AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INFLUÊNCIA DA FASE DE CRESCIMENTO CELULAR NA AÇÃO FOTODINÂMICA: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, MECÂNICA E BIOQUÍMICA EM CÉLULAS DE *Candida albicans*

Alessandra Baptista

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

São Paulo
2015

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

INFLÊNCIA DA FASE DE CRESCIMENTO CELULAR NA AÇÃO FOTODINÂMICA: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, MECÂNICA E BIOQUÍMICA EM CÉLULAS DE *Candida albicans*

Alessandra Baptista

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

Dedico este trabalho**:**

A Deus pela permissão de ter colocado em meu caminho pais maravilhosos. Meu pai sempre dizia: “Na vida precisamos plantar uma árvore, ter um cachorro e escrever um livro”. Pai, já plantei mais de uma árvore, conheci o amor incondicional com o Maximus, e não escrevi um livro, mas dedico esta tese para você.

Ao meu marido, Companheiro e Amigo Rodolfo, pela paciência, dedicação e principalmente por sempre acreditar em mim! Espero não tê-lo decepcionado. Minha enorme gratidão e eterno reconhecimento pela ajuda nesta jornada. Este trabalho é nosso com certeza!!! Te amo!!

Ao meu filho André, desculpe-me pela ausência em vários momentos... Espero ter plantado em você uma sementinha de que todo o esforço vale a pena. Corra atrás dos seus sonhos sempre, mesmo que eles possam parecer impossíveis!!

A minha mãe, avó, irmão, sogro, sogra e cunhados, obrigada pela força e compreensão durante todos esses anos. Vocês me ajudaram muito para que eu conseguisse concluir este trabalho.

Ao meu “pequeno”, obrigada por ser minha maior cobaia, sempre com muita paciência!! A sua confiança estará para sempre guardada em nossos olhares...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Martha Simões Ribeiro agradeço pela amizade e lealdade!! Você me fez vencer algumas barreiras e me transformar em uma pessoa mais segura e determinada. OBRIGADA pela confiança!

Agradeço à minha amiga Silvia por tanto carinho e dedicação durante todos estes anos!!! Cada palavra de incentivo somada às boas idéias, resultaram neste trabalho. Obrigada Amiga!

Agradeço ao Prof. Walter Toshi por toda a paciência e dedicação. Sua colaboração e conselhos foram essenciais para o amadurecimento e conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Airton Martin e à UNIVAP, por abrir as portas do laboratório e por ter oferecido todo o suporte para realização deste trabalho.

Agradeço ao pesquisador do Programa de Pós-graduaçào em Biofotônica aplicado às Ciências da Saúde Alessandro Melo Deana, pela construção e caracterização do LED utilizado neste estudo.

Aos meus amigos de laboratório: Camila, China, Caetano, Claudinei, Débora, Fernanda, Sayuri agradeço imensamente por tudo!!!!!! Parte de todos vocês está aqui neste trabalho. AMIGOS para sempre…

Agradeço a minha “Miga Tanha” por toda paciência, carinho e amizade!! Você sabe que pode contar comigo sempre!!

Agradeço ao Thiago pela amizade e ajuda na finalização deste trabalho.

Agradeço os meus amigos Aguinaldo, Ilka e Renato por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar. Vocês são mais do que especiais!!!

Aos colegas do CLA, em especial ao Lucas, meus agradecimentos pela companhia nesses anos de trabalho.

Agradeço aos alunos e aos professores do LEVB – UNIVAP, por todo apoio dado na parte de espectroscopia. Em especial ao Ícaro e ao João pela paciência e dedicação durante todo o tempo de experimentação.

Aos pesquisadores do Centro de Lasers e Aplicações (CLA), pelos momentos de convivência.

Aos funcionários do CLA, agradeço por estarem sempre prontos a ajudar. Os sorrisos, a acolhida, fizeram do meu tempo aqui mais feliz.

Ao IPEN, agradeço pela infraestrutura que permitiu a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Nacional (CNPq), agradeço a bolsa de doutorado.

À FAPESP, agradeço o apoio financeiro concedido.

"A civilização não existiria sem luz – a luz do Sol e a luz dos lasers tornaram-se uma parte importante em nossas vidas."

(Ahmed Zewail - Prêmio Nobel em Física -1999)

"A luz nos dá a vida através da fotossíntese, permite-nos olhar para trás no tempo em direção ao Big Bang, ajuda-nos a comunicarmos uns com os outros, e talvez, no futuro nos ajudará a conhecer outras pessoas no espaço."

(John Mather– cientista da NASA)

INFLUÊNCIA DA FASE DE CRESCIMENTO CELULAR NA AÇÃO FOTODINÂMICA: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, MECÂNICA E BIOQUÍMICA, EM CÉLULAS DE *Candida albicans*

Alessandra Baptista

RESUMO

Estudos têm demonstrado o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na inativação de diferentes células microbianas. No geral, são três as fases de crescimento dos microrganismos: fase lag, exponencial e estacionária. Os objetivos deste estudo foram avaliar a susceptibilidade de células *de Candida albicans* em diferentes fases de crescimento, submetidas à aPDT, associando azul de metileno (50 μM) e luz de emissão vermelha (λ= 660 nm) e investigar alterações morfológicas, mecânicas e bioquímicas, antes e depois da aPDT, por microscopia eletrônica de varredura, de força atômica e por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Os resultados obtidos sugerem que, em parâmetros letais, células em fase estacionária de crescimento (48 h) são menos susceptíveis à aPDT, quando comparadas àquelas em fases lag (6 h) e exponencial (24 h) de crescimento. Entretanto, em parâmetros subletais, células de 6 h e 48 h mostraram a mesma susceptibilidade à aPDT. Em sequência, os experimentos foram realizados em parâmetros considerados subletais para células crescidas por 6 e 48 h. A avaliação morfológica mostrou menor quantidade de matriz extracelular em células de 6 h comparada àquelas de 48 h. A espectroscopia de força atômica mostrou que células em fase lag perderam a rigidez após a aPDT, enquanto que células em fase estacionária mostraram comportamento inverso. Ainda, células de 48 h diminuíram sua adesividade após a aPDT, enquanto que células de 6 h e 24 h tornaram-se mais adesivas. Os resultados bioquímicos revelaram que as diferenças mais significativas entre as células fúngicas de 6 h e 48 h ocorreram na região de DNA e carboidratos. A aPDT promoveu mais alterações bioquímicas na região de DNA e carboidratos em células de 6 h e em lipídios e ácidos graxos em células de 48 h. Nossos resultados indicam que a fase de crescimento celular desempenha papel importante no sítio de ação da aPDT em células de *C. albicans*.

INFLUENCE OF THE CELL GROWTH PHASE ON PHOTODYNAMIC ACTION: MORPHOLOGICAL, MECHANICAL AND BIOCHEMICAL EVALUATION IN CELLS OF *Candida albicans*

Alessandra Baptista

ABSTRACT

Studies have demonstrated the potential of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on the inactivation of different microbial cells. Overall, there are three phases of cell growth: lag phase, exponential phase and stationary phase. The objectives of this study were to evaluate the susceptibility of *Candida albicans* in different growth stages submitted to aPDT, with methylene blue (50μM) and red light (λ = 660 nm) and to investigate morphological, mechanical and biochemical changes before and after aPDT, by scanning electron microscopy, atomic force microscopy and by Fourier transform infrared spectroscopy. The results suggested that with lethal parameters, cells in stationary phase (48 h) are less susceptible to aPDT, compared to those in lag phase (6 h) and exponential phase (24 h). However, in sub-lethal parameters 6 h and 48 h cells showed the same susceptibility to aPDT. The following results were obtained in sub-lethal parameters. The morphological evaluation showed lower amount of extra-cellular matrix at 6 h compared to cells growth for 48 h. The atomic force spectroscopy showed that cells in lag phase lost cell wall rigidity after aPDT, while cells in stationary phase showed a reverse behavior. Furthermore, 48 h cells presented a decrease in their adhesiveness after aPDT, whereas cells growth for 6 h and 24 h become more adhesive. The biochemical evaluation showed that the most significant differences among the fungal cells growth for 6 h and 48 h in DNA and carbohydrates. The aPDT caused more expressive alterations on DNA and carbohydrates in cells growth for 6 h, while cells growth for 48 h presented significant alterations on lipids and fatty acids. Our results indicate that cell growth phase play an important role on the target sites affected by aPDT in *C. albicans* cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
2. OBJETIVO 19
3. REVISÃO DA LITERATURA 20
3.1. *Candida albicans* 20
3.1.1. Fases de Crescimento 21
3.1.2. A Química da Célula 24
3.1.2.1. Lipídios 25
3.1.2.2. Carboidratos 26
3.1.2.3. Proteínas 27
3.1.2.4. Nucleotídeos e Ácidos nucleicos 28
3.1.3. Morfologia das Células Fúngicas 28
3.1.4. Fatores de Virulência e Patogenicidade 32
3.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana 33
3.3. Técnicas utilizadas na avaliação de micro-organismos 36
3.3.1. MEV e AFM 36
3.3.2. FT-IR 41
4. MATERIAL E MÉTODOS 45
4.1. Preparação do Inóculo de *C. albicans* 45
4.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana 45
4.3. Avaliação Microbiológica 47
4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura e de Força Atômica 48
4.5. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier 49
4.6. Análise Estatística 53
- Avaliação Microbiológica 53

- Microscopia de Força Atômica 53

5. RESULTADOS E DISCUSSÂO.....54

5.1. Avaliação Microbiológica.....54

5.2. Observações Morfológicas.....57

5.2.1 MEV.....57

5.2.2 AFM.....60

5.3. Avaliação Bioquímica.....66

5.3.1 Grupos: C X CFs.....66

5.3.2 Grupos: CFs 6 h X CFs 48 h.....73

- Análise espectral da região do 900-1800 cm^{-1}.....73
- Análise espectral da região do 2800-3100 cm^{-1}.....78

5.3.3 Grupos: CFs X aPDT.....79

- Análise espectral da região de 900-1800 cm^{-1} (CFs 6 h X aPDT 6 h).....88
- Análise espectral da região de 2800-3100 cm^{-1} (CFs 6 h X aPDT 6 h).....92
- Análise espectral da região de 900-1800 cm^{-1}(CFs 48 h X aPDT 48 h).....93
- Análise espectral da região de 2800-3100 cm^{-1}(CFs 48 h X aPDT 48 h).96
- aPDT 6 h X aPDT 48 h.....99

6. Trabalhos Futuros.....102

7. CONCLUSÕES.....104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes da parede celular apresentados na ordem em que se encontram na célula da superfície para o citoplasma[42]. 30
Tabela 2: Grupos de *C. albicans* (ATCC 90028). 45
Tabela 3: Grupos experimentais..... 47
Tabela 4: Grupos de *C. albicans* utilizados para avaliação da FT-IR..... 49
Tabela 5: Regiões espectrais com assinaturas características no infravermelho de biomoléculas. Os sinais positivos representam aumento do pico de absorção. 77
Tabela 6: Picos de absorbância após a aPDT 6 h e suas assinaturas espectrais. 91
Tabela 7: Picos de absorbância após a aPDT 48 h e suas assinaturas espectrais..... 98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das diferentes morfologias de *C. albicans.* 21
Figura 2: Esquema representando as fases de crescimento celular microbiano. UFC: unidades formadoras de colônia. 22
Figura 3: Visão geral dos tipos de moléculas biológicas que participam de várias estruturas celulares. 25
Figura 4: Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismos de ação da aPDT. 34
Figura 5: Diagrama esquemático do microscópio de força atômica[60]. 38
Figura 6: Típica curva de força em função da distância da ponta com relação à superfície da amostra. 40
Figura 7: Esquema de um espectrofotômetro FT-IR. 43
Figura 8: As setas apontam respectivamente para lente de CaF_2 e filme fino de *C. albicans*. 50
Figura 9: Ilustração dos dez pontos selecionados aleatoriamente na imagem do filme de *C. albicans* obtido por meio do microscópio acoplado no espectrômetro. 51
Figura 10: Fração de sobrevivência de *C. albicans* ± desvio padrão. (C), (L) e (FS), não demonstram nenhuma toxicidade em células fúngicas. Células em fase exponencial de crescimento mostraram-se mais susceptíveis a aPDT. O efeito fotodinâmico foi fluência–dependente em diferentes fases de crescimento ($p<0,05$, representado no gráfico através dos símbolos * e #) (N=9). 55
Figura 11: Micrografia eletrônica de varredura de células de *C. albicans* A (6 h); C (24 h); E (48 h); B (aPDT 6 h); D (aPDT 24 h) e F (aPDT 48 h). A seta curva aponta para o broto apical (C). Hifa e pseudo-hifa (cabeça de seta - C e E). As setas apontam para a presença de EPS (E). Os asteriscos em (B, D e F) mostram dano celular. As barras correspondem a 30 μm. 59
Figura 12: Imagem tridimensional de células de *C. albicans* obtidas por AFM (modo contato intermitente). A (C 6 h); B (aPDT 6 h); C (C 24 h); D (aPDT 24 h); E (C 48 h); F (aPDT 48 h). 61
Figura 13: Curva de força obtida em uma amostra de *C. albicans*. (1) Ponta e amostra afastadas e *cantilever* na posição de equilíbrio; (2) contato ponta/superfície da amostra e consequente deflexão do *cantilever;* (3) retração do *cantilever* associada à adesão ponta/amostra; (4) rompimento da adesão da ponta/amostra; (5) o *cantilever* volta para o equilíbrio. A seta indica deflexões causadas por interações atrativas. . 62

Figura 14: Constante elástica (N/m) de *C. albicans* ± erro padrão. Células fúngicas jovens do grupo controle apresentaram maior rigidez, quando comparadas às células controles crescidas por 24 h e 48 h ($p<0,05^1$, representado no gráfico através de letras). Após a aPDT, células fúngicas jovens perderam a rigidez, enquanto células crescidas por 24 h e 48 h, tornaram-se mais rígidas ($p<0,05^2$, representado no gráfico através dos símbolos *,# e $) (N=30). 63

Figura 15: Força de adesividade (nN) de *C. albicans* ± erro padrão. Células crescidas por 24 h se mostraram menos adesivas em relação às jovens e velhas ($p<0,05^1$, representado no gráfico através de letras). Após a aPDT, a adesividade aumentou em células jovens e em fase exponencial, enquanto em células velhas a adesividade diminuiu ($p<0,05^2$, representado no gráficos pelos símbolos *, # e $) ((N=30). 66

Figura 16: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos C e CFs em diferentes fases de crescimento celular, após correção de linha de base e normalização vetorial, no intervalo entre 900-4000 cm^{-1}. 67

Figura 17: Dendrograma das médias dos grupos: C (C 6 h; C 48 h) e CFs (CFs 6 h; CFs 48 h) em todo o espectro (900-4000 cm^{-1}). N=30. 68

Figura 18: Dendrogramas das médias dos grupos: CFs (6 h; 24 h; e 48 h). 70

Figura 19: Médias espectrais FT-IR amplificadas de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-4000 cm^{-1}. 72

Figura 20: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}. As setas contínuas representam os picos de absorbância das células jovens e as setas pontilhadas representam os picos de absorbância das células em fase estacionária de crescimento. 74

Figura 21: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 2800-3100 cm^{-1}. As setas contínuas representam os picos de absorbância das células crescidas por 6 h e as setas pontilhadas representam os picos de absorbância das crescidas por 48 h. 78

Figura 22: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* crescidas por 6 h e 48 h dos grupos CFs (L-Fs+) e dos grupos submetidos à aPDT (L+Fs+), após correção de linha de base e normalização vetorial, no intervalo espectral entre 900- 4000 cm^{-1}. 80

Figura 23: Médias espectrais FT-IR amplificadas de *C. albicans* crescidas por 6 h e 48 h dos grupos CFs (L-Fs+) e dos grupos submetidos à aPDT (L+Fs+), após correção de linha de base e normalização vetorial, no intervalo espectral entre 900- 4000 cm^{-1}. 81

Figura 24: Dendrograma das médias dos grupos: CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), em todo o espectro (900-4000 cm^{-1}). 82
Figura 25: Dendrograma das médias dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), na faixa espectral de DNA e polissacarídeos (900-1200 cm^{-1})..... 84
Figura 26: Dendrograma das médias dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), na faixa espectral de proteínas e lipídios (1200-1500 cm^{-1}). 85
Figura 27: Dendrograma das médias dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), na faixa espectral de amida I, amida II e lipídios (1500-1800 cm^{-1})..... 86
Figura 28: Dendrograma das médias dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), na faixa espectral de lipídios e ácidos graxos insaturados (2800-3100 cm^{-1})..... 87
Figura 29 Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e aPDT 6h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}. As setas contínuas representam os picos de absorbância das células do grupo controle e as setas pontilhadas representam os picos de absorbância das células submetidas à aPDT. 89
Figura 30: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 2800-3100 cm^{-1}. A seta mostra diminuição de absorbância em 3010 cm^{-1} em células crescidas por 6 h após a aPDT. 92
Figura 31: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 48 h e aPDT 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}. As setas contínuas e pontilhadas representam picos de absorbância menor e maior de células em fase estacionária submetidas à aPDT. Setas tracejadas indicam picos que não houve alteração de absorção de vibrações moleculares após a aPDT..... 94
Figura 32: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 48 h e aPDT 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 2800-3100 cm^{-1}. A seta mostra diminuição de absorbância em 3010 cm^{-1} em células crescidas por 48 h após a aPDT. 97
Figura 33: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos aPDT 6 h e aPDT 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}. As setas contínuas representam maiores picos de absorbância das células em fase lag de crescimento submetidas à aPDT, enquanto a seta pontilhada indica maior pico de absorbância das células crescidas por 48 h e submetidas a aPDT..... 100

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM – *atomic force microscopy* (microscopia de força atômica)
AM – azul de metileno
aPDT – *antimicrobial photodynamic therapy* (terapia fotodinâmica antimicrobiana)
$^{\circ}C$ – graus Celsius
CaF_2 – fluoreto de cálcio
cm – centímetro
cm^2 – centímetro quadrado
$C_3H_8O_3$ – álcoolglicerol
COOH – grupo carboxila
DNA – ácido desoxirribonucleico
EPS – exopolissacarídeos (matriz extracelular)
F – força
Fs – fotossensibilizador
FT-IR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier)
GASP – *growth advantage in stationary phase* (vantagens no crescimento na fase estacionária)
J – Joule
k – constante elástica
LED – *light emmiting diode* (diodo emissor de luz)
MCT – mercúrio-cádmio-telúrio
MEV – microscopia eletrônica de varredura
mW – miliwatt
NH_2 – grupo amina
N/m – Newton por metro
Nm – nanometro
O_2^- – ânion superóxido
OH – radical hidroxila
PBS – *phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)
RNA – ácido ribonucleico
ROS – *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)
rpm – rotação por minuto
s – segundos

Torr – unidade de pressão
u.a. – unidades de absorbância
UFC/mL – unidades formadoras de colônia por mililitro
Z – deslocamento
λ – comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT – do inglês*, Antimicrobial Photodynamic Therapy*) é uma técnica que envolve a ativação de um fotossensibilizador (Fs) por uma fonte de luz com comprimento de onda ressonante ao espectro de absorção do Fs[1]. O processo fotodinâmico promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*), tais como peróxidos, radicais hidroxilas, íons superóxido e oxigênio singleto, que levam à morte celular por estresse oxidativo[2,3]. A aPDT mostra grande atividade antimicrobiana com amplo espectro de atuação sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos[4,5,6]. Diversos estudos têm demonstrado o potencial da aPDT para inativação de grande diversidade de patógenos, inclusive micro-organismos resistentes a antimicrobianos[7,8,9]. Toda esta toxicidade é atribuída à geração de grandes quantidades de ROS, que superam o limite de defesa antioxidante das células e iniciam os diferentes mecanismos de morte celular[3].

As espécies de *Candida albicans* constituem parte da microbiota normal da pele, boca e trato gastrointestinal e são consideradas “oportunistas” por passarem de comensais a patogênicas, provocando quadros clínicos variáveis, desde abcessos, a fungemias, algumas vezes fatais, se não forem diagnosticadas e tratadas precocemente. As infecções por *C. albicans* são limitadas em extensão e gravidade dependendo da resposta imune do hospedeiro. Contudo, o uso indiscriminado de antibióticos de largo espectro atrapalham o equilíbrio da flora colonizadora, através da eliminação da microbiota residente, favorecendo o desenvolvimento de doenças fúngicas. Neste contexto, estudos da ação fotodinâmica em células fúngicas são importantes, visto que os resultados até agora encontrados desta terapia em fungos são promissores[3,10,11] .

A aPDT requer sensibilidade celular ao estresse oxidativo para promover uma significante redução microbiana. São cinco as fases bem estabelecidas de crescimento de uma cultura celular: 1) fase lag ou fase de adaptação; 2) fase exponencial de crescimento; 3) fase estacionária; 4) fase de morte celular e 5) fase estacionária de longo prazo, que pode estender-se por anos[12,13]. Sabe-se que células em fase estacionária de crescimento e células em biofilme apresentam maior resistência à aPDT do que células em fase logarítmica de crescimento[14,15]. Além disso, o envelhecimento celular também promove alterações nas cé-

lulas microbianas, que podem favorecer suas defesas contra o estresse oxidativo promovido pelas ROS[16,17].

Dentre os fotossensibilizadores estudados, podemos destacar o azul de metileno, pertencente à família das fenotiazinas. Ele se apresenta bem estabelecido como Fs na literatura e sua molécula provou efetividade em uma série de estudos sobre fotoinativação microbiana[18,19,20].

Apesar dos efeitos positivos da aPDT na inativação microbiana, os mecanismos pelos quais a aPDT opera em cada organismo ainda permanecem obscuros[21]. Sabe-se que para o sucesso da terapia é importante adequar os parâmetros de irradiação, bem como o tipo e concentração do Fs. Sabe-se também que o resultado da aPDT depende do tipo de micro-organismo estudado. Estudos envolvendo diferentes parâmetros de luz e Fs já estão bem descritos na literatura, porém pouco é conhecido do papel que o micro-organismo desempenha para o sucesso da aPDT[21, 22].

Diversas são as ferramentas para investigação dos mecanismos da aPDT. Imagens obtidas por diferentes métodos fornecem informações distintas e complementares entre si. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite avaliação morfológica da superfície da amostra[23], enquanto que a microscopia de força atômica (AFM – do inglês, *Atomic Force Microscopy*), além de obter imagens bi- e tri-dimensionais, de alta resolução e contraste, fornece informações quantitativas, como dimensão e propriedades mecânicas, que podem ser armazenadas para cálculos estatísticos e quantitativos de modo direto[24,25].

Neste contexto, surgem ainda as espectroscopias de RAMAN e FT-IR (FT-IR – do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), capazes de, em poucos segundos, produzir informações químicas e estruturais de amostras orgânicas ou não, fornecendo um espectro que é como uma impressão digital, permitindo sua identificação inequívoca ou, por exemplo, a detecção de alterações químicas decorrentes de um processo[26].

A motivação deste estudo foi promover um maior entendimento sobre a reação dos micro-organismos sobreviventes após a aPDT, procurando identificar meios de aumentar a eficácia da terapia. Uma vez identificados os possíveis mecanismos, é esperado que novos processos sejam desenvolvidos, a fim de burlar as resistências encontradas, aumentando as chances de sucesso da terapia. Micro-organismos em seu habitat natural apresentam-se na forma de biofilme, atra-

vés de inter-relações metabólicas sinérgicas ou antagônicas de uma mistura de células em todas as fases de crescimento[27]. Portanto, é necessário conhecer a morfologia da célula, a atividade bioquímica e sua virulência, em diferentes estágios de metabolismo celular, em busca de peculiaridades que possam ser avaliadas como possíveis alvos, mais seletivos e efetivos para ação da aPDT.

2. OBJETIVO

Objetivo Geral: entender o microrganismo para aumentar a efetividade da aPDT.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a susceptibilidade de células de *C. albicans* em diferentes fases de crescimento submetidas à aPDT, associando azul de metileno e luz de emissão vermelha;

- Investigar alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura de células de *C. albicans* em diferentes fases de crescimento celular, antes e depois da aPDT;

- Investigar alterações mecânicas por microscopia de força atômica de células de *C. albicans*, antes e depois da aPDT, em diferentes fases de crescimento celular.

- Investigar alterações bioquímicas por espectroscopia no infravermelhopor transformada de Fourier, em células de *C. albicans* em diferentes fases de crescimento, antes e depois da aPDT.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. *Candida albicans*

Calcula-se a existência de 200.000 espécies de fungos e, desses, 180 são patogênicos para o homem[28].

Todos os fungos recebem uma denominação binominal, seguindo os fundamentos da classificação de Linneu[28]. Em primeiro lugar, agrupamos os "indivíduos" em espécies; as espécies reúnem-se em gêneros; estes, em famílias; as famílias em ordens; as ordens, em classes; e estas, em ramos ou divisões[28]. Desta forma, a taxonomia do gênero *Candida* pertence:

- Domínio: Eucariota
- Reino:*Fungi*
- Divisão: *Eumycota*;
- Subdivisão: *Deuteromycotina*;
- Classe: *Blastomycetes*;
- Ordem: *Cryptococcaceae*;
- Gênero: *Candida*
- Espécie: *albicans*;

As leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são fungos unicelulares, eucarióticos, com aspecto arredondado ou ovalado, que medem aproximadamente de 2,0 a 4,0 µm. Não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos e sua nutrição é obtida por absorção. São seres aeróbios, que necessitam de fontes de carbono e nitrogênio para sobreviverem[29]. Suas principais fontes de carbono são os compostos orgânicos, as proteínas, os carboidratos, os lipídios e os álcoois. Como fontes de nitrogênio utilizam nitratos, sais de amônia, ácidos aminados, ureia, peptona e ácido glutâmico[30].

São considerados organismos polimorfos, ou seja, podem se apresentar na forma de leveduras ou na forma filamentosa, dependendo das condições de temperatura, disponibilidade de oxigênio e fontes de nutrição. Estas diferentes variedades morfológicas, permitem a adaptação destes micro-organismos a uma grande variedade de nichos biológicos, além de serem importantes para determinar a patogenicidade do fungo[31].

A multiplicação é feita por brotamento ou cissiparidade. No processo de multiplicação, ocorre o aumento isodiamétrico do tamanho da célula, seguido de divisão celular. Estas células de origem assexuada são denominadas de blastóporos ou blastoconídios. A formação das pseudo-hifas ocorre quando as células nascentes permanecem ligadas à célula parental, formando brotamentos alongados. As hifas verdadeiras são estruturas tubulares septadas cujos tubos germinativos apresentam crescimento apical[31] (Figura 1).

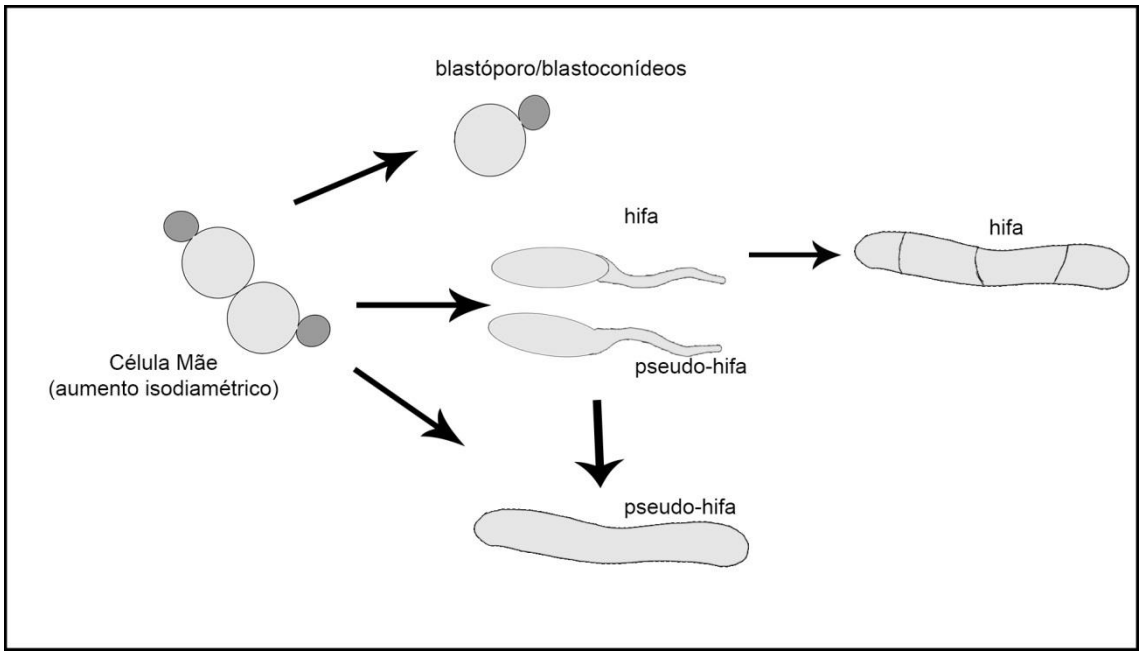

Figura 1: Representação esquemática das diferentes morfologias de *C. albicans.*

3.1.1. Fases de Crescimento

A descrição padrão do ciclo de vida de um micro-organismo consiste em três ou quatro fases. Entretanto, na literatura, podemos encontrar a descrição de cinco fases: fase lag, fase exponencial ou logarítmica, fase estacionária, fase de morte e fase estacionária de longo prazo[12] (Figura 2).

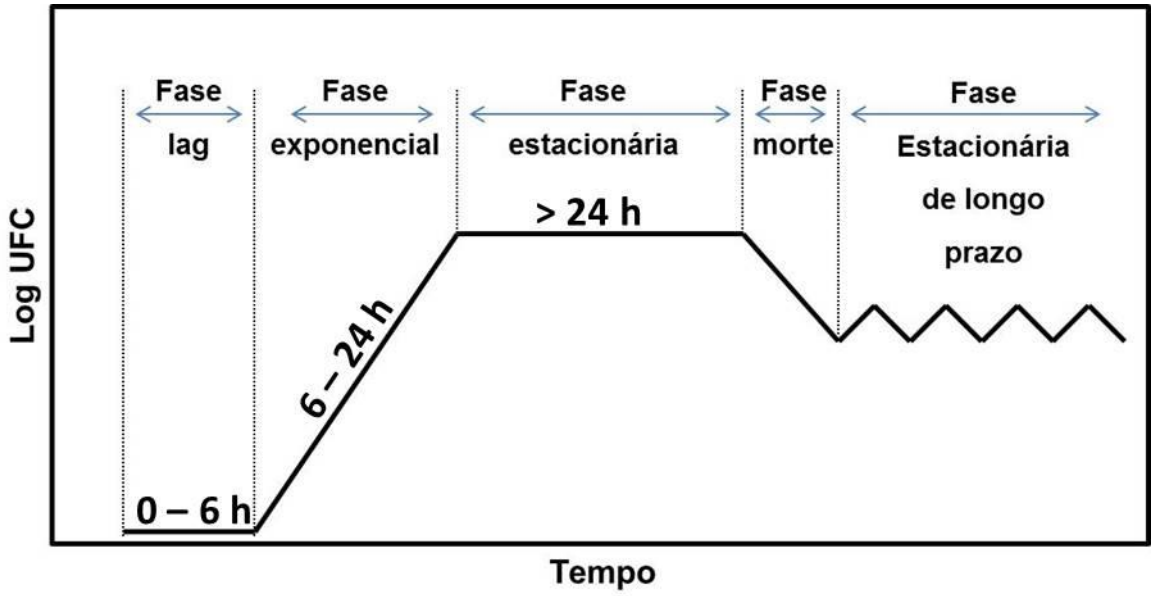

Figura 2: Esquema representando as fases de crescimento celular microbiano. UFC: unidades formadoras de colônia.

- **Fase Lag**

É considerado um período de adaptação celular, pois as células não se reproduzem imediatamente quando colocadas em um novo meio de cultura. Durante este tempo, as células encontram-se em um estado de latência com intensa atividade metabólica, principalmente síntese de DNA e enzimas[32].

- **Fase Exponencial de Crescimento**

A partir de um determinado momento, que varia de acordo com o tipo de micro-organismo, inicia-se o processo de divisão celular com aumento logarítmico de células, denominado de fase log ou exponencial de crescimento.

Durante este período, a reprodução celular encontra-se extremamente ativa. O gráfico logarítmico dessa fase de crescimento é uma linha reta inclinada, uma vez que o tempo de geração é constante. A alta atividade metabólica celular torna os micro-organismos particularmente sensíveis nesta fase[32].

- **Fase Estacionária**

Nesta fase, os nutrientes tornam-se escassos e os produtos tóxicos, decorrentes do metabolismo celular, abundantes. O número de células que se dividem é equivalente ao número de células que morrem. Ocorre produção de

substâncias contra o dano oxidativo[32]. Um aumento dos níveis citoplasmáticos de trealose e da expressão gênica de trealase nesta fase podem contribuir para a tolerância ao estresse nestas células[33].

- **Fase de morte celular**

Independentemente das condições ambientais, células incubadas em meios de culturas começam a perder a viabilidade, marcando a transição da fase estacionária para a fase de morte celular. A duração da fase de morte é um evento puramente estocástico, em que um ambiente de cultura só pode suportar certo número de células por um dado período de tempo. Quando a maioria das células não pode mais desempenhar funções de reparação e manutenção, ocorre acúmulo de proteínas e ácidos nucleicos oxidados intracelular e inicia-se o processo de morte[12].

