

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

THÂMARA TALLITA DA SILVA CORREIA

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA IN VITRO DE CANDIDA
ALBICANS E STAPHYLOCOCCUS AUREUS ASSISTIDA POR NANOCASCAS DE
OURO**

Recife

2018

THÂMARA TALLITA DA SILVA CORREIA

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA IN VITRO DE CANDIDA
ALBICANS E STAPHYLOCOCCUS AUREUS ASSISTIDA POR NANOCASCAS DE
OURO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves.

Recife

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

- C824i Correia, Thâmara Tallita da Silva.
Inativação fotodinâmica antimicrobiana *in vitro* de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* assistida por Nanocascas de ouro / Thâmara Tallita da Silva Correia. - 2018.
81 folhas, il., tab., abr. e sigl.
- Orientador: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo.
Coorientadora: Prof^a. Rejane Pereira Neves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2018.
Inclui Referências e Apêndice.
1. Engenharia Biomédica. 2. Inativação fotodinâmica antimicrobiana. 3. *Candida albicans*. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. Azul de metileno. 6. Nanocascas de ouro.
I. Araújo, Renato Evangelista de (Orientador). II. Neves, Rejane Pereira (Coorientadora). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2019-208

THÂMARA TALLITA DA SILVA CORREIA

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA IN VITRO DE CANDIDA
ALBICANS E STAPHYLOCOCCUS AUREUS ASSISTIDA POR NANOCASCAS DE
OURO**

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Engenharia Biomédica.

Aprovada em: __29__ / __06__ / __2018__.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Renato Evangelista de Araújo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Luciana Santos Afonso de Melo (Examinador Externo)
Centro Universitário Tiradentes

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Edilene e Rizonildo Correia, que sempre me amaram, e se dedicaram para me proporcionar a riqueza dos estudos. Sempre ao meu lado, me dando todo o suporte e carinho necessário para o meu crescimento. Esse trabalho é para vocês com meu imenso amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me proporcionar saúde e força necessárias para ir atrás dos meus objetivos. Cercando-me sempre de boas pessoas com as quais pude aprender ao longo da elaboração desse trabalho. Sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço ao meu esposo **Diego** por toda paciência e incentivo. Obrigada por todas as noites que você ficou acordado só para que eu não dormisse e continuasse estudando. Obrigada por sempre me ajudar, incentivar, por acreditar em mim, por toda torcida e por todo apoio. Obrigada por contar as UFCs comigo! Você é o meu alicerce! Foi um verdadeiro parceiro em todas as etapas desse trabalho! Sem você eu não conseguiria.

À UFPE- Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica muito obrigada pela oportunidade!

Ao meu orientador **Professor Drº. Renato Araújo** por aceitar me orientar nesse trabalho, por sua disponibilidade, dedicação, paciência. Sempre pronto a me ajudar, tirando minhas duvidas, indicando os melhores caminhos pelos quais percorrer. Obrigada por tornar esse trabalho possível.

Obrigada querida **Professora Drª Rejane Neves** pela co-orientação e apoio e a todos os colegas da Micologia Médica-CB/UFPE que pude conviver na graduação e no período do mestrado.

Minha eterna gratidão à **Professora Drª Martha Simões Ribeiro** do CENTRO DE LASERS E APLICAÇÕES-IPEN/SP pela oportunidade de aprender com a senhora e pela acolhida carinhosa, e a todos os seus alunos, especialmente a **Tania, o Saulo e a Carol** com quem estive trabalhando.

Meu muito obrigado também ao doutorando **Sajid** pela parceria. E a todos os colegas do Laboratório de Óptica Biomédica da UFPE.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de mestrado concedida.

RESUMO

A inativação fotodinâmica antimicrobiana baseia-se no uso de um agente fotossensibilizador (FS), ativado por luz em comprimento de onda específico, para a destruição de microorganismos. O processo leva à produção de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto e superóxidos, que são citotóxicos para a célula alvo. É conhecido que a presença de nanopartículas (NP) metálicas próximas ao FS podem potencializar a ação do processo fotodinâmico. Em nanopartículas metálicas, luz pode induzir uma oscilação coletiva dos elétrons do metal (efeito denominado de Plasmons localizados de superfície), acarretando o aumentando do campo elétrico próximo à nanoestrutura, que é percebido pelo FS. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* os efeitos da inativação fotodinâmica antimicrobiana associados ao Azul de Metileno (AM) assistida por nanocascas de ouro frente as cepas de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. As nanocascas utilizadas nesse trabalho apresentam núcleo esférico de SiO₂ com diâmetro de 82,6 nm e cascas de ouro com espessura de 21,5 nm. As amostras foram submetidas à irradiação usando LEDs (*Light Emitting Diode*) vermelhos com pico de emissão em 659 nm, e expostas a tempos de irradiação de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 10 minutos. Os resultados mostraram que a incubação dos *S. aureus* e *C. albicans* com AM ou nanopartículas isoladamente não promoveu nenhuma citotoxicidade. Porém, quando o AM foi combinado com as nanocascas de ouro, a redução dos microorganismos foi observada, após 1 min de irradiação. Para erradicação total de microorganismos, o tempo de iluminação no procedimento de inativação fotodinâmica com o uso de nanocasca foi reduzido em 3x. Nas leveduras de *Candida albicans* também foi verificado o potencial de inativação do Azul de Metileno combinado com o colóide de ouro.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica antimicrobiana. *Candida albicans*. *Staphylococcus aureus*. Azul de metileno. Nanocascas de ouro.

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic inactivation is based on the use of a light-activated photosensitizing agent (FS) at specific wavelengths for the destruction of microorganisms. The process leads to the production of reactive oxygen species, such as singlet oxygen and superoxides, which are cytotoxic to the target cell. It is known that the presence of metallic nanoparticles (NP) close to FS can potentiate the action of the photodynamic process. In metal nanoparticles, light can induce a collective oscillation of the electrons of the metal (effect called localized surface Plasmons), causing the increase of the electric field near the nanostructure, which is perceived by the FS. The objective of this study was to evaluate in vitro the effects of antimicrobial photodynamic inactivation associated with Methylene Blue (MB) assisted by gold nanocases against the strains of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. The nanocubes used in this work have a spherical SiO₂ core with a diameter of 82.6 nm and a gold bark with a thickness of 21.5 nm. The samples were subjected to irradiation using red LEDs (Light Emitting Diode) with peak emission at 659 nm, and exposed to irradiation times of 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8 and 10 minutes. The results showed that incubation of *S. aureus* and *C. albicans* with MB or nanoparticles alone did not promote any cytotoxicity. However, when MB was combined with gold nanocaps, the reduction of microorganisms was observed after 1 min of irradiation. For total eradication of microorganisms, the illumination time in the photodynamic inactivation procedure with the use of nanocoque was reduced by 3x. In the yeasts of *Candida albicans*, the inactivation potential of Methylene Blue combined with the gold colloid was also verified.

Keywords: Antimicrobial photodynamic inactivation. *Candida albicans*. *Staphylococcus aureus*. Methylene blue. Gold nanocases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fotomicrografia do fungo <i>Candida albicans</i>	17
Figura 2 –	Fotomicrografia de <i>Staphylococcus aureus</i> sob uma ampliação de 250X.....	24
Figura 3 –	Microscopia eletrônica de varredura colorida de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA).....	27
Figura 4 –	Mecanismo Fotoquímico da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana..	30
Figura 5 –	Estrutura molecular da Clorina	33
Figura 6 –	Estrutura molecular do Azul de toluidina.....	33
Figura 7 –	Estrutura molecular do Azul de metileno.....	33
Figura 8 –	Estrutura molecular da Riboflavina.	33
Figura 9 –	Espectro de absorção de espécies de monômero e dímero de azul de metileno	35
Figura 10 –	Esquema oscilação dos Plasmons em uma esfera	38
Figura 11 –	Nanocascas de ouro.....	41
Figura 12 –	Distribuição de tamanho das nanocascas de ouro	42
Figura 13 –	Propriedades ópticas das nanocascas de ouro	42
Figura 14 –	Alíquota da solução de azul de metileno	43
Figura 15 –	Etapas de preparo do inóculo.....	45
Figura 16 –	Mini-Eppendorfs (200 µL) utilizados para a TFDa	45
Figura 17 –	Aparelho vórtex utilizado para homogeneizar os grupos antes da irradiação	50
Figura 18 –	Sistema de iluminação utilizado.....	51
Figura 19 –	Esquema representativo da diluição seriada ($1:10^1$ a $1:10^{-6}$)	52
Figura 20 –	Esquema do plaqueamento em placa de Petri pelo Método de Jett <i>et al.</i> , 1997	53
Figura 21 –	Formação das colunas após corrida da gota no processo de plaqueamento	53
Figura 22 –	Esquema do plaqueamento em placa de petri após diluição seriada	54
Figura 23 –	Placa de Petri com meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose com semeio de <i>C. albicans</i> pela técnica de Jett após 24 horas de crescimento	54
Figura 24 –	A) Placas de petri com meio BHI para cultivo de <i>S. aureus</i> . B) Cultura	

	de <i>S. aureus</i>	55
Figura 25 –	A) Espectrofotômetro. B) Mensuração da turbidez do inóculo	56
Figura 26 –	Placa de microtitulação de 96 poços e fundo chato.....	56
Figura 27 –	A) Caixa de diodo emissor de luz vermelha (LED) em funcionamento emitindo a $65 = 659 \pm 9$ nm (BioLambda). B) Caixa de diodo emissor de luz vermelha (LED)	62
Figura 28 –	Placas semeadas na estufa	62
Figura 29 –	Placa semeada após 24 horas em estufa a 37°C	63
Figura 30 –	Imagem de microscopia eletrônica de varredura. Barra de escala da imagem: 1 μ m. Barra de escala da imagem inserida: 200 nm	64
Figura 31 –	Espectro de ressonância de ressonância plasmônica de superfície localizada das nanocascas de ouro	65
Figura 32 –	Crescimento das UFCs tratadas apenas com irradiação de 10 minutos e sem a adição de nanocascas e azul de metileno	65
Figura 33 –	Gráfico de contagem de UFCs/ml nos controles positivo, controle negativo e em suspensão de <i>Candida albicans</i> a 10^7 UFC/ml iluminada por 10 minutos (VIABILIDADE CELULAR)	66
Figura 34 –	A) controle positivo <i>Candida albicans</i> 10^7 UFC/ml. B) Controle negativo (apenas PBS)	66
Figura 35 –	Resultados do crescimento fúngico da suspensão fúngica (10^7 UFC/mL nas setas).....	67
Figura 36 –	Resultados do crescimento fúngico da suspensão fúngica (10^7 UFC/mL nas setas) após 24 horas nos tempos de 0, 2, 4, 8 e 10 minutos de irradiação tratadas com azul de metileno (10 μ M) e nanocascas de ouro (1 μ M)	67
Figura 37 –	Gráfico demonstrando o número de UCF/ml utilizando azul de metileno 10 μ M isoladamente, e azul de metileno 10 μ M associado às nanocascas de ouro nas concentrações de 0,1 e 1 μ M irradiadas nos tempos: 0, 2, 4, 8 e 10 minutos	68
Figura 38 –	Imagens das placas (a) e a fração de sobrevivência (b) de <i>S. aureus</i> após os tratamentos.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Grupos experimentais da primeira etapa (azul de metileno 10 μM e nanocascas (0,1 μM e 1,0 μM)	46
Tabela 2 –	Grupos experimentais da primeira etapa (azul de metileno 10 μM e nanocascas (0,1 μM e 1,0 μM) associados.....	47
Tabela 3 –	Grupos controles da primeira etapa (apenas luz, controle negativo e controle positivo)	48
Tabela 4 –	Grupos controles da primeira etapa (AM, Nanocasca 0,1 μM nanocasca 1,0 μM ambos sem iluminação)	49
Tabela 5 –	Grupos dos testes da Primeira Etapa.....	50
Tabela 6 –	Tempo de irradiação x Densidade de Energia.....	51
Tabela 7 –	Grupos testes tratados apenas com azul de metileno 80 μM (concentração final de 4 μM por poço)	57
Tabela 8 –	Grupos tratados com azul de metileno 80 μM (concentração final de 4 μM por poço) e nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$	58
Tabela 9 –	Grupos – controle.....	60
Tabela 10–	Grupos dos testes da Segunda Etapa	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPs	Nanopartículas
µg	Microgramas
µl	Microlitros
ml	Mililitros
nm	Nanômetros
TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
Au	Ouro
LED	Light Emitting Diode
FS	Fotossensibilizador
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
%	Porcentagem
°C	grau Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
pH	Potencial Hidrogeniônico
ROS	Reactive oxygen species
AIDS	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HIV	Acquired immunodeficiency Syndrome
AM	Azul de metileno
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation
Cm ²	Centímetros quadrado
HIV	Acquired immunodeficiency Syndrome
AM	Azul de metileno
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation
Cm ²	Centímetros quadrado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
J	Joule

