 SRINIVASAN, K. Antimutagenic and cancer preventive potential of culinary spices and their bioactive compounds. **PharmaNutrition**, v. 5, n. 3, p. 89–102, Sept. 2017.
- 98 DI NARDO, V. *et al.* Use of curcumin in psoriasis. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 218–220, Jan. 2018.
- 99 HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, Oct. 2017.
- 100 AMALRAJ, A. *et al.* Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – a review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 2, p. 205–233, 2017.

- 101 BARANKEVICZ, G. B. **Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão.**2018. Dissertacao (Mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,2018.
- 102 SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas. **Quimica Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.
- 103 ALISI, I. O. *et al.* Evaluation of the antioxidant properties of curcumin derivatives by genetic function algorithm. **Journal of Advanced Research**, v. 12, p. 47–54, July 2018.
- 104 FARZAEI, M. *et al.* Curcumin in liver diseases: a systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 855, July 2018.
- 105 PULIDO-MORAN, M. *et al.* Curcumin and health. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 264, Febr. 2016.
- 106 JIANG, S. *et al.* Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. **Pharmacological Research**, v. 119, p. 373–383, May 2017.
- 107 ORSOLIN, P. C.; CÉSAR, J.; NEPOMUCENO. Potencial carcinogênico do açafrão(*Curcuma longa* L.) identificado por teste para detecção de clones de tumores em *Drosophila melanogaster*. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 6, n. 6, p. 55–69, 2009.
- 108 SENFT, C. *et al.* The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 491, Dec. 2010.
- 109 INDIRA PRIYADARSINI, K. Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 11, p. 2093–2100, Apr. 2013.
- 110 PRIYADARSINI, K. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, Dec. 2014.
- 111 GERALDE, M. C. **Avaliação do tempo de incubação do fotossensibilizador curcumina em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na inativação fotodinâmica.**2013. Dissertacao (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos,2013.
- 112 DE OLIVEIRA, E. F. *et al.* Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 137, n. 2017, p. 86–94, Oct.2018.
- 113 CHEN, F. P.; LI, B. S.; TANG, C. H. Nanocomplexation between curcumin and soy protein isolate: influence on curcumin stability/bioaccessibility and in vitro protein digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 13, p. 3559–3569, 2015.
- 114 TEOW, S.-Y. *et al.* Antibacterial action of curcumin against *staphylococcus aureus* : a brief review. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2016, p. 1–10, 2016.
- 115 PINTO JR, F. F. **Interação e internalização de curcumina em culturas bacterianas.** 2019. 207p. Dissertacao (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

- 116 DE SOUZA, L. M. *et al.* Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 1, p. 151–158, March 2019.
- 117 MOUNCE, B. C. *et al.* Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. **Antiviral Research**, v. 142, p. 148–157, June 2017.
- 118 HEGER, M. *et al.* The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 222–307, Jan. 2014.
- 119 ORIGINLAB. OriginPro 2017. Disponível em: www.originlab.com/2017. Acesso em: 10 jan. 2019.
- 120 ZEISS. **Education in microscopy and digital imaging**. Disponível em : <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/livecellimaging/techniques.html>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- 121 RODRIGUES, A. *et al.* Evaluating the concentration of a *Candida albicans* suspension. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 1, n. 3, p. 134–6, 1993.
- 122 BECKER, W. *et al.* Advanced time-correlated single photon counting techniques for spectroscopy and imaging in biomedical systems. **Proceedings of SPIE**, v. 5340, June 2004. DOI 10.1117/12529143.
- 123 SEIFERT, E. OriginPro 9.1: scientific data analysis and graphing software—software review. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 5, p. 1552, 2014.
- 124 FÖRSTER, T. Transfer mechanisms of electronic excitation. **Discussion Faraday Society**, v. 27, n. 0, p. 7–17, 1959.
- 125 ROMANO, R. A. *et al.* Light-driven photosensitizer uptake increases *Candida albicans* photodynamic inactivation. **Journal of Biophotonics**, v. 10, n. 11, p. 1538–1546, 2017.
- 126 KAROTKI, A. *et al.* Simultaneous two-photon excitation of photofrin in relation to photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 2, p. 443, 2006.