Através do *quorum-sensing*[1], um mecanismo de auto-regulação na fase de morte celular, os micro-organismos que se encontram em altas densidades identificam que os nutrientes são insuficientes e desencadeiam um processo de morte celular programada (apoptose). Este parece ser um mecanismo de evolução celular, pois se parte delas “cometerem suicídio”, as sobreviventes poderão se reproduzir. Portanto, depois de um longo período em altas densidades celulares e com escassez de nutrientes a maioria da população de células entra em “modo de morte”. Como as células morrem gradativamente, outo sinal é liberado, promovido agora pela presença de nutrientes detríticos (incluindo os aminoácidos de proteínas, carboidratos advindos da parede celular, material lipídico da membrana e DNA), e as células sobreviventes saem deste processo de morte[12].

- **Fase estacionária de longo prazo**

Após a fase de morte celular, micro-organismos podem ser mantidos viáveis por longos períodos sem adição de nutrientes. Culturas de *Escherichia coli* foram mantidas em densidades de aproximadamente 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) por mais de cinco anos, apenas com a adição de

[1] *quorum-sensing* (sinalização de moléculas químicas produzidas por um micro-organismo, que pode afetar o comportamento dos outros envolvidos).

água destilada estéril, para manutenção do volume e osmolaridade celular[34]. Ao contrário da fase estacionária, em que há pouca divisão celular, a fase estacionária de longo prazo é um período altamente dinâmico, no qual as taxas de "nascimento" e "morte" celular são equilibradas[12].

Considerando as mudanças fisiológicas, morfológicas e de expressão de genes que ocorrem nesta fase, a mais significante está associada com as alterações genéticas que ocorrem na maioria das células. Não é uma adaptação à fase estacionária, mas uma modificação genética. O sinal fenotípico associado a estas alterações é o aparecimento da vantagem de crescimento em fase estacionária, denominado de GASP (GASP – do inglês, *growth advantage in stationary phase*)[35]. A GASP é definida pela habilidade que células velhas adquirem, para competirem com células de culturas jovens[12].

O fenótipo GASP foi demonstrado através de experimentos com células em diferentes fases de crescimento competindo umas com as outras[12]. Finkel e colaboradores[12] mostraram que praticamente todas as culturas de *Escherichia coli* produziram células que expressavam o fenótipo GASP após 10 dias de incubação. Células colhidas antes de 8 dias raramente expressaram GASP. As cepas mantiveram o fenótipo GASP após repetidos ciclos de crescimento.

3.1.2. A Química da Célula

O maior constituinte de um organismo é a água. Quando esta é totalmente removida, a maior parte da massa seca remanescente são átomos de carbono[36]. Além do carbono, a matéria orgânica que forma os seres vivos caracteriza-se pela presença constante de certos elementos químicos como hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre[37.] Vários compostos inorgânicos como: sódio, potássio, ferro, magnésio, cálcio e cloro são encontrados em todos os organismos. Estes compostos orgânicos atuam em etapas importantes do metabolismo e na definição de estruturas celulares.

As moléculas orgânicas geralmente encontradas nas células vivas podem ser divididas com base no seu papel metabólico. Dentre os compostos orgânicos, destacam-se os aminoácidos e proteínas, os lipídios, os carboidratos, e os nucleotídeos e ácidos nucleicos (Figura 3).

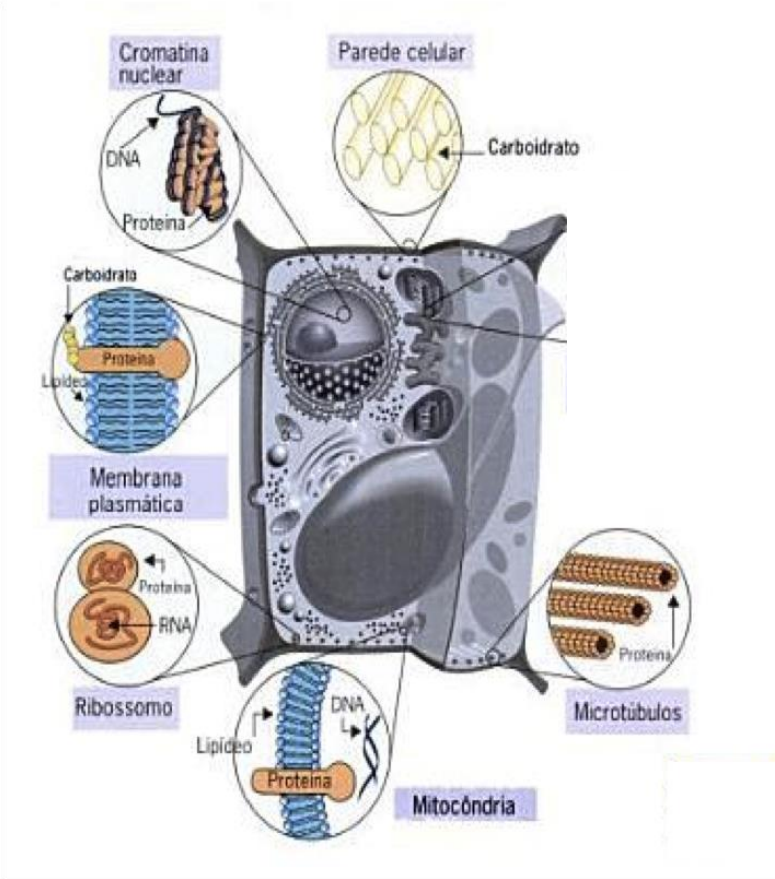

Figura 3: Visão geral dos tipos de moléculas biológicas que participam de várias estruturas celulares[36].

3.1.2.1. Lipídios

São um grupo diverso de moléculas biológicas anfipáticos, cujas propriedades comuns são a solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água (gordura, esteroides e fosfolipídios). São compostos de átomos de C, H e O. Os lipídios de importância celular incluem os glicerídios, os fosfolipídios, os esteróides e os carotenóides[36,37].

- Os glicerídios são constituídos por uma molécula do álcool glicerol ($C_3H_8O_3$) ligados através de uma ligação éster a uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos[36].

  Ácidos graxos são longas cadeias carbônicas, não ramificadas, com um grupo carboxila (-COOH) em uma das ligações terminais, que a torna hidrofílica em pH fisiológico, e uma cadeia hidrocarbonada, hidrofóbica, na outra extremidade. Diferem entre si no comprimento da cadeia hidrocarbonada e na presença ou ausência de duplas ligações.

Ácidos graxos que não apresentam duplas ligações são chamados saturados, aqueles com dupla ligação são os insaturados[36].

- Os fosfolipídios: do ponto de vista químico, um fosfolipídio é um diacilglicerol ligado covalentemente a um grupo fosfato, o qual está unido covalentemente a um grupo orgânico. A extremidade que contém o grupo fosfato tem um caráter hidrofílico, a outra extremidade composta de dois ácidos graxos apresenta caráter hidrofóbico. Os fosfolipídios são os principais componentes das membranas celulares[36, 37].

- Os esteróides são compostos por átomos de C interligados, formando quatro anéis, aos quais se ligam cadeias carbônicas, grupos hidroxila (-OH) ou átomos de O. São constituintes importantes das membranas plasmáticas das células. Nas células fúngicas, o ergosterol é um dos principais constituintes da parede celular[36].

- Os carotenóides são pigmentos de cor vermelha, laranja ou amarela, insolúveis em água e solúveis em óleos e solventes orgânicos. Alguns carotenóides em células bacterianas e fúngicas podem atuar como um fator de virulência, principalmente por serem antioxidantes que auxiliam os microrganismos frente ao estresse oxidativo[37].

3.1.2.2. Carboidratos

Os carboidratos são compostos orgânicos que incluem os açúcares e amidos. São moléculas constituídas fundamentalmente por átomos de C, H e O. A maioria dos açúcares tem a fórmula geral $(CH_2O)_n$. Os açúcares de importância no metabolismo celular têm um *n* que varia de 3 a 7[36]. Constituem a principal fonte de energia para os seres vivos. Além da função energética, a quitina, por exemplo, é um carboidrato que possui átomos de nitrogênio (N) na molécula e é um dos constituintes da parede celular dos fungos[38].

Participam da estrutura dos ácidos nucleicos, tanto do RNA, quanto do DNA. O trifosfato de adenosina (ATP), principal substância envolvida nos processos energéticos celulares, também apresenta um carboidrato em sua composição, a ribose[32].

Podem ser classificados de acordo com o tamanho e a organização de suas moléculas[37]:

- Monossacarídeos possuem em geral entre três e sete átomos de carbono. Podem ser ligados através de ligações glicosídicas covalentes, que formam grandes moléculas. Essas ligações são formadas pela reação entre o átomo de C de um açúcar e o grupo hidroxila (-OH) de outro açúcar, formando uma ligação –C-O-C, entre dois açúcares.

- Oligossacarídeos são monossacarídeos que se ligam e formam pequenas cadeias formadas por dois a dez monossacarídeos. Muitas dessas cadeias estão ligadas covalentemente aos lipídios e proteínas, formando glicolipídios e glicoproteínas. A matriz extracelular secretada pela célula fúngica é constituída basicamente destes oligossacarídeos, que além de fornecerem proteção mecânica às células, podem mediar interações célula-célula e célula-substrato[39].

- Polissacarídeos são polímeros de monossacarídeos, com mais de dez monossacarídeos interligados. O glicogênio e o amido são polissacarídeos nutricionais, enquanto a quitina, os glucanos, as mananas e os glicosaminoglicanos são polissacarídeos estruturais.

3.1.2.3. Proteínas

As proteínas são macromoléculas relacionadas com todas as atividades celulares. Fazem parte da estrutura das membranas celulares e dão consistência ao citoplasma. São polímeros formados de monômeros de aminoácidos[32,37].

- Aminoácido é uma molécula orgânica formada por átomos de C, H, O, N e S. Todos os aminoácidos têm um grupo carboxila (-COOH) e um grupo amina ($-NH_2$) separados entre si por um único átomo de carbono-alfa, um átomo de hidrogênio (-H) e um grupo denominado, genericamente, radical (-R). Este é o grupo que varia entre diferentes aminoácidos e os caracteriza. Peptídeos são moléculas resultantes da união através de ligações peptídicas de aminoácidos. Durante a formação da ligação peptídica, quando a proteína está sendo produzida, o grupo

carboxila de um dos aminoácidos perde um grupamento hidroxila (-OH), enquanto o grupo amina do outro aminoácido perde um (-H). Os aminoácidos se unem e os grupamentos (-OH) e (-H) livres se juntam formando uma molécula de água (H_2O)[37].

São descritos quatro tipos de organização das proteínas: primário, secundário, terciário e quaternário. A estrutura primária se refere à sequência de aminoácidos da proteína, enquanto os outros três níveis se referem à conformação espacial e interações tridimensionais de diferentes cadeias polipeptídicas[37].

3.1.2.4. Nucleotídeos e Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são constituídos por três tipos de componentes: carboidratos do grupo das pentoses, ácido fosfórico e bases nitrogenadas. Esses componentes organizam-se em trios moleculares denominados de nucleotídeos[32].

Existem dois tipos de ácido nucleico: DNA (do inglês, *desoxirribonucleic acid*) e o ácido ribonucleico (RNA – do inglês, *ribonucleic acid*). Essas substâncias apresentam, respectivamente, desoxirribose e ribose em suas moléculas. As bases nitrogenadas adenina (A), guanina (G), citosina (C), estão presentes tanto no DNA quanto no RNA. A timina (T) está presente apenas no DNA e a uracila (U), apenas no RNA[36].

3.1.3. Morfologia das Células Fúngicas

A célula fúngica é constituída pelos principais componentes encontrados nos demais organismos eucarióticos, isto é apresentam núcleos dotados de membrana envolvente própria; requerem carbono orgânico na sua nutrição, que obtêm por absorção; apresentam reserva de energia na forma de glicogênio; apresentam parede celular, membrana plasmática, e citoplasma com várias organelas, entre as quais podemos destacar: vacúolo, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomo, mitocôndria, peroxissoma e núcleo[28,].

A parede celular de *C. albicans* representa 30% da massa seca da célula, é composta de 80 a 90% de carboidratos, além de proteínas e lipídios. Uma característica típica da parede celular dos fungos é a presença de quitina[28, 29].

A quitina é um polissacarídeo aminado insolúvel, resistente, flexível, que se apresenta acompanhado de polímeros de glicose, como glucanas, e ma-

nanas (polímero de manose), ligadas a proteínas, polifosfatos e íons orgânicos, que, juntos, formam a matriz estrutural da parede celular. Esta estrutura serve como uma barreira mecânica rígida, determinando a forma e a proteção osmótica celular. É sítio de várias enzimas extracelulares, veículo de antígenos de superfície e reserva de carboidratos[29] e permite a interação entre o micro-organismo e o ambiente, incluindo o hospedeiro[40].

As proteínas são responsáveis pela sustentação e estão envolvidas na hidrofobicidade e adesão celular. Algumas são responsáveis por reparos na parede e em células velhas (células em fase estacionária de crescimento) podem proteger contra danos oxidativos[41]. A composição de polissacarídeos garante a resistência mecânica, e as glicoproteínas, além de fonte de energia, são responsáveis pela sustentação da camada externa da parede celular. Estas glicoproteínas são ligadas a cadeias laterais de carboidratos através de um átomo de N, limitando a permeabilidade da parede celular para macromoléculas e protegendo os polissacarídeos do ataque de proteínas estranhas (Tabela 1)[42].

A composição da parede celular é variável e se modifica com a idade do fungo e por fatores ambientais[42]. Células velhas apresentam paredes mais espessas, conferindo-lhes resistência às condições desfavoráveis como calor, luz e agentes químicos[29].

Tabela 1: Componentes da parede celular apresentados na ordem em que se encontram na célula da superfície para o citoplasma[42].

Macromoléculas	% de massa na parede celular
Manoproteínas*	30,0 a 50,0
1,6 – β glucano	5,0 a 10,0
1,3 – β glucano	30,0 a 45,0
Quitina	1,5 a 6,0

A membrana plasmática é a camada que está em íntimo contato com o citoplasma e é constituída por lipídios (incluindo os fosfolipídios)[29], um arranjo de proteínas fracamente ligadas com proteínas de superfície e pequenas quantidades de carboidratos[29]. Difere das membranas animais por apresentar ergosterol, ao invés de colesterol. Os esteróis da membrana conferem estrutura e modulação da fluidez[43].

As leveduras possuem um ou mais vacúolos no citoplasma, limitados por uma membrana de composição semelhante à membrana celular, que podem ser identificados através da microscopia. Durante a fase exponencial de crescimento, o saco vacuolar não contém elementos estruturais. Entretanto, a partir da fase estacionária, passam a apresentar quantidades crescentes de material granular, que podem ser formados por metafosfatos, polifosfatos e lipídios[29]. Existem os vacúolos digestivos, os de reserva e os relacionados aos sistemas enzimáticos[28].

O complexo de Golgi está envolvido em processos de síntese e secreção. Sua principal função é o processamento de proteínas ribossomáticas e a sua distribuição entre essas vesículas[37].

O retículo endoplasmático é uma organela exclusiva de células eucariontes e está envolvido na síntese e processamento de proteínas e de lipídios, desintoxicação celular e no transporte intracelular. Existem dois tipos: o retículo endoplasmático liso, que participa da síntese de esteroides, fosfolipídios e outros lipídios, e o retículo endoplasmático rugoso, responsável pela síntese de proteínas[37].

---

* O conteúdo proteico é de aproximadamente de 4-5 %. A massa restante são proteínas ligadas, contendo cadeias laterais de carboidratos (manose)[42].

Os lisossomos são estruturas derivadas da membrana plasmática e suas atividades envolvem secreção, formação de parede celular e síntese de glicogênio[29].

Os peroxissomos são organelas responsáveis pela oxidação de certas substâncias orgânicas, em especial os ácidos graxos, retirando átomos de hidrogênio e combinando-os com o oxigênio molecular, produzindo o peróxido de hidrogênio. Este, no entanto, por ser uma substância tóxica à célula é imediatamente degradado pela enzima catalase, no interior do peroxissomo[37].

A β-oxidação dos ácidos graxos acontece nos peroxissomos e nas mitocôndrias. Estes ácidos são biomoléculas importantes como combustível para as células[37].

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela produção de energia necessária para o metabolismo celular, através da respiração aeróbia. Os mecanismos de óxido-redução, sistemas de transferência de energia por meio de hidrogênio ou de transporte eletrônico, são exercidos nas células fúngicas através das mitocôndrias. São envolvidas por duas membranas, constituídas por lipoproteínas, uma externa, lisa e contínua, e outra interna, que apresenta invaginações, formando as cristas mitocondriais. As cristas mitocondriais delimitam a matriz mitocondrial, rica em enzimas que participam de etapas da respiração celular. Imersos nessa matriz também podem ser encontrados grânulos densos, que representam acúmulos de íons de cálcio, magnésio, mitorribossomos e moléculas de DNA e RNA[37].

O núcleo é bem definido, delimitado por um envoltório nuclear semipermeável, formado por duas camadas lipoproteicas. Armazena as informações genéticas e regula o metabolismo celular, através do controle das reações químicas que ocorrem dentro da célula. Os fungos são haplóides e seus cromossomos ocorrem como filamentos lineares constituídos de DNA e proteínas associadas[29].

3.1.4. Fatores de Virulência e Patogenicidade

A virulência e patogenicidade de *C. albicans* estão ligadas à capacidade que o micro-organismo tem em aderir, penetrar e causar doença no hospedeiro[44].

Um dos principais mecanismos de virulência deste fungo é a sua versatilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados[45]. Assim, as leveduras parecem ser importantes para a disseminação de novos nichos, enquanto as hifas parecem fundamentais para a invasão e consequente dano ao tecido hospedeiro[31].

Para que ocorra a adesão e posterior infecção, são necessárias interações físicas entre a superfície da célula hospedeira e adesinas da parede celular fúngica[46].

Certos constituintes da parede celular, como glucano, quitina e manoproteínas, possuem capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro, promovendo implicações diretas na patogênese[47].

Outros fatores têm sido relacionados com a virulência de *C. albicans* tais como a adaptação ao ambiente oxidativo[48, 49], a capacidade em formar biofilmes[50], a produção de enzimas extracelulares hidrolíticas e a produção de glicoproteínas como agentes tóxicos[28].

Uma enzima considerada importante no processo infeccioso é a fosfolipase. Localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, atuam na hidrólise de fosfolipídios da membrana hospedeira, causando danos à célula epitelial, favorecendo a invasão do tecido[51]. Outras enzimas e metabólitos ativos de leveduras são citados a seguir[28,52].

- Hidrolases ou enzimas hidrofílicas: Glicidases (sacarase; maltase; lactase; trealase; glicogenase), enzimas proteolíticas (proteases; peptidases), esterases (fosfatases), amidases (asparaginase).
- Desmolases: oxirredutase (deidrogenase; glicerofosfórica; carboxilase; hexoquinase).

O aumento da síntese de enzimas extracelulares produzidas pelas células fúngicas, como as proteinases e as fosfolipases está diretamente associado ao potencial patogênico do fungo[53]. A inibição na produção das proteinases diminui a virulência do microrganismo[54].

A resistência a antifúngicos também é um fator de virulência a ser considerado, pois mesmo com a introdução de novos fármacos, ocorre a seleção de cepas resistentes[55].

3.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A descoberta da penicilina em 1928, por Alexander Fleming e sua utilização em humanos a partir de 1941, parecia prometer o fim das doenças infecciosas de origem bacteriana. O uso indiscriminado de antibióticos na agricultura, nas rações de animais e seu uso em humanos, muitas vezes sem prescrição médica adequada, ajudaram a selecionar micro-organismos resistentes através da transferência de fatores de resistência de uma bactéria para outra, tornando a resistência microbiana o grande desafio do século XXI.

Terapias baseadas em luz não são novas. O uso de fotossensibilizadores exógenos para melhorar a eficácia da fototerapia foi descrito no *Atharva Veda*, um livro indiano sagrado datado de 1400 a.C. Civilizações antigas como a Índia, Egito e China, usavam a ação fotodinâmica através da ingestão de plantas contendo psoralenos associadas à exposição da luz solar para tratamento de doenças da pele, como vitiligo e psoríase, o que o filósofo grego Heródoto chamava de Helioterapia[56].

A ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica começou a ser estudada a partir da década de 90, com a descoberta da efetividade de Fs catiônicos, da família das porfirinas, ftalocianinas e fenotiazinas, em doenças infecciosas. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT - do inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy*) encontra-se bem estabelecida na literatura, tanto sua ação sobre diferentes bactérias, como sua ação antifúngica, principalmente em casos de infecções localizadas, de pouca profundidade e de microflora conhecida, como as de ocorrência mais frequente na cavidade oral e na pele[14, 57, 58].

A aPDT é uma fototerapia que associa substâncias fotossensibilizadoras com uma fonte de luz com comprimento de onda adequado ao espectro de absorção do fotossensibilizador (Fs). Após a incorporação do Fs pelas células alvo, período chamado de tempo de pré-irradiação, na presença de oxigênio, a absorção da luz pelo Fs desencadeia uma série de reações fotoquímicas, que produzem espécies reativas de oxigênio, produtos citotóxicos que levam a danos

celulares. Uma vez que o dano é oxidativo, poucas são as chances para o desenvolvimento da resistência microbiana por modificações de natureza química, sendo, portanto, uma ótima alternativa viável para o tratamento de infecções.

Como ilustra o diagrama de Jablonski (Figura 4), os mecanismos fotoquímicos são divididos em tipo I e tipo II. No mecanismo tipo I, a energia luminosa passa da molécula excitada no estado tripleto para uma biomolécula pela transferência de elétron (mecanismo radicalar), promovendo danos diretos às biomoléculas, ou na formação de espécies reativas de oxigênio, como, por exemplo, o radical superóxido. No mecanismo tipo II, o tempo de vida do estado tripleto é grande o suficiente para permitir que a energia de excitação seja transferida para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singleto, $^1O_2$, que é extremamente eletrofílico, sendo capaz de causar danos em biomoléculas.

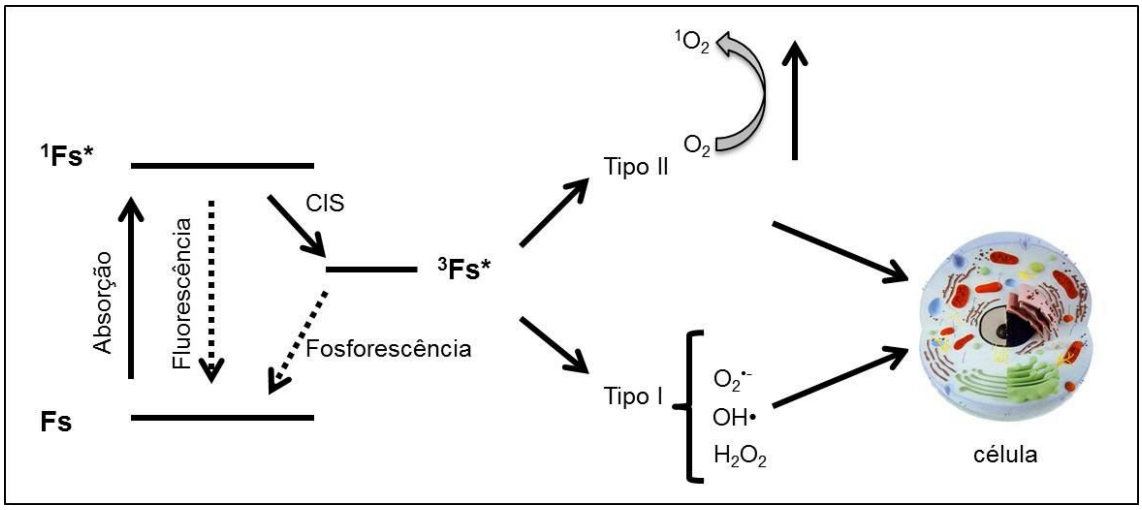

Figura 4: Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismos de ação da aPDT. Mecanismos Tipo I e II de fotossensibilização, sendo Fs o fotossensibilizador no estado fundamental, ^{1}Fs* primeiro estado excitado singleto e ^{3}Fs* primeiro estado tripleto e CIS - cruzamento intersistema.

As ROS (ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*) são divididas em dois grupos os radicalares e não radicalares, formados respectivamente pelas reações Tipo I e Tipo II. Os radicalares são: a radical hidroxila (OH•), o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o não radicalar é o oxigênio singleto ($^1O_2$)[59].

As ROS podem reagir por meio de transferência de elétron (mecanismo predominante em proteínas) ou da extração de átomos de hidrogênio (mecanismo

predominante em ácidos graxos insaturados), formando biomoléculas oxidadas ou reduzidas, dependendo do potencial redox dessas moléculas[60]. Estas reações iniciam processos radicalares, que se propagam em cadeia e induzem a grandes danos biomoleculares[61].

Em termos químicos, as alterações nos fosfolipídeos e colesterol, com cadeia insaturada, ocorrem devido à peroxidação lipídica, que são reações que se iniciam em consequência dos hidroperóxidos (ROOH), formados através da reação de radicais livres e $^1O_2$. A progressão de hidroperóxido para radical peroxila (ROO•) ou alcoxila (RO•) acontece provavelmente pela reação com tripletos pelo mecanismo tipo I. A extensão da lesão na biomolécula depende de uma combinação de formação de $^1O_2$ e radicais livres e da capacidade antioxidante do sistema[60].

Nos últimos 25 anos, os estudos em aPDT concentraram-se em explorar o Fs, o tempo de pré-irradiação, a disponibilidade de oxigênio, o comprimento de onda, a densidade de energia e a fluência da fonte de luz[57, 62, 63, 64]. Entretanto, o consenso emergente é que a eficácia da aPDT pode ser afetada pelos mecanismos de defesa que os micro-organismos exercem. Portanto, a compreensão da fisiologia da célula microbiana da célula alvo é fundamental para que se obtenha maior eficácia desta terapia[21].

As diferenças estruturais, metabólicas e comportamentais entre os micro-organismos devem ser levadas em consideração na efetividade da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana. De forma geral, bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a aPDT, quando comparadas às Gram-negativas[65]. Células fúngicas são ainda mais resistentes à aPDT, devido a seu maior tamanho, presença de membrana nuclear e maior quantidade de alvos possíveis para as ROS[57, 62].

Javed e colaboradores[64] mostraram, em uma revisão da literatura, que aPDT é uma estratégia eficaz no tratamento de *C. albicans*. Para avaliação do efeito fotodinâmico, os fotossensibilizadores mais usados foram o azul de metileno, o azul de toluidina e os derivados das porfirinas. O comprimento de onda do laser e a potência de saída variaram entre 455 nm e 660 nm e 30 mW e 400 mW, respectivamente. A densidade de energia variou entre 26 e 245 J/cm^2 e o tempo de irradiação entre 10 s e 26 min. Entretanto, em nenhum estudo desta revisão de literatura foram avaliadas as características do micro-organismo.

Embora haja um grande número de compostos que possam atuar como Fs, apenas alguns estão disponíveis comercialmente. O azul de metileno (AM) tem sido usado como agente de fotossensibilização desde 1920[10]. De acordo com Teichert e colaboradores[68], o AM é o fotossensibilizador ideal para terapia antifúngica devido à sua baixa toxicidade, ampla aceitação nas aplicações médicas, e potencial antimicrobiano quando ativado pela luz.

Estudos de aPDT, mediado por AM, mostraram eficiência na redução microbiana de *C. albicans* em suspensão[63, 66, 67]. Entretanto, estudos em modelo animal e em biofilme mostraram uma efetividade menor da aPDT em *C. albicans*[10, 68, 69].

3.3. Técnicas utilizadas na avaliação de micro-organismos

Uma série de técnicas, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de força atômica (AFM), vêm sendo utilizadas para explorar a morfologia da célula e da matriz extracelular de *C. albicans*[70]. A espectroscopia por absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) também pode ser uma ferramenta valiosa para aprofundar nossos conhecimentos a respeito de micro-organismos, uma vez que é capaz de evidenciar vibrações moleculares que identificam diferentes composições bioquímicas de células microbianas, tais como DNA, proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos[71].

3.3.1. MEV e AFM

Através da MEV, podemos identificar várias formas de *C. abicans* (blastoconídeo, pseudo-hifa e hifa), caracterizar alterações morfológicas relacionadas a diferentes condições de crescimento[72] e avaliar a efetividade de diferentes agentes antimicrobianos[73, 74].

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), um feixe de elétrons focalizado na superfície da amostra realiza varreduras em linhas sucessivas e justapostas, interagindo ponto a ponto com essa superfície[75]. Dessa interação, parte dos elétrons é retroespalhada pela superfície, e outra parte gera os elétrons secundários (emitidos pela superfície da amostra). Esses elétrons (retroespalhados ou secundários), com diferentes energias, podem ser coletados por um detetor. A

imagem visualizada no monitor é o resultado da modulação do brilho da tela, dada pela variação de intensidade do sinal no detector.

A microscopia eletrônica de varredura requer que as amostras sejam colocadas em vácuo (~10^{-6} Torr) e que sejam condutoras ou recobertas por um filme fino condutor, não só para garantir sua integridade, mas, principalmente, evitar que os elétrons acumulados na superfície gerem uma carga elétrica capaz de provocar divergência do feixe incidente.

Existem microscópios eletrônicos de varredura de baixo vácuo, que permitem avaliações morfológicas e topográficas da superfície, sem a necessidade de desidratação e recobrimento com filme fino condutor para submissão ao vácuo, o que favorece e torna viável sua utilização em estudos na área microbiológica[76, 77].

Vários estudos na literatura reportam o uso da MEV para avaliação dos efeitos fotodinâmicos em micro-organismos[78, 79, 80, 81], entretanto, ainda não foi relatada a utilização da MEV de baixo vácuo para avaliação morfológica dos efeitos promovidos pela aPDT.

A microscopia de força atômica (AFM – do *inglês, Atomic Force Microscopy*), por outo lado, tem sido muito utilizada nas últimas décadas para investigar superfícies microbianas em alta resolução. A técnica proporciona imagens tridimensionais da superfície, com resolução molecular, em tempo real, sob condições fisiológicas e com mínima preparação da amostra, o que a torna muito atraente para aplicações não só na microbiologia, como também na aPDT[24, 82, 83].

Além de obter imagens bi- e tri-dimensionais, de alta resolução e contraste, a AFM fornece informações quantitativas, como dimensões estruturais, adesividade e elasticidade de superfície, parâmetros estatísticos, e outras grandezas, de modo direto, a partir das imagens[24].

Na AFM, a caracterização de superfície é feita por meio de uma sonda que realiza a varredura "tateando"[84] a amostra, permitindo estudar interações inter e intra-moleculares, com alto grau de precisão espacial (subnanométrica) e resolução de força (piconewton)[85]. A ponta de prova está localizada na extremidade de uma haste flexível, chamada *cantilever*. Durante a varredura, o *cantilever* sofre deflexões de acordo com as variações topográficas da superfície. Essas deflexões são detectadas com o auxílio de um feixe *laser* refletido pelo *cantilever* sobre

um fotodetector. O sinal do fotodetector é processado por um computador, que o transforma em coordenadas topográficas e armazena os dados (Figura 5).

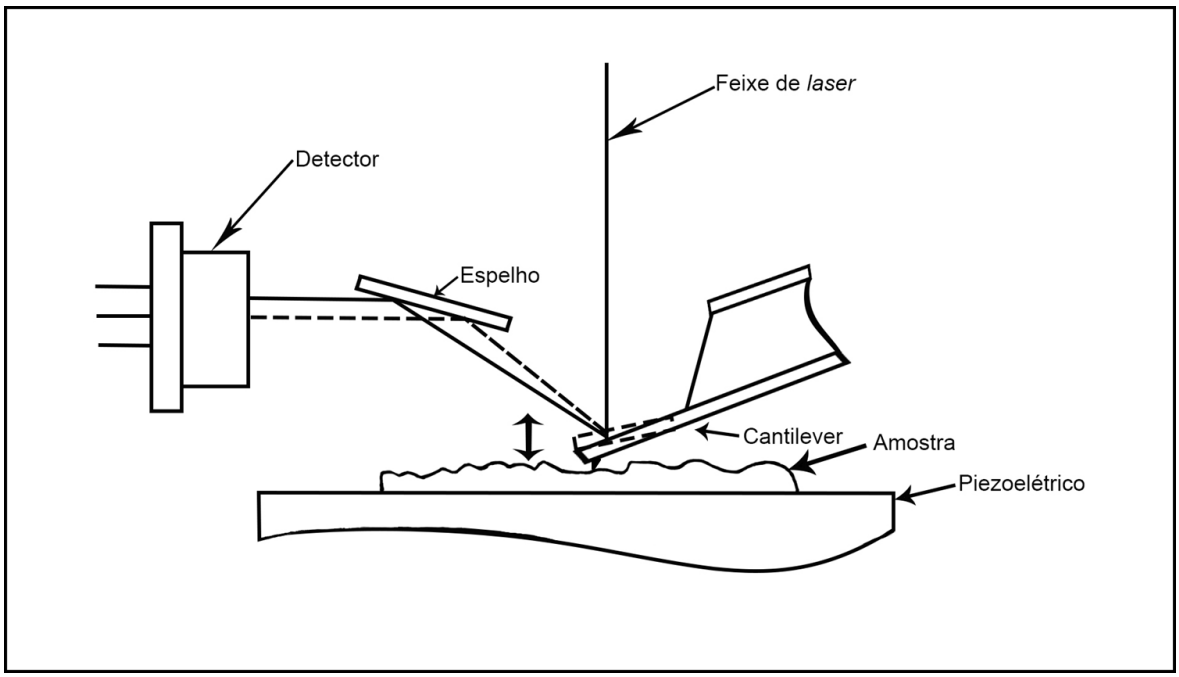

Figura 5: Diagrama esquemático do microscópio de força atômica[60].