PBS	Phosphate- Buffered-Saline (Tampão Fosfato-Salino)
S	Segundos
Min	Minutos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
λ	Comprimento de onda
μm	Micrômetro
mWh	Megawatt-hora
nm	Nanômetro
$\text{O}_2^{\cdot -}$	Ânion superóxido ou Radical superóxido
OH	Hidroxila
$^1\text{O}^2$	Oxigênio singlete
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
USP	Universidade de São Paulo
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
Log10	Logarítimo na base de 10
BHI	Ágar Brain Heart Infusion
DAS	Ágar sabouraud dextrose
PIT	Tempo de pré- irradiação
$\bar{x}$	Média
dp	Desvio Padrão
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Proteína ligadora de penicilina
$\bar{x}$	Média
dp	Desvio Padrão
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Proteína ligadora de penicilina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	GÊNERO <i>Candida</i>	16
2.2	CANDIDÍASE	18
2.3	GÊNERO <i>Staphylococcus spp.</i>	23
2.4	INFECÇÕES POR <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.5	INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA.....	28
2.6	FOTOSENSIBILIZADORES	32
2.6.1	Fotosensibilizador azul de metileno	34
2.7	NANOPARTÍCULAS DE OURO	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCASCAS DE OURO.....	40
4.2	PROCESSAMENTO DAS NANOCASCAS DE OURO.....	42
4.3	PROCESSAMENTO DA SOLUÇÃO DO FOTOSENSIBILIZADOR.....	42
4.4	PRIMEIRA ETAPA- <i>Candida albicans</i> (ATCC 90028).....	43
4.1	SEGUNDA ETAPA - <i>S. aureus</i> (ATCC 29231)	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
5.1	RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA - <i>Candida albicans</i>	62
5.2	RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA- <i>Staphylococcus aureus</i>	66
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	81

1 INTRODUÇÃO

A raça humana sempre foi acometida por adversidades de origem infecciosa. Muito antes da existência de seres humanos na Terra, já havia a presença de seres microbiológicos, como as bactérias e os fungos. Com o avanço da população e a ocupação humana nos diversos ambientes do planeta, ampliaram-se os contatos interpessoais acarretando na maior disseminação de doenças infecciosas (FREIRE, 2005).

A bactéria Gram-Positiva *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*, que acarretam uma diversidade de manifestações clínicas (LIMA et al., 2018), principalmente em pacientes expostos a uma grande variedade de fatores, podem cursar clinicamente como assintomáticas, oligossintomáticas ou sintomáticas com quadros severos em pacientes imunodepressivos (COUTO et al., 2015).

O aparecimento de cepas de bactérias e leveduras multirresistentes trata-se de uma ameaça à saúde pública. Há uma urgência na busca e implantação de novas e efetivas medidas terapêuticas antimicrobianas alternativas, visto que os recursos terapêuticos disponíveis são relativamente poucos, especialmente para espécies resistentes de forma inata, ou dependentes da dose aplicada dos tratamentos disponíveis no mercado (FREITAS et al., 2017). Uma modalidade terapêutica alternativa bastante promissora para inativação microbiana é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (FREITAS et al., 2017).

Além de ser uma abordagem alternativa para infecções resistentes, a Terapia Fotodinâmica tem a vantagem adicional, em relação à terapia farmacológica convencional, de não selecionar cepas resistentes. Pois, diversos alvos microbianos são atingidos simultaneamente, evitando assim o desenvolvimento de resistência, além de afetar a expressão de fatores de virulência, o que provoca também sua degradação (GARG et al., 2015; BARTOLOMEU et al., 2016; FREITAS et al., 2017; KASHEF et al., 2017).

Um grande número de microrganismos apresenta susceptibilidade à terapia fotodinâmica antimicrobiana, incluindo as leveduras do gênero *Candida spp.* e a bactéria *S. aureus*, fazendo desta modalidade uma alternativa para o tratamento de infecções microbianas (FREITAS et al., 2017). A inativação fotodinâmica antimicrobiana é uma área de crescente interesse e as pesquisas neste ramo têm avançado e os resultados são promissores, porém, necessitando de mais investigações (FARIA, 2017; GARCIA, 2018).

O mecanismo de ação da inativação fotodinâmica antimicrobiana envolve três elementos fundamentais: a presença de um fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz específica e moléculas de oxigênio que estarão presentes no sistema (FARIA, 2017). Após ser

irradiado, o fotossensibilizador passa para um estado excitado, e transfere a sua energia para o oxigênio molecular, podendo produzir 14 tipos de espécies reativas de oxigênio, causando danos às estruturas celulares de mecanismos oxidativos conduzindo as células à morte por apoptose, necrose ou autofagia (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Apesar da comprovada ação da Inativação ou Terapia fotodinâmica antimicrobiana na eliminação de microrganismos, algumas alternativas têm sido desenvolvidas para ampliar o efetivo uso desta técnica como: a produção de drogas mais eficientes na geração de oxigênio reduzido ou o uso de nanopartículas metálicas que induzem uma produção de oxigênio reativo. Contudo, há a necessidade de mais estudos que explorem o uso de nanopartícula de ouro ou de prata associada à na inativação fotodinâmica antimicrobiana (KHAN et al., 2012; SHERWANI et al., 2015; MALISZEWSKA, et al., 2017).

O azul de metileno é um corante bem estabelecido como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica por absorver na região da luz vermelha (600 a 660nm), apresentar um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, apresentando eficiência fototóxica frente a variados microrganismos e necessitando de doses de energia menores para obtenção de resultados equivalentes se comparados a outros FS, além de apresentar baixo custo, fácil obtenção e baixa toxicidade no escuro, sendo muito utilizado em procedimentos de terapia fotodinâmica antimicrobiana, bem como, denota uma atividade *in vivo* frente a diversos tumores (KHAN ET AL., 2012; ALVES, 2016).

A combinação do uso da nanopartícula metálica com o FS é determinada por alguns parâmetros como forma, material e tamanho da nanopartícula e pelas características absorptivas do fotossensibilizador. Em particular, nanocascas de ouro podem apresentar espectros de extinção (absorção e espalhamento) na região vermelha e infravermelha do espectro eletromagnético, o que os tornam atraentes para o uso em TFD. Khan et al., 2012 e Sherwani et al., 2015 apresentaram o uso de NP de ouro associado ao Azul de Metileno (AM) na foto-inativação de *Candida albicans* e Hu et al., 2017 apresentaram o uso de nanopartículas de ouro associado a irradiação de luz vermelha no biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

Neste trabalho, é avaliado o uso de nanocascas de ouro associadas ao fotossensibilizador Azul de Metileno na foto-inativação de cepas da levedura *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Documentadamente o uso da luz e compostos fotossensíveis pelo ser humano como recurso terapêutico tem relatos desde a pré-história. A Inativação Fotodinâmica de microrganismos é uma modalidade terapêutica que utiliza um agente fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular que se encontra presente na célula a ser inativada, a fim de produzir espécies citotóxicas nocentes às células, levando-as à morte (OLIVEIRA, 2016).

Assim, nesta revisão serão abordados tópicos relevantes sobre o presente estudo, divididos em subtítulos. Segue abaixo a revisão realizada para a referida pesquisa.

2.1 GÊNERO *Candida*

O gênero *Candida* é constituído por cerca de 350 espécies (SOUZA, 2015) composto por microrganismos unicelulares e pleomórficos, que vivem geralmente em condições saprófitas, sendo isoladas da microbiota humana em diversos sítios corporais (LIM et al., 2016) como pele, mucosas, trato gastrointestinal (LIMA et al., 2018), respiratório (CHÁVEZ, 2009) e mucoso-oral e vulvovaginal, bem como, em variados ecossistemas, como solo, alimentos e água (BOKOR-BRATIC, 2008).

Do ponto de vista taxonômico, essas espécies estão incluídas no Reino Fungi, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Blastomycetes*, Família *Cryptococcaceae* (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; GUARRO, 2012). E apenas 10% destas leveduras encontram-se associadas às infecções no ser humano (EGGIMANN et al., 2003; WILLIAMS et al., 2011), sendo o maior gênero de leveduras de importância médica (BRANDT e LOCKHART, 2012; MARTINS et al., 2014).

Essas leveduras caracterizam-se pelo seu caráter oportunista e são microrganismos cosmopolitas, eucarióticos desprovidos de pigmentos fotossintetizantes, gram-positivos, morfológicamente suas células são ovais, leveduriformes, podendo formar durante o crescimento as estruturas conhecidas como blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas, que invadem os tecidos, e causam danos, pela invasão direta ou liberação de metabólitos. Elas possuem parede celular composta por quitina e membrana plasmática fosfolipídica que contém esteróis, com predomínio do ergosterol (BERMAN, 2002; DE AGUIAR, 2007).

Esses microrganismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos fundamentais para seu desenvolvimento e podem ainda apresentar a

capacidade de modificação de fenótipo, conhecidos como fase branca e opaca, sendo a branca a mais virulenta (RODRIGUES; HENRIQUES, 2014).

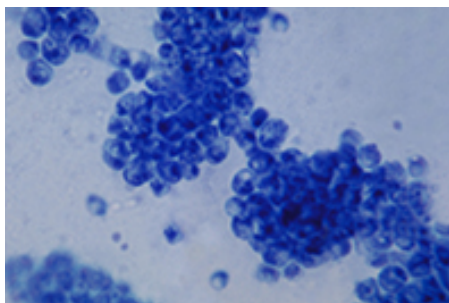
Devido a sua capacidade adaptativa, esses fungos podem se desenvolver tanto na presença e/ou ausência de oxigênio e, na maioria das vezes, se reproduzem de maneira assexuada, de conídios, todavia, algumas espécies de *Candida* se multiplicam de forma sexuada (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

Os principais fatores de virulência das leveduras que poderão induzir a quadros clínicos infecciosos são: capacidade de expressão e secreção de enzimas extracelulares (fosfolipases e proteinases) que degradarão o tecido do hospedeiro levando à invasão tecidual; a síntese de substâncias tóxicas que provocam lesões celulares/ teciduais; a capacidade de adesão a células e tecidos; a produção de biofilmes sobre células e superfícies inertes; a formação de pseudo-hifas por algumas espécies de *Candida* spp.; a capacidade de aderência a materiais médico-hospitalares e células hospedeiras (COLOMBO et al., 2003); a produção de hemolisinas ; a hidrofobicidade da superfície celular e a resistência ao peróxido de hidrogênio (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

Assim, a infecção poderá se instalar a partir da resposta imunológica do hospedeiro associada a esses mecanismos de patogenicidade desenvolvidos pela levedura ou pelo rompimento das barreiras anatômicas, como em casos de queimaduras e na presença de dispositivos médico-invasivos como cateteres ou cirurgias invasivas (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

A *Candida albicans* (FIGURA 1) é um fungo polimórfico e encontra-se como a espécie mais isolada em infecções por *Candida*, considerada a espécie mais patogênica do gênero é também o principal agente etiológico da candidíase neonatal, que constitui pelo menos 60% das espécies de *Candida* isoladas em amostras clínicas (DE HAAN et al., 2013).

Figura 1 - Fotomicrografia do fungo *Candida albicans*.



Fonte: Centers for disease control and prevention's public health image library.

A *Candida albicans* representa o microrganismo mais frequentemente isolado em infecções nosocomiais (GULLO et al., 2009). No entanto, aproximadamente 17 espécies diferentes são conhecidas por serem agentes etiológicos de infecções em seres humanos (PFALLER et al., 2010).