A deflexão do *cantilever* ocorre devido à interação (força) entre a ponta e a amostra. Esta força (*F*) é definida por *F* = -k.z, onde k é a constante elástica do *cantilever* e (z) é o deslocamento (deflexão).

Existem três modos de operação para que imagens sejam obtidas através da AFM: o modo de contato, o de não contato e o de contato intermitente. No modo de contato, a ponta estabelece contato permanente com a superfície, de modo que o *cantilever* fique levemente pressionado contra a amostra. Neste caso, forças interatômicas repulsivas predominam na interação entre a ponta e a amostra. As imagens obtidas neste modo possuem melhor resolução lateral que as de modo de contato intermitente. Porém, a força constante exercida pela ponta pode causar danos em amostras mais delicadas, e *cantilevers* com baixos valores de constantes elásticas são mais indicados para não danificar a amostra. Estas pontas possuem constantes elásticas tipicamente da ordem de 0,02 N/m a 0,80N/m[86].

No modo de não contato, a ponta não estabelece contato físico com a amostra. O *cantilever* oscila próximo a sua frequência de ressonância, a uma altura constante da superfície. Devido às fracas interações, as imagens obtidas por

meio deste modo possuem resolução limitada. Os *cantilevers* utilizados são mais "duros", com constantes elásticas altas da ordem de 20 N/m a 100 N/m[86].

No modo de contato intermitente, o *cantilever* também oscila em frequências próximas a sua frequência de ressonância, interagindo tanto de forma atrativa como repulsiva, tocando com delicadeza a superfície da amostra. As características topográficas são adquiridas por meio das variações na amplitude ou na frequência de oscilação do *cantilever*, no momento da interação. As imagens obtidas neste modo são de alta resolução, mesmo em amostras delicadas ou que não estejam suficientemente presas ao substrato, sendo, portanto, um modo bastante apropriado para amostras biológicas. São utilizados *cantilevers* mais rígidos, com constantes elásticas entre 20 N/m a 80 N/m. Quanto maior for a constante de mola, mais rígido será o *cantilever* e, consequentemente, maior será sua frequência de oscilação[86].

A AFM é mais do que uma ferramenta de imagem. Medidas de força podem ser realizadas para sondar as propriedades mecânicas e físicas, tais como interações moleculares, hidrofobicidade e carga da superfície[87].

O fato da ponta do microscópio de força atômica "tatear" a superfície da amostra permite que este equipamento forneça informações únicas e exclusivas. Características plásticas/elásticas e de aderência da amostra, por exemplo, podem ser diretamente adquiridas ao tatear-se a superfície, o que não ocorre com outras técnicas de microscopia.

A estratégia para determinar o que a ponta "sente" ao tatear a amostra, ou seja, se a superfície está mais rígida ou mais flexível, ou se está mais viscosa ou aderente, é conhecida como espectroscopia de força. Nela, monitoram-se as forças que atuam durante os ciclos de aproximação e afastamento da ponta em relação à superfície, gerando um gráfico que é a curva de força sobre a amostra (Figura 6).

Na aproximação (segmento ABCD da Figura 6), quando a ponta está próxima de tocar a superfície da amostra, forças atrativas fazem com que a ponta seja "puxada" para a superfície (segmento BC da Figura 6). À medida que a ponta pressiona a superfície (segmento CD da Figura 6) forças repulsivas fazem com que o *cantilever* sofra uma deflexão para cima. Enquanto a amostra estiver em seu regime elástico, ou seja, permitindo que sua superfície retorne à posição original quando a força aplicada for totalmente removida, o deslocamento da ponta

na direção z será diretamente proporcional à força exercida pela superfície sobre a ponta, fornecendo uma medida da elasticidade do material (Lei de Hooke). Desta forma, a inclinação do segmento CD corresponde à constante elástica da superfície do material.

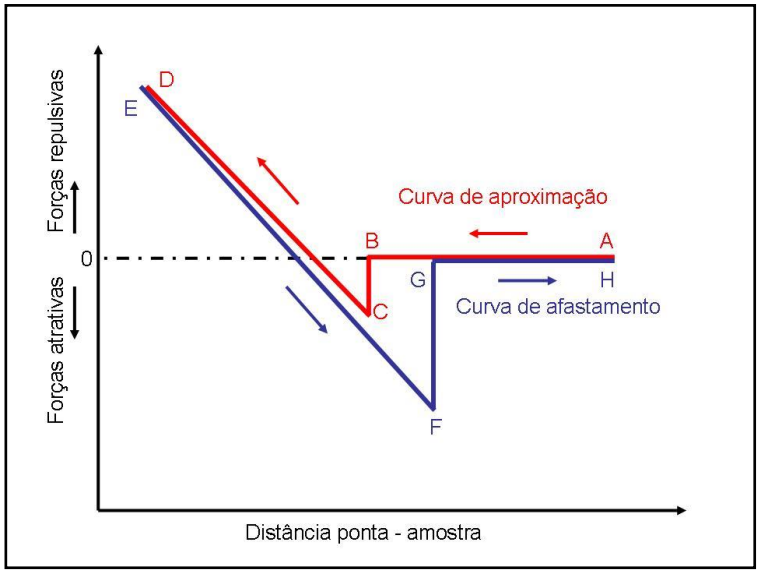

Figura 6: Típica curva de força em função da distância da ponta com relação à superfície da amostra.

No ciclo de afastamento da ponta (segmento EFGH da Figura 6), a intensidade das forças repulsivas vai reduzindo, passa para o regime de forças atrativas, até o ponto em a força elástica do *cantilever* se iguale à força de adesão. Neste ponto, que corresponde ao segmento FG da Figura 6, a ponta perde contato com a superfície da amostra. A dimensão do segmento FG na curva de força por distância fornece, assim, a força necessária para que a ponta se "solte" da amostra, ou seja, é a força de adesão da amostra.

Alguns trabalhos na literatura reportam o uso da AFM na avaliação morfológica e nas propriedades nanomecânicas de fungos submetidos a antifúngicos, estresse oxidativo, choque térmico e estresse osmótico[88, 89, 90, 91]. Portanto, a AFM, combinada com a avaliação bioquímica, pode ser uma ferramenta poderosa na investigação, em nanoescala, da topografia e nas propriedades mecânicas da célula fúngica em resposta à aPDT.

3.3.2. FT-IR

No início do século XX, Ernest Rutherford, Hans Geiger e Ernest Marsden, foram os precursores sobre o entendimento da estrutura dos átomos e da natureza da luz, estabelecendo bases para a compreensão da formação dos espectros.

A análise do processo de interação entre a radiação eletromagnética e a matéria é o que chamamos de espectroscopia e o registro dessa interação denomina-se espectro.

A história da espectroscopia inicia-se no século XVII com Isaac Newton, através da comprovação de que a luz do sol se dispersa em feixes coloridos, chamados de *spectrum*, ao atravessar um prisma de vidro, totalmente polido. Os trabalhos de Newton foram complementados no século XIX por Frederick William Herschel, através do descobrimento da luz no infravermelho. Ao colocar um termômetro com bulbo preto na faixa de luz no infravermelho, notou que a temperatura subia. Posteriormente, ao colocar uma amostra na trajetória da luz no infravermelho, observou que ao mudar a parte do espectro que passava através da amostra, a temperatura diminuía repentinamente e concluiu que a temperatura diminuía porque a amostra absorvia a luz, criando o princípio usado na espectroscopia com absorção no infravermelho.

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica que fornece informações sobre os modos de vibrações moleculares, relacionados à estrutura molecular[92]. Através da representação gráfica dos valores do número de onda (cm^{-1}) *versus* a absorbância (espectro de absorção), é possível identificar e quantificar os diferentes elementos químicos de uma amostra, obtendo sua impressão digital, uma vez que cada elemento possui um padrão único. Cada uma das bandas que aparecem no espectro se refere à absorção da radiação eletromagnética no infravermelho associada a um movimento vibracional[93].

De acordo com a teoria quântica, átomos, íons ou moléculas têm somente um número limitado de níveis de energia discretos e para que a absorção da radiação ocorra, a energia do fóton de excitação deve ser exatamente igual à diferença de energia entre o estado fundamental e um estado excitado da amostra absorvedora. Uma vez que essa diferença de energia é única para cada espécie, um estudo das frequências da radiação absorvida fornece um meio de identi-

ficar os constituintes de uma amostra. Quanto maior for a variação do momento dipolar da molécula durante a vibração, maior será a absorção no infravermelho. As moléculas diatômicas homonucleares não são registradas na espectroscopia no infravermelho, pois não há variação no momento dipolar durante a vibração, somente as moléculas diatômicas heteronucleares apresentam absorção no infravermelho[94].

O espectrofotômetro infravermelho baseado em princípios dispersivos foi utilizado na década de 40 para obtenção do registro das bandas do espectro vibracional[95]. No final da década de 70, começaram a ser progressivamente substituídos por espectrofotômetros com transformada de Fourier (FT)[96]. Um espectrômetro FT recolhe simultaneamente dados espectrais de alta resolução através de uma vasta gama espectral, enquanto o espectrômetro de dispersão mede a intensidade ao longo de uma pequena faixa de comprimentos de onda de cada vez.

O FT-IR utiliza o interferômetro de Michelson. O sinal é um interferograma, que é a variação da amplitude da luz absorvida ou transmitida em função da varredura do espelho móvel.

O espectrômetro FT-IR possui três componentes básicos: a fonte, o interferômetro e o detector. A radiação infravermelha proveniente de uma fonte é transmitida através de um interferômetro à amostra antes de chegar ao um detector. Após a amplificação do sinal, em que as contribuições de alta frequência são eliminadas por um filtro, os dados são convertidos em formato digital por um conversor analógico-digital, e transferido para o computador por transformada de Fourier[97] (Figura 7).

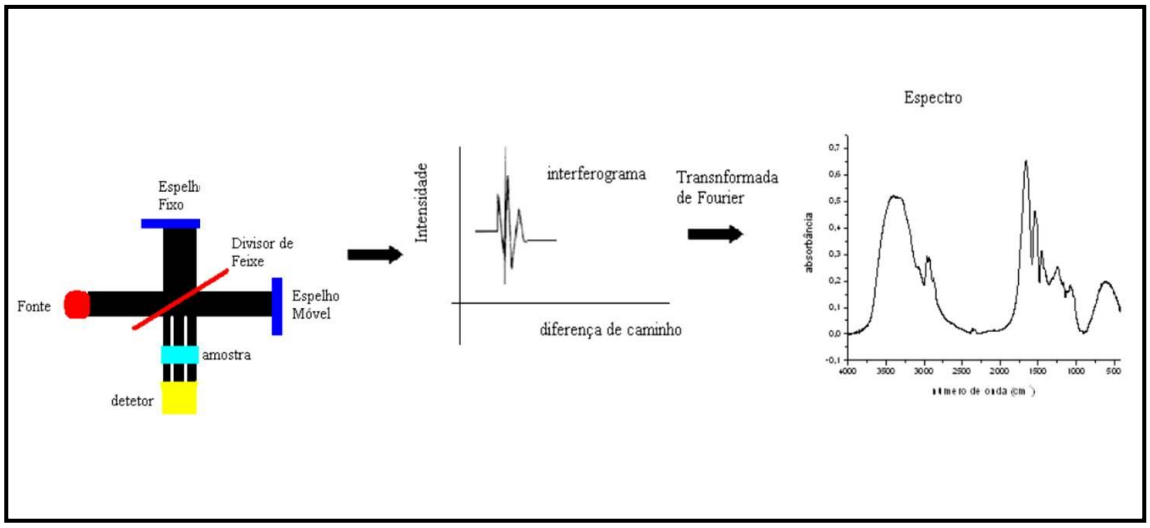

Figura 7: Esquema de um espectrofotômetro FT-IR.

A absorção da radiação infravermelha ocorre pelas ligações moleculares de compostos presentes nas estruturas das células, como proteínas, lipídios, polissacarídeos e ácidos nucléicos. Através dessa absorção, é possível caracterizar a composição bioquímica de vários sistemas biológicos complexos, inclusive microrganismos[26]. O espectro infravermelho é a diferença de intensidade da radiação infravermelha registrada antes e depois da passagem através da amostra, ou seja, o quanto de radiação eletromagnética foi absorvida, gerando assim o grau de absorbância[98].

Em microbiologia, o espectro infravermelho é representado por uma sobreposição de todos os modos vibracionais ativos de várias moléculas presentes na amostra microbiana[98]. Essa sobreposição decorre de vibrações moleculares das substâncias da parede celular, da membrana, citoplasma e núcleo das células. A região entre 500 e 4000 cm^{-1}, conhecida como região espectral do infravermelho médio, detém bandas características e adequadas para caracterização dos micro-organismos, pois esta região reflete grupos funcionais específicos como proteínas, carboidratos, fosfolipídios e polissacarídeos[26, 99].

A grande vantagem da técnica da espectroscopia FT-IR na microbiologia é que a amostra é avaliada sem necessidade de preparação, permitindo que a integridade dos espectros e a química dos micro-organismos e tecidos sejam preservadas. Entretanto, uma rigorosa padronização da amostra no que diz respeito às condições de cultura, em particular o meio de cultura, temperatura de incubação, tempo de cultura e o processo de aquisição dos dados devem ser obrigatori-

amente realizadas, uma vez que, os espectros das amostras microbiológicas são sensíveis às mudanças estruturais, variações de interações intra e intermoleculares, constituição de membrana, interação lipídio-proteína e estado conformacional das estruturas proteicas.

A espectroscopia por FT-IR tem sido usada para identificação e classificação de micro-organismos[100, 101]. Já está bem estabelecido na literatura que a espectroscopia por FT-IR é uma ferramenta adequada para analisar e caracterizar diferentes estruturas celulares[102, 103, 104], bem como identificar possíveis alterações relacionadas a resistência fenotípica[105,106].

Alvarez-Ordóñez e colaboradores[107] mostraram que a espectroscopia por FT-IR é um método físico-químico capaz de determinar características químicas globais de células, portanto, representa uma técnica adequada para estudar alterações moleculares após a exposição ao estresse.

Neste contexto, o uso da espectroscopia por FT-IR pode ser uma ferramenta valiosa na avaliação de *C. albicnas* em diferentes fases de crescimento celular, a fim de identificarmos mudanças bioquímicas que possam diminuir a efetividade da aPDT, e compreendermos os efeitos promovidos pelas ROS, provenientes da aPDT em células em condições metabólicas diferentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparação do Inóculo de *C. albicans*

As culturas de *C. albicans* (ATCC 90028) foram preparadas em caldo de Sabouraud Dextrose (Difco Laboratories Inc.) e incubadas aerobicamente sob agitação de 100 rpm (rotação por minuto) a 37˚ C por 6 h, 24 h e 48 h, para avaliação da influência do metabolismo celular, nas diferentes fases de crescimento, antes e após o tratamento com a aPDT, como mostra a Tabela 2. Decorridos os tempos de incubação, as células foram lavadas, ressuspendidas em solução tampão fosfato-salina (PBS - *phosphate buffered saline*) e a concentração celular foi ajustada em espectrofotômetro para transmitância de 10 a 15 %, no comprimento de onda λ= 540nm, para a obtenção de suspensões padronizadas contendo 10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colônia/mL). Para o preparo das amostras para MEV, AFM e FT-IR, decorridos os tempos de incubação, os procedimentos foram os mesmos, com a diferença de que as células foram ressuspendidas em água destilada estéril ao invés de PBS, para não haver interferência nas medidas.

Tabela 2: Grupos de *C. albicans* (ATCC 90028).

Grupos Controle	Grupos aPDT
C 6 h	aPDT 6 h
C 24 h	aPDT 24 h
C 48 h	aPDT 48 h

4.2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Para avaliação da susceptibilidade de *C. albicans* à aPDT em diferentes estágios de crescimento celular, foi utilizado como Fs o azul de metileno (AM) (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, EUA), na concentração final de 50 μM.

Como fonte de luz, foi utilizado um LED, λ= 660$\pm$20 nm (*homemade*), potência de saída P= 360mW e taxa de fluência de 180 mW/cm^2. A potência de saída foi aferida em detector de potência (FieldMate – *Laser Power Meter*) antes de cada irradiação. O tempo de pré-irradiação (tempo entre a adição do Fs e o início da irradiação) foi de 10 min para todos os grupos e os tempos de irradiação

foram de 12 min, 15 min e 18 min, conforme o grupo. Cada amostra foi irradiada isoladamente, de cima para baixo, de tal forma que, a ponta do LED coincidia com o diâmetro do poço da placa de 24 poços irradiado.

As amostras foram divididas em seis grupos como mostra a Tabela 3. Para todos os grupos, os experimentos foram feitos em placas de 24 poços, contendo 990 µL da suspensão de *C. albicans* + 10 µL de PBS ou de Fs, dependendo do grupo. Foram utilizadas células crescidas durante 6 h, 24 h e 48 h.

Tabela 3: Grupos experimentais.

Grupos	Luz	Fs
Grupo C	-	-
Grupo L (18 min)	+	-
Grupo Fs	-	+
aPDT (12 min)	+	+
aPDT (15 min)	+	+
aPDT (18 min)	+	+

Os grupos controle (C) não receberam nenhum tratamento com luz ou Fs. Os grupos LED (L) foram irradiados por 18 min, sem a adição de Fs. Nos grupos fotossensibilizador (Fs) foram adicionados às amostras 10 µL de AM (na concentração de 500 µM), em ausência de luz, permanecendo nessa condição, durante todo o experimento (88 min), para testes de toxicidade no escuro. Para cada grupo de aPDT, suspensões de *C. albicans* foram colocadas em poços diferentes e adicionados 10 µL de AM (na concentração de 500 µM) e após o tempo de pré-irradiação, as amostras foram irradiadas durante os tempos estabelecidos na Tabela 3.

4.3. Avaliação Microbiológica

As contagens microbiológicas seguiram de acordo com metodologia estabelecida por Jett e colaboradores[108]: foram realizadas diluições seriadas na ordem de 1/10, com finalidade de diminuir a concentração de UFC/mL para a contagem final. Com uma pipeta multicanal, dez-µL por diluição foram estriadas em placas de Petri de ágar Sabouraud dextrose e, em seguida, colocadas em estufa bacteriológica a 37º C, aerobicamente, por 24 h. As placas foram feitas em triplicata, e em três diferentes dias para cada amostra (n=9). O número de colônias contadas nas diferentes diluições foi multiplicado pelo fator de diluição e pelo volume estriado (10 µL) para obtenção das unidades formadoras de colônia por mililitro. Os resultados médios obtidos para cada grupo foram convertidos em fração de sobrevivência, sendo divididos pela média de UFC/mL dos seus respectivos grupos controle.

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura e de Força Atômica

Para a avaliação por MEV, culturas dos grupos controles e submetidas à aPDT foram lavadas por centrifugação a 2400 rpm, três vezes, intercalada com ressuspensões em 1 mL de água destilada estéril. Após a última lavagem, removeu-se o sobrenadante, e os *pellets*, coletados com uma pipeta de 5 μL, foram depositados em porta-amostras metálicos, para observação ao microscópio eletrônico de varredura. (*TM 3000 Tabletop, Hitachi,*Tókio, Japão - do Centro de Lasers e Aplicações).

Na AFM, as suspensões dos grupos controle também foram submetidas a três lavagens, e após a última lavagem, 10 μL dos *pellets* foram colocados em lâminas de vidro por esfregaço. A fixação das células foi feita por calor, com o auxílio de um soprador térmico, cujo jato de ar inferior a 37 ˚C foi direcionado na parte de baixo da lâmina.

Após a avaliação dos grupos controle e para avaliação da aPDT, as mesmas lâminas foram colocadas em placas de 24 poços e acrescentado 990 μL de água destilada estéril + 10 μL de AM (na concentração de 500 μM) e irradiadas nos mesmos parâmetros da avaliação microbiológica (15 min), para cada tempo de crescimento. Após a aPDT, as lâminas foram removidas da placa, com extremo cuidado, e submetidas a jatos de ar morno para fixação das células.

As amostras foram avaliadas no microscópio de força atômica (*SPM9500J3, Shimadzu Corp,* Japão), do laboratório de Plasmas e Processos (LPP), do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), com colaboração do Prof. Dr. Walter Miyakawa, em modo contato e contato intermitente, utilizando pontas de nitreto de silício, com raio nominal de 10 nm e constante de mola de 0,10 N/m.

4.4.1 Espectroscopia de Força

Para a espectroscopia de força utilizou-se pontas de nitreto de silício, com raio nominal de 20 nm, e constante de mola de 0,10 N/m[109]. A deflexão do *cantilever* foi calibrada com uma amostra de aço inox AISI 304. Foram obtidas dez curvas de força para cada amostra, em três dias diferentes, resultando n=30 para cada grupo.

4.5. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier

Para obtenção dos espectros, e subsequente análise dos componentes bioquímicos, as amostras foram divididas em nove grupos como representado na Tabela 4.

Tabela 4: Grupos de *C. albicans* utilizados para avaliação da FT-IR.

Grupos controle	Grupos Fs	Grupos aPDT
C 6 h	CFs 6 h	aPDT 6 h (15 min)
C 24 h	CFs 24 h	aPDT 24 h (15 min)
C 48 h	CFs 48 h	aPDT 48 h (15 min)

Todos os grupos foram preparados como descrito anteriormente, para avaliação microbiológica.

Os grupos controle (C) não receberam nenhum tratamento com luz ou Fs. Os grupos controle Fs (CFs) permaneceram em contato com o AM por 25 min (considerando os tempos de pré- e irradição). Os grupos tratados com a aPDT, foram colocados em poços separadamente, irradiados de forma isolada por 15 min, nas mesmas condições e parâmetros de irradiação já descritos.

As culturas dos grupos: C, CFs e aPDT, foram lavadas por centrifugação a 2400 rpm, três vezes em 1mL de água destilada estéril. Os sobrenadantes foram desprezados, e foram acrescentados 100 µL de água destilada estéril aos *pellets*. As soluções foram então agitadas em vórtex por alguns segundos e alíquotas de 5 µL foram depositadas em lâminas de fluoreto de cálcio – CaF_2 (substrato transparente ao infravermelho) (Figura 8). Antes do procedimento, as lâminas de CaF_2 foram lavadas com água e detergente, em seguida desinfetadas com álcool 70 % e secas com papel absorvente.

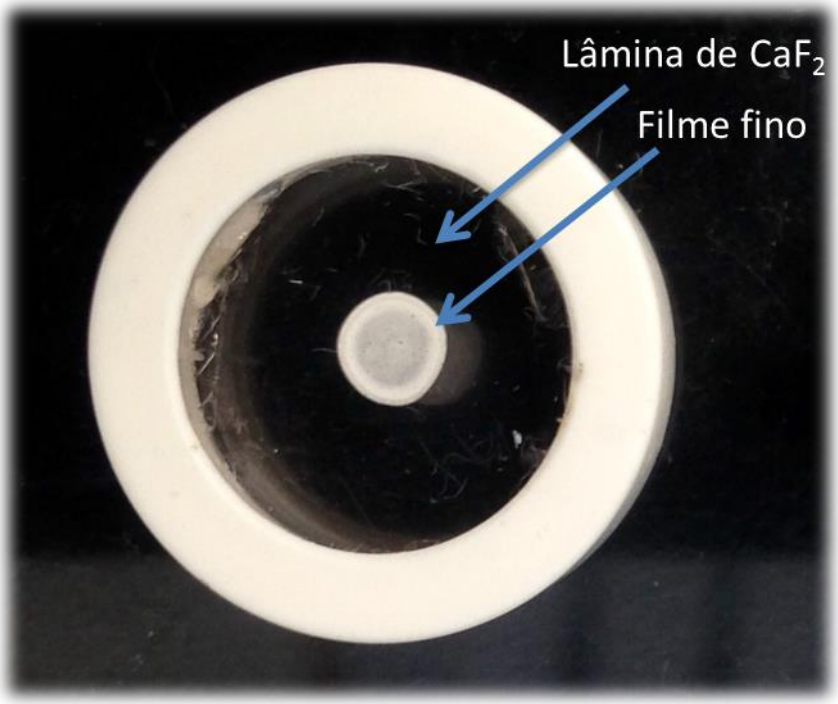

Figura 8: As setas apontam respectivamente para lente de CaF_2 e filme fino de *C. albicans*.

As análises por espectroscopia FT-IR foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em colaboração com o Prof. Dr. Airton Martin.

A cada leitura uma imagem (2000 μm X 2000 μm) do filme fino foi obtida por meio de um microscópio acoplado no espectrofotômetro. Através desta imagem, dez pontos foram selecionados aleatoriamente nas amostras para obtenção dos espectros (Figura 9).

Os espectros foram obtidos em modo de ponto por transmissão, no intervalo de 900 a 4000 cm^{-1}, com 32 varreduras realizadas e resolução de 2 cm^{-1} utilizando o espectrofotômetro *Spectrum Spotlight* 400 FT-IR (*Perkin Elmer,Walthan, MA, USA*), equipado com detector MCT (mercúrio cádmio telúrio), operando à temperatura do nitrogênio liquido (-196˚ C). Os espectros foram considerados reprodutíveis, quando os picos espectrais não ultrapassavam o valor de 0,1 em unidades de absorbância (u.a.). Um *background* utilizando uma janela sem a amostra foi realizado a cada troca de leitura.

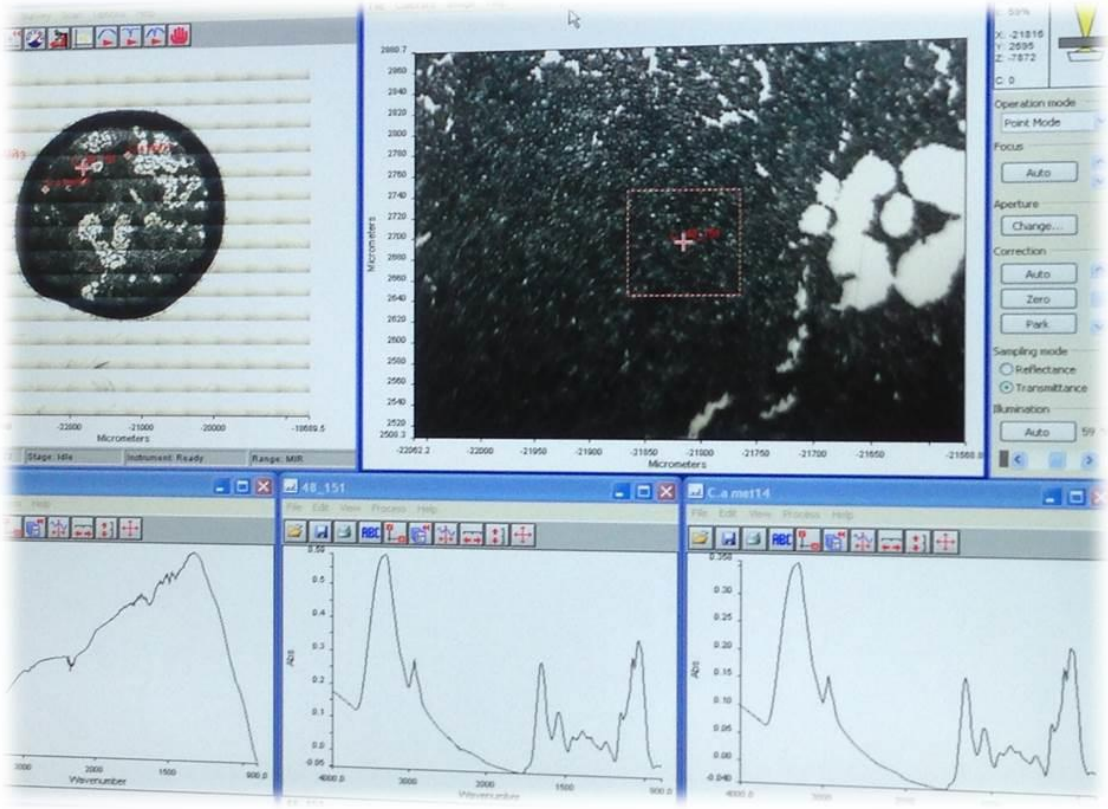

Figura 9: Ilustração dos dez pontos selecionados aleatoriamente na imagem do filme de *C. albicans* obtido por meio do microscópio acoplado no espectrômetro.

Os espectros foram obtidos no intervalo entre 900-4000 cm^{-1} em três dias diferentes (n=30 para cada grupo). Os espectros da matriz de imagem foram extraídos do programa *Cystospec* em extensão *Jcamp.dx* e em seguida tratados utilizando o programa estatístico OPUS versão 4.2, Bruker). As médias dos espectros foram realizadas com o mesmo software, submetidas à correção de linha de base (correção de *Rubberband*, 32 pontos e exclusão das bandas de CO_2), para minimizar a heterogeneidade espectral devido às diferenças de espessura da amostra, seguidas de normalização vetorial em todo o alcance espectral. Para evidenciar a heterogeneidade espectral, foram obtidas as segundas derivadas das médias espectrais, com auxílio do programa estatístico MATLAB.

Para tornar visíveis as variações entre os espectros, foram obtidos dendrogramas, através da análise hierárquica de *cluster*, que são análises quantitativas de dissimilaridade, que consideram as formas e os contornos dos espectros, em vez de números de banda, frequências ou intensidades[110]. As médias espectrais foram submetidas ao cálculo da primeira derivada, com nove pontos de suavização, com o objetivo de amplificar o número de características discriminan-

tes presentes no espectro e minimizar a heterogeneidade espectral por diferenças de espessura da amostra. Também foi aplicado o dimensionamento de primeiro intervalo (*Scaling first range*) e o algoritmo *Ward's*, buscando minimizar a soma das diferenças (heterogeneidade) entre os elementos de cada grupo e o valor médio do grupo, minimizando o desvio padrão entre os dados de cada grupo formado, construindo grupos mais homogêneos[100].

Quatro regiões espectrais foram selecionadas para este estudo, que ilustram os picos espectrais correspondentes às ligações moleculares de DNA e carboidratos (900-1200 cm^{-1}), DNA e proteínas (1200-1500 cm^{-1}), lipídios (1500-1800 cm^{-1}) e lipídios e ácidos graxos insaturados (2800-3100 cm^{-1}).

4.6. Análise Estatística

- **Avaliação Microbiológica**

Para avaliação dos resultados microbiológicos foram calculadas as frações de sobrevivência dos grupos aPDT, L e Fs em relação ao grupo controle (C). Foi realizado teste de normalidade por Shapiro-Wilk, que atestou distribuição não-normal entre os grupos avaliados. Por conta disso, o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado nas comparações entre as frações de sobrevivência após a aPDT nos diferentes tempos de crescimento de *C. albicans* (6 h, 24 h e 48 h), usando o teste de *Dunn* como *post hoc*. Foram considerados significantes valores de $p<0,05$.

- **Microscopia de Força Atômica**

Após avaliação de normalidade por Shapiro-Wilk dos resultados da espectroscopia de força através da AFM, os grupos tiveram suas médias comparadas através de teste *t* de *Student* pareado, quanto às diferenças promovidas pela aPDT na constante elástica e adesividade dos micro-organismos. Para as mesmas variáveis, os grupos controle, nas diferentes fases de crescimento, foram comparados através de análise de variância por um fator (*one-way* ANOVA), usando *Tukey* e *Bonferroni* como pós-testes. Diferenças significantes foram consideradas quando $p<0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÂO

5.1. Avaliação Microbiológica

Quando analisados isoladamente os efeitos da luz e do Fs sobre as células de *C. albicans* (grupos L e Fs), observamos que não foram promovidas alterações de sobrevivência em comparação ao grupo controle (C), Figura 10.

A aPDT, realizada durante 18 min em células de *C. albicans* foi letal para células em fases lag (6 h) e exponencial de crescimento (24 h). Entretanto, o grupo em fase estacionária de crescimento (48 h) continuou a apresentar células viáveis na mesma dose de irradiação (Figura 10), com redução de 2 logs na fração de sobrevivência.

Células em fase exponencial de crescimento tiveram redução de 1,5 log no número de células viáveis, com 12 min de irradiação, enquanto que células jovens apresentaram a mesma redução com 15 min (Figura 10).

Também foi observado, na Figura 10, que células jovens (6 h) e velhas (48 h) tiveram a mesma redução na viabilidade celular quando irradiadas por 12 min e 15 min. Células na fase exponencial de crescimento foram estatisticamente diferentes de células jovens e velhas, nos dois tempos de irradiação (12 min e 15 min).

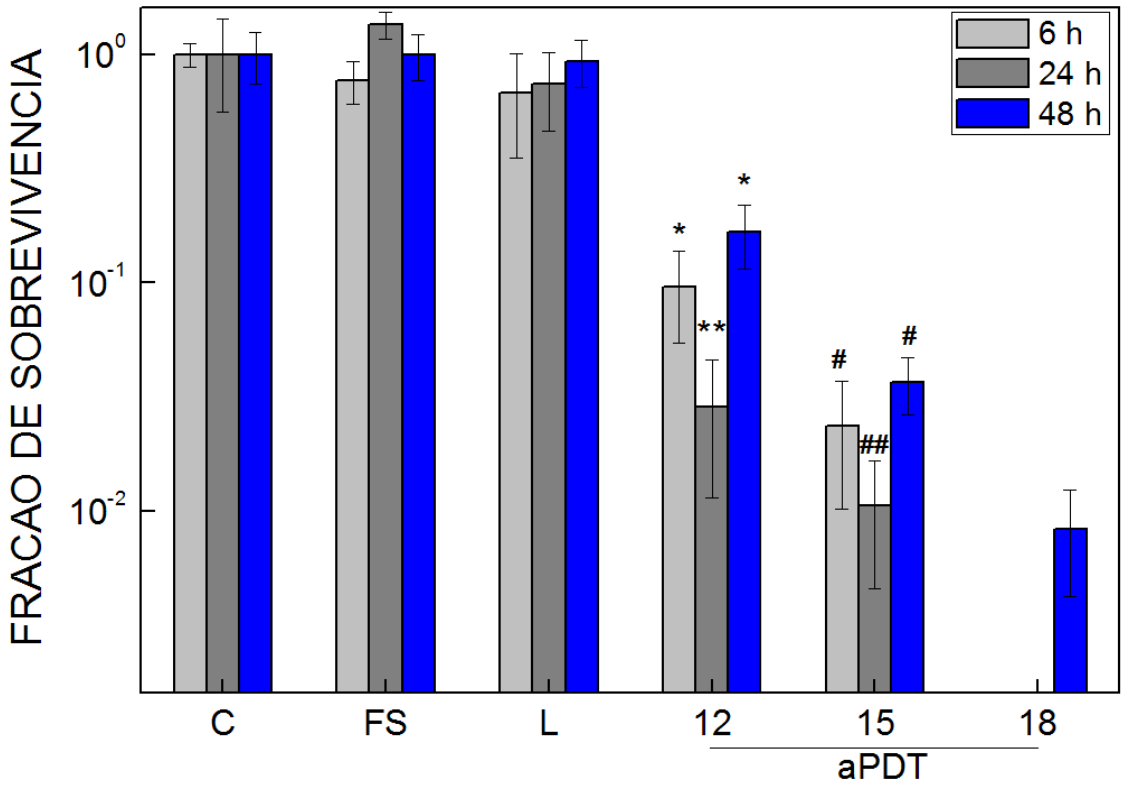

Figura 10: Fração de sobrevivência de *C. albicans* ± desvio padrão. (C), (L) e (FS), não demonstram nenhuma toxicidade em células fúngicas. Células em fase exponencial de crescimento mostraram-se mais susceptíveis a aPDT. O efeito fotodinâmico foi fluência–dependente em diferentes fases de crescimento ($p<0,05$, representado no gráfico através dos símbolos * e #) (N=9).

A fisiologia da fase lag de crescimento ainda é pouco reportada na literatura, enquanto que as fases exponencial e estacionária de crescimento já estão bem estabelecidas[111]. A fase lag é descrita por ser uma fase que permite a adaptação do micro-organismo a novos ambientes e ser metabolicamente ativa, entretanto não existem critérios fisiológicos ou bioquímicos que definam esta fase de crescimento[112]. Recentemente, foram descritas mudanças de transcrição durante a fase lag que indicam atividades altas do metabolismo do nucleotídeo e biossíntese de lipopolissacarídeos e ácidos graxos[112]. Genes que codificam a síntese de aminoácidos de RNA e proteínas ribossomais também foram encontrados em altos níveis, indicando que, nesta fase de crescimento, ocorre a preparação da "máquina" do micro-organsismo, que será necessária para a multiplicação celular durante a fase exponencial[112].

Uma vez que a aPDT promove a formação de ROS, que causam danos oxidativos, a redução da efetividade desta em células em fase lag de crescimento,

em relação às células na fase exponencial, é justificada pelo aumento nas concentrações de ferro e manganês intracelular livres durante a fase latente, minimizando os danos causados pelo estresse oxidativo[113]. Mediadores que regulam a resposta primária de danos oxidativos provocados pelo peróxido de hidrogênio e por radicais superóxidos foram identificados em toda a fase lag[112].

Nossos resultados corroboram com a literatura, uma vez que em geral células em fase exponencial de crescimento são mais susceptíveis a aPDT, do que células em fase estacionária de crescimento[14,15]. Este fato pode ser devido à proteção adquirida pela célula frente ao estresse oxidativo[52]. Frohner e colaboradores mostraram que a inativação de genes envolvidos na proteção contra ROS, tais como a superóxido dismutase e a catalase, atenua a virulência fúngica[114].

Células velhas secretam maior quantidade de matriz extracelular (EPS – exopolissacarídeos – matriz extracelular), formando uma barreira mecânica que protege e auxilia a comunicação entre células e célula-substrato (mecanismo de *quorum sensing*), contribuindo com a virulência do micro-organismo[15]. Ainda, a matriz extracelular pode dificultar a difusão e a interação do Fs com a célula fúngica, diminuindo a efetividade da aPDT[82].

A compreensão da influência do metabolismo das células de *C. albicans*, antes e após o tratamento com a aPDT é fundamental para que os resultados desta terapia sejam otimizados. Neste contexto, análises morfológicas, propriedades mecânicas, capacidade de aderência e avaliações bioquímicas dos diferentes estágios de crescimento da célula fúngica, ganham maior relevância para identificação dos fatores de proteção celular contra a aPDT.

Com base nestas análises, foi escolhido o tempo de irradiação de 15 min para as avaliações da aPDT por MEV, AFM e FT-IR, uma vez que há células viáveis e não viáveis nas três fases de crescimento, com diferenças metabólicas no comportamento de morte.

5.2. Observações Morfológicas

5.2.1 MEV

Os resultados da MEV demostraram que células em fase lag de crescimento se apresentaram na forma de blastoconídeos esféricos e ovais de 3 a 5 µm de diâmetro, representado na Figura 11 A. Foram identificados brotamentos apicais em formação, indicando que nesta fase não houve divisão celular, portanto, as células estão com atividade metabólica alta preparando-se para o crescimento exponencial[112].

Na fase exponencial, as células se apresentaram na forma de blastoconídeos esféricos e ovais, entretanto, observamos o aparecimento de células alongadas (cabeça de seta), indicando a formação de hifas e pseudo-hifas (Figura 11 C). Foi possível observar na maioria das células o broto apical, confirmando a divisão celular acelerada nesta fase (Figura 11 C – seta curva).

Observamos na Figura 11 E, que a maioria das células em fase estacionária se apresentaram na forma de levedura. Assim como na fase exponencial, foi possível verificar células alongadas, indicando a presença de hifas e pseudo-hifas (cabeça de seta). O dimorfismo celular da *C. albicans* permite a adaptação do micro-organismo a diferentes nichos ecológicos e contribui para maior virulência[52]. Células de levedura apresentam melhor aderência em relação às hifas, e quando dispersas em biofilme, aumentam o poder de adesão deste[115].

A seta branca da Figura 11 E indica a presença de EPS envolvendo as células crescidas por 48 h.

Observações morfológicas das células em diferentes estágios de crescimento, submetidas à aPDT por 15 min, corroboraram com os resultados microbiológicos, sendo as células crescidas por 24 h, mais susceptíveis[14,15]. A aPDT promoveu dano celular em todas as fases de crescimento, entretanto este foi mais significativo em células em fase exponencial (representado pelos asteriscos nas Figura 11 B, D e F). Células em fases lag e estacionária de crescimento apresentaram melhor preservação morfológica, em relação à fase exponencial.

A Figura 11 F mostrou que a aPDT reduziu a quantidade de EPS em células crescidas por 48 h. Núñez e colaboradores[82] mostraram que a matriz extracelular é realmente o primeiro alvo da aPDT. Este espessamento da camada

de EPS é um mecanismo de defesa que as células fúngicas desenvolvem como forma de proteção, dificultando a penetração de fármacos incluindo-se os Fs e diminuindo a efetividade da aPDT[52].

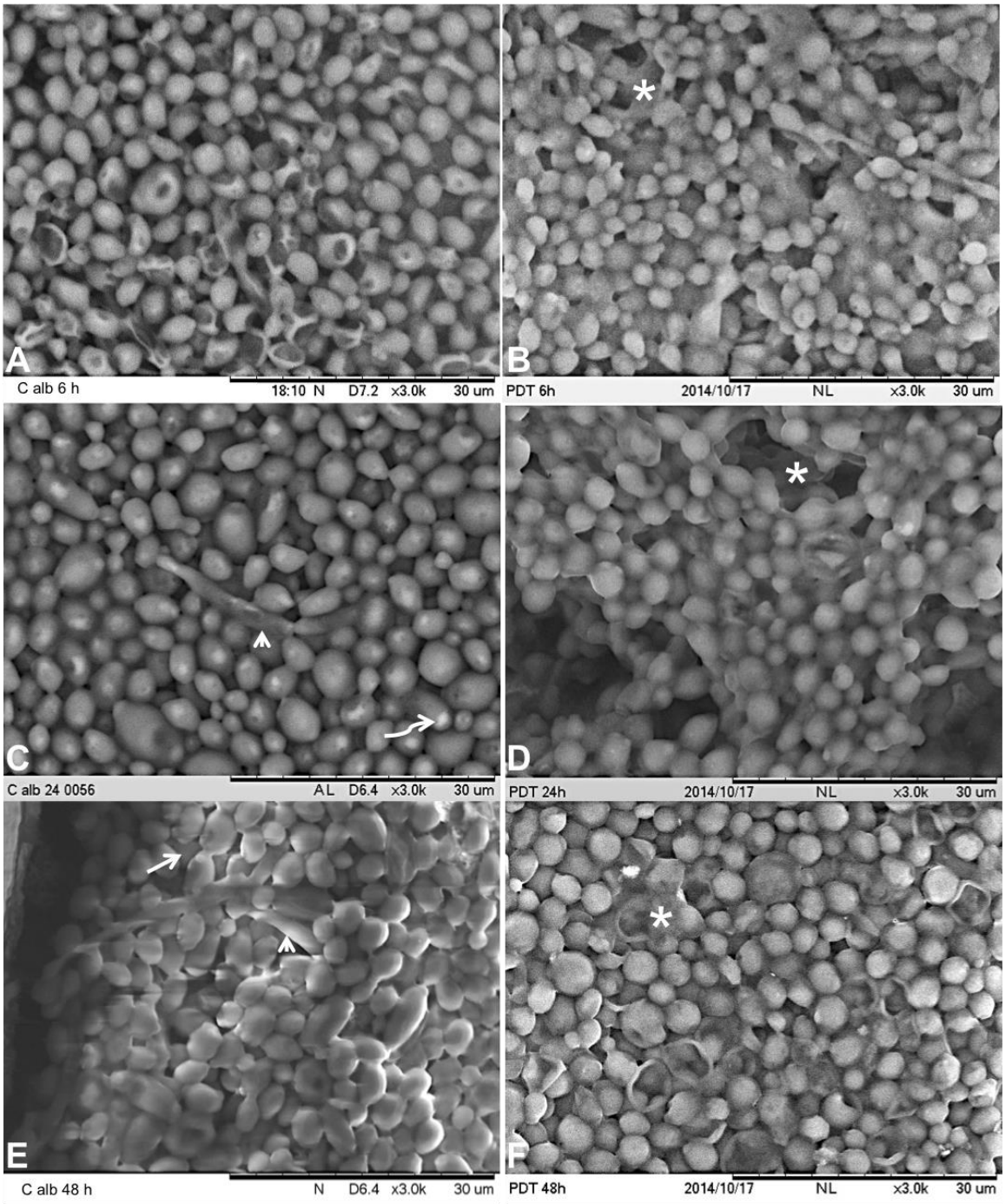

Figura 11: Micrografia eletrônica de varredura de células de *C. albicans* A (6 h); C (24 h); E (48 h); B (aPDT 6 h); D (aPDT 24 h) e F (aPDT 48 h). A seta curva aponta para o broto apical (C). Hifa e pseudo-hifa (cabeça de seta - C e E). As setas apontam para a presença de EPS (E). Os asteriscos em (B, D e F) mostram dano celular. As barras correspondem a 30 μm.

Nossos resultados demonstram que a aPDT foi mais efetiva em células em fase exponencial comparada às outras fases metabólicas. Removeu a camada de EPS em culturas de 48 h, sugerindo que esta tenha sido o primeiro alvo das ROS, poupando alvos vitais da estrutura celular, uma vez que mesmo com 18 min de irradiação, não houve erradicação total das células velhas.

5.2.2 AFM

As imagens topográficas da AFM em modo contato intermitente forneceram melhor resolução e definição na dimensão vertical da imagem em relação à MEV.

Através da AFM foi possível avaliar a altura das células em diferentes fases de crescimento e após o tratamento com a aPDT (Figura 12).

Nos últimos anos, a AFM tem sido usada em adição a MEV para monitorar mudanças morfológicas após o tratamento com a aPDT[116].

O tratamento com a terapia fotodinâmica promoveu redução de aproximadamente 20% da biomassa de *C. albicans* em células na fase exponencial de crescimento, enquanto que nas fases lag e estacionária, esta redução foi de aproximadamente 10% (Figura 12). Ansari e colaboradores[83] mostraram através da AFM que a espessura de biofilme de *C. albicans* diminui pela metade após tratamento com mel de jujuba, um antifúngico natural.

A AFM também fornece informações sobre a matriz de EPS que recobre as células fúngicas. Na visualização tridimensional, observou-se que, além de serem maiores, as células do grupo controle crescidas por 48 h, apresentavam-se envolvidas por uma grande quantidade de EPS, o que sugere maior dificuldade para inativação fúngica em 48 h (Figura 12). Núñez e colaboradores[82] mostraram através da AFM que a camada de exopolissacarídeos é o primeiro alvo da aPDT em células maduras, assim como, Ansari e colaboradores[83] mostraram que o aumento da rugosidade na superfície do biofilme de *C. albicans* após o tratamento com antifúngico, sugere a remoção da camada de EPS, que mantém a textura lisa do biofilme e inibe a penetração de drogas antifúngicas e de Fs.

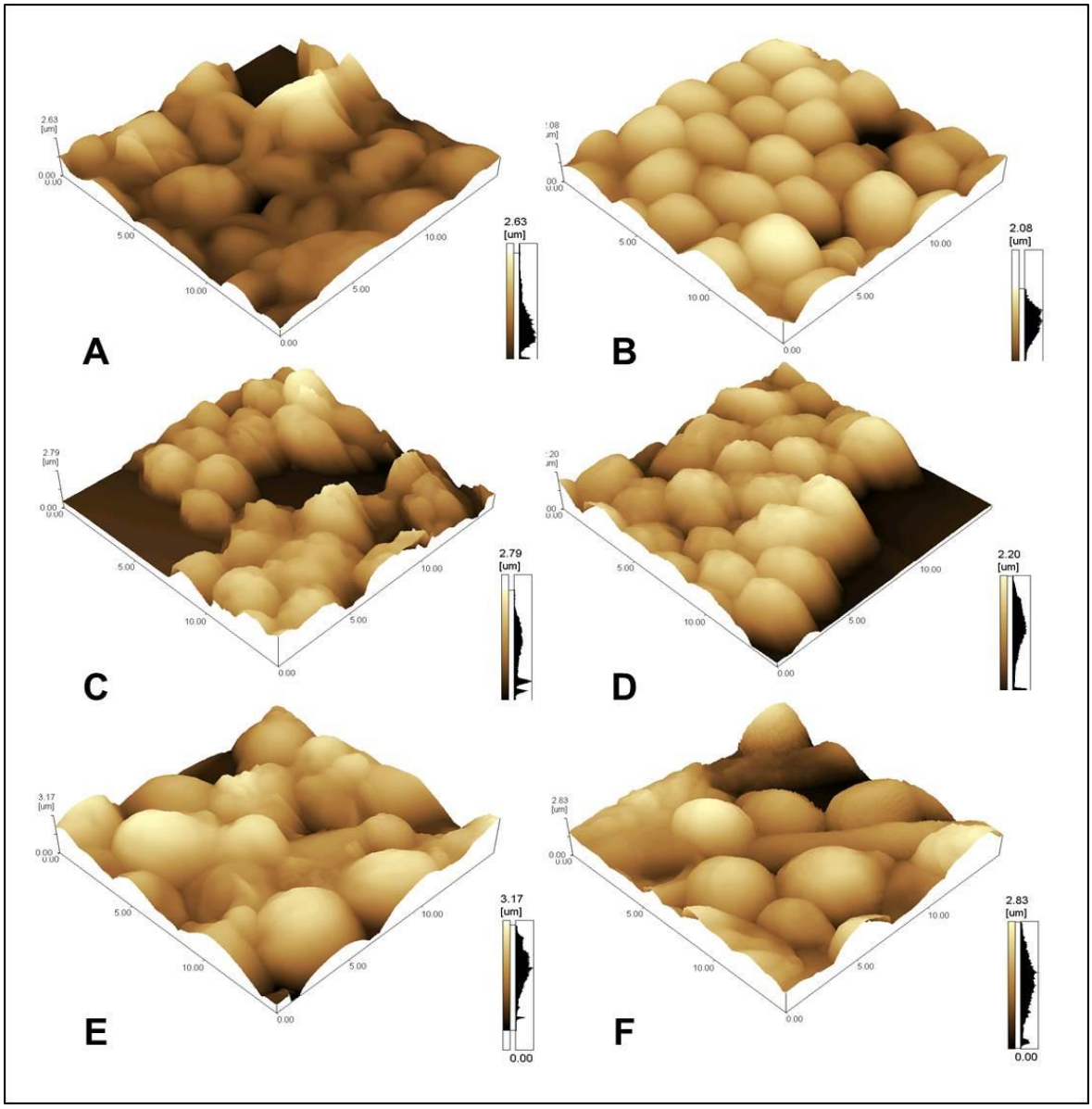

Figura 12: Imagem tridimensional de células de *C. albicans* obtidas por AFM (modo contato intermitente). A (C 6 h); B (aPDT 6 h); C (C 24 h); D (aPDT 24 h); E (C 48 h); F (aPDT 48 h).

Nossos resultados corroboram com a literatura[83], uma vez que verificamos que células em fase estacionária de crescimento possuem maior quantidade de EPS, que pode dificultar a penetração do fotossensibilizador, reduzindo a efetividade da aPDT[15].

Assim como Sahu e colaboradores[117], a aPDT não promoveu alterações no tamanho celular em nenhuma fase de crescimento, como mostrado na Figura 12. No entanto, a AFM mostrou que o tratamento com a aPDT induziu modificações mecânicas na superfície celular.

Uma vez que a ponta do equipamento tocou a amostra realizando uma força específica sobre a mesma e retraiu voltando a posição original, obteve-se o gráfico da curva de força sobre a amostra (Figura 13). Os pontos A e B e C e D da Figura 13, foram utilizados para obter os dados de elasticidade e adesividade, respectivamente.

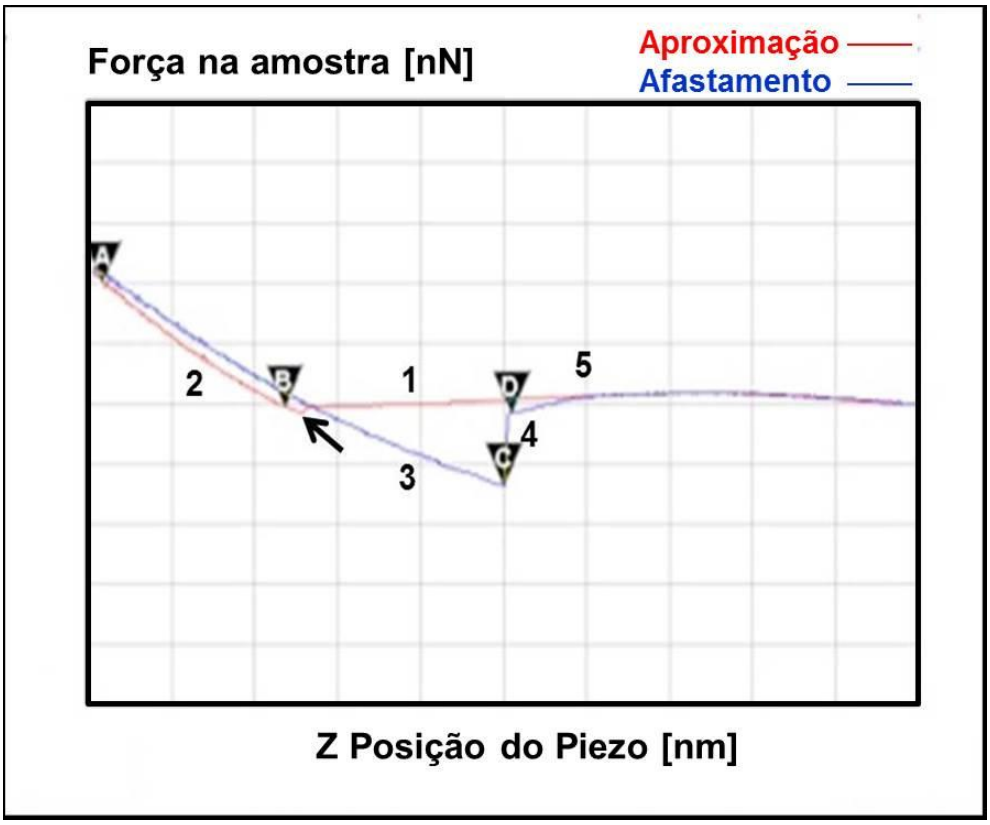

Figura 13: Curva de força obtida em uma amostra de *C. albicans*. (1) Ponta e amostra afastadas e *cantilever* na posição de equilíbrio; (2) contato ponta/superfície da amostra e consequente deflexão do *cantilever;* (3) retração do *cantilever* associada à adesão ponta/amostra; (4) rompimento da adesão da ponta/amostra; (5) o *cantilever* volta para o equilíbrio. A seta indica deflexões causadas por interações atrativas.

A elasticidade das amostras foi medida por meio da constante elástica (k). As células jovens do grupo controle apresentaram maior rigidez em relação às células crescidas por 24 h e 48 h. Há diferença estatística significativa na constante elástica entre os grupos C 6 h, C 24 h e C 48 h ($p<0,05$) (Figura 14).

Klis e colaboradores[45] destacaram a flexibilidade da parede celular fúngica como sendo uma forma de adaptação às alterações ambientais. Mudanças significativas no proteoma da parede celular de *C. albicans* foram observadas em diferentes fases de crescimento celular crescidas em condições de pH, tempe-

ratura e de nutrição diferentes. Além disso, após exposição a drogas antifúngicas, *C. albicans* desencadearam mecanismos de remodelação da parede celular influenciados pela alteração da expressão gênica de quitina, β-glucano e manana[118].

Após a aPDT, as células fúngicas jovens perderam a rigidez, enquanto que as células fúngicas crescidas por 24 h e 48 h, tornaram-se mais rígidas em relação aos seus grupos controles. Houve diferença estatística significativa na constante elástica, entre os grupos tratados com a aPDT, em relação aos seus controle em todas as fases de crescimento (p<0,05) (Figura 14).

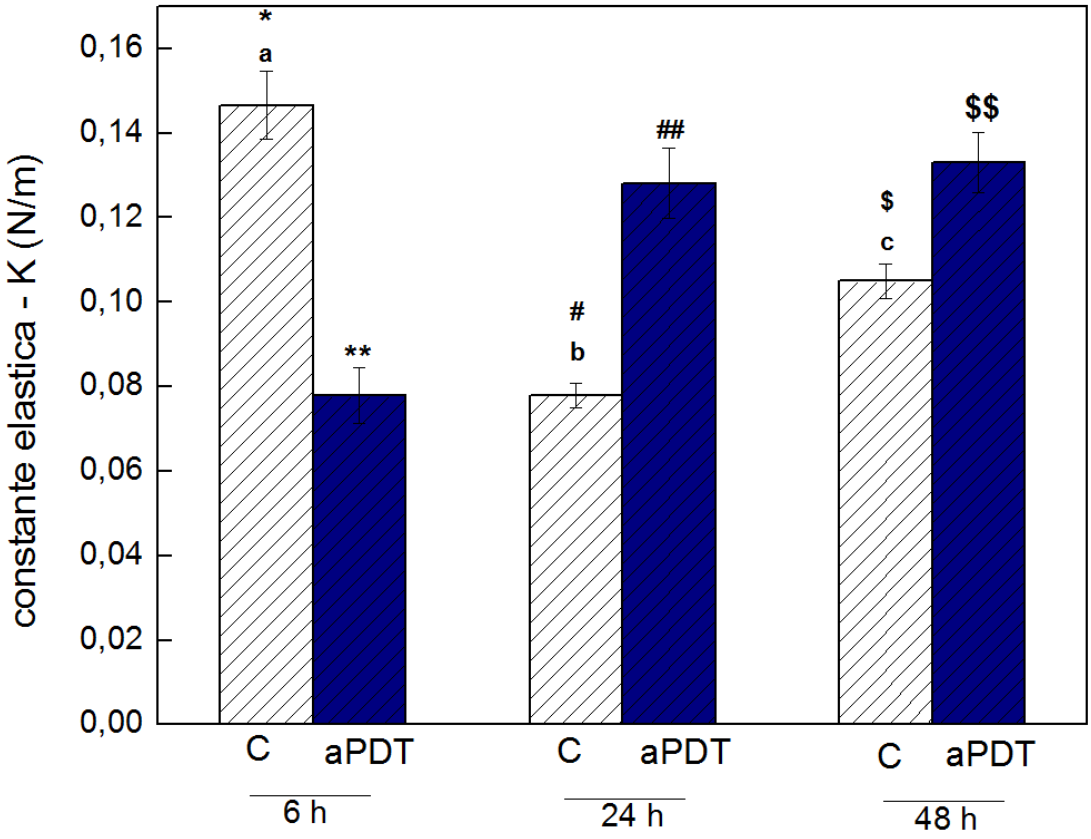

Figura 14: Constante elástica (N/m) de *C. albicans* ± erro padrão. Células fúngicas jovens do grupo controle apresentaram maior rigidez, quando comparadas às células controles crescidas por 24 h e 48 h (p<0,05[1], representado no gráfico através de letras). Após a aPDT, células fúngicas jovens perderam a rigidez, enquanto células crescidas por 24 h e 48 h, tornaram-se mais rígidas (p<0,05[2], representado no gráfico através dos símbolos *,# e $) (N=30).

[1] one-way ANOVA
[2] teste *t* de *Student* pareado.

A elasticidade da parede da célula reflete a estrutura das moléculas individuais de 1,3 - β glucano, que tem uma forma flexível e helicoidal, como uma

mola que pode existir em vários estados de tensão[45]. A estrutura celular pode variar, dependendo do ciclo metabólico e das condições ambientais[119].

A construção da parede celular é totalmente coordenada pela progressão do ciclo celular. Durante a fase lag, e somente nesta fase, ocorre a síntese e fixação da quitina nas paredes laterais da célula, estabilizando assim, a parede da futura célula mãe. Estudos[120, 121, 122] indicam que a quitina desempenha um papel fundamental na elasticidade da parede celular.

Normalmente, na fase de divisão celular, a quitina se encontra no estreitamento da célula mãe, no septo primário e em cicatrizes do broto[119]. Cabib e colaboradores[123] mostraram a importância da quitina e β-1,3 glucano durante a fase de divisão celular em leveduras. Este trabalho focou no remodelamento da parede celular durante o processo de divisão celular, particularmente na interface célula mãe e broto.

Nossos resultados indicaram que a elasticidade da célula fúngica depende da arquitetura e da composição molecular da parede celular, sugerindo que células jovens apresentam maior quantidade de quitina nas paredes laterais, que as tornam mais rígidas em relação às outras fases de crescimento, que apresentam a quitina concentrada na região de estreitamento celular e cicatriz do broto.

A parede celular é uma estrutura dinâmica e sofre remodelação em resposta ao estresse oxidativo[89]. Células em fase exponencial e estacionária de crescimento tornaram-se mais rígidas após a aPDT, devido a modificações bioquímicas importantes durante o processo de reparação ao estresse. A deposição massiva de quitina nas paredes laterais das células, o aumento de ligações transversais entre quitina e β- 1,3- glucano e o aparecimento de novas ligações através do β-1,6-glucano entre proteínas da parede celular e quitina, são mecanismos de reparação da parede celular causada pelo estresse sofrido[90].

Formosa e colaboradores[88] mostraram que células tratadas com antifúngicos tiveram aumento no módulo de elasticidade. Este aumento da rigidez está relacionado principalmente com o aumento do conteúdo de quitina.

Células jovens apresentaram resposta inversa na elasticidade da parede celular comparadas as outras fases de crescimento, ou seja, perderam rigidez após a aPDT. Estes dados sugerem que a aPDT em células em fase lag de crescimento provocou provavelmente danos irreversíveis na parede celular fúngica, que não possibilitaram o processo de reparação ao estresse, tornando-a mais

elástica. Esta hipótese fica mais clara uma vez que os resultados microbiológicos mostraram que apesar de células jovens e velhas apresentarem o mesmo comportamento quando irradiadas por 15 min, aumentando o tempo de exposição da luz, células jovens foram mais susceptíveis a aPDT devido ao enfraquecimento da parede celular.

Com relação à adesividade, dada pela força necessária para separar a ponta do AFM da superfície celular, os grupos controles crescidos por diferentes tempos de crescimento foram estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$), sendo as células crescidas por 48 h mais adesivas em relação às células mais jovens, devido a maior quantidade de EPS produzida por células estacionárias como mecanismo de proteção[15] (Figura 15).

Após a aPDT, a adesividade dos grupos crescidos por 6 h e 24 h aumentou em relação aos seus controles, corroborando os resultados microbiológicos e morfológicos. O extravasamento do conteúdo citoplásmico das células danificadas pela ação da aPDT, tornou-as mais adesivas em relação aos seus controles (Figura 15), sendo este aumento mais significativo nas células crescidas por 24 h. Este fato se dá, devido a maior susceptibilidade à aPDT das células nesta fase de divisão celular[14,15](Figura 15).

Células em fase estacionária de crescimento apresentaram redução significativa na adesividade após tratamento com a aPDT. Uma vez que os resultados morfológicos mostraram redução de EPS em células velhas submetidas a aPDT, podemos sugerir que a adesividade está relacionada com a presença da mesma (Figura 15).

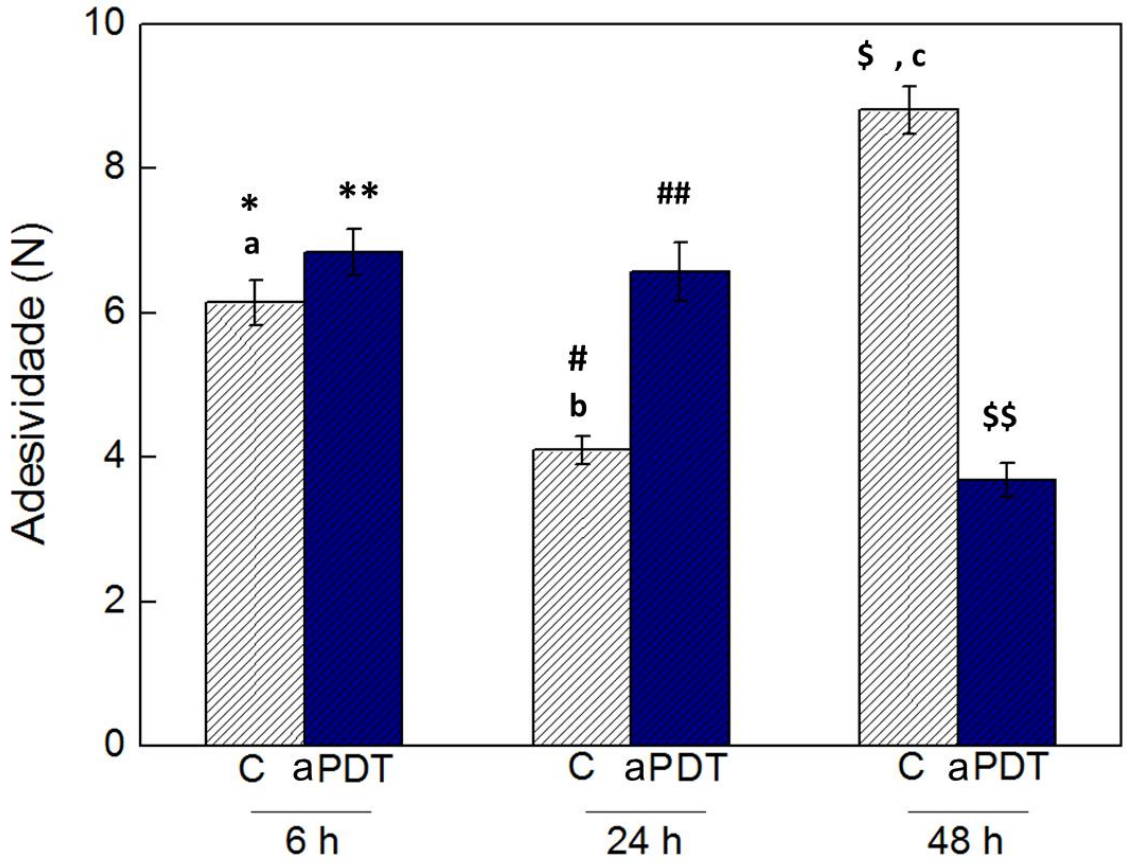

Figura 15: Força de adesividade (nN) de *C. albicans* ± erro padrão. Células crescidas por 24 h se mostraram menos adesivas em relação às jovens e velhas ($p<0,05$[1], representado no gráfico através de letras). Após a aPDT, a adesividade aumentou em células jovens e em fase exponencial, enquanto em células velhas a adesividade diminuiu ($p<0,05$[2], representado no gráficos pelos símbolos *, # e $) ((N=30).

[1] one-way ANOVA
[2] teste *t* de *Student* pareado.

5.3. Avaliação Bioquímica

5.3.1 Grupos: C X CFs

Foram obtidas as médias espectrais dos grupos controles (C) e controles com fotossensibilizador (CFs) (Figura 16), nas diferentes fases de crescimento celular (6 h, 24 h e 48 h), no intervalo entre 900-4000 cm^{-1}.