As principais espécies de *Candida* associadas às infecções no ser humano são: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, *Candida norvegensis*, *Candida sake*, *Candida apicola*, *Candida zeylanoides*, *Candida valida*, *Candida intermedia*, *Candida pulcherrima*, *Candida haemulonii*, *Candida stellatoidea*, *Candida utilis*, *Candida humicola*, *Candida lambica*, *Candida ciferrii*, *Candida catenulata*, *Candida colliculosa*, *Candida holmii*, *Candida marina*, *Candida viswanathii*, *Candida auris* e *Candida sphaerica*. (DIEKEMA et al., 2012; SANTOS, 2017).

As espécies não-*albicans* estão sendo cada vez mais reconhecidas como importantes patógenos fúngicos emergentes, ocorrendo uma mudança na epidemiologia da candidíase. A emergência de candidíases provocadas por espécies não-*albicans*, associadas a altas taxas de morbimortalidade, resulta em parte dos mecanismos de resistência, intrínsecos ou adquiridos, que estas espécies apresentam aos antifúngicos convencionalmente utilizados na terapia. Sendo as principais espécies emergentes a: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. (KOŁACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016).

No entanto, a *Candida albicans* ainda é a mais isolada (PFALLER et al., 2007). Sendo, por exemplo, a segunda causa mais frequente de vulvovaginite no período menstrual, responsável por 85% dos casos (PEIXOTO et al., 2014; RAIMUNDO et al., 2018).

2.2 CANDIDÍASE

As leveduras do gênero *Candida* são fungos de interesse médico devido à elevada frequência que colonizam e infectam o ser humano (PLANTINGA et al., 2012). São comensais oportunistas (VALLE et al., 2010; AIKAWA et al., 2015), das quais algumas das espécies são potencialmente patogênicas (PLANTINGA et al., 2012; SARDI et al., 2013; ANTINORI et al., 2016).

As infecções por *Candida*, denominadas candidíases, candidoses ou monilíase mostram um amplo espectro de apresentações clínicas (KOBAYASHI et al., 2013). Essa micose

pode ainda ser classificada em: aguda e crônica. A lesão aguda apresenta, na maioria das vezes, hiperemia e prurido leve e na lesão crônica pode haver também eliminação de secreção purulenta, febre, neutropenia dor e prurido intenso (VIEIRA et al., 2014).

É consenso que as espécies de *Candida* que causam infecções em seres humanos participam ativamente do processo fisiopatogênico da doença, e utilizam-se de seus mecanismos de agressão/ resistência, conhecidos como fatores de virulência (TAMURA et al., 2007).

Esta levedura pode ser isolada de indivíduos saudáveis (colonizando), contudo, com ausência de doença (ausência de processo infeccioso). Comprovando, assim, a necessidade de uma alteração fisiológica no hospedeiro, para que haja um desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro e a doença supere seu sistema imunológico e se estabeleça (BANDEIRA; SABADIN et al., 2017).

A etiopatogenia da candidíase ocorre de forma endógena e/ou exógena e, predominantemente, encontra-se associada às modificações fisiológicas ligadas à imunossupressão (BUSETTO et al., 2013), acometendo pacientes expostos a uma grande variedade de fatores de risco, em especial aqueles acometidos por doenças sistêmicas que cursam com imunodepressão, utilização de fármacos imunossupressores ou citostáticos e esteroides, o uso prolongado de antibioticoterapia de amplo espectro, que podem causar modificações na microbiota, estimulando a proliferação de *Candida* (PINHATI, 2016).

De acordo com as manifestações clínicas, as candidíases classificam-se como: a) Infecções muco-cutâneas (acometem preferencialmente a cavidade oral e canal vaginal), como a candidíase oral, orofaríngea e a vaginal, sendo a candidíase vaginal a segunda infecção genital mais frequente em mulheres em idade fértil (SHIOZAWA et al., 2018). b) A forma cutânea, que se manifestam clinicamente por lesões superficiais, limitando-se a pele e anexos. Aparecem com mais frequência em espaços interdigitais, inframamárias e axilares. c) Podendo ainda até atingir tecidos profundos, (candidíase invasiva ou disseminada) disseminando para órgãos internos como: pulmões, meninges, rins, bexiga, articulações, fígado, coração e olhos (COUTO et al., 2015), d) podendo alcançar a corrente sanguínea, infecção conhecida como candidemia. Sendo capaz de evoluir para um quadro grave potencialmente fatal de septicemia que apresenta altas taxas de morbimortalidade atingindo de 40% a 60%, independente da complexidade da imunodeficiência do paciente (SANGLARD et al., 2016; KURTZMAN et al., 2011), estimada em 72,8 casos por milhão de habitantes por ano (VIEIRA et al., 2014).

Algumas das mais comuns manifestações clínicas da candidíase em pacientes imunocomprometidos HIV-positivos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) incluem a endoftalmite, endocardite, candidíase vaginal, candidíase cutânea, artrite séptica e peritonite por *Candida* (CANTO'N et al., 2011).

Esses indivíduos são também frequentemente acometidos pela candidíase orofaríngea e pela esofagiana que, devido à diminuição progressiva da imunidade celular (GASPARIN et al., 2009), da condição imunológica do portador e dos fatores de virulência (SARDI et al., 2013; PINHATI, 2016), podem permanecer localizadas nestes locais ou disseminar-se por via hematogênica a partir da infecção inicial (BONAN et al., 2007). Este quadro clínico está também associado à má-absorção farmacológica, desnutrição, dentre outras comorbidades, o que agrava ainda mais o estado clínico desses indivíduos (FIDEL, 2006; HANSAN et al., 2009).

As defesas do hospedeiro e a virulência do microrganismo irão conduzir a expressão da relação parasita/hospedeiro. Em relação ao hospedeiro, a colonização prévia e a posterior diminuição da capacidade de resposta imunológica observada em doenças imunossupressoras podem favorecer a infecção. Em relação ao microrganismo o principal fator associado à ocorrência de doença é o potencial de patogenicidade, que está relacionado à capacidade de invadir o organismo e causar danos (VALLE et al., 2010).

Além dos fatores de predisposição citados, a presença de dispositivos terapêuticos invasivos, como o uso de cateter venoso central, ventilação mecânica e nutrição parenteral, transplantes de órgãos e células-tronco, granulocitopenia (principalmente a neutropenia), hemodiálise, queimaduras extensas, mal formação congênita, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda e internações prolongadas por mais de 30 dias em unidades hospitalares configuram outros exemplos de predisposição à tais infecções em comparação com os pacientes saudáveis (PAPPAS, 2015; PEMÁN; QUINDÓS, 2015).

As candidíases têm espantoso ônus quando se refere à morbimortalidade no Brasil e no mundo. Um dos fatores associados à disseminação da levedura para corrente sanguínea, evoluindo de um quadro de candidíase superficial, por exemplo, para uma sistêmica, está associado à prévia colonização, bem como a inoculação acidental e a disseminação através de lesões prévias (LIMA et al., 2018).

Outro fator é o tratamento, que é bastante oneroso, sendo um fardo financeiro para os sistemas de saúde, com um custo aproximado de cada hospitalização de até US \$ 40 000 (GUINEA, 2014).

A epidemiologia das candidíases é variável, dependendo da virulência do isolado, da carga parasitária e da predisposição do hospedeiro e estado imunológico e da região geográfica, tratando-se de um fugo cosmopolita. Como por exemplo, as taxas de mortalidade observadas no Hemisfério Norte, permanecem altas, evidenciando a necessidade de melhorar o manejo clínico em pacientes com candidíase, abrangendo um diagnóstico precoce, controle da origem da infecção e terapia antifúngica precisa e adequada (RUIZ LS et al., 2005; YAPAR, 2014). Estando associados esses dados à falha terapêutica, como o retardamento do início da terapia, dose e agentes antifúngicos inadequados ou ineficazes. (GUINEA, 2014).

De acordo com ANVISA (2016, p. 83, apud LOPES, 2018) a *Candida* spp. é o terceiro microrganismo na notificação nacional. Adicionalmente, essas infecções são particularmente sérias devido ao elevado número de pacientes acometidos por IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde) por estes patógenos oportunistas, pela associação a altas taxas de mortalidade (KUHN et al., 2002) e pela resistência a agentes antifúngicos, o que eleva o tempo de hospitalização dos pacientes e torna o tratamento muito mais oneroso (BLANKENSHIP et al., 2006).

A resistência antifúngica conduz à falha terapêutica e consequentemente dificulta o combate às infecções (LIM et al., 2012), relacionada a altas taxas de morbimortalidade atribuível (HSU, LI YANG et al., 2015), o que representa uma ameaça progressiva para a saúde humana, podendo resultar em alta morbimortalidade, em consequência, por exemplo, das dificuldades no diagnóstico e a disponibilidade limitada de drogas antifúngicas eficazes (DAI et al., 2011). Por isso, o aumento no número de casos de resistência à terapêutica antifúngica atual é preocupante (ANWAR et al., 2012).

Dessa forma, as micoses tornaram-se um grande problema para a saúde e o número de casos de infecções disseminadas por fungos tem aumentado nas últimas duas décadas (LEPAK; ANDES, 2011). A levedura em questão é o agente etiológico mais isolado em infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva de etiologia fúngica (MONTAGNA et al., 2013; GUPTA et al., 2015). Sendo 80% dessas infecções de origem fúngica causadas por algumas das espécies de *Candida* (SARDI et al., 2013; DOI et al., 2016), com prognóstico geralmente de difícil desfecho (ANTINORI et al., 2016; FUENTEFRÍA et al., 2016).

Outro ponto de notória relevância neste cenário é que ainda não se encontram disponíveis vacinas para prevenir infecções fúngicas, muito embora, essas infecções encontram-se relacionadas a altas taxas de morbimortalidade em todo o mundo (CANELA, 2017) e as opções terapêuticas ainda são escassas e restritas a poucas classes de drogas (SARDI et al., 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

A semelhança entre as células fúngicas e as células dos mamíferos, visto que ambas compreendem seres eucariotos, atrapalhando o processo de busca por novos agentes antifúngicos que sejam seguros, eficientes e de baixo custo (ROSSETI et al., 2015).

Atualmente está disponível uma limitada variedade de antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções por *Candida*, e são usados na maioria dos casos algum dos agentes antifúngicos dessas quatro seguintes classes: polienos (nistatina e anfotericina B), azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) fluocitocitosina e equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), podendo ser usado até mais de um antifúngico em associação no tratamento (VIEIRA et al., 2017).

Os polienos e azólicos muito utilizados clinicamente, como a anfotericina B e o itraconazol, pode propiciar o desenvolvimento de toxicidade em alguns tecidos/órgãos, possuindo variados efeitos colaterais e muitas cepas de *Candida* encontram-se resistentes ou adquirem menos sensibilidade a muitos deles (PFALLER et al., 2010; NETT; ANDES, 2016).

Convencionalmente, o tratamento das candidíases tem demonstrado falhas devido ao surgimento da resistência aos fármacos usuais e, principalmente, pela reduzida quantidade de antifúngicos disponíveis, como também a elevada toxicidade de alguns antifúngicos de ação sistêmica (KHAN et al., 2012).

Nas últimas duas décadas houve um elevado aumento no número de infecções nosocomiais por *Candida spp.* resistentes a antifúngicos, o que tem ocasionado aumento nas taxas de insucesso terapêutico frente a esses agentes, bem como, aumento nos custos com o tratamento, elevação no tempo de hospitalização e, encontra-se associado às elevadas taxas de mortalidade e morbidade (NUNES et al., 2011).

Diante do cenário atual de infecções como as candidíases houve um maior interesse em buscar novas estratégias terapêuticas eficientes, tendo em vista que os antifúngicos sistêmicos convencionais podem ocasionar alguns efeitos adversos graves, como a hepato e a nefro-toxicidade, interações medicamentosas e possuem um esquema terapêutico de longo prazo, os quais exigem maiores orçamentos e cuidados de saúde específicos, comprometendo ainda mais as medidas terapêuticas clínicas utilizadas, além da resistência antifúngica atribuída (STRAKHOVSKAYA et al., 2002).

Ante as dificuldades relacionadas à utilização de antifúngicos convencionais e à resistência antifúngica associada, a terapia fotodinâmica (do inglês *photodynamic therapy*, “PDT”) tem sido sugerida como um método alternativo na inativação de *Candida spp.* (CARMELLO, 2015).