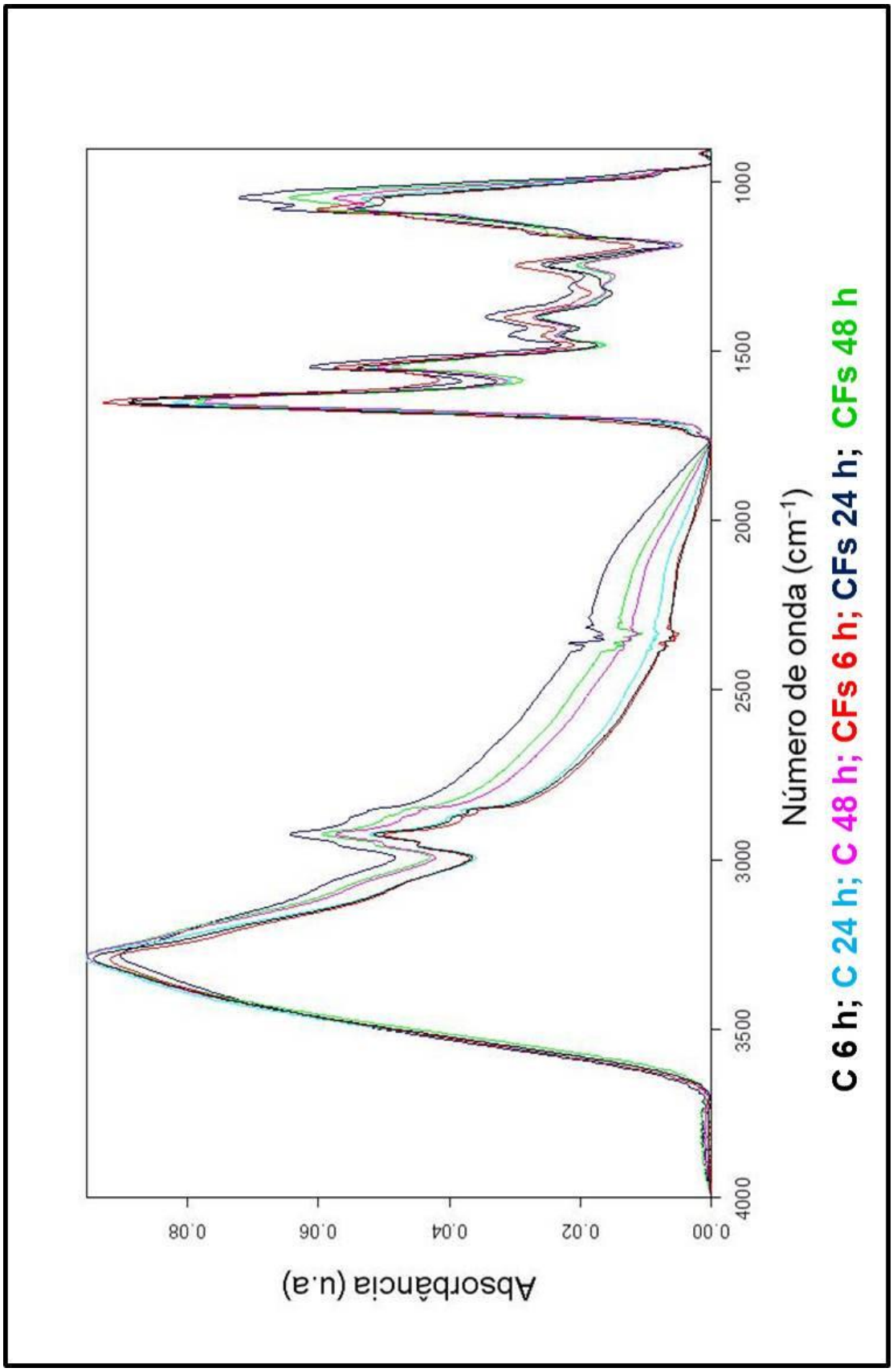

Figura 16: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos C e CFs em diferentes fases de crescimento celular, após correção de linha de base e normalização vetorial, no intervalo entre 900-4000 cm^{-1}.

Para facilitar o entendimento dos espectros e identificar possíveis diferenças bioquímicas entre células em fases lag e estacionária de crescimento, foi obtido através da análise hierárquica de *cluster*, o dendrograma dos grupos C e CFs no intervalo espectral entre 900-4000 cm^{-1} (Figura 17).

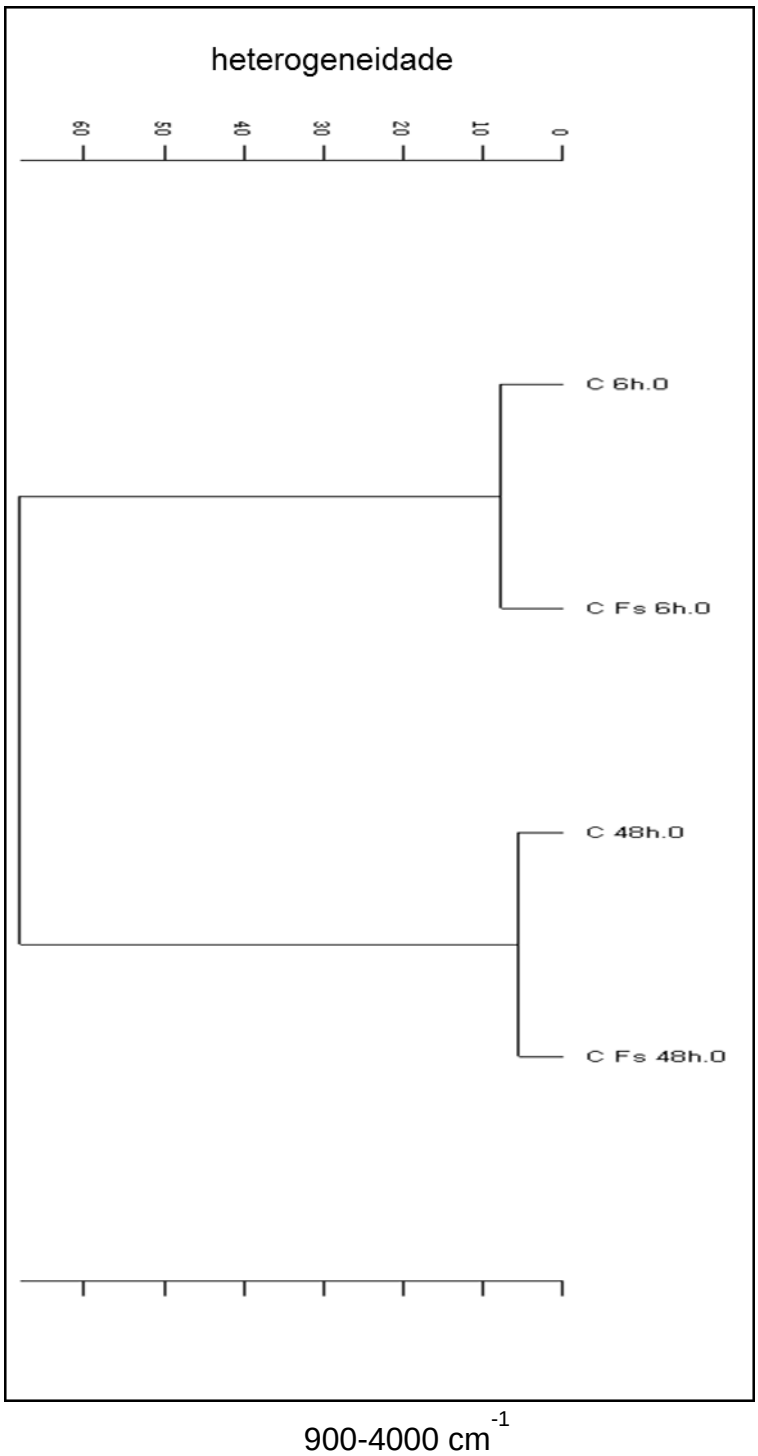

Figura 17: Dendrograma das médias dos grupos: C (C 6 h; C 48 h) e CFs (CFs 6 h; CFs 48 h) em todo o espectro (900-4000 cm^{-1}). N=30.

O dendrograma dos grupos C e CFs mostrou que células jovens são diferentes bioquimicamente das células em fase estacionária de crescimento, e que o azul de metileno não interferiu nesta diferenciação (Figura 17).

Os resultados microbiológicos mostraram que células em fase lag e estacionária de crescimento tiveram a mesma redução microbiana com 12 e15 min de irradiação, entretanto com 18 min, células em fase lag se mostraram mais susceptíveis a aPDT. Com a finalidade de identificarmos possíveis alterações bioquímicas em células fúngicas, que esclarecessem esta resistência microbiana, foram escolhidos para este estudo os grupos CFs 6 h e CFs 48 h.

Quatro regiões espectrais foram selecionadas para tentar identificar as alterações bioquímicas em diferentes fases metabólicas: 900-1200 cm^{-1}, correspondente às ligações moleculares de carboidratos; 1200-1500 cm^{-1}, ácidos nucleicos e proteínas; 1500-1800 cm^{-1}, lipídios; e 2800-3100 cm^{-1}, lipídios e ácidos graxos insaturados (Figura 18).

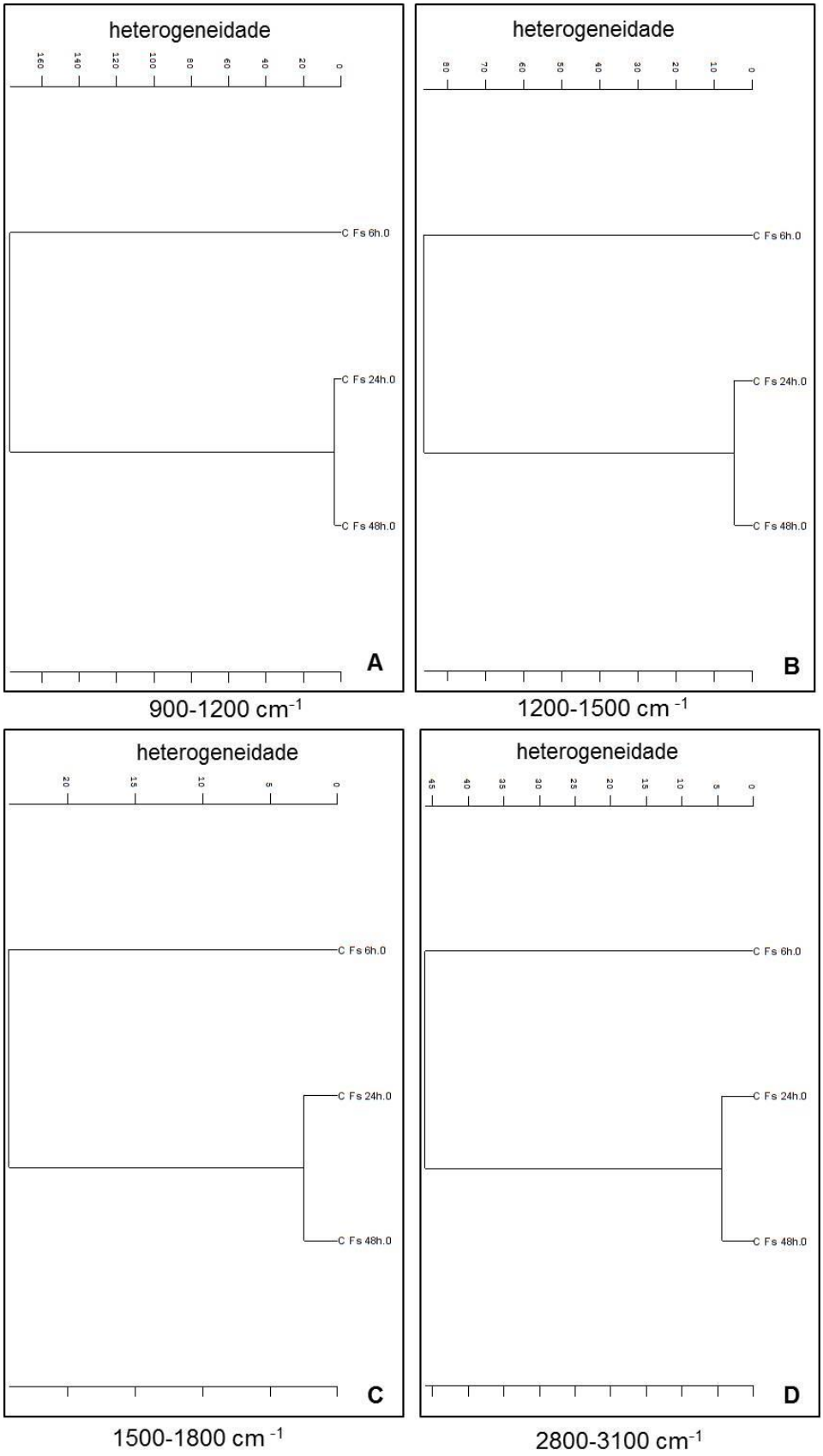

Figura 18: Dendrogramas das médias dos grupos: CFs (6 h; 24 h; e 48 h). Regiões espectrais selecionadas: 900-1200 cm^{-1} (A); 1200-1500 cm^{-1}(B); 1500-1800 cm^{-1}(C); 2800-3000 cm^{-1}(D). n=30

Não foi possível a identificação de uma região específica de alterações bioquímicas que diferenciasse células jovens e velhas, através da análise de *cluster*. Em todos os intervalos espectrais analisados, células jovens foram, bioquimicamente, diferentes das velhas. Células em fase exponencial de crescimento mantiveram homogeneidade com células velhas em todas as regiões analisadas (Figura 18).

Para melhor compreensão das diferenças bioquímicas entre as amostras de *C. albicans* jovens e velhas, foram obtidos os espectros de segunda derivada das médias espectrais dos grupos CFs 6 h e 48 h (Figura 19), em todo o intervalo espectral (900-4000 cm^{-1}) (Figura 19).

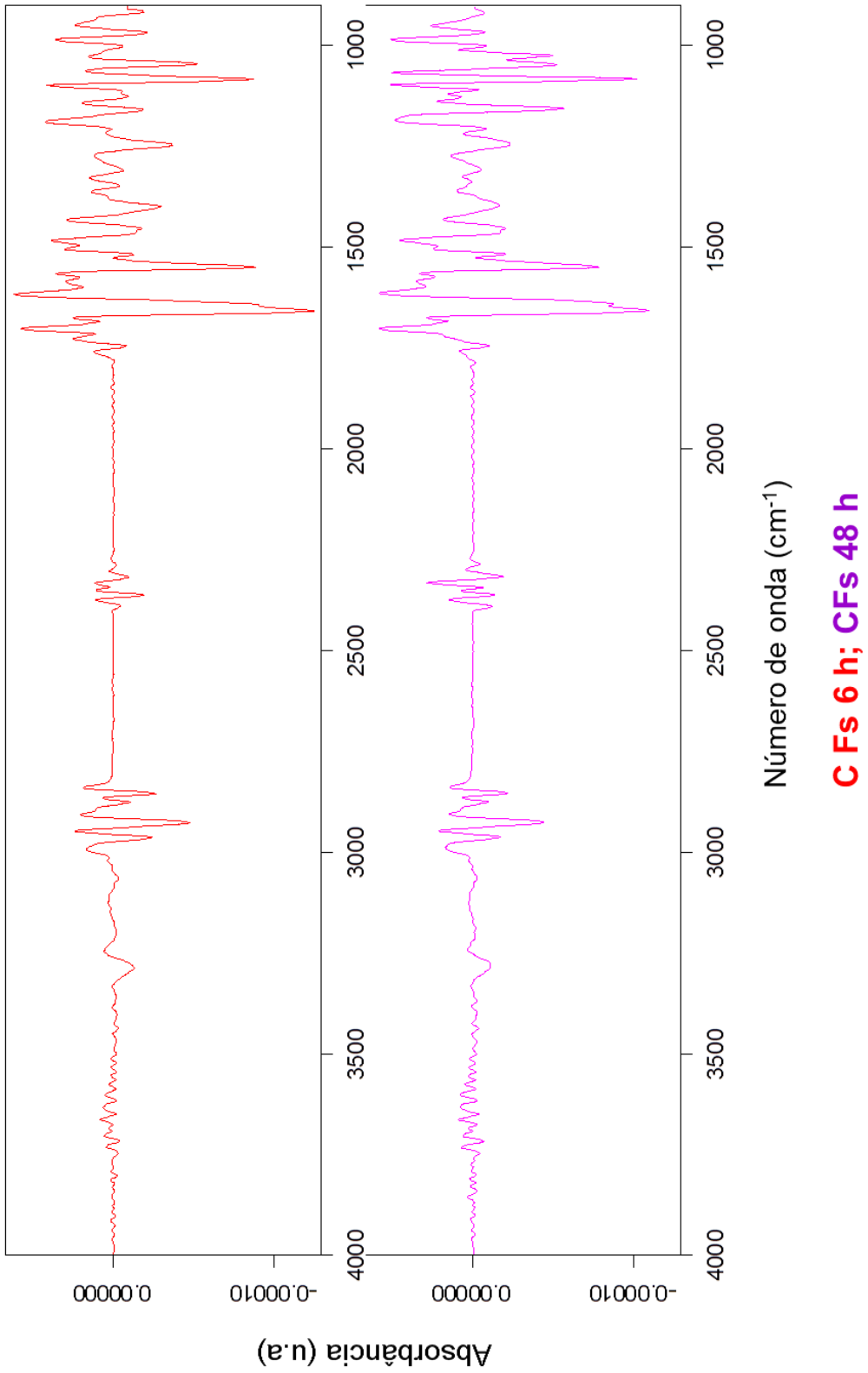

Figura 19: Médias espectrais FT-IR amplificadas de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-4000 cm^{-1}.

Os espectros de segunda derivada das médias espectrais dos grupos CFs: 6 h e 48 h mostraram diferenças principalmente nas regiões entre 900-1800 cm^{-1}, 2200-2400 cm^{-1} e 2800-3100 cm^{-1}(Figura 19).

Foram selecionadas as mesmas regiões submetidas à análise de *cluster* para avaliação dos espectros de segunda derivada: 900-1800 cm^{-1} e 2800-3100 cm^{-1}. A região entre 2200-2400 cm^{-1} foi desprezada por ser uma região principalmente de influência do CO_2.

5.3.2 Grupos: CFs 6 h X CFs 48 h

- **Análise espectral da região do 900-1800 cm^{-1}**

A análise espectral entre 900-1800 cm^{-1} (segunda derivada), entre células fúngicas jovens e velhas, mostrou heterogeneidade entre os grupos principalmente na faixa entre 900-1200 cm^{-1} (Figura 20).

O perfil espectral na região entre 900-1200 cm^{-1} pode refletir a absorção de açúcares presentes na parede celular[103], uma vez que a maioria dos carboidratos de célula fúngica se encontra na parede[124].

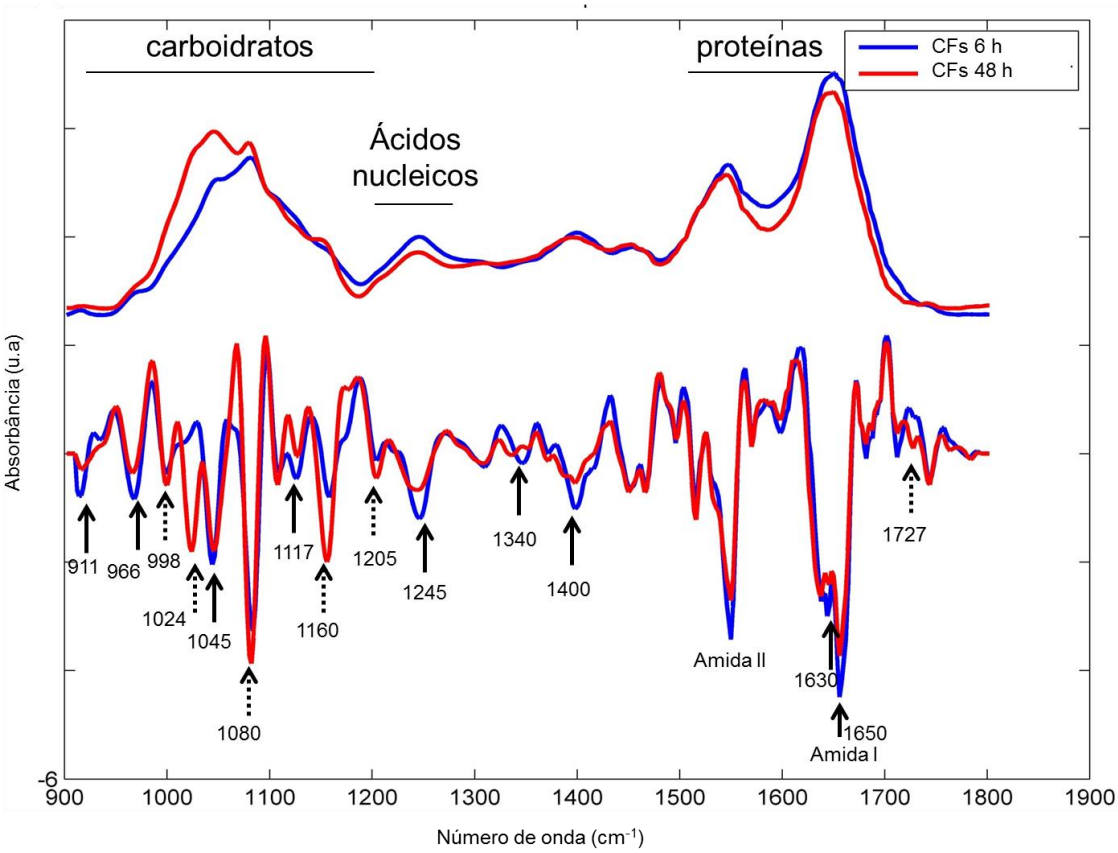

Figura 20: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}. As setas contínuas representam os picos de absorbância das células jovens e as setas pontilhadas representam os picos de absorbância das células em fase estacionária de crescimento.

As setas contínuas e pontilhadas mostradas no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1} da Figura 20 representam, respectivamente, picos de absorbância mais intensos de células em fase lag e em fase estacionária de crescimento. As correspondências entre os picos de absorção e suas assinaturas estão indicadas na Tabela 5.

O aumento das vibrações moleculares C-C e C-O de desoxirribose (DNA - 966 cm^{-1}) e C-OH de ribose (RNA – 915 cm^{-1} e 1117 cm^{-1}), de células em fase lag, corroboram com o período de adaptação e alto metabolismo celular[112]. Uppuluri e colaboradores[41] demonstraram pela análise de conteúdo de DNA através da citometria de fluxo, histograma de número de células viáveis e medidas de fluorescência, maior atividade em células jovens. O aumento do pico de absorção das vibrações moleculares de alongamento antissimétrico de fosfato (grupos de fosfodiéster) mostrado em 1245 cm^{-1} corresponde às vibrações da cadeia de açúcar-fosfato da conformação da cadeia principal dos nucleotídeos[125]. Rolfe e cola-

boradores[112] mostraram aumento de captação de fosfato durante a fase lag, uma vez que este é essencial para a formação ácido nucleico.

O aumento da absorbância mostrado em 1045 cm^{-1}, em células jovens, sinalizou a presença de bandas de glicogênio e carboidratos. Os fungos gastam considerável montante de energia metabólica, na construção da parede celular[119].

A principal reserva energética de polissacarídeo prontamente mobilizada em fungos é o glicogênio. O conteúdo de glicogênio de células de levedura é altamente dependente do estado fisiológico e pode chegar até 20 % da massa seca das células[26]. O consumo de glicogênio pode estar envolvido na transição de células fúngicas de blastóporos para hifas e estar relacionado a diferentes fases de crescimento celular[112, 105].

Na faixa espectral considerada mista pela literatura, 1200-1500 cm^{-1}, há um complexo perfil de absorção decorrente de modos de flexão de lipídios e proteínas ($-CH_2$ e $–CH_3$)[100].

O aumento das vibrações moleculares em 911 cm^{-1} e 1340 cm^{-1} indicam respectivamente, vibrações moleculares de α-manano e ligações de manano+quitina[104]. Na Figura 20 observamos o aumento de absorbância em 1400 cm^{-1} em células crescidas por 6 h.

Gow e colaboradores[126] mostraram que glucanos compartilham muitos picos de absorção com a quitina, particularmente nas regiões entre 1368-1640 cm^{-1}. Dhananasekaran e colaboradores[127]mostraram, através do espectro puro de quitina, um espectro típico de carboidratos com uma série de picos de absorção nítidos, devido à cristalinidade, e picos na região de alongamento C=O de amida entre 1500-1600 cm^{-1}. O pico de absorção de amida I pode caracterizar diferentes assinaturas espectrais (α-quitina e β-quitina). Um pico de amida I dividido em 1630 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} representa ligações de α-quitina, assim como β-quitina produz um pico único de amida I[127]. Portanto, o aumento de absorção nestas regiões pode sugerir aumento dos níveis de quitina em células jovens, corroborando com os nossos resultados da AFM, onde células jovens apresentaram maior rigidez em relação às velhas.

As setas pontilhadas da Figura 20 mostraram aumento de absorção principalmente nos picos de β-glucanos: 998 cm^{-1}(β-1,6), 1024 cm^{-1}(β-1,4), 1080 cm^{-1}(β-1,3), 1106 cm^{-1}(β-1,3) e 1205 cm^{-1} em células velhas. Adt e colaboradores[105] mostraram mudanças entre blastóporos e hifas no intervalo entre 900-1200

cm^{-1} que correspondem a β-glucanos, através do aumento dos modos vibracionais em 998 cm^{-1} e 1106 cm^{-1} em células velhas, confirmando um aumento de espessura da parede celular durante o envelhecimento[47]. Entretanto a literatura reporta que o aumento da espessura da parede celular não tem relação direta com a resistência de células em fase estacionária de crescimento a drogas antifúngicas, ao estresse oxidativo e ao estresse osmótico[47, 89, 91]. Através da análise de transcriptoma de *C. albicans,* foram identificados genes envolvidos nos processos de resistência ao estresse oxidativo, reparação de DNA, envelhecimento, virulência, resistência a drogas e biossíntese de parede celular que expressam apenas em fase estacionária de crescimento[41].

Em microbiologia médica, as lipases têm sido estudadas em alguns fungos devido a sua correlação com virulência e patogenicidade em infecções humanas. A lipase é normalmente quantificada através da liberação de ácidos graxos ou glicerol de triacilglicerol ou ésteres de ácidos graxos[128]. Os ácidos graxos liberados pela hidrólise mediada por lipases podem ser quantificados utilizando-se ensaios imunológicos ou espectrofotométricos[129]. A cinética destas reações pode ser seguida em diferentes regiões do espectro: na região do grupo carbonila (1710-1750 cm^{-1}); na região de ligação de C-O (em torno de 1160 cm^{-1}) e nas ligações de O-H (em torno de 3500 cm^{-1})[130].

Na região entre 1500-1800 cm^{-1} (Figura 20) os espectros conservaram o mesmo perfil espectral com intensidades de absorbâncias diferentes. Células jovens mantiveram os picos de absorbâncias mais intensos, nas regiões de amida I e II. O pico de 1727 cm^{-1} corresponde às vibrações moleculares das ligações de C=O (modo de estiramento de éster de ácido graxo). A banda de amida II não pode fornecer informações de uma única proteína[26].

A análise espectral da região entre 900-1800 cm^{-1} sugere modificações entre células jovens e velhas, principalmente na região espectral de maior absorbância de componentes da parede celular, mais especificamente em DNA e carboidratos(Tabela 5). Portanto podemos concluir que os componentes dominantes das células jovens e velhas, são respectivamente proteínas e polissacarídeos, consequentemente a relação entre estas duas macromoléculas pode estar relacionada à resistência fúngica ao estresse oxidativo.

Tabela 5: Regiões espectrais com assinaturas características no infravermelho de biomoléculas. Os sinais positivos representam aumento do pico de absorção[131].

Região espectral	(cm^{-1})	Assinatura-descrição aproximada	(CFs 6 h)	(CFS 48 h)
900-1200 cm^{-1} Carboidratos DNA e RNA	911	α-manano[2]	+	
	966	C-C e C-O de desoxirribose[3]	+	
	998	β-1,6 glucano[2]		+
	1024	β-1,4 glucano[2]		+
	1045	Banda de glicogênio; estiramento C-O acoplados com C-OH de grupos de carboidratos[2]	+	
	1080	β-1,3 glucano[2]		+
	1106	β-1,3 glucano[2]		+
	1117	Vibrações de estiramento C-O de grupos C-OH de ribose (RNA)[3]	+	
	1160	alongamento (C-O)[3]		+
1200-1500 cm^{-1} DNA e Proteínas	1205	C-O-C, C-O (anéis de vibração de polissacarídeos)[3]		+
	1245	Alongamento antissimétrico de fosfato (grupo de fosfodiéster)	+	
	1320 e 1340	Grupos carboxila (-COOH)[4]	+	
	1400	quitina[5]	+	
1500-1800 cm^{-1} Proteínas e Lipídeos	1550	Amida II de proteínas[3]	+	
	1630	Amida I[3] (α-quitina)[5]	+	
	1650	Amida I[3] e (α-quitina)[5]	+	
	1727	modo estiramento C=O do grupo éster de ácido graxo[3]		+

[2] Baseado em Galichet[103].
[3] Baseado em Movasaghi[131]
[4] Baseado em Synytsya[102]
[5] Baseado em Dhananasekaran[127].

- **Análise espectral da região do 2800-3100 cm^{-1}**

Nas regiões de lipídios e ácidos graxos insaturados (2800-3100 cm^{-1}), observamos o mesmo perfil espectral com picos ligeiramente mais intensos em 2850 cm^{-1}, 2960 cm^{-1} e 3014 cm^{-1} em células crescidas por 6 h (Figura 21- setas contínuas). Células crescidas por 48 h apresentaram picos mais intensos em 2890 cm^{-1} e 2925 cm^{-1} (Figura 21- setas pontilhadas).

A região entre 2800-3100 cm^{-1} apresenta vibrações de estiramento dos grupos funcionais de $–CH_3$ e $–CH_2$, portanto é dominada pelas características espectrais de cadeias de ácidos graxos de vários compostos anfifílicos de membrana (fosfolipídeos) e por algumas vibrações de cadeia lateral de aminoácidos[132]

A fração lipídica de leveduras jovens de *C. albicans* é composta principalmente de lipídios polares, fosfolipídios e glicolipídios, enquanto a fração lipídica de leveduras e hifas em fase estacionária de crescimento é composta de lipídios apolares, principalmente ésteres e triacilglicerol[133].

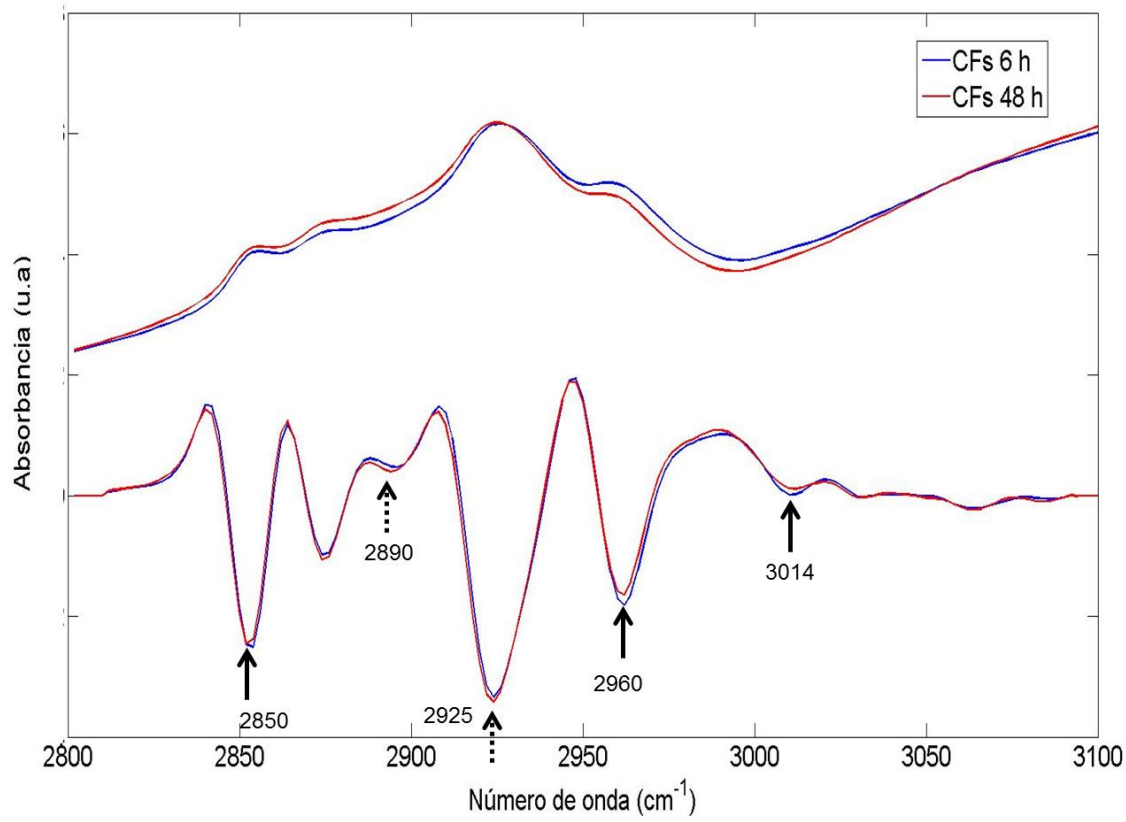

Figura 21: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 2800-3100 cm^{-1}. As setas contínuas representam os picos de absorbância das células crescidas por 6 h e as setas pontilhadas representam os picos de absorbância das crescidas por 48 h.

A maior absorbância na faixa espectral correspondente as ligações de lipídios para células jovens, sugerem um maior acúmulo de fosfolipídios e glicolipídios, principais constituintes da membrana e da parede celular, uma vez que estas células se encontram com metabolismo de formação aumentado.

5.3.3 Grupos: CFs X aPDT

As amostras dos grupos C e CFs apresentaram os mesmos padrões de absorbância com picos de intensidades diferentes, como já mostrado anteriormente na Figura 16. Portanto, a avaliação dos efeitos da aPDT em células fúngicas foi realizada através da comparação bioquímica dos grupos CFs, a fim de eliminarmos as diferenças de intensidades dos espectros após a aPDT causadas pela interferência da absorção do azul de metileno.

Médias dos espectros dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), entre 900-4000 cm^{-1} estão representadas na Figura 22. Os espectros apresentaram o mesmo perfil espectral com diferentes picos de absorção (Figura 22 e Figura 23).

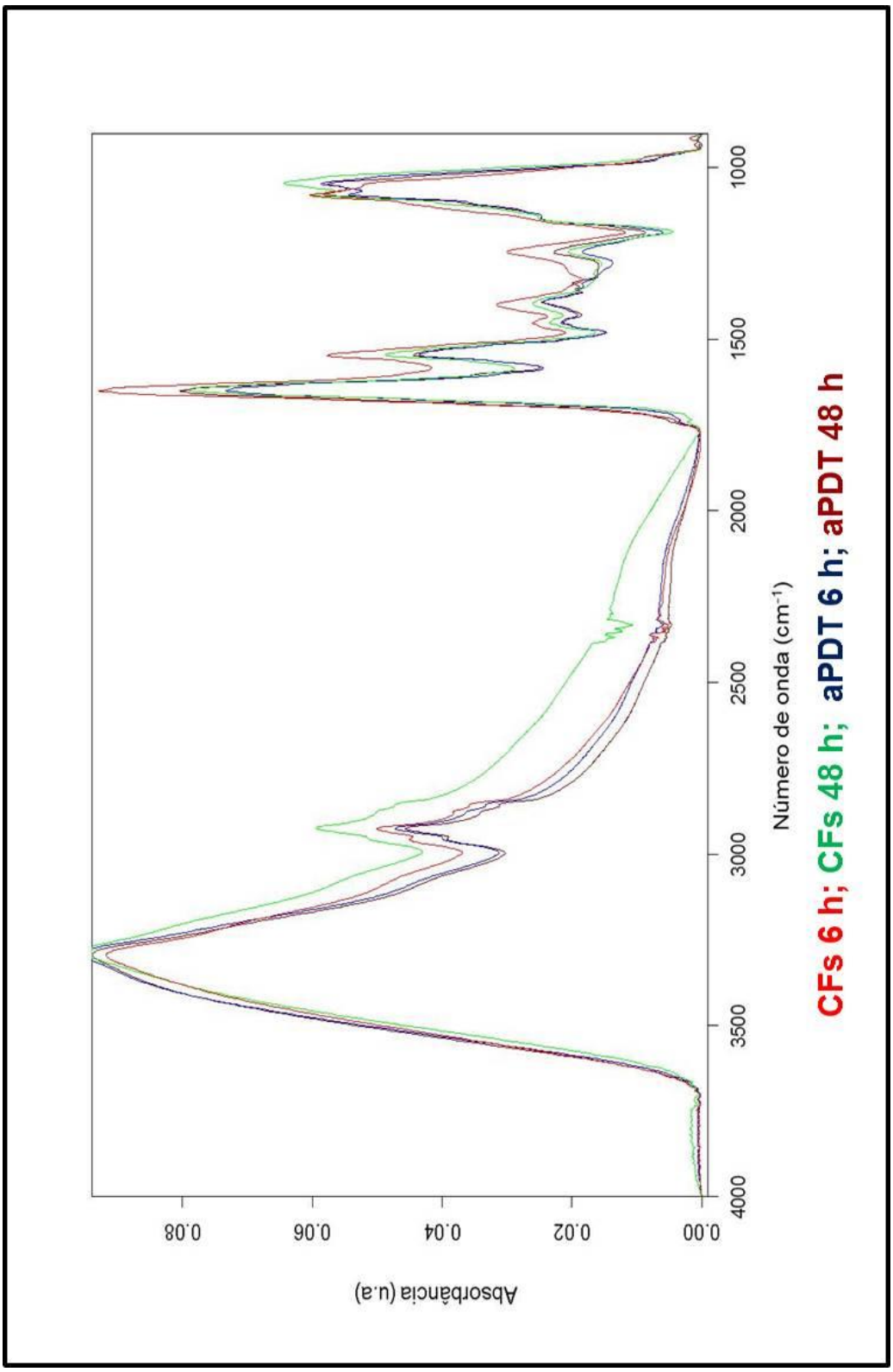

Figura 22: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* crescidas por 6 h e 48 h dos grupos CFs (L-Fs+) e dos grupos submetidos à aPDT (L+Fs+), após correção de linha de base e normalização vetorial, no intervalo espectral entre 900- 4000 cm^{-1}.

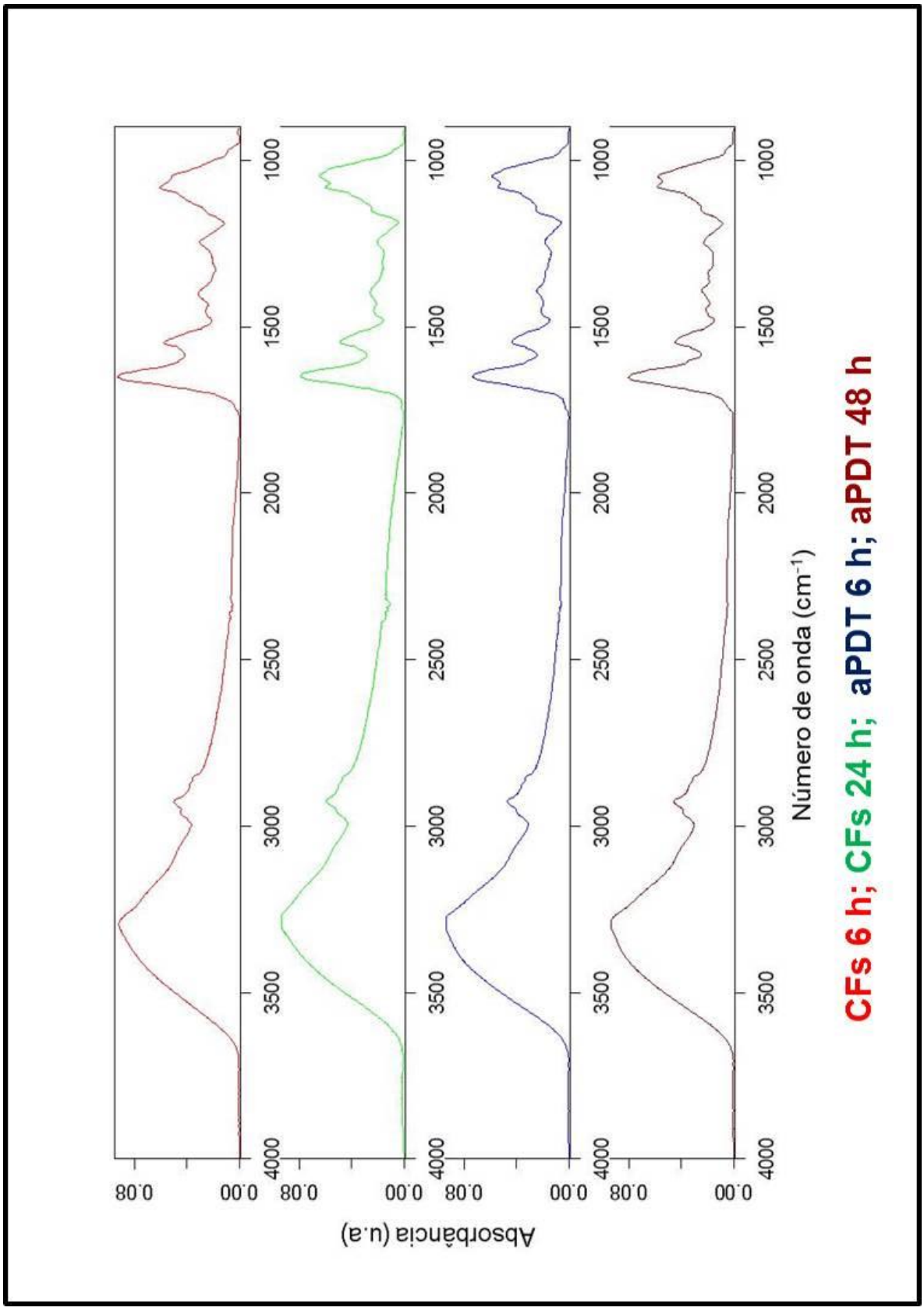

Figura 23: Médias espectrais FT-IR amplificadas de *C. albicans* crescidas por 6 h e 48 h dos grupos CFs (L-Fs+) e dos grupos submetidos à aPDT (L+Fs+), após correção de linha de base e normalização vetorial, no intervalo espectral entre 900- 4000 cm^{-1}.

Para identificar alterações bioquímicas promovidas pela ação da aPDT em diferentes fases do crescimento celular, foi obtido, através da análise hierárquica de *cluster*, o dendrograma dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), no intervalo espectral entre 900-4000 cm^{-1} (Figura 24).

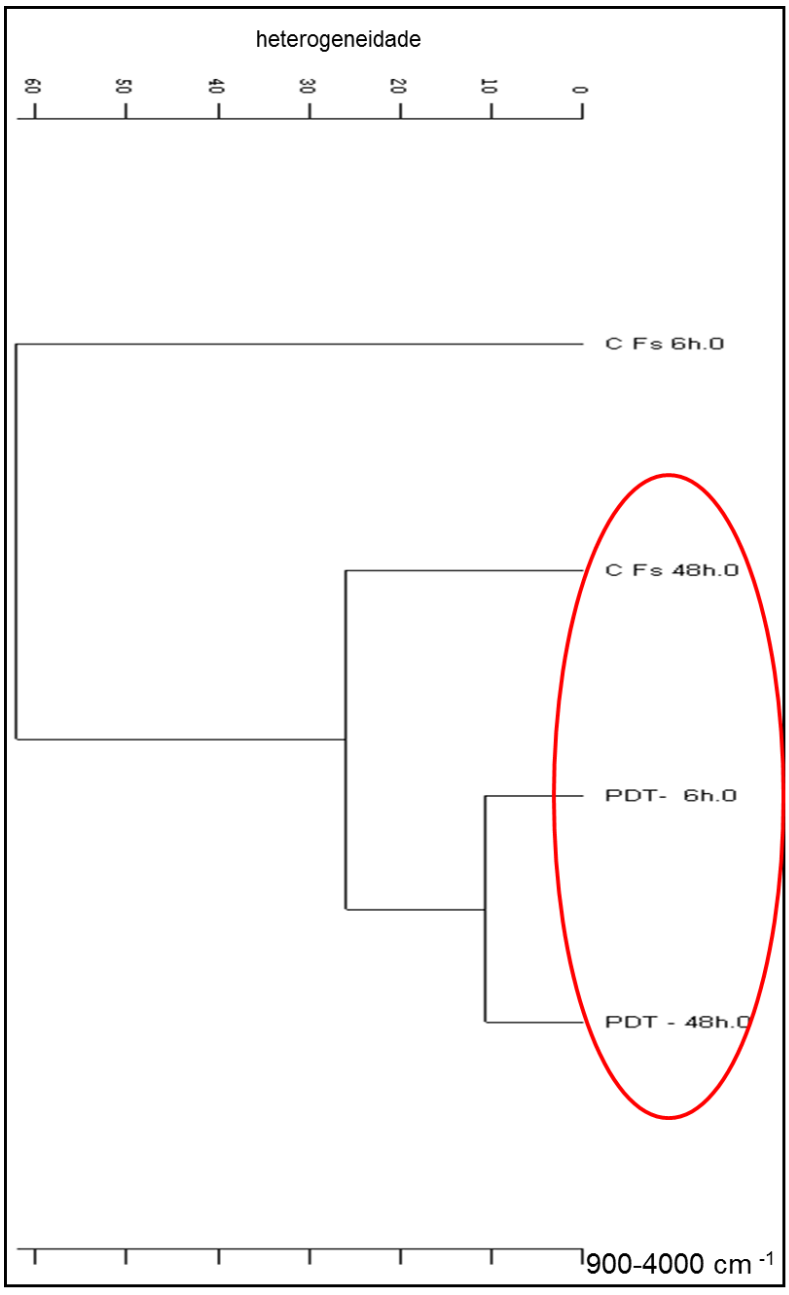

Figura 24: Dendrograma das médias dos grupos: CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), em todo o espectro (900-4000 cm^{-1}).

O dendrograma dos grupos CFs (6h e 48 h), em relação aos grupos aPDT (6h e 48 h), em todo intervalo espectral, mostrou que após o tratamento com a aPDT, células jovens e velhas apresentaram características bioquímicas semelhantes. Células jovens do grupo controle mostraram-se bem heterogêneas em relação às velhas e às submetidas à aPDT. Entretanto, células do grupo CFs 48 h mostraram certa homogeneidade em relação às tratadas com a aPDT.

O fato das células envelhecidas desenvolverem mecanismos específicos que promovem defesa contra ROS[52], justificam a homogeneidade com os grupos tratados com a aPDT, uma vez que esta terapia promove formação de ROS que levam a danos celulares.

O resultado da análise hierárquica de *cluster* corroborou com os resultados microbiológicos, indicando que a aPDT promoveu alterações bioquímicas mais significativas em células jovens, uma vez que células em fase lag e estacionária de crescimento apresentaram redução na viabilidade celular semelhantes após 12 e 15 min de irradiação e após 18 min células jovens se mostraram mais susceptíveis aPDT (Figura 10). De acordo com os nossos resultados morfológicos, observados na MEV e na AFM, o fato da matriz extracelular ter sido o primeiro alvo em células fúngicas crescidas por 48 h pode ter evitado alterações bioquímicas significativas nestas células após a aPDT.

Para identificar os efeitos causados pela ação da aPDT em células de *C. albicans* em fases lag e estacionária de crescimento e evidenciar possíveis alvos que possam aumentar a efetividade da aPDT, foram obtidos, através da análise hierárquica de *cluster*, dendrogramas nas regiões de interesse destacadas neste estudo (Figura 25, Figura 26, Figura 27 e Figura 28).

O dendrograma da Figura 25 mostrou que, na faixa espectral de DNA e carboidratos (900-1200 cm^{-1}), a aPDT promoveu alterações significativas em células jovens. Em células velhas não foram observadas mudanças bioquímicas significativas neste intervalo, uma vez que células controle e submetidas à aPDT ficaram no mesmo *cluste*r.

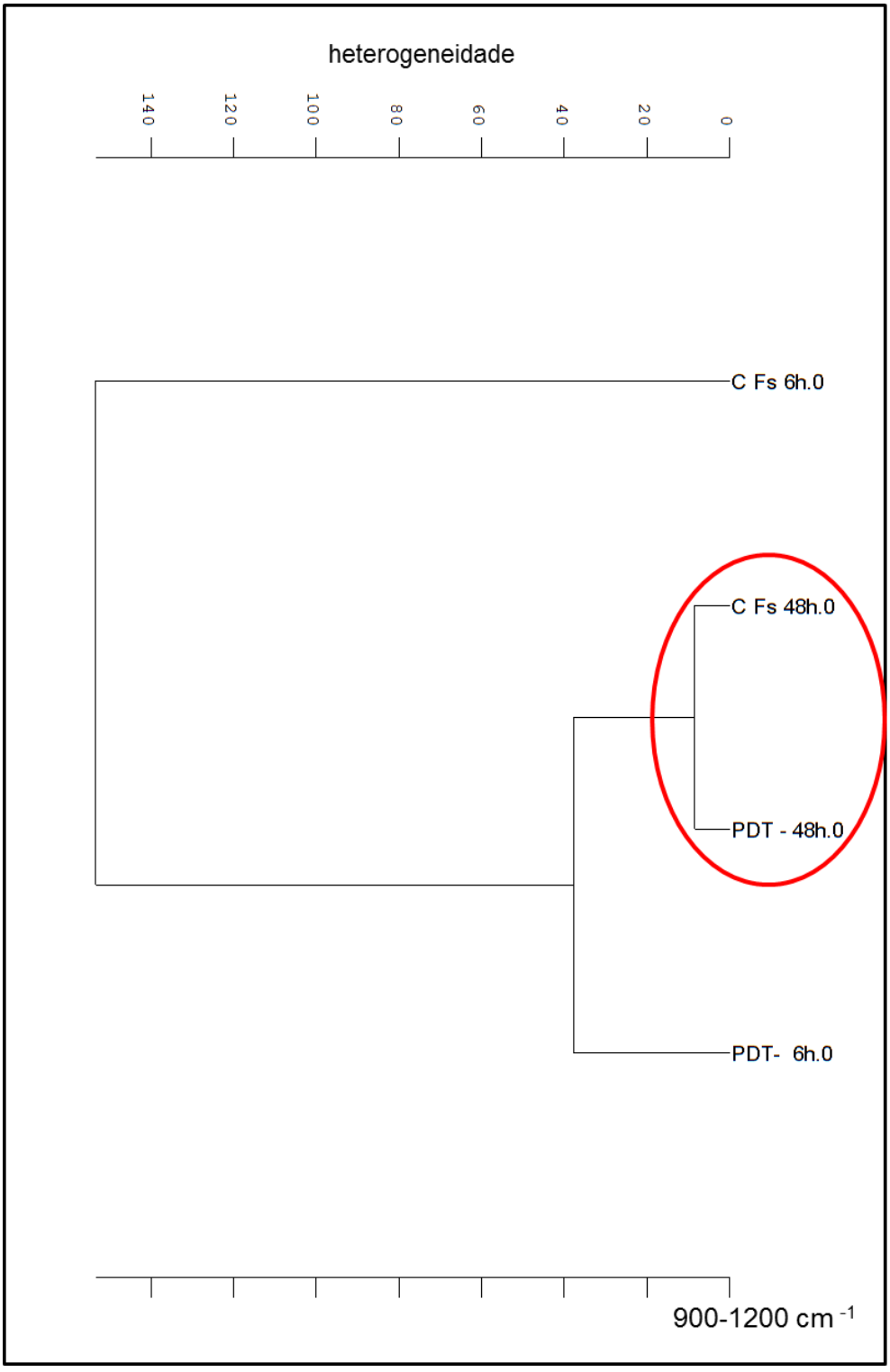

Figura 25: Dendrograma das médias dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), na faixa espectral de DNA e polissacarídeos (900-1200 cm^{-1}).

Na faixa espectral de DNA e proteínas (1200-1500 cm^{-1}), o dendograma dos grupos controles e tratados com a aPDT mostrou que a aPDT promoveu alterações bioquímicas tanto em células jovens, quanto em células velhas, formando dois *clusters* distintos (Figura 26).

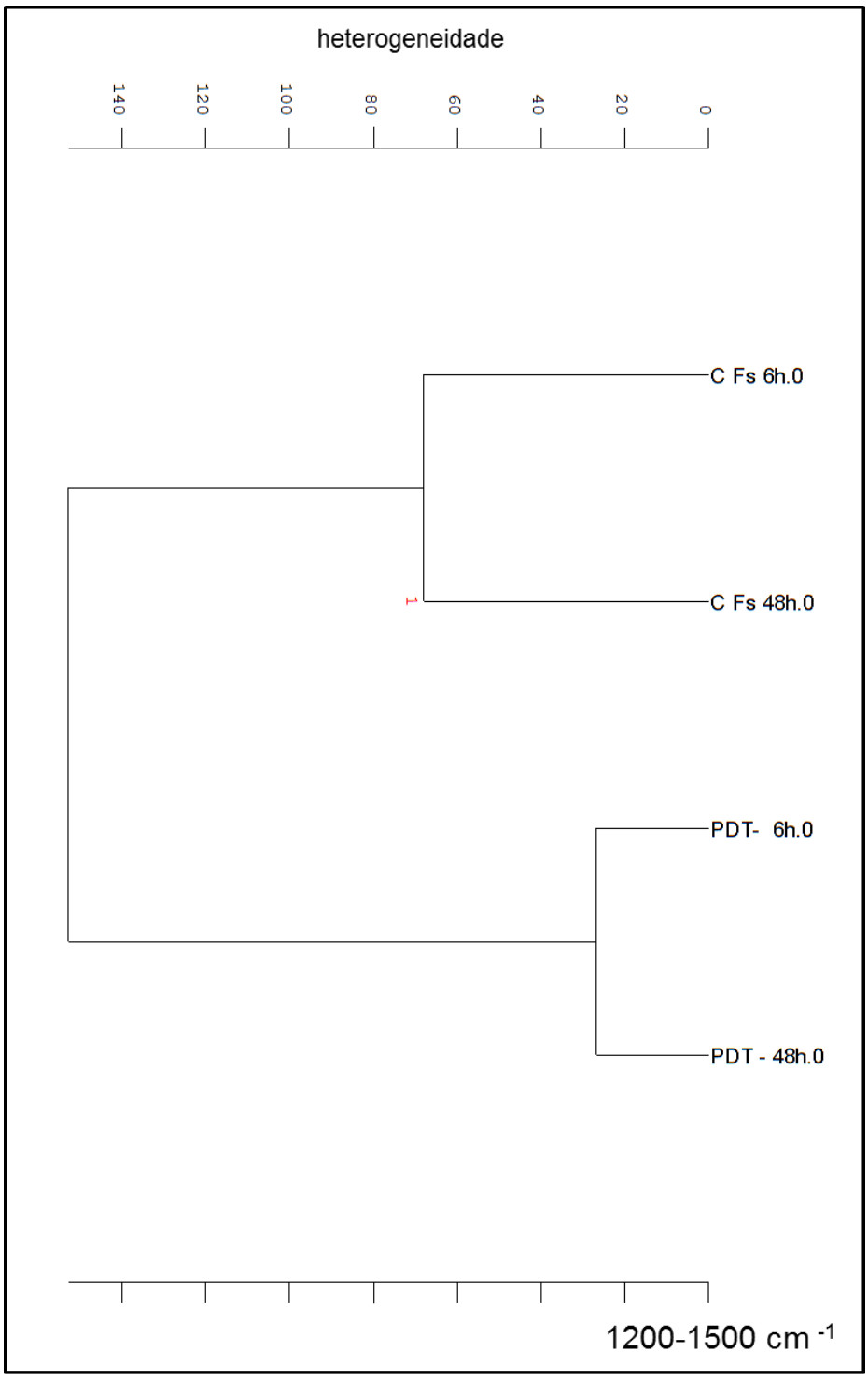

Figura 26: Dendrograma das médias dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), na faixa espectral de proteínas e lipídios (1200-1500 cm^{-1}).

Assim como na região analisada anteriormente, o dendrograma da faixa espectral de amida I, amida II e lipídios (1500-1800 cm^{-1}) mostrou que a aPDT promoveu alterações bioquímicas em células em fases lag e estacionária de crescimento. Nesta região espectral, ficaram mais evidentes as diferenças bioquímicas entre as duas fases de crescimento celular nos grupos controles. (Figura 27)

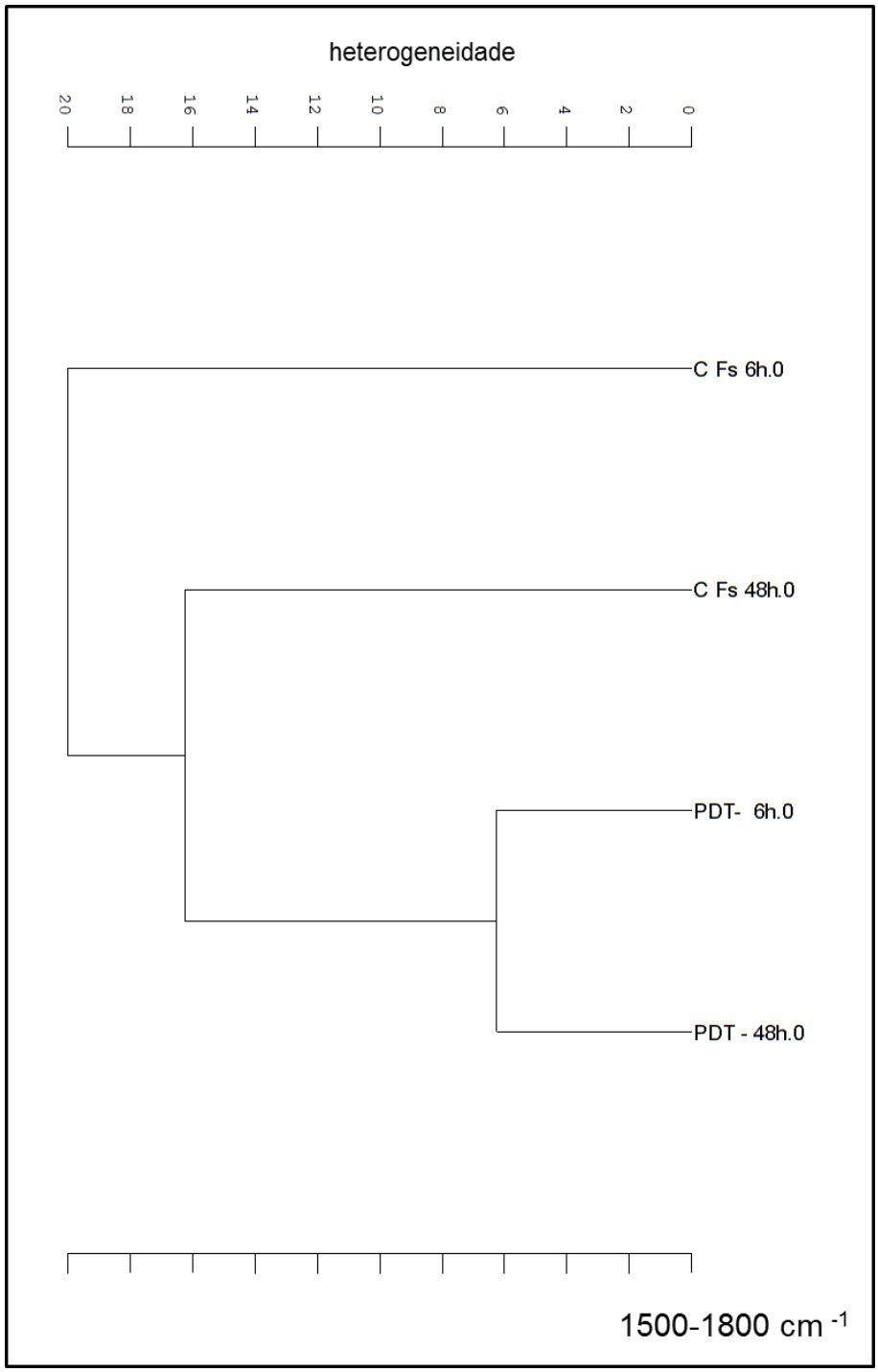

Figura 27: Dendrograma das médias dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), na faixa espectral de amida I, amida II e lipídios (1500-1800 cm^{-1}).

A análise hierárquica de *cluster* na faixa espectral de lipídios e ácidos graxos insaturados mostrou que a aPDT promoveu alterações bioquímicas mais significativas em células velhas do que em jovens, uma vez que verificamos um *cluster* isolado de células controle em fase estacionária de crescimento (Figura 28).

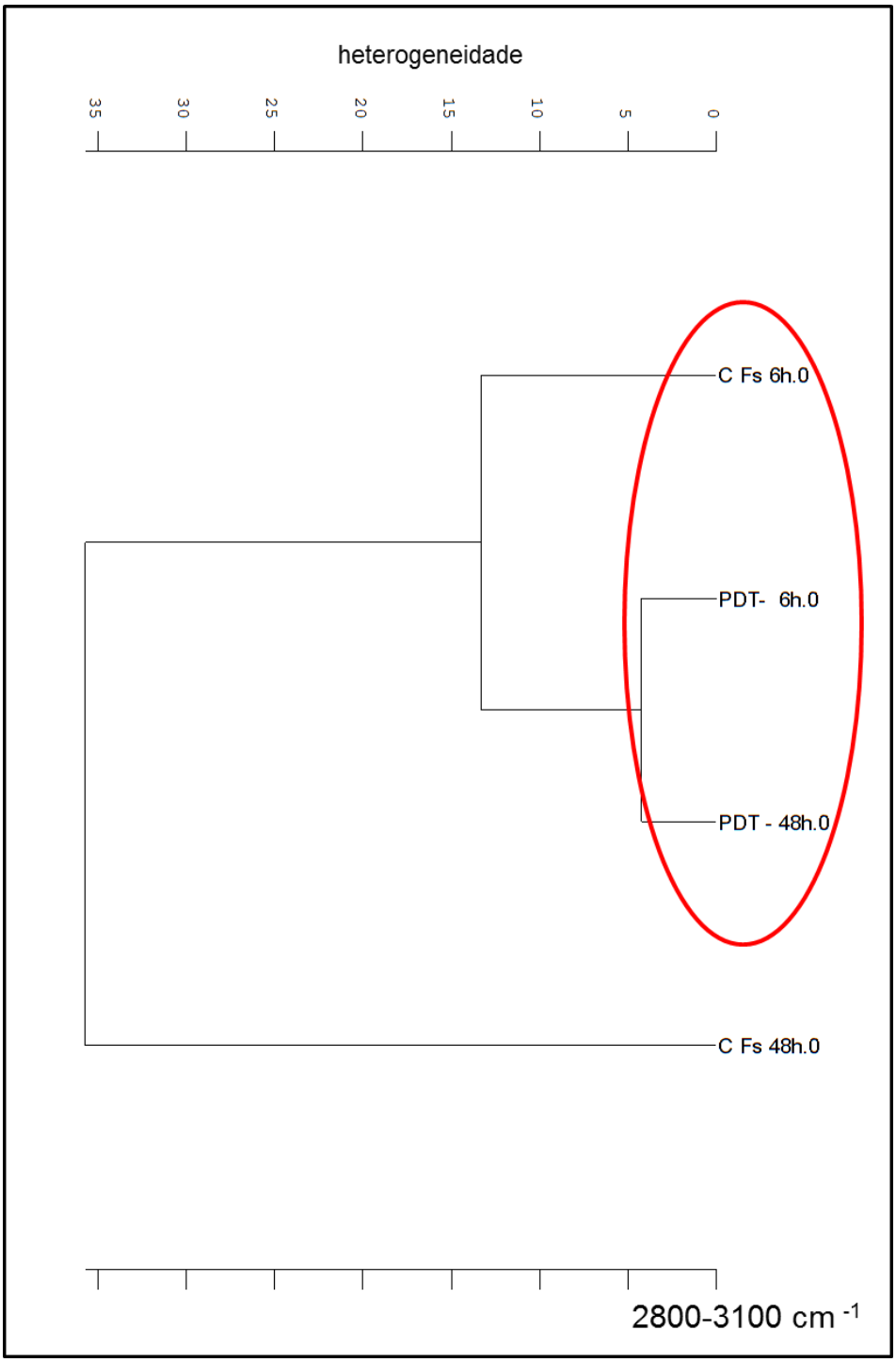

Figura 28: Dendrograma das médias dos grupos CFs (6 h e 48 h) e aPDT (6 h e 48 h), na faixa espectral de lipídios e ácidos graxos insaturados (2800-3100 cm^{-1}).

A análise dos dendrogramas em diferentes regiões espectrais mostrou alvos específicos da aPDT em diferentes fases de crescimento celular. A aPDT promoveu mudanças mais significativas em células jovens, na região correspondente a carboidratos, enquanto que nesta mesma região espectral, não foram encontradas alterações bioquímicas significativas em células velhas. Entretanto, na faixa espectral de lipídios e ácidos graxos insaturados, a aPDT promoveu alterações bioquímicas mais significativas em células velhas.

Estes achados foram muito importantes, visto que, a partir dos resultados obtidos através dos dendrogramas foram feitas análises espectrais, a fim de identificarmos picos de absorção específicos que esclarecessem a ação da aPDT em diferentes fases de crescimento celular.

- **Análise espectral da região de 900-1800 cm^{-1} (CFs 6 h X aPDT 6 h)**

Espectros de segunda derivada foram obtidos dos grupos CFs 6 h e aPDT 6 h no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}(Figura 29) evidenciando grandes diferenças espectrais, principalmente no intervalo entre 900-1500 cm^{-1}, indicando modificações mais significativas em carboidratos da parede celular, ácidos nucleicos e proteínas de células jovens submetidas a aPDT.