Assim, é urgente a necessidade de novas alternativas terapêuticas seguras e satisfatórias no tratamento das infecções por *Candida*. Sendo a Terapia Fotodinâmica uma promissora terapia que combina luz, substância fotossensibilizadora e oxigênio molecular, que juntos promovem a morte de células a partir de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, por exemplo, tóxicas para microrganismos (ALVES, 2017).

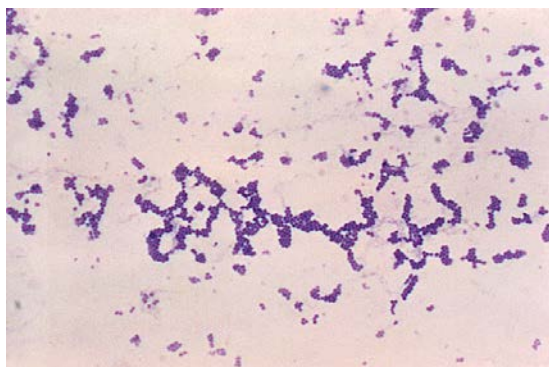
2.3 GÊNERO *Staphylococcus spp.*

O gênero *Staphylococcus* dispõe de 54 espécies de bactérias, das quais 17 podem ser isolados de amostras biológicas de seres humanos e são potencialmente patogênicas. Espécies deste gênero compõem parte da microbiota endógena da pele e membranas mucosas humanas, especialmente a nasal, desenvolvendo uma relação comensal com seu hospedeiro (DE FREIRAS et al., 2004).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* apresentam-se como cocos c medindo de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, Gram positivos e catalase positivos, sendo a espécie *Staphylococcus aureus* microrganismos oportunistas de maior importância médica. Decerto é a espécie de maior relevância médica devido à magnitude das infecções que pode causar, liderando todas as estatísticas tanto de infecções quanto de complicações e morbimortalidade (TONG et al., 201; BLOMFELDT et al., 2016).

Morfológicamente, se apresentam aos pares, isolados ou como um cacho de uvas (do grego *estaphyle* = cachos de uva) (FIGURA 2) à microscopia óptica por conta da sua divisão celular que ocorre em três planos perpendiculares. Em sua maioria são aeróbicos podendo ser anaeróbicos facultativos. Diferencia-se de outras espécies do gênero *Staphylococcus spp.* por apresentar um pigmento dourado em suas colônias, e por apresentarem resultado positivo para o teste coagulase (TONG et al., 2015).

Figura 2 - Fotomicrografia de *Staphylococcus aureus* sob uma ampliação de 250X.



Fonte: Centers for disease control and prevention's public health image library.

A parede celular dessas bactérias é formada por peptídeoglicano, uma característica comum às bactérias-Gram positivas. Esta substância possui atividade análoga á endotoxina, estimulando a produção de pirógenos endógenos, ativando o sistema complemento e estimulando a síntese de interleucina pelos monócitos e a agregação de leucócitos polimorfonucleares (processo responsável pela formação de abscessos, típicos em infecções de pele por este patógeno) (RODRIGUES et al., 2012).

Essas bactérias possuem uma cápsula de polissacarídeo que envolve a camada mais externa da parede celular que pode inibir as defesas do hospedeiro, inibindo o processo de fagocitose por leucócitos, contribuindo para a invasão dos tecidos e da corrente sanguínea, a partir de um foco periférico (MURRAY et al., 2015).

Apesar de ser encontrado na microbiota normal de seres humanos, fazendo parte da microbiota da pele e da mucosa em humanos, contudo, pode tornar-se patogênico ao invadir os tecidos através do rompimento da barreira cutânea em decorrência de traumas, queimaduras, inoculação acidental por agulhas ou implantação de dispositivos médicos (TEIXEIRA et al., 2005).

Staphylococcus spp. apresentam estratégias anti-ímunes para superar a imunidade inata e a adquirida, tendo um papel crítico na sua patogenicidade, apresentando resistência elevada mundialmente (VERBOON-MACIOLEK et al., 2006).

Ele consegue sobreviver em ambientes hospitalares e também é encontrado em diversos locais de circulação humana, podendo ser facilmente transferido desses locais para novos hospedeiros, por meio de contato interpessoal direto (transmissão direta) e também por meio de objetos contaminados (transmissão indireta) (OLIVEIRA et al., 2016; STROMMINGER, et al., 2018).

2.4 INFECÇÕES POR *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é o patógeno mais importante do gênero e pode ser isolado da microbiota normal da pele do ser humano e outros animais (MURRAY et al., 2015).

É considerado altamente patogênico, conquanto integre a microbiota da maioria dos indivíduos saudáveis, sendo isolado em diversos sítios anatômicos. É um dos agentes virulentos predominantes e pode ocasionar variados quadros clínicos infecciosos que se manifestam com variadas sintomatologias, que vão de infecções localizadas até quadros sistêmicos (COSTA, 2013; MARCHANT et al., 2013).

Esta é uma das espécies bacterianas mais comumente isolada e pode ser encontrada em até 15% na pele (MURRAY et al., 2015) e 30% na nasofaringe de indivíduos saudáveis (ALSULAMI et al., 2017).

Em relação à morfologia do *S. aureus*, externamente a maioria das cepas apresenta o fator de coagulação, coagulase ligada, que é um importante fator de virulência desta espécie, sendo detectada em testes laboratoriais que são utilizados para identificação desta espécie (coagulase positiva) (MURRAY et al., 2015).

Encontra-se frequentemente colonizando pele e mucosas, o que possibilita a facilidade de penetrar e infiltrar na cadeia de alimentos, possuindo alta transmissibilidade entre pessoas, animais e alimentos (BAPTISTÃO, 2014).

É o segundo patógeno causador de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, resultado da sua capacidade de produção de enterotoxinas, sendo a Enterotoxina-A a mais frequente (DE MIRANDA et al., 2014).

É também apontado como uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais e infecções comunitárias, as quais estão associadas a elevados índices de morbidade e mortalidade (GELATTI et al., 2009). É responsável por cerca 45% das toxinfecções em todo o mundo (CUNHA et al., 2002) e é um dos principais agentes de Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), sendo grande parte dessas infecções superficiais como os abscessos cutâneos e infecções de feridas, porém também são agentes etiológicos de infecções sistêmicas, com bacteremia, endocardite e pneumonia (TEIXEIRA et al., 2005; LIMA et al., 2018).

S. aureus é o principal agente etiológico de doenças de pele, respiratórias, de ossos, articulações e doenças endovasculares e a maioria dessas doenças ocorre em indivíduos com múltiplos fatores de risco para a infecção (CORREAL et al., 2013).

Embora exista uma diversidade nos quadros clínicos oriundos das infecções por *S. aureus*, estes podem ser divididos em três principais tipos: infecções superficiais, tais como: abscessos cutâneos e as infecções de feridas; infecções sistêmicas, tais como: osteomielite, miosite tropical, endocardite, pneumonia e septicemia; e os quadros tóxicos, tais como: síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada, fístula carótido-cavernosa após bacteremia por *S. aureus* e a intoxicação alimentar (DAMASCO et al., 2012).

O *S. aureus* é um desafio para profissionais da saúde, devido aos fatores de virulência, a sua alta frequência nas infecções no ambiente hospitalar e ao seu espectro de resistência aos mais variados antibióticos atualmente utilizados (CARVALHO et al., 2016).

É uma das espécies mais resistentes não formadoras de esporos, ele pode sobreviver a grandes períodos sob objetos inanimados secos e em qualquer sítio anatômico do corpo humano, podendo ser também termo-resistente. Ocasionalmente ainda doenças mais frequentes e mais variadas do que qualquer outro patógeno humano (TALLY e BARG, 2002).

Essa bactéria sintetiza e secreta diversas exotoxinas, como os polipeptídeos. Tais como as toxinas formadoras de poros (alfa-hemolisina, beta-hemolisina, gama-hemolisina, leucocidina Pantón Valentine, e modulinas fenol solúveis) que têm a capacidade de lesionar a membrana plasmática de células do hospedeiro (VANDENESCH et al., 2012).

Além das exotoxinas esse microrganismo possui diversos fatores de virulência que incluem a secreção de toxinas citolíticas como: leucocidinas, alfa-toxinas e modulinas fenol-solúveis hemolisinas que têm sido associadas à gravidade das infecções, e os superantígenos que, podem interferir com quase todos os mecanismos da resposta imune do hospedeiro, e enzimas, que propiciam ao *S. aureus* escapar do sistema de defesas do hospedeiro. Sendo assim, as toxinas são notadamente os mais relevantes determinantes de virulência e agressividade dessas bactérias (DELEO et al., 2009).

Algumas infecções provocadas por *S. aureus* são ocasionadas pelas toxinas produzidas por este patógeno, como exemplo a síndrome do choque tóxico associada à Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) e à síndrome da pele escaldada associada à produção de toxinas esfoliatinas (IWATSUKI, 2006).

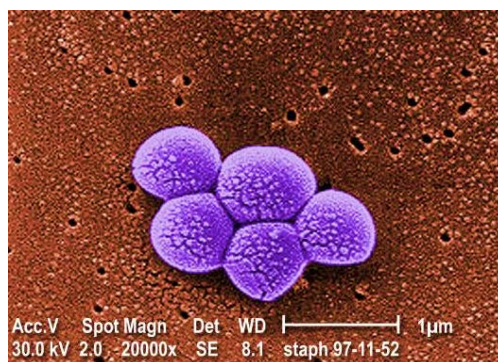
Diversos determinantes de virulência e resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* estão relacionados com elementos genéticos móveis, como também a transferência de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos e a transferência entre espécies (NOVICK, SCHLIEVERT e RUZIN, 2001).

S. aureus é uma das principais causas de morte em IRAS, especialmente em imunocomprometidos. O que se deve ao fato desse micro-organismo desenvolver fatores de

virulência que promovem a sua entrada, colonização, persistência no hospedeiro, disseminação e evasão das defesas imunológicas (RIBOLI et al., 2018).

O antibiótico convencionalmente utilizado no tratamento de infecções por *S. aureus* é a meticilina, no entanto, algumas cepas são resistentes a esta droga, essas cepas são chamadas de: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (FIGURA 3). A ocorrência de *S. aureus* e MRSA varia de acordo com o país e população estudada. O que representou um problema clinicamente grave, pois o antimicrobiano utilizado para o controle de tais infecções tornou-se ineficaz (KLINGENBERG et al., 2007).

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura colorida de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Sob uma ampliação de 20 mil X.



Fonte: Centers for disease control and prevention's public health image library.

Tal resistência é mediada pela síntese da proteína ligadora de penicilina (PBP) suplementar (PBP 2' ou PBP 2a), que apresenta baixa afinidade às penicilinas semissintéticas, como a meticilina (ALCARÁZ et al., 2003).

Winter et al. (2013) relatou em seu estudo que 58% dos pacientes internados na UTI do Hospital das Clínicas de Porto Alegre/Brasil e infectados por bactérias multirresistentes foram ao óbito após quatro semanas do início da infecção. Micro-organismos resistentes aos antibióticos progressivamente estão mais emergentes, (SHARMA et al., 2011; WINTER et al., 2013), demonstrando assim, a urgência em novas abordagens terapêuticas.

O desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos antibióticos e antifúngicos favorecem substancialmente para as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. Os patógenos encontram nos pacientes internados um ambiente extramamnete fácil para sua multiplicação e desenvolvimento de seus mecanismos de virulência e resistência (IZADPANA e KHALILI, 2015).

Nas últimas décadas houve um aumento de casos de infecções por MRSA, podendo provocar morbidade grave, como por exemplo: pneumonia, abscesso cerebral e septicemia

(TONG et al., 2015; LINARDI et al., 2017) e, segundo BOUCHER e COREY, 2008, os MRSA são responsáveis por aproximadamente 19 mil óbitos anualmente.

Relacionado aos elevados índices de infecções pelo patógeno em questão, encontra-se atribuída à expressão de um refinado sistema de defesa que imprime, entre outros fatores, resistência até mesmo aos fármacos de última geração mais eficazes (CARVALHO et al., 2016). Haja vista, esse quadro extremamente preocupante para os serviços de saúde, é necessário o estudo de novas estratégias terapêuticas para combater este microrganismo.

Devido a essa crescente ocorrência de de infecções por *S. aureus*, é crucial o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas não tradicionais que sejam não invasivos e não tóxicos aos hospedeiros, mas eficientes e de ação rápida, evitando o desenvolvimento de resistência para o tratamento de infecções por este patógeno. MONTEIRO et al. (2017) e PÉREZ-LAGUNA et al. (2017) mostraram em seus estudos como a inativação fotodinâmica antimicrobiana é uma potencial alternativa terapêutica.

2.5 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

A Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana é uma modalidade terapêutica utilizada para tratar tumores e infecções, que associa uma substância fotossensível, ativada por luz em comprimento de onda específico (usualmente LED ou laser) (DAVIES et al., 2017). Ela pode ser definida também como processo fotoquímico utilizado com a finalidade de destruir seletivamente células e tecidos (WEBBER, et al., 2014).

Usado em diversas áreas, o efeito fotodinâmico pode ser utilizado na remoção de contaminantes ambientais, para descontaminar alimentos, na terapia contra o câncer, doenças reumáticas, degeneração macular da retina, psoríase, arteriosclerose, doenças virais (herpes), inativação viral, em tratamentos orais, doenças bacterianas, micoses, tratamentos odontológicos e dermatológicos, como o tratamento contra a acne (MEDEIROS et al., 2018);

Também vem sendo bastante estudado para o tratamento de infecções de etiologia bacteriana e fúngica, localizadas, como infecções superficiais na pele e cavidade oral (HAMBLIN; HASAN, 2004) e/ou sistêmicas (SILVA, 2007), periodontites (TEICHERT et al., 2002), parasitologia (ALOUINI; JEMLI, 2001) nos bancos de sangue e hemoderivados na inativação de patógenos (BESSELINK, 2003).

O mecanismo de ação da Inativação Fotodinâmica se inicia quando o fotossensibilizador absorve os fótons de uma dada fonte de luz que emite um comprimento de

onda ressonante à banda de absorção do fotossensibilizador. Só após a absorção de luz o FS passa do estado fundamental ao estado excitado de energia (TRINDADE et al., 2015).

Essa modalidade de tratamento de doenças é histórica. O uso de Terapia Fotodinâmica teve início há aproximadamente mais de 4.000 anos, quando os povos egípcios faziam a ingestão de plantas contendo psoralenos (fotossensibilizantes e estimulantes da produção de melanina) e se expunham à luz solar para tratar doenças dermatológicas, especialmente o vitiligo (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Estudos científicos surgiram em meados de 1900 com os experimentos do pesquisador Oscar Raab e seu orientador Hermann von Tappeiner em Munique, quando aconteceu a primeira demonstração de fotossensibilização letal de células (ACKROYD et al., 2001). Eles verificaram que na exposição à luz do dia, era obtida a inativação de microrganismos, levando-os rapidamente à morte. Observaram também que com o uso do agente fotossensibilizador, o corante acridina, no escuro, sem a iluminação natural do dia, não foi apresentada nenhuma ação sobre o protozoário *Paramecium caudatum*, concluindo assim que havia relação entre o uso do corante com a exposição à luz (KESSEL, 2004).

A atenção a essa nova modalidade foi reforçada com a disseminação do HIV/AIDS e o aumento do número de infecções hospitalares e resistência microbiana aos agentes terapêuticos convencionais da indústria farmacêutica. Foi a partir de meados dos anos 80 que esta tecnologia teve maior desenvolvimento, especialmente nas ciências médicas (MAISCH, 2007).

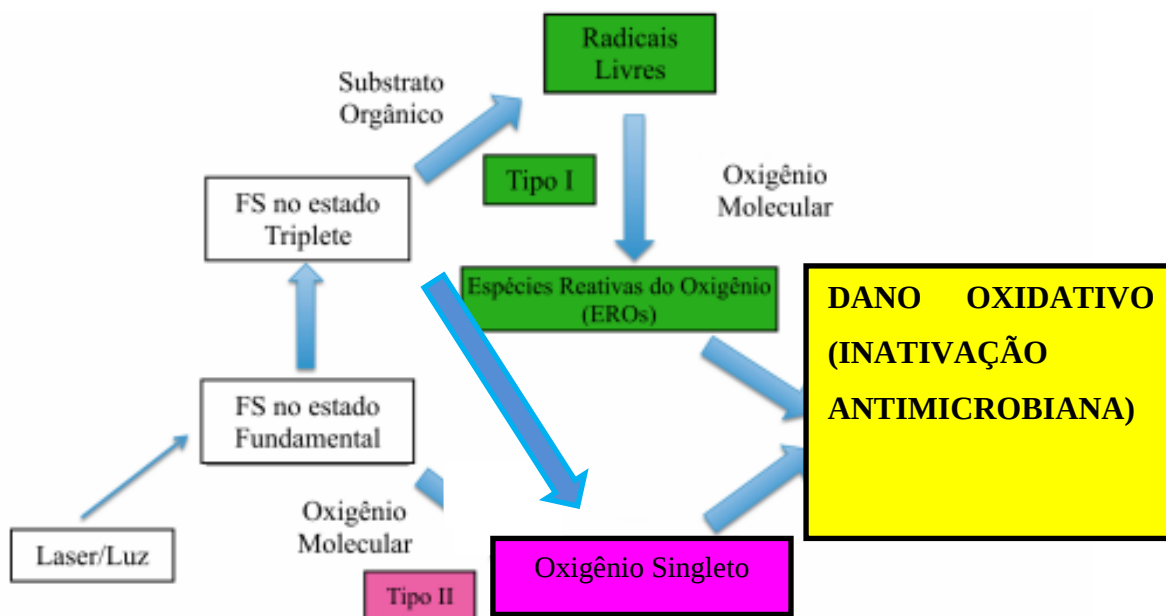
Ainda no século XX, Hermann von Tappeiner deu continuidade aos estudos e associou a presença do oxigênio para que ocorresse a reação, criando o termo Terapia Fotodinâmica (TFD) (WEBBER, 2009). Aproximadamente vinte anos depois, Policard publicou as primeiras observações clínicas de TFD (PERUSSI, 2007).

Historicamente, lâmpadas convencionais que emitem luz branca eram utilizadas em processo de TFD. Posteriormente foram empregados LASERs e LEDs como fontes luminosas. Os LEDs são diodos que emitem luz que apresentam um largo espectro de luz (entre 20 e 40 nm) e são relativamente baratos (MARINHO, 2006).

O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na excitação do FS pela luz no comprimento de onda ressonante, resultando em processos fotoquímicos que geram, produtos tóxicos (PRATES et al., 2010; OLIVEIRA, et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2016) por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I), ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II). O oxigênio excitado, também chamado de oxigênio singleto, é altamente reativo, podendo induzir a morte celular, inclusive de microrganismos como

leveduras e bactérias (FIGURA 4) (CORBI, 2017). A figura 4 apresenta os mecanismos associados à Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana.

Figura 4 - Mecanismo Fotoquímico da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana.



Fonte: Adaptado de Corbi, 2017 .

A ativação do cromóforo ou fotossensibilizador, quando incorporado a um sistema biológico irradiado, produz efeitos que não são induzidos sem a presença de luz. Assim, formam-se várias Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ou, do inglês, “Reactive Oxygen Species” (ROS), como íons peróxidos, radicais superóxidos, radicais hidroxilas e oxigênio singleto que possuem reatividade não específica com moléculas orgânicas, ocasionando a morte das células alvo. As liberações dessas espécies químicas altamente reativas, promovem o efeito citotóxico da técnica sobre as células-alvo. Com isso, os altos níveis de estresse oxidativo gerados irão inviabilizar células e microrganismos, ativando o processo de necrose (morte celular) e apoptose (morte programada) envolvendo caspases e liberação de citocromo C e autofagia celular (DE SOUSA, 2014; MAJEWSKI et al., 2015).

O oxigênio singleto interage com praticamente todos os componentes celulares, dado que os compostos orgânicos insaturados são, em sua grande maioria, sensíveis à ação do oxigênio singleto. O primeiro contato com a célula do oxigênio singleto se dá na membrana celular, formada por lipídeos insaturados que poderão ser lesados, inativando a célula. Visto

que a reatividade das ROS com moléculas orgânicas é inespecífica, qualquer macromolécula intracelular poderá ser um alvo em potencial para Inativação Fotodinâmica. Desta maneira, a pluridade de alvos torna mais laborioso para as células desenvolverem resistência celular, tornando-se uma das vantagens da fotossensibilização, além da inviabilidade ou inativação celular (CARRE et al., 1999; PERUSSI, 2007).

O uso do processo de TFD na destruição de microrganismo é conhecido como Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) ou Quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica (do inglês Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy, PACT) ou ainda, Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês Photodynamic Inactivation, PDI) (ARANTES, 2015).

O mecanismo da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana se dá a partir dos produtos oxidativos que são formados e que irão interagir em regiões intracelulares dos microrganismos, rompendo a membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade celular, o que danifica irreversivelmente estruturas intracelulares e compromete a virulência das células tratadas (CARVALHO, M. J. et al., 2018).

A morte celular pode acontecer por: danos à membrana plasmática, inativação de proteínas, liberação de enzimas lisossomais em consequência da lise da membrana lipossomal, danos às moléculas de DNA e inibição do metabolismo energético e também por lesões irreversíveis nas mitocôndrias (GARCEZ et al., 2015).

Alguns fatores são de suma importância para a extensão do processo de reação foto-oxidação na TFD, como por exemplo: o tipo, a dose e a intensidade da luz e a preparação e aplicação do fotossensibilizante (DE SOUSA, 2014).

Há relatos do emprego da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana contra a *C. albicans* utilizando luz LED azul, vermelha e verde associadas com azul de metileno e azul de toluidina (CARVALHO et al., 2018; DA SILVA et al., 2018).

Segundo Corbi (2017) diversos estudos apontam que bactérias são susceptíveis à Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana, que tem demonstrado ser efetiva tanto *in vitro* como em *in vivo* contra bactérias e fungos em cultura planctônica como em biofilmes, inclusive frente a cepas resistentes aos fármacos convencionais (FLOREZ, 2012; TEIXEIRA et al., 2012).

Ainda existem controvérsias nos resultados da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (VAZIRI et al., 2012), sugerindo assim, novos estudos. Resultados recentes apontam para uma relação entre a sensibilidade do microrganismo em questão, o tipo de FS

usado, a potência do LED, o tempo de incubação do microrganismo com o FS e o tempo de irradiação (ALVES, 2016).

A Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana apresenta muitas vantagens se comparada às técnicas convencionais antimicrobianas, como: não sendo necessárias doses de manutenção; redução de efeitos colaterais; eliminação total dos microrganismos, diminuindo assim as reincidivas (DE OLIVEIRA MIMA, et al., 2010) e improvável desenvolvimento de resistência ao tratamento por parte dos microrganismos, independentemente de a cepa ser ou não resistente a um ou mais antimicrobianos (PERUSSI, 2007) além de apresentar bons resultados *in vitro* contra um grande número de patógenos, inclusive microrganismos resistentes a antimicrobianos (HSIEH, Yi-HSUAN et al., 2019).

Assim, com a problemática da resistência antimicrobiana aos tratamentos convencionais, a TFDa apresenta-se como um método alternativo para a inativação de microrganismos patogênicos, surgindo como importante escolha a ser usada no controle de cepas resistentes aos antifúngicos e antibióticos utilizados na prática clínica (ZOLFAGHARI et al., 2009; GARCIA, 2018).

2.6 FOTSENSIBILIZADORES

Fotossensibilizadores são compostos químicos que podem ter origem orgânica ou sintética. Eles absorvem luz e transferem energia ao oxigênio e a outras moléculas, como resultado, induzem a geração de substâncias demasiadamente reativas e de tempo de vida curto, que interagem com os sistemas biológicos, acarretando em prejuízos aos tecidos (GARCEZ, 2002).

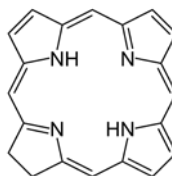
Para ser considerado um FS vantajoso ele deverá ter baixo custo, apresentar bandas de absorção na região compreendida entre 600- 750 nm, viabilidade comercial, foto-estabilidade, alta solubilidade em água ou em derivados do sangue, alta produção de oxigênio singleto e baixos níveis de efeitos colaterais ou baixa citotoxicidade (FLOREZ, 2012).

A localização celular do FS depende do seu tipo químico, peso molecular, características lipofílicas e anfifílicas, da carga iônica, tempo de incubação, concentrações séricas e tipo da célula-alvo. Essas características interferem na eficácia do FS (CHREPA et al., 2014).