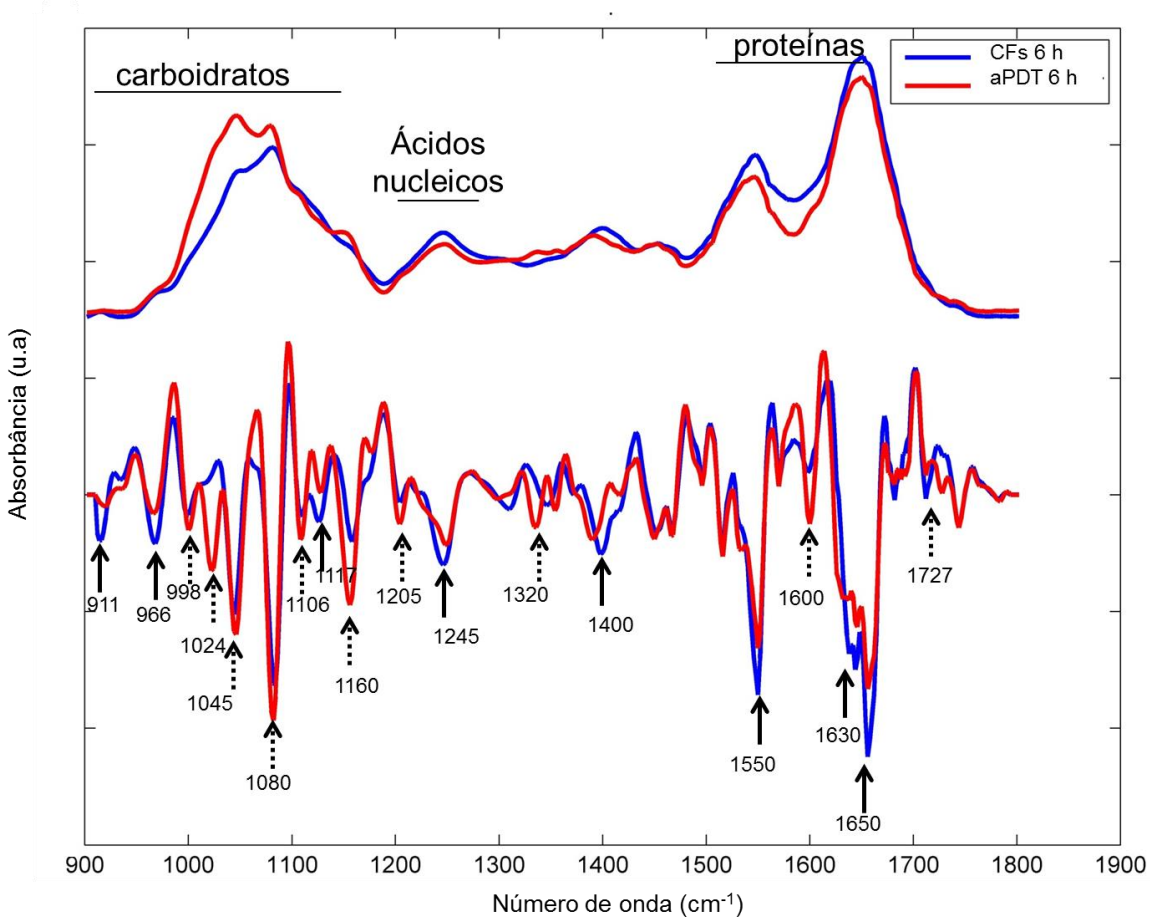

Figura 29 Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e aPDT 6h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}. As setas contínuas representam os picos de absorbância das células do grupo controle e as setas pontilhadas representam os picos de absorbância das células submetidas à aPDT.

A análise espectral da faixa entre 900-1800 cm^{-1} em células em fase lag de crescimento dos grupos CFs e aPDT mostrou diminuição das vibrações moleculares de C-O e C-C de desoxirribose (DNA - 966 cm^{-1}), C-OH de ribose (RNA - 1117 cm^{-1}) e na banda de absorção dos fosfatos antissimétricos (1245 cm^{-1}) após a aPDT (Figura 29 – setas contínuas), indicando danos ou mudanças conformacionais em DNA e RNA promovidas pela ação das ROS (Figura 29 – seta contínua).

As setas pontilhadas mostradas no intervalo entre 900-1245 cm^{-1} da Figura 29 representam picos de absorbância mais intensos das células jovens submetidas à aPDT, principalmente na região de carboidratos da parede celular. A banda de α-manano diminui (911 cm^{-1}), enquanto todas as bandas de β-glucanos exibem aumento (998 cm^{-1}, 1024 cm^{-1}, 1080 cm^{-1} e 1106 cm^{-1}). Estas

alterações no perfil espectral após a aPDT sugerem danos ou mudanças conformacionais/composicionais nos componentes da parede da célula jovem.

Ene e colaboradores[91] mostraram que a primeira resposta contra agentes estressantes da célula fúngica é a parede celular, que responde através de mudanças significativas com o realinhamento estrutural em poucos segundos após a agressão.

A diminuição acentuada da banda de amida I (α-quitina), o aumento das vibrações moleculares em 1600 cm^{-1} e o deslocamento do pico de 1400 cm^{-1} após a aPDT indicam alterações em quitina. Uma vez que esta estrutura é responsável pela integridade da parede celular e suporta grandes pressões[134], estes resultados corroboram com a perda de rigidez observada através da espectroscopia de força, sugerindo que o alvo da aPDT em células jovens pode ter sido preferencialmente a parede celular.

Dhananasekaran[127], Dogan[135], Longhinotti[136] e colaboradores mostraram que polímeros naturais, como a quitina são capazes de adsorver corantes como azul de metileno. A união da quitina com o azul de metileno ocorre através de ligações químicas, normalmente covalentes. Uma vez que a célula jovem possui quitina distribuída em toda a parede, a afinidade do azul de metileno pode ser maior nesta região.

Na faixa espectral entre 1200-1500 cm^{-1}, correspondente às vibrações moleculares de proteínas e lipídios, verificamos o aparecimento de novas bandas no intervalo entre 1320-1360 cm^{-1} (Figura 29 - seta pontilhada). Esta região é assinada pelas vibrações moleculares simétricas e assimétricas de estiramentos-COO- (ácidos graxos) e deformações CH da superfície, formando espécies carboxiladas. O aparecimento destas bandas é proveniente da modificação de β-(1,3) e (1,6)-glucanos para a forma carboximetilada após a aPDT[102].

A Figura 29 mostrou que, na região de proteínas (1500-1800 cm^{-1}), as células jovens apresentaram diminuição espectral após a aPDT na fração proteica (1550 cm^{-1}). O aumento dos picos de 1600 cm^{-1} e 1727 cm^{-1}, representados respectivamente pelas grupos carbonila e aldeído, sugerem a formação de subprodutos decorrentes da peroxidação lipídica[137].

A Tabela 6 mostra as assinaturas espectrais, correspondentes aos picos de absorbância das células em fase lag de crescimento, antes e após a aPDT.

Tabela 6: Picos de absorbância após a aPDT 6 h e suas assinaturas espectrais.

Região espectral	(cm^{-1})	Assinatura-descrição aproximada	*C. albicans* (aPDT 6 h)
900-1200 cm^{-1} Carboidratos DNA e RNA	911	α-manano[6]	diminuição
	966	C-C e C-O de desoxirribose[7]	diminuição
	998	β-1,6 glucano[6]	aumento
	1024	β-1,4 glucano[6]	aumento
	1045	Banda de glicogênio; estiramento C-O acoplados com C-OH de grupos de carboidratos[7]	aumento
	1080	β-1,3 glucano[6]	aumento
	1106	β-1,3 glucano[6]	aumento
	1117	Vibrações de estiramento C-O de grupos C-OH de ribose (RNA)[7]	diminuição
	1160	alongamento (C-O) [7]	aumento
1200-1500 cm^{-1} DNA e Proteínas	1205	C-O-C, C-O (anéis de vibração de polissacarídeos)[7]	constante
	1320 e 1340	Grupos carboxila (-COOH)[8]	formação
	1400	quitina[9]	Diminuição e deslocamento
1500-1800 cm^{-1} Proteínas e Lipídeos	1550	Amida II de proteínas[7]	diminuição
	1600	estiramento (C=O) [7]	diminuição
	1630	Amida I[7] (α-quitina)[9]	diminuição
	1650	Amida I[7] e (α-quitina)[9]	diminuição
	1727	modo estiramento C=O do grupo éster de ácido graxo[7]	aumento

[6] Baseado em Galichet[103].
[7] Baseado em Movasaghi[131].
[8] Baseado em Synytsya[102].
[9] Baseado em Dhananasekaran[127].

- **Análise espectral da região de 2800-3100 cm^{-1} (CFs 6 h X aPDT 6 h)**

Na faixa correspondente as vibrações moleculares de lipídios e ácidos graxos insaturados (2800-3100 cm^{-1}), verificamos o mesmo perfil espectral das células fúngicas jovens antes e após a aPDT, como demostrado na Figura 30. Apenas diferenças nas intensidades de absorbância foram observadas em todo o intervalo espectral analisado, confirmando os dados obtidos através da análise de *cluster* (Figura 28), de que células controle na fase lag de crescimento apresentam homogeneidade com as submetidas à aPDT.

Nesta região espectral, temos principalmente lipídios (CH_3; 2959 cm^{-1}), com algumas contribuições de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Vibrações (CH_2; 2926 cm^{-1}), com grande contribuição de lipídios e pequena contribuição de carboidratos e ácidos nucleicos. Temos ainda mais dois picos: 2873 e 2854 cm^{-1}, que correspondem respectivamente a CH_3 e CH_2, também representando principalmente os lipídios[32].

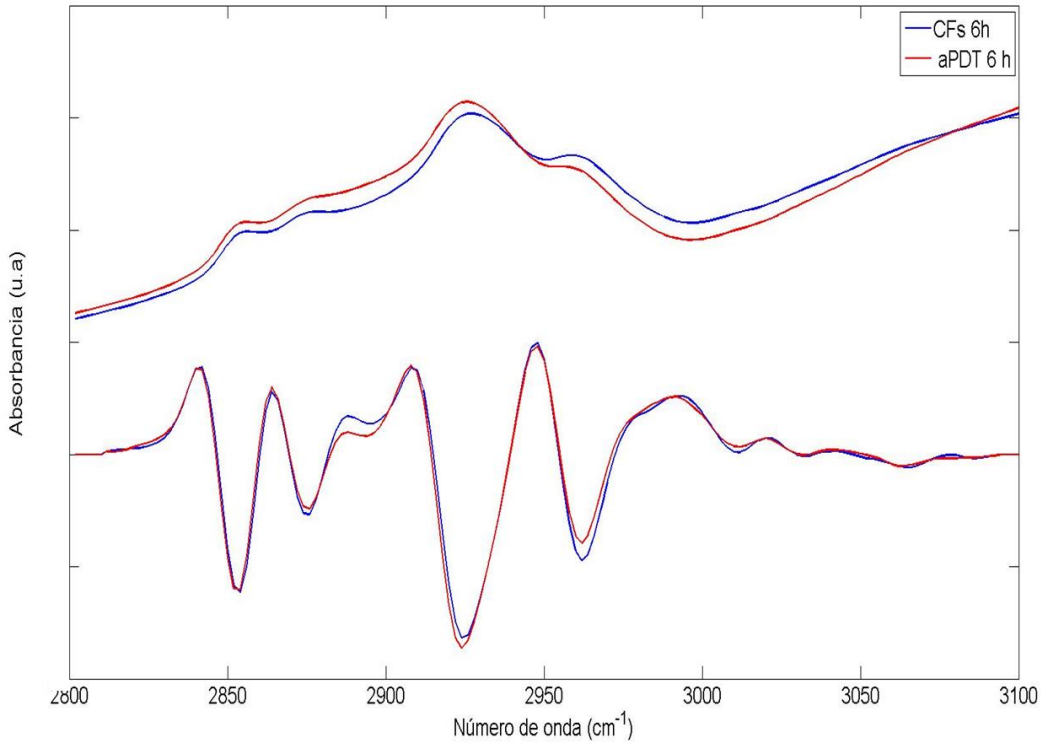

Figura 30: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 6 h e 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 2800-3100 cm^{-1}. A seta mostra diminuição de absorbância em 3010 cm^{-1} em células crescidas por 6 h após a aPDT.

A diminuição de absorção em 3010 cm^{-1} (ácidos graxos insaturados) e o aumento dos picos de 1600 cm^{-1} e 1727 cm^{-1} indicam a peroxidação lipídica desencadeada pelas ROS em membranas fúngicas (Figura 30 - seta contínua).

O pico de 3010 cm^{-1} representa a ligação dupla *cis*. Quando ocorre a oxidação dos ácidos graxos, ligações duplas *cis* das cadeias hidrofóbicas são rearranjadas e formam duplas ligações *trans* e a intensidade da banda *cis* C=C diminui, enquanto o grupo carbonila (1727 cm^{-1}) e o grupo aldeído (1600 cm^{-1}) aumentam, como produtos da peroxidação lipídica[137].

Portanto a análise das faixas espectrais entre 900-1800 cm^{-1} e 2800-3100 cm^{-1} sugerem que a aPDT promoveu danos ou mudanças conformacionais em DNA, RNA e proteínas de células jovens. A formação de grupos carbonila e aldeído sugerem que tenha ocorrido peroxidação lipídica em lipídios poli-insaturados das membranas celulares fúngicas.

- **Análise espectral da região de 900-1800 cm^{-1}(CFs 48 h X aPDT 48 h)**

A análise espectral de células em fase estacionária de crescimento, antes e após a aPDT, na faixa espectral de carboidratos e DNA (900-1200 cm^{-1}), mostrou o mesmo perfil espectral, variando apenas a intensidade de absorbância. A Figura 31 indica as regiões espectrais que sofreram alterações vibracionais após a aPDT, em células crescidas por 48 h.

A manutenção dos picos de absorção em 966 cm^{-1}, 1117 cm^{-1} e o deslocamento em 1245 cm^{-1}, assinados respectivamente por vibrações moleculares de açúcares de DNA, RNA e fosfato de fosfodiéster de ácidos nucleicos, indicam que houve pouco dano ou mudança de conformação molecular nestas estruturas (Figura 31 - setas tracejadas).

As diminuições de absorção das vibrações moleculares em 911 cm^{-1}, 998 cm^{-1}, 1024 cm^{-1}, 1080 cm^{-}1, 1160 cm^{-1} 1630 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} e o aumento dos picos em 1045 cm^{-1}e 1106 cm^{-1}, representados na Figura 31 por setas contínuas e pontilhadas, respectivamente, indicaram alterações em α-manana, α e β-glucanos da parede celular, sugerindo danos ou mudanças conformacionais na parede celular.

Nossos resultados morfológicos, através da MEV e da AFM, mostraram que células em fase estacionária de crescimento apresentaram, como primeira linha de defesa contra as ROS ,a matriz extracelular.

Estes dados confirmam os obtidos através da análise de *cluster*, de que nesta região espectral, a aPDT não promoveu alterações bioquímicas em células fúngicas velhas (Figura 25). De fato, a análise dos dendrogramas nas regiões específicas selecionadas neste estudo mostrou que, apenas na faixa espectral de DNA e carboidratos, células crescidas por 48 h apresentaram homogeneidade antes e após a aPDT.

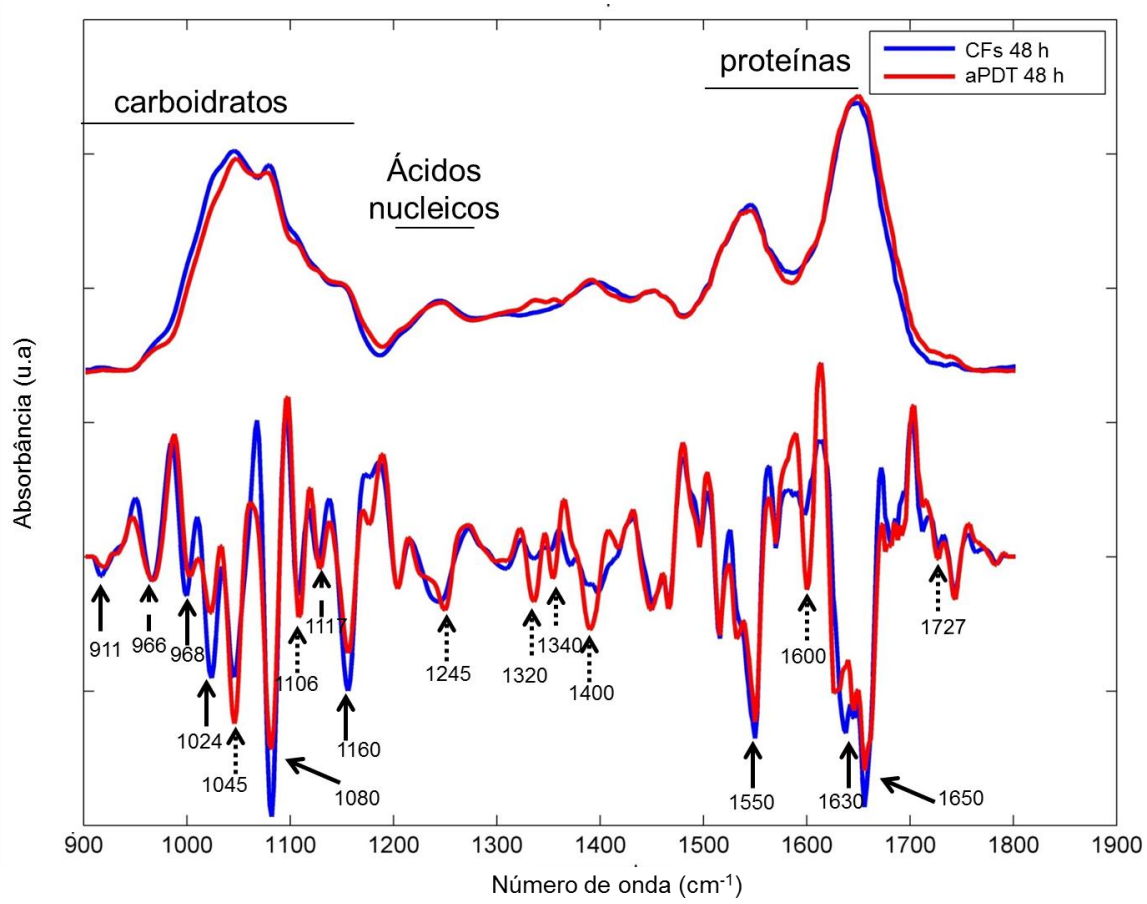

Figura 31: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 48 h e aPDT 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}. As setas contínuas e pontilhadas representam picos de absorbância menor e maior de células em fase estacionária submetidas à aPDT. Setas tracejadas indicam picos que não houve alteração de absorção de vibrações moleculares após a aPDT.

Na faixa espectral entre 1300-1500 cm^{-1}, correspondente às vibrações moleculares de proteínas e lipídios, verificamos que, independentemente da fase de crescimento celular, após a aPDT, novas bandas surgiram no espectro, em torno de 1320-1360 cm^{-1}. Esta região é assinada pelas vibrações moleculares de COO- (ácidos graxos) e deformações CH da superfície, formando espécies carboxiladas provenientes da mudança da estrutura química para a forma carboximetilada dos β-glucanos da parede celular[102].

Ainda nesta região espectral, observamos aumento de absorbância no pico de 1400 cm^{-1} (absorção específica de proteínas) (Figura 31– setas pontilhadas). Gow[126] e Dhananasekaran[127] e colaboradores atribuem relação deste pico de absorção com os níveis de quitina. Portanto, este resultado corrobora com a espectroscopia de força, que mostrou aumento de rigidez em células em fase estacionária de crescimento após a aPDT. Ene e colaboradores mostraram que a parede celular é uma estrutura dinâmica, que sofre alterações na sua arquitetura frente uma situação de estresse[91].

A quitina representa um componente relativamente pequeno em termos de biomassa da parede celular (1-3%), mas é essencial para a viabilidade celular fúngica[91]. Polímeros de quitina são ligados covalentemente a rede de β-glucanos e contribuem para rigidez e resistência física da célula fúngica[91].

A Figura 31 mostrou que, na região de proteínas, amida I, amida II e lipídios (1500-1800 cm^{-1}), células crescidas por 48 h apresentaram o mesmo perfil espectral com mudança de absorbância após a aPDT. O aumento dos picos de absorção 1600 cm^{-1} e em 1727 cm^{-1} sugerem a formação de subprodutos decorrentes da peroxidação lipídica[137]. Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos são estudados desde o séc. XIX[138]. Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, mediado por espécies reativas de oxigênio[139], que levam a danos em estruturas das células como parede celular, membrana e DNA, causando desequilíbrio e até morte celular. A reação destas ROS com os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, abstrai um átomo de hidrogênio da cadeia do ácido graxo poli-insaturado e dá início a um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica, que se espalha para os ácidos graxos adjacentes[140].

A avaliação da região espectral entre 900-1800 cm^{-1} sugere que, em células velhas, tenha ocorrido um dano ou remodelação da parede celular fúngica, principalmente nas ligações entre β-glucanos e quitina, sem alterações bioquímicas destas biomoléculas. Ainda, a diminuição discreta dos picos de absorção nas regiões de açúcares de DNA e RNA, nas vibrações antissimétricas de fosfato de fosfodiésteres de ácidos nucleicos e proteínas, sugere que estas estruturas não foram o principal alvo das ROS em células em fase estacionária.

- **Análise espectral da região de 2800-3100 cm^{-1}(CFs 48 h X aPDT 48 h)**

Os resultados obtidos através da análise de *cluster* mostraram que a aPDT promoveu alterações moleculares mais significativas em células crescidas por 48 h nas regiões de proteínas, lipídios e ácidos graxos insaturados (Figura 27 e Figura 28). A partir destes dados, a identificação de alvos mais específicos através da análise espectral na faixa de lipídios e ácidos graxos insaturados (2800-3100 cm^{-1}) mostrou diminuição de absorbância no pico de 3010 cm^{-1} em células velhas submetidas à aPDT (Figura 32). A banda entre 2990-3030 cm^{-1} é conhecida por ser a banda dos oleofínicos (=CH). Embora seja uma banda fraca, encontramos nesta região vibrações moleculares de lipídios insaturados, os quais são mais propensos a peroxidação lipídica. Severcane[140] e colaboradores mostraram que, por esta razão, a intensidade desta banda pode ser utilizada para a monitorização da peroxidação lipídica.

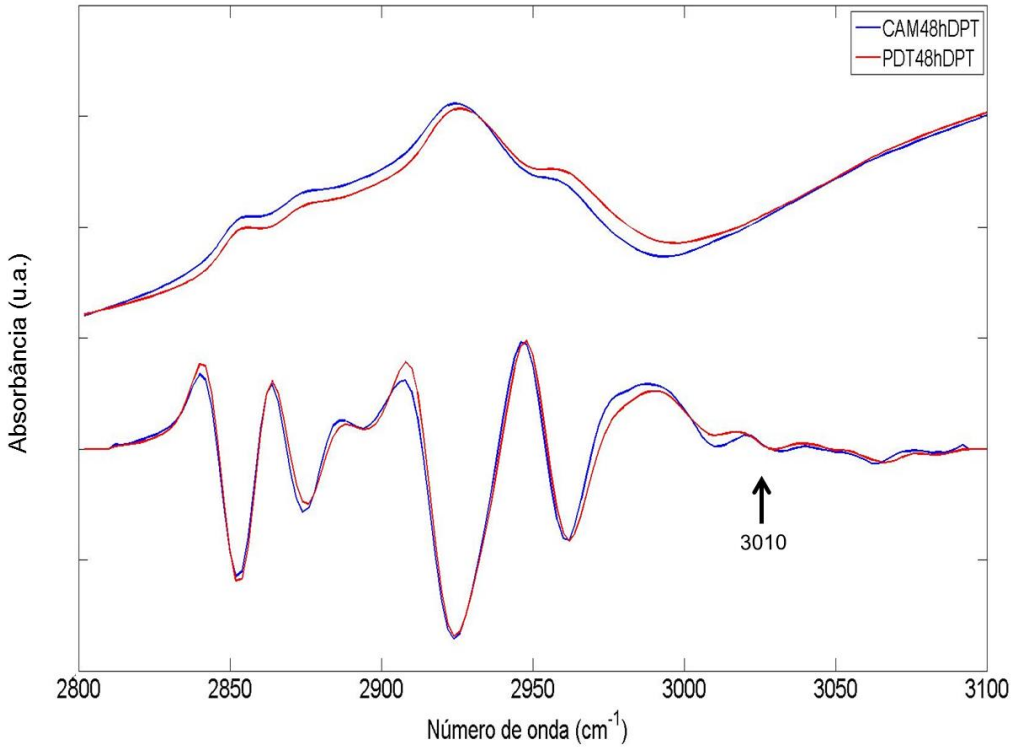

Figura 32: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos CFs 48 h e aPDT 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 2800-3100 cm^{-1}. A seta mostra diminuição de absorbância em 3010 cm^{-1} em células crescidas por 48 h após a aPDT.

Portanto, de acordo com nossas avaliações espectrais na região entre 2800-3100 cm^{-1}, em células em fase estacionária de crescimento, podemos sugerir que houve peroxidação lipídica das membranas celulares fúngicas desencadeadas pelas ROS provenientes da aPDT.

Tabela 7: Picos de absorbância após a aPDT 48 h e suas assinaturas espectrais.

Região espectral	**(cm^{-1})**	**Assinatura-descrição aproximada**	***C. albicans* (aPDT 48 h)**
900-1200 cm^{-1} Carboidratos DNA e RNA	911	α-manano[10]	diminuição
	966	C-C e C-O de desoxirribose[11]	constante
	998	β-1,6 glucano[10]	diminuição
	1024	β-1,4 glucano[10]	diminuição
	1045	Banda de glicogênio; estiramento C-O acoplados com C-OH de grupos de carboidratos[11]	aumento
	1080	β-1,3 glucano[10]	diminuição
	1106	β-1,3 glucano[10]	aumento
	1117	Vibrações de estiramento C-O de grupos C-OH de ribose (RNA)[11]	constantel
	1160	alongamento (C-O)[11]	diminuição
1200-1500 cm^{-1} DNA e Proteínas	1205	C-O-C, C-O (anéis de vibração de polissacarídeos)[11]	constante
	1245	alongamento antissimétrico de fosfato (grupos de fosfodiéster)[11]	constante e deslocado
	1320 e 1340	Grupos carboxila (-COOH)[12]	formação
	1400	quitina[13]	aumento
1500-1800 cm^{-1} Proteínas e Lipídeos	1550	Amida II de proteínas[11]	diminuição
	1600	estiramento (C=O) [11]	aumento
	1630	Amida I[11] (α-quitina)[13]	diminuição
	1650	Amida I[11] e (α-quitina)[13]	diminuição
	1727	modo estiramento C=O do grupo éster de ácido graxo[11]	aumento

[10] Baseado em Galichet[103].
[11] Baseado em Movasaghi[131].
[12] Baseado em Synytsya[102].
[13] Baseado em Dhananasekaran[127].

- **aPDT 6 h X aPDT 48 h**

A compreensão destes resultados é muito importante, uma vez que, com 18 min de irradiação, conseguimos uma erradicação total de células jovens enquanto que células velhas permaneceram viáveis. A análise dos espectros após a aPDT (Figura 33) mostrou que, na região entre 900-1200 cm^{-1}, células jovens ficaram com as mesmas características bioquímicas de células crescidas por 48 h.

A parede celular normalmente é vista como uma estrutura rígida, que confere forma e robustez, protegendo a célula do meio externo[47]. Mudanças significativas no proteoama da *C. albicans* são observadas nas diferentes fases de crescimento, pH, temperatura e fontes nutricionais. Em resposta ao estresse a *C. albicans* dispara mecanismos de remodelação da parede celular que influenciam a expressão de quitina, β-glucano, manana e genes biossintéticos[91,141, 142]. No entanto, estas alterações gênicas podem levar muito tempo, inviabilizando a manutenção celular frente um estresse[143].

Ene e colaboradores[91] mostraram, recentemente, que a parede da célula fúngica apresenta um grau elevado de dinamismo celular, que permite grandes alterações arquitetônicas em poucos segundos, frente um estresse e que estas mudanças não estão relacionadas com as proporções dos principais componentes da parede, mas sim com as ligações cruzadas entre eles.

A análise dos espectros após a aPDT em células jovens e velhas, no intervalo entre 900-1800 cm^{-1}, mostrou o mesmo perfil espectral em todo o intervalo, com pequenas alterações nos picos de absorção. Isto pode significar que o aumento da susceptibilidade da célula jovem a aPDT com o aumento do tempo de exposição à luz, seja um reflexo dos danos causados com 15 min de irradiação.

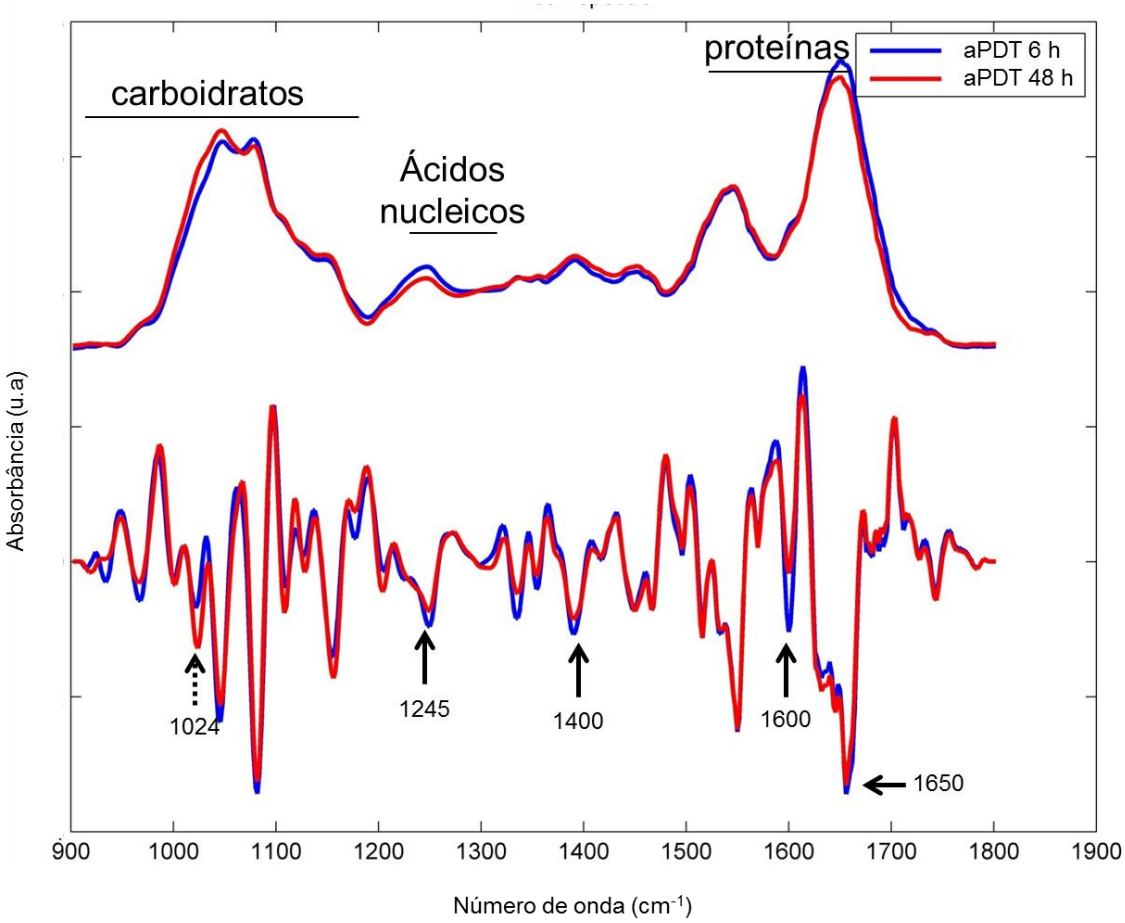

Figura 33: Médias espectrais FT-IR de *C. albicans* dos grupos aPDT 6 h e aPDT 48 h, segunda derivada, no intervalo espectral entre 900-1800 cm^{-1}. As setas contínuas representam maiores picos de absorbância das células em fase lag de crescimento submetidas à aPDT, enquanto a seta pontilhada indica maior pico de absorbância das células crescidas por 48 h e submetidas a aPDT.

Apesar da célula fúngica mais velha apresentar diferentes alvos para aPDT, estas células possuem alguns mecanismos denominados de “atributos de adaptação”, que incluem funções envolvidas no metabolismo, adaptação ao estresse, que agem por meio de adequação fisiológica das células[144]. As células precisam se adaptar para sobreviverem em ambientes com condições menos favoráveis ao desenvolvimento. Vias de sinalização são mecanismos através dos quais as células interpretam e respondem a estímulos extracelulares[145].

Mutações que perturbam a integridade da parede celular resultam na perda da forma espacial e podem promover a morte celular[91]. Os nossos resultados sugerem que os danos causados na parede fúngica da célula jovem foram provavelmente irreversíveis, uma vez que a espectroscopia de força mostrou perda de rigidez após a terapia fotodinâmica subletal e os nossos resultados microbi-

ológicos mostraram que o aumento no tempo de irradiação erradica completamente estas células. Ainda, a análise espectral na faixa entre 1200-1800 cm^{-1}, correspondente às vibrações moleculares de proteínas e lipídios, sugere que as ROS causaram mais danos ou alterações moleculares em DNA e proteínas, em células fúngicas jovens.

Independentemente da fase de crescimento celular, após a aPDT, novas bandas foram formadas nos picos de 1600 cm^{-1} e 1727 cm^{-1}, provenientes da peroxidação lipídica[137] desencadeada pelas ROS, geradas no processo fotodinâmico.

As células crescidas por 6 h mostraram um pico maior de absorção em 1600 cm^{-1}, em relação às células velhas. Este dado sugere que a aPDT agiu mais nos lipídios das membranas celulares das células velhas, comparada às células em fase lag de crescimento (Figura 33– seta contínua).

A mensuração da peroxidação lipídica avalia os danos causados em células provocados pelo stress oxidativo[35]. Isso indica que esta técnica pode ser usada para avaliar e mensurar a efetividade da aPDT em células submetidas a diferentes condições de crescimento.