Os fotossensibilizadores antimicrobianos podem ser divididos em três grupos: 1) aqueles que se ligam fortemente e penetram nos organismos, como a clorina (FIGURA 5); 2) os que estão ligados fracamente, como o azul de toluidina (FIGURA 6) e o azul de metileno

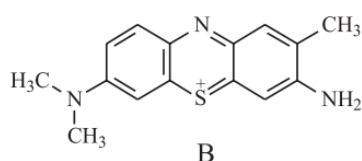
(FIGURA 7); 3) aqueles que não demonstram ligação, como a riboflavina (FIGURA 8) (PERUSSI, 2007).

Figura 5 - Estrutura molecular da Clorina.



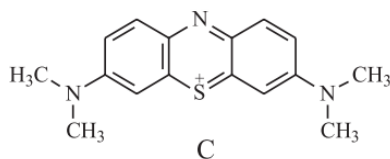
Fonte: Wikipédia.

Figura 6 - Estrutura molecular do Azul de toluidina.



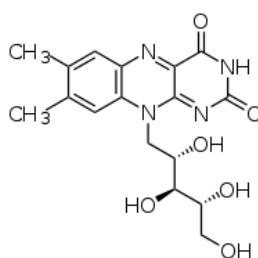
Fonte: Perussi, 2007.

Figura 7 - Estrutura molecular do Azul de metileno.



Fonte: Perussi, 2007.

Figura 8 - Estrutura molecular da Riboflavina.



Fonte: Wikipédia.

Segundo Prussi (2007) os principais fotossensibilizadores são: as Porfirinas (derivados de hematoporfirina, heterociclos aromáticos), as Clorinas (porfirinas reduzidas), o Ácido 5-aminolevulínico (ALA), as Ftalocianinas (compostos aromáticos derivados de porfirinas), Fenotiazínicos (são corantes que exibem intensa absorção de 600- 660 nm), Riboflavina, Hipericina (Vitamina B2), e os Xantenos (compostos cíclicos com três anéis aromáticos).

Para que haja sucesso na Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana é necessário se levar em consideração alguns pontos importantes, como a concentração do FS utilizada. Ele deve ser usado em uma concentração não tóxica, que é aquela que não produz dano sem que haja a ativação pela fonte de luz. E essa concentração não toxica varia de FS para FS. Outro ponto relevante é a interação entre o FS e o substrato. O fotossensibilizador deve estar próximo ao alvo para que haja sucesso na terapia, para que tenha a formação de EROS no local desejado. (RIBEIRO et al., 2005).

Além disso, o tempo de pré-irradiação, também conhecido como tempo de incubação do FS e o substrato, ou seja, tempo entre a adição do fotossensibilizador no alvo e sua ativação pela irradiação. Sendo os tempos utilizados na Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana da ordem de 1 a 10 minutos (RIBEIRO et al., 2005).

2.6.1 Fotosensibilizador azul de metileno

São conhecidas mais de 400 espécies de substâncias que possuem atividade fotossensibilizante. Entre eles destaca-se o Azul de Metileno (AM, ou MB do inglês: methylene blue), também denominado cloreto de metiltionínio (o cloreto de 3,7 bis ou dimetilaminofenotiazina) (WAINWRIGHT, 2005).

Desde que foi sintetizado pela primeira vez em 1876, esta molécula é utilizada em diferentes áreas, como, por exemplo, como corante e indicador nas reações de oxirredução; como medicamento de uso interno para tratar a metahemoglobinemia, doença caracterizada pela quantidade anormal no sangue de metahemoglobina, que é a forma oxidada da hemoglobina, e como antídoto nas intoxicações por cianeto e nitrato, no tratamento de carcinoma de células basais, sarcoma de Kaposi, melanoma, infecções virais e também se enquadra como desinfetante e antisséptico (WAINWRIGHT, 2005).

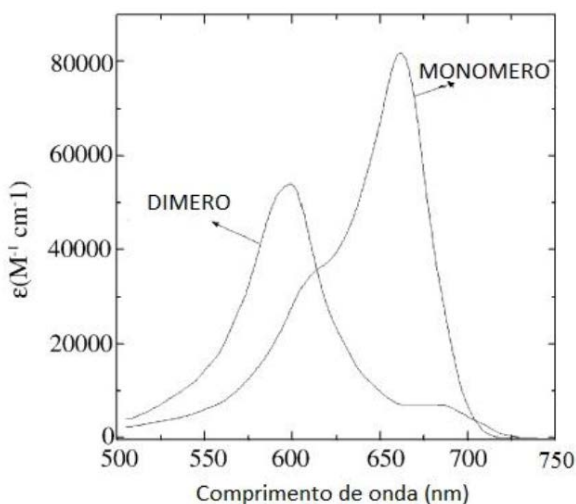
O AM é um corante catiônico em pH fisiológico que tem sido largamente utilizado desde o final do século XIX em estudos biomédicos que incluíam desinfecção de sangue, tratamento de enfermidades como a malária, esquizofrenia e cancro, sendo a mais recentemente, utilização no tratamento de infecções microbianas na Inativação Fotodinâmica (WAINWRIGHT, 2005).

Ele pertence à classe das fenotiazinas, que desempenham relevante papel na microbiologia, farmacologia e histologia (TEICHERT *et al.*, 2002). Sua fórmula molecular é $C_{16}H_{18}ClN_3S$ e são compostos tricíclicos planos, anfífilos que possuem afinidade pelas membranas celulares em razão da sua lipofilicidade (YAMADA, 2007).

É considerado um bom FS por conta do seu comprimento de absorção máximo ser na faixa do vermelho, em torno de 660 nm, por possuir boa penetração relativa na pele, por sua comprovada ação contra bactérias, e por sua disponibilidade e baixa toxicidade (LONGO; AZEVEDO, 2017) e pela sua eficácia de geração de oxigênio singlete, em torno de 50%. Outra vantagem para o uso do AM como fotossensibilizador na TFD é a sua facilidade de obtenção, seu baixo custo, bem como, a possibilidade do uso de fontes de luz policromáticas (NUNEZ et al., 2013).

Seu espectro de absorção tem relação de dependência com a concentração por conta do processo de dimerização. Além do que, monômeros e dímeros de AM possuem espectros de absorção diferentes. Os monômeros apresentam absorvância máxima em torno de 664 nm e os dímeros em torno de 590 nm (Figura 9). A ação de monômeros ou dímeros resulta em diferentes tipos de produtos das reações fotoquímicas na TFD, o que pode influenciar na eficácia de inativação ou morte celular (TARDIVO et al., 2005).

Figura 9 - Espectro de absorção de espécies de monômero e dímero de azul de metileno.



Fonte: SANTOS (2016) Adaptado de TARDIVO et al. (2005).

Ambos, os dímeros e os monômeros apresentam seu papel nas reações fotoquímicas na TFD. Sendo a reação fotoquímica do monômero a que tem maior produção de oxigênio singlete (reação tipo II) e os dímeros apresentam maior rendimento para a transferência de elétrons (reações do tipo I) (SANTOS, 2016).

Um dos mecanismos de ação do AM na Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana consiste na alteração da permeabilidade da membrana plasmática (LYON et al., 2011). Alguns estudos demonstraram sua efetividade na fotoinativação microbiana (PRATES et al., 2009), e, por exemplo, seu emprego realizado nos trabalhos de COSTA et al., 2013, mostrou-se capaz

de reduzir as alterações epiteliais e a resposta inflamatória crônica na candidíase bucal induzida.

Outro exemplo da atividade do AM na Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana foi o trabalho realizado por Souza *et al.*, 2006 e de SENA, 2013 no qual foi observado efeito fungicida sobre diversas espécies de *Candida* na TFD assistida por azul de metileno. O alto rendimento quântico da geração de oxigênio singlete ($\Phi\Delta \approx 0,5$), associado à toxicidade escura relativamente baixa, ou seja, sem luz (sem iluminação), as drogas fotossensibilizadoras são minimamente tóxicas, faz do azul de metileno um bom FS (HAH *et al.*, 2011).

Atualmente, são encontrados diversos estudos demonstrando a ação da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana mediada por azul de metileno em culturas plactônicas e biofilmes de bactérias e leveduras, inclusive associado com nanopartículas (VOOS *et al.*, 2014).

No estudo de JESUS *et al.* (2018) os resultados da análise de viabilidade de células tumorais tratadas com TFD usando o azul de metileno associado à nanopartículas de ouro (AuNPs) e nanopartículas de prata (AgNPs), apontaram que as células tratadas com nanopartículas exibiram maior citotoxicidade do que as células tratadas com apenas o azul de metileno, conduzindo uma melhor eficiência do tratamento nas células tumorais. Esse efeito da citotoxicidade do FS utilizado associado a AgNPs pode estar correlacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio.

Estudos como o TAWFIK *et al.* (2015) mostraram que esse conjugado de nanopartículas de ouro-MB quando fotoativado apresentou o efeito inibitório máximo sobre a bactéria *S. aureus* graças ao aumento do efeito antibacteriano fotodinâmico do azul de metileno pela nanopartícula de ouro associada.

A associação do fotossensibilizador azul de metileno à nanopartículas metálicas como as de prata ou ouro tem sido utilizada para potencializar o efeito fotodinâmico aumentando a eficiência dessa terapia (DARABPOUR *et al.*, 2017).

2.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO

A nanotecnologia é uma ciência que tem crescido muito nas últimas décadas. O ícone da nanotecnologia, o físico norte-americano Richard Feynman introduziu em 1959, pela primeira vez o conceito de nanotecnologia no seu trabalho “There’s a plenty of Room at the Bottom” demonstrando novas possibilidades sobre a manipulação e controle de materiais numa escala muito pequena, tanto quanto a escala atômica e molecular. Com o avanço na área

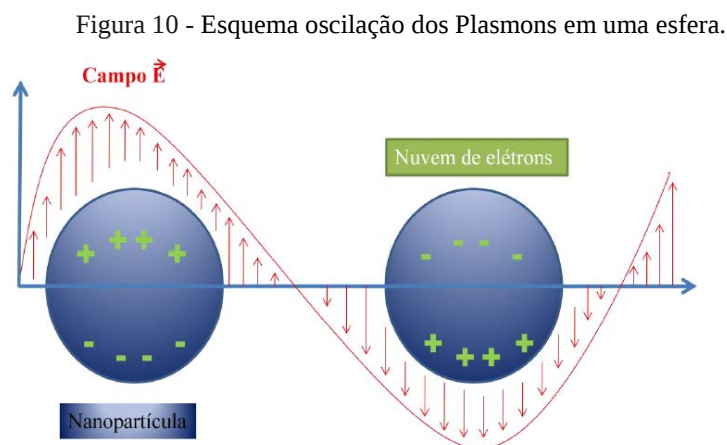
tecnológica e desenvolvimento de novos nanomateriais, têm-se descoberto novas propriedades eletrônicas, ópticas e catalíticas úteis para aplicações nanotecnológicas (SANTOS, 2011).

Contudo, interesse pelas propriedades que envolvem a interação dessas NPs com luz é algo bastante antigo. Como exemplo, os vitrais das janelas e cerâmicas de igrejas de aproximadamente dois mil anos atrás eram compostos por nanopartículas (NP) metálicas (CORREIA, 2008).

Diante do fascínio científico frente às NPs, foram realizados nos últimos anos diversos estudos referentes a ação antimicrobiana de nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de ouro ou AuNPs (ZANG *et al.*, 2008).

As nanopartículas metálicas apresentam características ópticas associadas ao fenômeno de ressonância plasmônica, que depende do diâmetro e forma das nanopartículas. Teoricamente o efeito de ressonância de plasmon pode ser verificado em todos os metais (como Au, Ag, Cu e metais alcalinos) (EL-ANSARY *et al.*, 2009). Contudo nanopartículas de Au e Ag consistem nas nanoestruturas mais estudadas na atualidade. Plasmons localizados consistem da oscilação coletiva de elétrons em nanopartículas (XIA; HALAS, 2005).

Nesta oscilação ocorre uma separação de cargas elétricas na partícula. Assim, em períodos de curto tempo, esses elétrons podem se acumular mais em determinadas regiões da partícula (RYCENGA *et al.*, 2011), como indicado na figura 10.



Fonte: SÁ (2015).

Nanopartículas metálicas são utilizadas em diversas aplicações biomédicas, como: liberação controlada de fármacos (GHOSH *et al.*, 2008), imagem ótica de células e tecidos (ECK *et al.*, 2010) e diagnóstico de patologias (BOISSELIER *et al.*, 2009), terapia por efeito fototérmico (BHATTACHARYA *et al.*, 2008). Além disto, foram realizados nos últimos anos

diversos estudos avaliando a ação antimicrobiana de nanopartículas metálicas (SHERWANI et al., 2015).

O material, que constitui as NPs e o meio em que elas estão inseridas determinam a frequência de ressonância da oscilação coletiva desses elétrons (DARABPOUR et al., 2017). Nanopartículas metálicas de ouro apresentam bandas espectrais referentes à ressonância dos plasmons na região visível do espectro eletromagnético (BUCHARSKAYA et al., 2016).

O efeito de Ressonância Localizada de Plasmons pode ser verificado nas nanopartículas metálicas, como as AuNPs, quando irradiadas. A interação das NPs com irradiação com comprimento de onda ressonante, ou seja, específico, pode induzir alterações significativas do campo eletromagnético próximo às nanopartículas metálicas (NEVES, 2015).

Em particular, na frequência de ressonância de plasmon, as NPs metálicas podem apresentar grandes seções transversais ópticas (absorção e espalhamento) se comparadas aos corantes convencionais (PAPAVASSILIOU, 1979). Plasmons provocam o aumento no campo externo próximo às NPs.

O efeito antimicrobiano pode também ser observado com a associação de nanopartículas metálicas às moléculas FS. A NP pode aumentar o campo eletromagnético percebido pelo FS, induzindo o aumento da geração de oxigênio singlete na periferia do NP/FS, fenômeno conhecido como geração de oxigênio singlete melhorado por metal (DE MELO et al., 2012.).

A combinação de NP metálicas e FS em TFD exige uma sobreposição do espectro de absorção do FS e do pico de extinção de plasmons. Nanoesferas de prata tem pico de plasmons na região azul do espectro (~ 400nm). Por sua vez, nanoesferas de ouro apresentam máxima extinção (absorção e espalhamento) em ~ 520nm (NOVOTNY; HECHT, 2006).

Ressonâncias na região vermelha e infravermelha do espectro eletromagnético podem ser obtidas com diferentes nanoestruturas (nanocascas e nanobastões). Em particular nanocascas com diâmetro de 120 nm, possuem pico de plasmon em ~660nm, região espectral semelhante ao pico de absorção do fotossensibilizador AM (NOVOTNY; HECHT, 2006).

O uso associado de nanopartículas de ouro ou prata ao fotossensibilizador azul de metileno na TFD aponta para a eficácia desse procedimento aumentada com a dose de nanopartículas e o tempo de irradiação (HAH et al., 2011; TAWFIK et al., 2015; JESUS et al., 2018).

3 OBJETIVOS

Segue abaixo os objetivos do presente estudo.

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da inativação fotodinâmica antimicrobiana associada ao Azul de Metileno (AM) assistida por nanopartículas de sílica envolvidas por casca de ouro em cepas de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização morfológica e óptica por microscopia de varredura das nanopartículas de sílica envolvidas por casca de ouro.
- Investigar a ação do azul de metileno na inativação de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.
- Analisar a atuação das nanocascas de ouro associadas ao azul de metileno na inativação de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* utilizando um LED.
- Avaliar a influência do tempo de irradiação na ação fotodinâmica em culturas de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* assistidas por nanocascas de ouro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

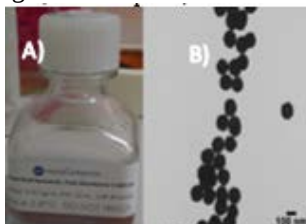
Esta pesquisa foi realizada em duas etapas. A primeira etapa, ou etapa 1, no Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens/Departamento de Eletrônica e Sistemas e no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos / Departamento de Micologia – Centro de Biociências, ambos na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Campus Recife-Pernambuco. A segunda etapa, ou etapa 2, foi executada em parceria com o Laboratório de Terapia Ótica do Centro de Lasers e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), bairro Butantã- São Paulo.

Na primeira etapa dos experimentos, realizada na UFPE, os testes de inativação antimicrobiana pela técnica de terapia fotodinâmica associada ao corante azul de metileno assistida com nanocascas de ouro foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *C. albicans* (referência da cepa: ATCC 90028) da Micoteca URM – UFPE, depositadas desde o ano de 2010. Na segunda etapa, realizada no IPEN, foram utilizadas cepas das bactérias *S. aureus* (referência da cepa: ATCC 29231). Segue abaixo a metodologia realizada no presente estudo.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCASCAS DE OURO

As nanocascas de ouro utilizadas foram adquiridas da empresa nanoComposix e consistem de um núcleo de sílica (SiO_2) coberto por uma casca de ouro. Na aquisição de nanopartículas foi selecionada a estrutura que apresentava pico de Plamon que sobrepujasse ao espectro do AM, fotossensibilizador utilizado para induzir geração de oxigênio singlete. Foi adquirido coloide de nanocascas de ouro, com concentração de massa Au (0,053 mg / mL) e estabilizador de polivinilpirrolidona (PVP). A figura 11 apresenta uma fotografia do produto adquirido e uma imagem de microscopia eletrônica (fornecida pelo fabricante).

Figura 11 - Nanocascas de ouro

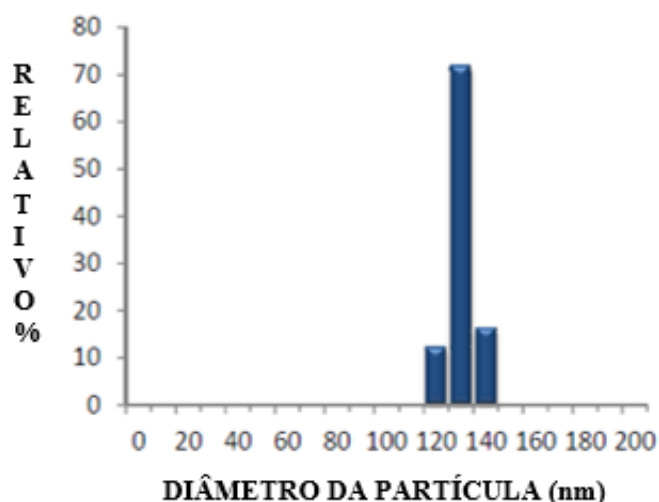


Fonte: autor.

A) nanoComposix B) 100nm.

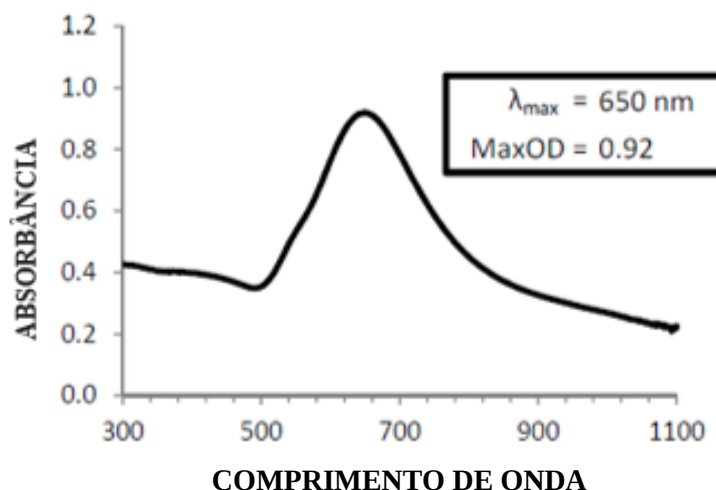
Segundo o fabricante, o tamanho médio das nanoestruturas foi de $125 \pm 5,8$ nm, como mostra a figura 12, com diâmetro do núcleo $82,6 \pm 4,7$ nm e espessura das cascas de ouro de 21,5 nm, com concentração de partículas de 3.7×10^9 partículas/mL e com pico de absorção em 650 nm como pode ser observado na figura 13.

Figura 12 - Distribuição de tamanho das nanocascas de ouro.



Fonte: nanoComposix.

Figura 13 - Propriedades ópticas das nanocascas de ouro.



Fonte: nanoComposix.

Para a aferição das estruturas adquiridas imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanocascas de ouro foram obtidas usando o microscópio MIRA 3 TESCAN com 20 kV, disponível no Departamento de Física da UFPE. Para a realização das imagens, as nanocascas de ouro foram dispersas em substratos de silício.

Espectros de extinção das amostras foram obtidos usando um espectrofotômetro Ocean Optics (HR +4000).

4.2 PROCESSAMENTO DAS NANOCASCAS DE OURO

As concentrações utilizadas da suspensão das nanocascas de ouro (AuNPs) nos experimentos realizados na UFPE foram de 0,1 e 1 μM . para *C. albicans* (10 μL das nanocascas de ouro/ grupo) e deixado por 10 minutos de incubação às células em temperatura ambiente.

Nos experimentos realizados no IPEN utilizou-se a concentração 30 $\mu\text{g/ mL}$ para *S. aureus* (120 μL das nanocascas de ouro /poço) e também deixado por 10 minutos de incubação às células em temperatura ambiente.

4.3 PROCESSAMENTO DA SOLUÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

O azul de metileno obtido da Merck foi utilizado como fotossensibilizador para induzir geração de oxigênio singleto. A solução aquosa de azul de metileno (FIGURA 14) foi preparada com água destilada estéril, nos testes realizados na UFPE, e com PBS estéril, nos testes realizados no IPEN, em concentrações variadas, e filtrada em uma membrana estéril (0,22 μm , Milipore, São Paulo, Brasil).

Figura 14 - Alíquota da solução de azul de metileno.



Fonte: A Autora (2017).

Nos experimentos realizados na UFPE com *Candida albicans* (ATCC 90028), a solução de azul de metileno utilizada foi de 10 μM (solução mãe). Adicionando-se a cada grupo tratado com AM 10 μL desta solução, obtendo-se uma concentração final de 0,5 μM .

Para os ensaios realizados no IPEN foi feita a concentração de azul de metileno 80 μM (solução mãe) e foi adicionando 10 μL do AM nos testes feitos com *S. aureus* (ATCC 29231), obtendo-se a concentração de 4 μM de azul de metileno.

Na etapa realizada na UFPE e no IPEN se adotou o tempo de incubação ou Tempo Pré-Irradiação (PIT, do inglês *pré irradiation time*) de 10 minutos, como admitido no trabalho de Cabral (2017), em temperatura ambiente. Sendo o PIT o tempo no qual o fotossensibilizador é administrado ou inoculado protegido da luz, até o momento da irradiação para internalização do corante às células dos micro-organismos testados.

4.4 PRIMEIRA ETAPA- *Candida albicans* (ATCC 90028)

A primeira etapa foi realizada na UFPE.

- **PREPARAÇÃO DO INÓCULO**

Na primeira etapa foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028). Estas foram subcultivadas aerobicamente em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (União Química, São Paulo, Brasil) (preparado conforme instrução do fabricante) overnight a 37°C, conforme recomendado no Manual de Microbiologia Clínica (SHADOMY *et al.*, 1985).

O preparado do meio ASD contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol (meio seletivo para fungos) foi usado nas sementeiras das placas de Petri após procedimentos experimentais envolvendo as culturas de *Candida*. Após dissolução completa do meio de cultura, o béquer contendo a mistura foi levado à autoclave vertical (PRISMATEC) para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, ainda na fase líquida, cerca de 20 mL do meio foi vertido em placas de Petri estéreis descartáveis, mantendo proximidade de 10 cm da chama do bico de Bunsen.