6. Trabalhos Futuros

A resistência microbiana aos antifúngicos é um fato extremamente relevante e, infelizmente, presente na nossa realidade. A cada ano, mais de 13 milhões de mortes em todo o mundo são atribuídas ao surgimento de novas doenças infecciosas ou ao ressurgimento de doenças que se pensava estarem sob controle. Uma vez que a aPDT tem se mostrado uma boa alternativa no combate as infecções localizadas, precisamos encontrar uma forma de otimizar estes resultados. Não há evidências até o momento, na literatura, de que a aPDT possa produzir o aparecimento de cepas resistentes. Entretanto, os micro-organismos apresentam respostas bioquímicas e de modulação na expressão gênica em decorrência ao estresse oxidativo promovido pelas ROS geradas pela aPDT, fundamentais para a reparação e proteção celular, que interferem na efetividade da terapia.

De acordo com os nossos resultados, os danos causados nas células em fase lag com dose subletal foram suficientemente irreversíveis, a ponto de torná-las mais susceptíveis a terapia com o aumento do tempo de irradiação. Sabemos que, *in vivo, C. albicans* se apresentam na forma de biofilme, onde encontramos uma arquitetura altamente complexa de células em todas as fases de crescimento. Kato e colaboradores[3] mostraram que *C. albicans* submetidas a doses subletais aumentaram o tempo de fase lag, imediatamente após a aPDT, como uma resposta reparatória, para permitir a progressão do ciclo celular. Pensando nestes e nos nossos resultados, estudos na avaliação de uma aPDT em doses subletais em biofilme de *C. albicans* seguida de outra aPDT poderia aumentar a efetividade da terapia. Ainda nesta linha de raciocínio, sabemos que células em biofilme apresentam baixa atividade metabólica, principalmente devido à escassez de nutrientes. Quando fontes de carbono são disponibilizadas em abundância, as células entram em fase lag novamente, interrompendo o processo degenerativo e se preparando para a multiplicação celular. Rolfe e colaboradores[112] mostraram que a fase lag representa um rejuvenescimento celular acompanhado de reparos a danos oxidativos e desenvolvimento de estruturas intracelulares necessárias para um ótimo crescimento. Suzuki[146] mostrou em seus resultados que a adição de glicose em biofilme pode aumentar a efetividade da aPDT em biofilme de *C. albicans*.

Portanto, a partir da literatura e dos nossos resultados mais investigações devem ser feitas a fim de melhorar a efetividade da aPDT em célula fúngica.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos pode-se concluir que:

- Em doses letais, células de *C. albicans* em fase estacionária de crescimento foram menos susceptíveis a aPDT comparadas às células crescidas por 6 h e 24 h, associando azul de metileno e luz de emissão vermelha. Em doses subletais, células crescidas por 6 h e 48 h apresentaram a mesma susceptibilidade a aPDT.
- Células crescidas por 48 h se apresentaram envoltas por uma maior quantidade de EPS quando comparadas às crescidas por 6 h e 24 h. Células em fases lag e estacionária de crescimento apresentaram melhor preservação morfológica em relação à fase exponencial após a aPDT em doses subletais, corroborando com os resultados microbiológicos. A aPDT removeu a camada de EPS em células crescidas por 48 h.
- Células crescidas por 6 h apresentaram maior rigidez da parede celular em relação às crescidas por 24 h e 48 h, indicando que células jovens apresentam maior quantidade de quitina nas paredes laterais, que as tornam mais rígidas em relação às outras fases de crescimento. Após a aPDT em doses subletais, células crescidas por 6 h se tornaram mais elásticas, enquanto células crescidas por 24 h e 48 h ficaram mais rígidas.

  Células crescidas por 48 h se apresentaram mais adesivas em relação às crescidas por 6 h e 24 h, devido a maior quantidade de EPS produzido por células estacionárias. Após a aPDT houve redução na adesividade em células estacionárias corroborando com os resultados morfológicos. Células crescidas por 6 h e 24 h se tornaram mais adesivas em relação aos seus grupos controle, devido aos danos provenientes do tratamento com a aPDT.
- Os componentes dominantes das células nas fases lag e estacionária são respectivamente, proteínas e polissacarídeos. A aPDT em células jovens promoveu alterações bioquímicas na faixa espectral de DNA e carboidratos, deixando-as com aspecto bioquímico de células em fase

estacionária, em resposta ao estresse oxidativo. Promoveu a peroxidação lipídica, independentemente da fase de crescimento celular.

Portanto, de acordo com as avaliações microbiológicas, morfológicas e de espectroscopia de força, podemos concluir que, a maior quantidade de EPS secretada por células crescidas por 48 h, serve como mecanismo de proteção, tornando-se o primeiro alvo das ROS provenientes da aPDT, poupando alvos vitais da estrutura celular, uma vez que, mesmo em dose letal para células crescidas por 6 h e 24 h, não houve erradicação total das células em fase estacionária de crescimento. Neste contexto, um segundo tratamento poderia ser realizado imediatamente após o primeiro, com o objetivo de atacar diretamente as células crescidas por 48 h.

Através da análise bioquímica por FT-IR podemos concluir que, em células em fase lag de crescimento, as mudanças conformacionais e/ou danos causados pela interação de biomoléculas com ROS ocorreram principalmente na região de açúcares de DNA e RNA e fosfodiéster de ácidos nucleicos e em proteínas. Enquanto que os principais alvos da aPDT em células em fase estacionária foram os lipídios e as proteínas.

As técnicas utilizadas foram complementares entre si e podem ajudar no avanço de estudos relacionados a diferentes Fs, bem como identificar alvos específicos a serem atacados, a fim de diminuir a patogenicidade de células sobreviventes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Mroz, P., Bhaumik, J., Dogutan, D.K., Aly, Z., Kamal, Z., Khalid, L., Kee, H.L., Bocian, D.F., Holten, D., Lindsey, J.S. and Hamblin, M.R. Imidazole metaloporphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy: role of molecular charge, central metal and hydroxyl radical production. Cancer lett., v. 282, n.1, p. 63-76, 2009.

[2] Komerik, N., Nakanishi, H., Macrobert, A.J., Henderson, B., Speight, P., Wilson, M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. Antimicrob Agents Chemother., v. 47, n.3, p.932-940, 2003.

[3] Kato, I.T., Prates, R.A., Tegos,G.P., Hamblim, M.R., Ribeiro, M.S., Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity.Antimicrob Agents Chemother., v.57, n. 1, p. 445-51, 2013.

[4] Prates, R.A., Kato, I.T., Ribeiro, M.S., Tegos, G.P., Hamblin, M.R.Influence of multidrug efflux systems on methylene blue- mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother., v. 66, n. 7, p. 1525-1532, 2011.

[5] Nagata, J.Y., Hioka, N., Kimura, E., Batistela, V.R., Terada, R.S., Graciano, A.X., Baesso, M.L., Hayacibar, A.M.F. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. Photodiag Photodyn Ther., v. 9, n. 2, p. 122-31, 2012.

[6] Garcez, A.S., Núñez, S.C., Jr, N.A., Fregnani, E.R., Rodriguez, H.M.H., Hamblin,M.R., Suzuki,H., Ribeiro, M.S. Effects of photodynamic therapy on Gram-positive bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. Photomed Laser Surg., v. 31, n. 11, p. 519-525, 2013.

[7] Sardi, C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Giannini, M.J.S.M. *Candida species*: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol., v. 62, v. 1, p. 10-24, 2013.

[8] Kurlenda, J.,Grinholc, M. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. Acta Biochim Pol., v. 59, n. 2, p.171-184, 2012.

[9] Mihu, M.R.,Martinez, L.R. Novel therapies for treatment of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* skin infections. Virulence, v.2, n.2, p. 97-102, 2011.

[10] Khademi,H. Torabinia, N., Allameh, M., Jebrellamtigh, H.R. Comparative evaluation of photodynamic therapy, induced by two different photosensitizers in rat experimental candidiasis. Dent Res J., v. 11, n. 4, p. 452-459, 2014.

[11] Pupo, Y.M., Gomes, G.M., Santos, E.B., Chaves, L., Michel, M.D., Kozlowski, V.A.Jr., Gomes, O.M., Gomes, J.C. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. Acta Odontol Latinoam., v. 24, n.2, p. 188-192, 2011.

[12] Finkel, S.E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. Nat Rev Micobiol., v. 4, p. 113-120, 2006.

[13] Bacon-Druzina, V., Butorac, A., Mrvcic, J., Dragicevic, T. L., Stehlik-Tomas, V. Bacterial stationary-phase evolution. Food Technol Biotechnol., v. 49, n. 1, p. 13-23, 2011.

[14] Jori, G, Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., Roncucci, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. Lasers in Surg And Med., v. 38, p. 468-481, 2006.

[15] Gad, F., Zahra, T., Hasan, T., Hamblim, M. R. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive phathogenic bacteria. Antimicr Agents and Chemother., v. 48, n. 6., p. 2173- 2178, 2004.

[16] Goswani, M., Mangoli, S.H., Jawal,i N. Involvement of reactive oxygen species in the action of Ciprofloxacin against *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother., v. 50, n.3, p. 949-954, 2006.

[17] Brown, A.J.P., Budge, S., Kaloriti, D., Tillmann, A., Jacobsen, M.D., Yin, Z., Ene, I.V., Bohovych, I., Sandai, D., Kastora, S., Potrykus, J., Ballou, E.R., Childers, D.S., Shahana, S., Lech, M.D. Stress adaptation in a pathogenic fungus. J Exp Biol., v. 217, p. 144-155, 2014.

[18] Sperandio, F.F.; Huang, Y.Y.; Hamblin, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-Negative Bacteria. Recent Pat Antinfect Drug Discov., v. 8, n. 2, p. 108-120, 2013.

[19] Komine, C., Tsujimoto, Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. J Endod., v. 39,n.3, p. 411-414, 2013.

[20] Lyon, J.P., Rezende, R.R., Rabelo, M.P., de Lima, C.J., Moreira, L.M. Synergic effect of photodynamic therapy with methylene blue and surfactants in the inhibition of *Candida albicans*. Mycopathologia, v. 175, n.1-2, p. 159-164, 2013.

[21] Vera, D.M, Haynes, M.H, Ball, .AR, Dai, T., Astrakas, C., Kelso, M.J, Hamblin, MR, Tegos, G.P. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. Photochem Photobiol.,v. 88, n. 3, p. 499-511, 2012.

[22]Prates, R.A. Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre leveduras patogênicas. Tese de doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nuclares (IPEN), 2010.

[23] Hayek, R.R., Araújo, N.S., Gioso, M.A., Ferreira, J., Baptista-Sobrinho, C.A., Yamada, A.M., Ribeiro, M.S. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. J Periodontol., v. 76, n. 8, p. 1275-1281, 2005.

[24] de Melo, M.A., Rolim, J.P., Zanin, I.C., Barros, E.B., da-Costa, E.F., Rodrigues, L.K. Characterization of antimicrobial photodynamic therapy-treated *Streptococci mutans*: an atomic force microscopy study. Photomed Laser Surg., v. 31, n. 3, p. 105-109, 2013.

[25] López-Jiménez, L., Fusté, E., Martinez-Garriga, B., Arnabat-Dominguez, J., Vinuesa, T., Viñas, M. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. Lasers Med Sci., v. 30, n. 5, p. 519-526, 2015.

[26] Naumann, D. Infrared spectroscopy in microbiology. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd, Chinchester. R. A. Meyers (Ed.), p. 102-131, 2000.

[27] Grant, S.C.,Hung, D.T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. Virulence, n.4, v.4, p. 1-11, 2013.

[28] Lacaz, C.S*. et al.* Tratado de micologia médica. 9. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

[29] Pelczar, M., Reid, R., Chan, E.C.S. Microbiologia Volume 1. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980.

[30] Forbes, B.A., Sahn, D.F., Weisseefeld, A.S. Diagnostic Microbiology. 11 Ed. - St Louis: Mosby, 2002.

[31] Berman, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans.* Curr Opin Microbiol., v. 9, n. 6, p. 595-601, 2006.

[32] Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. Microbiologia*.* Artmed, 2012.

[33] Nwaka, S., Holzer, H. Molecular biology of trehalose and trehalases in the yeast, *Saccharomyces cerevcesiae*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, v. 58, p. 197-237, 1998.

[34] Finkel, S.E., Kolter, R. Evolution of microbial diversity during prolonged startivation. Proc Natl Acad Sci USA, v.96, p. 4023-4027, 1999.

[35] Zinser, E.R., Kolter, R. *Escherichia coli* evolution during stationary phase. Res Microbiol, v. 155, n. 5, p. 328-336, 2004.

[36] Karp, G. Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos. Capítulo 2 - A base química da vida. P.44. Manole, 2005.

[37] Lopes, S., Rosso, S. BIO volume único. 3. Ed. – São Paulo: Saraiva, 2013.

[38] Okada, H. Ohnuki, S., Roncero, C., Konopka, J.B., Ohya, T. Distinct roles of cell wall biogenesis in yeast morphogenesis as revealed by multivariate analyseis of high-dimensional morphometric data. Mol Biol Cell, v. 25, n. 15, p. 222-233, 2014.

[39] Munro, C.A. Chitin and glucan, the Yin and Yang of the fungal cell wall, implications for antifungical drug discovery and therapy. Adv Appl Microbiol, v.83, p. 145-180, 2013.

[40] Chaffin, W.L., López-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J.P. Cell wall and secreted of *Candida albicans*: identification, function, and expression.. Microbiol Mol Biol Rev., v. 62, n. 1, p. 130-180, 1998.

[41] Uppuluri, P., Chaffin, W.L. Defining *Candida albicans* stationary phase by cellular and DNA replication, gene expression and regulation. Mol Microbiol., v. 64, n. 6, p. 1572-1586, 2007.

[42] Klis, F.M., Boorsma, A., de Groot, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, v. 23, n.3, p. 185-202, 2006.

[43] Kuhn, P.J., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W., Copping, L.G. Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Springer Berlin Heidelberg, p. 135-157 1990.

[44] Suzuki, L.C. Desenvolvimento de biofilme formado pr *Candida albicans in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN , 2009.

[45] Klis, F.M., Sosinska, G.J., de Groot, P.W.J., Brul, S. Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. FEMS Yeast Re., v. 9, p. 1013-1028, 2009.

[46] Calderone, R.A. Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. Arch Med Res., v. 24, n.3, p. 275-279, 1993.

[47] Cassone, A. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. Curr Top Med Mycol., v. 3, p. 248-314, 1989.

[48] Hromatka, B.S., Noble, S.M., Johnson, A.D. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of THB1 gene in nitrosative stress and virulence. Mol Biol Cell., v. 16, n. 10, p. 4814-4826, 2005.

[49] Vatansever, F., de Melo,, W.C.M.A., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N., Yin, R., Tegos, G.P., Hamblin, M.R. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. FEMS Microbiol Rev., v. 37, n.6, p. 955-989, 2013.

[50] Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., Williams, C. Fungal biofilm resistance. Int J Microbiol., v. 2012; 2012: 528521.

[51] Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., Kozik, A. Fungi phathogenic to humans: molecular bases of virulence *Candida albicans, Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim. Pol., v. 56, n.2, p. 211-224, 2009.

[52] Mayer, F.L., Wilson, D., Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence, v. 15, n.4:2, p. 119-128, 2013

[53] Mohan, V., Ballal, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida species* isolated from blood. Rev Iberoam Micol., v. 25, p. 208-210, 2008.

[54] Sther, F., Felk, A., Kretschmar, M.,Schaller, M., Schäfer, W., Hube, B. Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. Mycoses, v. 43, n. 2, p. 17-21, 2000.

[55] Pfaller, M.A. Antifungical drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. Am J Med., v. 125, p. S3-S13, 2012.

[56] Goldman, M.P. Terapia Fotodinâmica, Série procedimentos em dermatologia cosmética, Saundrs / Elsevier, cap. 1, Mecanismos de ação do ácido aminolevulínico tópico, p.1-12, 2007.

[57] Zeina, B., Greenman, J., Purcel, W.M., Das, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. Br J Dermatol., v. 144, n. 2, p. 274-78, 2001.

[58] Späth, A., Leib, C., Cieplik, F., Lehner, K., Regensburger, J., Hiller, K., Bäumler, W., Schnalz, G., Maisch, T. Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-colorede type-II photosensitizers. J Med Chem., v. 57, n. 12, p. 5157-5168, 2014.

[59] Barreiros, A.L.B.S., David, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defes do organismo. Quim Nova, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

[60] Garcez, A., Ribeiro, M., Núñez, S.C. PDT - Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia. Rio de Janeiro : Elsevier, 2013.

[61] Baker, A., Kanofsky, J. R. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 Leukemia cells. Photochem and Photobiol., v. 55, n.4, p. 523-528, 1992.

[62] Demidova, T.N., Hamblin, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother., v. 49, n. 6, p. 2329-2335, 2005.

[63] Prates, R.A., Silva, E.G., Yamada Jr, A.M., Suzuki, L.c., Paula, C.R., Ribeiro, M.S. Light parameters influence cell viability in antifungical photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. Laser Physics, v. 19, n.5, p. 1038-1044, 2009.

[64] Javed, F., Samaranayake, L.P., Romanos, G.E. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. Potochem Photobiol Sci., v. 13, p. 726-734, 2014.

[65] Dai, T., Huang, Y.Y., Hamblin, M.R. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. Photodiagnisis Photodyn Ther., v. 6, n. 3-4, p. 170-188, 2009.

[66] Pupo, Y.M., Gomes, G.M., Santos, E.B., Chaves, L., Michel, M.D., Koslowski Jr, V.A., Gomes, O.M.M., Gomes, J.C. Susceptibility of *Candida albicans* to phoyodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. Acta Odontol Latinoam., v. 24, n.2, p. 188-192, 2011.

[67] Souza, R.C., Junqueira, J.C., Rossoni, R.D., Pereira, C.A., Munin, E., Jorge, A.O., Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. Lasers Med Sci, v. 25, p. 385-389, 2010.

[68] Teichert, M.C., Jones, J.W., Usacheva, M.N., Biel, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 93, n. 2, p. 155-160, 2002.

[69] de Melo, W.C.M.A., Avci, P., de Oliveira, M.N., Gupta, A., Vecchio, D., Sadavisam, M., Chandran, R., Huang, Y-Y., Yin, R., Perussi, L.R., Tegos, G.P., Perussi, J., Dai, T., Hamblin, M.R. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. Expert Rev Anti Infect Ther., v.11, n.7, p. 669-693, 2013.

[70] Lal, P. Sharma, D., Pruthi, P., Pruthi, V. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. J Appl Microbiol., v. 109, n.1, p. 128-136, 2010.

[71] Al-Qadiri, H.M., Al-Alami, N.I., Lin, M., Al-Holy, M., Canivato, A.G., Rasco, B.A. Studying of the bacterial growth phases using transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. J Rapid Methods Autom Microbiol., v.16, n.1, p. 73-80, 2008.

[72] Staniszewska, M., Bondaryk, M., Swoboda-Kopec, E., Siennicka, K., Sygitowicz, G., Kurzattkowski, W. *Candida albicans* morplhologies revealed by scanning electron microscopy analysis. Braz J Microbiol., v. 44, n.3, p. 813-821, 2013.

[73] Lkhagvajav, N., Koizhaiganova, M., Yasa, I., Celik, E., Sari, Ö. Characterization and antimicrobial performance of nano silver coatings on leather materials. Braz J Microbiol., v. 46, n.1, p. 41-48, 2015.

[74] Benmansour, W., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K. Dormancy of *Candida albicans* ATCC 10231 in the presence of amphotericin B. Investigation using the scanning electron microscope (SEM). J Mycol Med., v. 24, n.3, p. e93-100, 2014.

[75] Dedavid, B.A., Gomes, C.I., Machado, G. Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

[76] Bergmans, L., Moisiadis, P. Meerbeek, B.V., Quirynen, M., Lambrechts, P. Microscopic observation of bacteris: review highlighting the use of environmental SEM. Int Endod J, v. 38, n.11, p. 775-788, 2005.

[77] Weber, K., Delben, J., Bromage, T.G., Duarte, S. Comparison of SEM and VPSEM imaging techniques with respect to *Streptococcus mutans* biofilm topography. FEMS Microbiol Lett., v. 350, n. 2, p. 175-179, 2014.

[78] Tennert, C., Feldmann, K., Haamann, E., Al-Ahmad, A., Follo, M., Wrbas, K.T., Hellwig, E., Altenburger, M.J. Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. BMC Oral Health, v. 4, n.14, p.132, 2014.

[79] Khan, S., Alam, F., Azam, A., Khan, A.U. Gold nanoparicles enhance methylene blue- induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm. Int J Nanomedicine, v. 7, p. 3245-3257, 2012.

[80] Garcez, A.S., Núñez, S.C., Azambuja Jr, N., Fregnani, E.R., Rodriguez, H.M.H., Hamblin, M.R., Suzuki, H., Ribeiro, M.S. Effects of photodynamic

therapy on gram-positive and gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. Photom Laser Surg., v. 31, n.11, p. 519-525, 21013.

[81] Costa, A.C., Rasteiro, V.M., Pereira, C.A., Rossoni, R.D., Junqueira, J.C., Jorge, A.O. The effects of rose Bengal- and erythrosine- mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. Mycoses, v. 55, n.1, p. 56-63, 2012.

[82] Núñez, S.C., Ribeiro, M.S., Garcez, A.S., Miyakawa, W. Assesment of photodynamic damage on *Escherichia coli* via atomic force microscopy. In: Popp J, Dexter W, Tuchi W, Mathews DL, editors. Biophotonics: photonics Solutions for Better Health Care II. Proc. Of SPIE; 7715: 77151L1-8, 2010.

[83] Ansari, M.J., Al-Ghamdi, A, Usmani, S., Al-Waili, N.S., Sharma, D., Nuru, A., Al-Attal, Y. Effect of jujube honey on *Candida albicans* growth and biofilm formation. Arch of Medical Res., v. 44, n.5, p. 352-360, 2013.

[84] Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P. Atomic Force Microscopy for Biologists. 2nd ed., Imperial College Press, 2010.

[85] Viani, M.B., Schäffer, T.E., Chand, A., Rief, M., Gaub, H.E., Hansma, P. K. Small cantileveres for force spectroscopy of single molecules. J App Phys., v. 86, n. 4, p. 2258-2262, 1999.

[86] Monçores, M.C. Propriedades mecao-elásticas de sistemas biológicos: caracterização por microscopia de força atômica. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

[87] Dufrêne, Y.F. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. J Bacteriol., v. 184, n. 19, p. 5205-5213, 2002.

[88] Formosa, C., Schiavone, M., Martin-Yken, H., François, J.M., Duval, R.E., Dague, E. Nanoescale effects of caspofungin against two yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother., v. 57, n. 8, p. 3498-3506, 2013.

[89] Canetta, E., Walker, G.M., Adya, A.K. Nanoscopic morphological changes in yeast cell surfaces caused by oxidative stress: an atomic force microscopic study. J Microbiol Biotechnol., v. 19, n.6, p. 547-555, 2009.

[90] Pillet, F., Lemonier, S., Schiavone, M., Formosa, C., Martin-Yken, H., François, J.M., Dague, E. Uncovering by atomic force microscopy of an original

circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock. BMC Biology, v. 12, n.6, 2014.

[91] Ene, I.V., Walker, L.A., Schiavone, M., Lee, K.K., Martin-Yken, H., Dague, E., Gow, N.A.R, Munro, C.A., Brown, A.J.P. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. mBio, v. 6, n. 4, p. 1-15, 2015.

[92] Santos, P.M, Cardoso, M.A.G., Khouri, S., Paula Jr, A.R., Uehara, M., Sakane, K.K. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans, Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. Rev Bras Eng Biom., v.28, n.4, p. 398-409, 2012.

[93] Dieter Naumann, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A. Meyers (Ed.) Copyright Ó John Wiley & Sons Ltd

[94] Sala, O. I_2 – Uma moécula didática. Quim Nova, v. 31, n.4, p. 914-920, 2008.

[95] Braiman, M.S., Rothschild, K.J. Fourier transform techniques for probing membrane protein structure. Ann Rev Biophys Chem., v.17, p.541-570, 1988.

[96] Siebert, F. Hildebrandt, P. Vibrational Spectroscopy in Life Science. Weinheim : Willey-Vch, 2008.

[97] Stuart, B.H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons, 2004.

[98] Beekes, M., Lasch, P., Naumann, D. Analytical applications of Fourier tranform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and príon research. Veterin Microbiol., v. 123, p. 305-319, 2007.

[99] Branan, N. Wells, T.A. Microorganism chararacterzation using ATR-FTIR on an ultrathin polystyrene layer. Vibrac Spectrosc., v. 44, p. 192-196, 2007.

[100] Sockalingum, G.D., nBouhedja, W., Pina, P., Alloch, P., Mandray, C., Labia, R. Millot, J.M., Manfait, M. ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and –resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains. Biochem Biophys res Comun., v. 232, p. 240-246, 1997.

[101] Toubas, D., Essendoubi, M., Adt, I., Pinon, J.M. Manfait M, Sockalingum, G.D. FTIR spectroscopy in medical micology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. Anal Bioanal Chem., v. 387, n.5, p. 1729-1737, 2006.

[102] Synytsya A., Novak, M. Structural analysis of fungal glucans. Biology and Chemistry of Beta glucan, v. 2, p. 3-28, 2013.

[103] Galichet, A., Sockalingum, G.D., Belarbi, A., Manfait, M. FTIR spectroscopy analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of na anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. FEMS Microbiol Lett., v. 197, n.2, p. 179-186, 2001.

[104] Michell, A.J., Scurfield, G. An assessmet of infrared spectra as indicators of fungal cell wall composition. Aust J Biol Sci., v. 23, p. 345-360, 1970.

[105] Adt, I., Toubas, D., Pinon, J-M., Manfait, M., Sockalingum, G.D. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. Arch Microbiol., v. 185, p. 277-285, 2006.

[106] Alvarez-Ordóñez, A., Mouwen, D.J.M., López, M., Prieto, M. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bactéria. J Microbiol Metthods, v. 84, p. 369-378, 2011.

[107] Alvarez-Ordóñez, A., Prieto, M. Changes in ultrastructure and Fourier transform infrared spectrum of *Salmonella enterica Serovar Typhimurium* cells after exposure to stress conditions. Appl Environ Microbio., v. 76, n. 22, p. 7598-7607, 2010.

[108] Jett, B.D., Hatter, K.L., Huycke, M.M. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. Biotechen., v. 23, n.4, p. 648-650, 1997.

[109] Fang, H.H.P., Chan, K.Y., Xu, L.C. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). J Microbiol Methods, v. 40, p. 89-97, 2000.

[110] Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G.,Naumman, D.Classification and identification of a bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J. Gener Microbiol., v.137, p. 69-79, 1991.

[111] Llorens, J.M.N., Tormo, A., Martnez-Garcia, E. Stationary phase in gram-positive bactreria. FEMS Microbiol Rev., v. 34, n.4, p. 476-495, 2010.

[112] Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D.S., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R.P., Baranyi, J., Peck, W., Hinton, J.C.D. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponencial growth and involves transient metal accumulation. J Bacteriol., v. 194, n.3, p. 686-701, 2012.

[113] Touati, D. Iron and oxidative stress in bacteria. Arch Biochem Biophys., v. 373, n. 1, p. 1-6, 2000.

[114] Frohner, I.E., Bourgeous, C., Yatsyk, K., Majer, O., Kuchler, K. *Candida albicans* cells surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. Mol Microbiol., v. 71, p. 240-252, 2009.

[115] Uppuluri, P., Chaturvedi, A.K., Srinivasan, A., Baneriee, M., Ramasubramaniam, A.K., Köhler, J.R., Kadosh, D., Lopez-Ribot, J.L. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilms development cycle. PloS Pathog., v. 6, n. 3, p. e1000828, 2010.

[116] Alves, E., Faustino, M.A.F., Neves, M.G.M.S., Cunha, A., Tome, J., Almeida, A. An insight on bacterial cellular targets of phoyodynamic inactivation. Future Med Chem., v. 6, n.2, p. 141-164, 2014.

[117] Sahu, K., Bansal, H., Mukherjee, C., Sharma, M, Gupta, P.K., Atomic force microscopic study om morphological alterations induced by photodynamic action of toluidine blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli.* J Photochem. Photobiol. B., v.96, n.1. p. 9-16, 2009.

[118] de Groot, P.W., de Boer, A.D., Cunningham, J., Dekker, H.L., de Jong, L., Hellingwerf, K.J., de Koster, C., Klis, F.M. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. Eukaryot Cell, v. 3, p. 955-965, 2004.

[119] Klis, F.M., Boorsma, A., de Groot, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, v. 23, n.3, p. 185-202, 2006.

[120] Dague, E., Bitar, R., Ranchon, H., Durand, F., Yken, H.M., François, J.M. An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. Yeast, v.27, p.673-684, 2010.

[121] Touhami, A., Nysten, B., Dufrêne, Y.F. Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy. Langmuir, v. 19, p. 4546, 2003.

[122] Alsteens, D., Dupres, V., Mc E.K., Wildling, L., Gruber, H.J., Dufrene, Y.F. Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM. Nanotechnology, v. 19, n. 38, p. 384005, 2008.

[123] Cabib, E., Blanco, N., Arroyo, J. Presence of a large β(1-3) glucan linked to chitin at the *Saccharomyces cerevisiae* mother-bud neck suggests involvement in localized growth control. Eukaryot Cell, v. 11, p. 388-400, 2012.

[124] Nguyen, T.H., Fleet, G.H., Rogers, P.L. Compositiom of cell walls of several yeast species. Appl Micobiol Biotechnol, v. 50, n.2, p. 206-212, 1998.

[125] Mello, M.L.S., Vidal, B.C. Changes in the infrared microspectroscopic characreristics of DNA caused by cationic elemments, different base richness and single-stranded form. PloSOne, v. 7, n.8: e43169, 2012.

[126] Gow, N.A.R., Gooday, G.W. Ultrastructure of chitin in hyphae of *Candida albicans* and other dimorphic and mycelial fungi. Protoplasma, v. 115, p. 52-58, 1983.

[127] Dhananasekaran, S., Palanivel, R., Pappu, S. Adsorption of methylene blue, bromophenol blue and coomassie brilliant blue by alpha-chitin nanoparticles. J Adv Res.,2090-1232©Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Cairo University, http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.03.003, 2015.

[128] Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S. Lipases assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnol Appl Biochem, v. 37, p. 63-71, 2003.

[129] da Costa, J.M. Caracterização enzimática de agentes da cromoblasomicose com ênfase em atividade lipase. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós graduação em Ciências Médicas, 2006.

[130] Walde, P., Luisi, L. A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier transform infrared spectroscopy. Biochem., v. 28, p. 3353-3360, 1989.

[131] Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. Appl Spectrosc Rev., v. 43, n.2, p. 134-179, 2008.

[132] Lam, H.S., Proctor, A., Nyalala, J., Morris, M.D., Smith, W.G. Quantitative determination of low density lipoprotein oxidation by FTIR and chemometric analysis.

[133] Guannoum, M.A., Janini, G., Khamis, L., Radwan, S.S. Dimorphism-associated variations in the lipid composition of *Candida albicans*. J Gen Microbiol., v.132, p. 2367-2375, 1986.

[134] Fukuda, E.K., Vasconcelos, A.F.D., Matias, A.C., Barbosa A. de M., Dekker, R.F.H., da Silva, M.L.C. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. Semina:Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n.1, p. 117-134, 2009.

[135] Dogan, M., Özdemir, Y., Alkan, M. Adsorption kinetics and mechanism of cationic methyl violet and methylene blue dyes onto sepiolite. Dyes Pigm., v. 75, n.3, p. 701-713, 2007.

[136] Longhinotti, E. Furla, L., Laranjeira, M.C.M., de Fávere, V.T. Adsorção de azul de metileno e croconato amarelo pelo biopolímero quitina. Quím Nova, v. 19, n. 3, p. 221-224, 1996.

[137]Borchman, D., Sinha, S. Determination of products of lipidic oxidation by infrared spectroscopy. Methods in molecular biology. v. 186, p. 21-28, 2002.

[138] Lorrain-Smith, J. The patological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. J Physiol., v. 24, p. 19-25, 1899.

[139] Lima, E.S., Abdalla, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

[140] Severcan, F., Gorgulu, G., Gorgulu, S.T., Guray, T. Rapid monitoring of diabetes-induced lipid peroxidation by Fourier transform infrared spectroscopy:

evidence from rat liver microsomal membranes. Anal Biochem., v. 339, p. 36-40, 2005.

[141] Heilmann, C.J. Sorgo, A.G., Mohammadi, S., Sosinska, G.J., de Koster, C.G., Brul, S. de Koning, L.J., Klis, F.M. Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Eukariot Cell, v. 12, p. 254-264, 2013.

[142] Westwater, C., Balish, E., Schofield, D.A. *Candida albicans*-conditoned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. Eukariot Cell, v. 4, n.10, p. 1654-1661, 2005.

[143] Smits, G.J., van den Ende, H., Klis, F.M. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. Microbilogy, v. 147, p. 781-794, 2001.

[144] Brown, A.J.P., Budge, S., Kalorit, D., Tillmann, A., Jacobsen, M.D., Yin, Z., Ene, I.V., Bohovuch, I., Sandai, D., Kastora, S., Potrykus, J., Ballou, E.R., Childers, D., Shahana, S., Leach, M.D. Stress adaptation in a pathogenic fungus. J Exp Biol., v. 217, n. 1, p. 144-155, 2014.

[145] Alonso-Monge, R., Román, E., Arana, D.M., pla, J., Nombela, C. Fungi sensing environmental stress. Clin Microbiol Infect., v. 15, n.1, p. 17-19, 2009.

[146] Suzuki, L.C. Estudo in vitro da terapia fotodinâmica em *Candida albicans* mediada por azul de metileno e glicose. Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN , 2015.