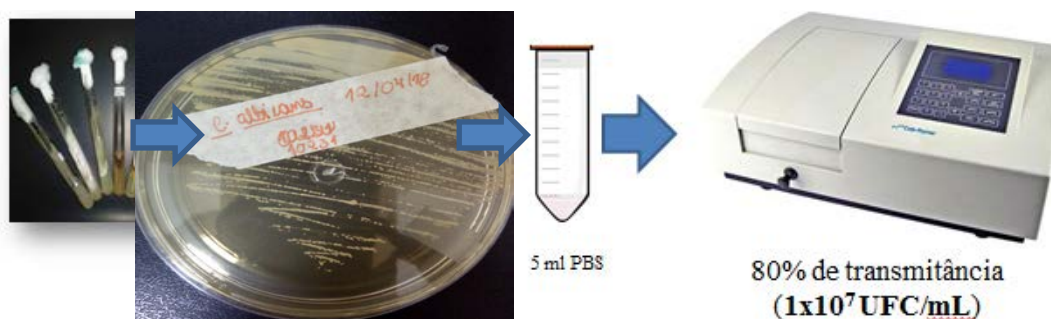
As placas de Petri foram individualmente fechadas e mantidas em temperatura ambiente até a completa solidificação do meio de cultura. Após a solidificação, todas as placas de Petri foram devidamente identificadas e datadas. As células de *Candida albicans* foram subcultivadas a partir de frascos estoques em Agar Sabouraud Dextrose – ASD sob condições aeróbicas a 37°C.

Após 24 h de incubação, uma amostra de colônias puras foi removida da superfície do ágar da placa e suspensas em solução salina tamponada estéril a 0,85 % em pH aproximado de

7,2. A partir dessa suspensão foi realizada a padronização do inóculo com o auxílio do padrão 0,5 da escala de MacFarland (Padrão de turbidez) em espectrofotômetro. Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 1990; NCCLS, 2002).

A turbidez da suspensão celular foi medida em espectrofotômetro (BIOSPECTRO) sob irradiação de $\lambda=530$ nm e a transmitância ajustada para 80%, que resultou em uma concentração de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL, como ilustrado na figura 15.

Figura 15 - Etapas de preparo do inóculo.



Fonte: A Autora (2017).

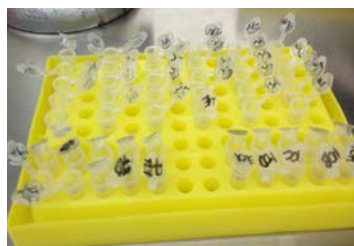
• INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Na primeira etapa os ensaios foram realizados nos Laboratório de Micologia Médica e Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens, ambos na UFPE/PE.

Os experimentos iniciais da aplicação da TFDa nos grupos experimentais compostos por suspensões de *Candida albicans* (ATCC 90028) as amostras foram dispensadas nos minitubos Eppendorfs (180 μ L/tubo) (FIGURA 16) contendo 10^7 UFC/ML.

Em seguida, adicionou-se 10 μ L da solução de azul de metileno na concentração de 10 μ M e 10 μ L de PBS 0,85%, resultando no volume final de 200 μ L e manteve sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos (PIT) para internalização do AM nas células fúngicas antes do procedimento de irradiação dos grupos.

Figura 16 - Mini-Eppendorfs (200 µL) utilizados para a TFDa.



Fonte: A Autora (2017).

O mesmo procedimento foi feito para os grupos tratados apenas com as nanocascas de ouro nas concentrações-mãe de 0,1 (5 µM concentração final/ eppendorf) e 1 µM (50 µM concentração final/ Eppendorf).

Para os grupos tratados exclusivamente com as nanocascas de ouro nas concentrações-mãe de 0,1 (5 µM concentração final/ eppendorf) e 1 µM (50 µM concentração final/ Eppendorf) ou tratados exclusivamente com o FS azul de metileno 10 µM foram realizados 3 grupos experimentais:

- **Grupo 1:** azul de metileno 10 µM (concentração final de 0,5 µM por tubo).
- **Gupo 2:** nanocasca de ouro 0,1 µM (concentração final de 0,5 µM por tubo).
- **Grupo 3:** nanocasca de ouro 1,0 µM (concentração final de 50 µM por tubo).

Para tais grupos foi adicionado a cada mini-tubo 180 µL da suspensão fúngica e em seguida adicionado 10 µl da solução de AM (10 µM) ou 10 µl das nanocascas de ouro (0,1 ou 1 µM) resultando no volume final de 200 µl, mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos antes do procedimento de irradiação dos grupos (PIT) (TABELA 1).

Tabela 1 - Grupos experimentais da primeira etapa (azul de metileno 10 µM e nanocascas (0,1 µM e 1,0 µM).

Grupos	Grupo 1 (AM 10 µM)	Grupo 2 (Nanocasca de ouro 0,1 µM)	Grupo 3 (Nanocasca de ouro 1,0 µM)
INÓCULO	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 µL)	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 µL)	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 µL)
AZUL DE METILENO	10 µL (concentração final 0,5 µM)	-	-
SOLVENTE (PBS 0,85 %)	10 µL	10 µL	10 µL
NANOCASCA DE OURO	-	10 µL (5 µM concentração final)	10 µL (50 µM concentração final)
PIT	10 min	10 min	10 min

Fonte: A Autora (2017).

Para os grupos tratados com as nanocascas de ouro nas concentrações-mãe de 0,1 (5 μM concentração final/ eppendorf) e 1 μM (50 μM concentração final/ Eppendorf) associadas ao fotossensibilizador azul de metileno 10 μM foram realizados 2 grupos experimentais:

- **Grupo 4:** azul de metileno 10 μM (concentração final 0,5 μM) associado às nanocasca de ouro 0,1 μM (concentração final de 0,5 μM por tubo).
- **Gupo 5:** azul de metileno 10 μM (concentração final 0,5 μM) associado às nanocasca de ouro 1,0 μM (concentração final de 50 μM por tubo).

Para tais grupos foi adicionado a cada mini-tubo 180 μL da suspensão fúngica e em seguida adicionado 10 μl da solução de AM (10 μM) mais 10 μl das nanocascas de ouro (0,1 ou 1 μM) resultando no volume final de 200 μl , mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos antes do procedimento de irradiação dos grupos (PIT) (TABELA 2).

Tabela 2 - Grupos experimentais da primeira etapa (azul de metileno 10 μM e nanocascas (0,1 μM e 1,0 μM) associados.

Grupos	Grupo 4 (AM 10 μM + Nanocasca de ouro 0,1 μM)	Grupo 5 (AM 10 μM + Nanocasca de ouro 1,0 μM)
INÓCULO	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 μL)	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 μL)
AZUL DE METILENO	10 μL (concentração final 0,5 μM)	10 μL (concentração final 0,5 μM)
SOLVENTE (PBS 0,85 %)	-	-
NANOCASCA DE OURO	10 μL (0,5 μM concentração final)	10 μL (50 μM concentração final)
PIT	10 min	10 min

Fonte: A Autora (2017).

Para o grupo que não recebeu nenhum tratamento, no qual não foi adicionado nanocascas e/ou AM e foram apenas irradiados, usou-se 180 μL da suspensão do fungo por mini-tubo e 20 μl de PBS 0,85%, resultando no volume final de 200 μl , mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos (PIT) e, posteriormente foi irradiado por 10 minutos, tempo máximo de irradiação utilizado.

Foi criado também um grupo denominado controle negativo, no qual foi adicionado ao mini-tubo Eppendorf 200 µl de PBS 0,85% mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos (PIT) e um grupo denominado controle positivo onde foi adicionado 180 µl de suspensão fúngica de igual concentração aos grupos-teste que utilizaram o fungo, mais 20 µl de PBS 0,85%, resultando no volume final de 200 µl, mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos (PIT).

Assim, houve 3 grupos experimentais:

- **Grupo 6:** apenas a suspensão do inóculo fúngico, sem a adição do FS e/ou das nanocascas de ouro submetidas à irradiação (apenas o tratamento com luz).
- **Grupo 7:** apenas o solvente PBS 0,85%, sem a adição do inóculo fúngico ou de FS e/ou das nanocascas de ouro.
- **Grupo 8:** apenas o inóculo fúngico sem tratamento com irradiação ou de FS e/ou das nanocascas de ouro.

Tais grupos mantiveram-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos antes do procedimento de irradiação dos grupos (PIT) (TABELA 3).

Tabela 3 - Grupos controles da primeira etapa (apenas luz, controle negativo e controle positivo)

Grupos	Grupo 6 (LUZ)	Grupo 7 (CONTROLE NEGATIVO)	Grupo 8 (CONTROLE POSITIVO)
INÓCULO	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 µL)	-	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 µL)
AZUL DE METILENO	-	-	-
SOLVENTE (PBS 0,85 %)	20 µL	200 µL	20 µL
NANOCASCA DE OURO	-	-	-
PIT	10 min	10 min	10 min

Fonte: A Autora (2017).

Adotou-se também três grupos que não foram submetidos à irradiação: tratado apenas com azul de metileno 10 µM. Neste grupo usou-se 180 µL de suspensão fúngica, 10 µL de AM µM (concentração final 0,5 µM) e 20 µl de PBS 0,85%, resultando no volume final de

200 µl. Foi submetido também ao PIT de 10 minutos, mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação, porém não seguiu com a irradiação.

Outros dois grupos distintos, usou-se 180 µL de suspensão fúngica e receberam tratamento (10 µL) apenas com nanocasca na concentração 0,1 µM e 1 µM. Foi adicionado a cada um 10 µl de PBS 0,85%, resultando no volume final de 200 µl para ambos. Nenhum desses dois últimos grupos recebeu doses de irradiação, sendo mantidos ao PIT de 10 minutos, sem agitação, à temperatura ambiente.

Assim, dispuseram mais 3 grupos experimentais:

- **Grupo 9:** apenas a suspensão do inóculo fúngico, com a adição do FS sem a exposição à irradiação e sem a adição de nanocascas de ouro.
- **Grupo 10:** apenas tratamento com nanocascas de ouro na concentração 0,1 µM (0,5 µM concentração final) sem a exposição à irradiação.
- **Grupo 11:** apenas tratamento com nanocascas de ouro na concentração 1,0 µM (50 µM concentração final) sem a exposição à irradiação.

Tais grupos mantiveram-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos (PIT) (TABELA 4).

Tabela 4 - Grupos controles da primeira etapa (AM, Nanocasca 0,1 µM nanocasca 1,0 µM ambos sem iluminação).

Grupos	Grupo 9 (AM 10 µM SEM LUZ)	Grupo 10 (Nanocasca de ouro 0,1 µM SEM LUZ)	Grupo 11 (Nanocasca de ouro 1,0 µM SEM LUZ)
INÓCULO	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 µL)	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 µL)	Suspensão de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 (180 µL)
AZUL DE METILENO	10 µL (concentração final 0,5 µM)	-	-
SOLVENTE (PBS 0,85 %)	10 µL	10 µL	10 µL
NANOCASCA DE OURO	-	10 µL (0,5 µM concentração final)	10 µL (50 µM concentração final)
PIT	10 min	10 min	10 min

Fonte: A Autora (2017).

Os testes foram realizados em triplicata para todos os grupos da primeira etapa de ensaios. Foram adotados 11 grupos de amostras para a primeira etapa de testes de inativação

fotodinâmica antimicrobiana para *C. albicans*. Todos os grupos que foram submetidos à irradiação com o sistema de LED utilizado, foram testados em tempos diferentes de 0 (sem receber irradiação), 2, 4, 8 e 10 minutos de iluminação, como mostra a tabela 5 a seguir.

Tabela 5 - Grupos dos testes da Primeira Etapa.

GRUPOS	DESCRIÇÃO DOS GRUPOS
CONTROLE POSITIVO	Apenas a suspensão fúngica (1×10^7 UFC/ μ L)-Sem tratamento (C+)
CONTROLE NEGATIVO	Apenas PBS (200 mL)-Sem adição de inóculo e sem tratamento (C-)
SÓ IRRADIAÇÃO	Inóculo submetido à irradiação por 10 minutos
AM 10 μM	Inóculo fúngico acrescido de tratamento com AM sem irradiação
AM 10 μM + LUZ	Inóculo tratado apenas com AM (sem adição de NP) submetidos à irradiação nos tempos: 2,4,8 e 10 minutos
NP 0,1 μM	Inóculo fúngico acrescido de tratamento com NP 0,1 μ M sem irradiação
NP 1,0 μM	Inóculo fúngico acrescido de tratamento com NP 1 μ M sem irradiação
NP 0,1 μM +LUZ	Inóculo tratado com NP 0,1 μ M sem adição de AM irradiado nos tempos 2,4,8 e 10 minutos
NP 1,0 μM +LUZ	Inóculo tratado com NP 1 μ M sem adição de AM irradiado nos tempos 2,4,8 e 10 minutos
AM 10 μM NP 0,1 μM +LUZ	Inóculo tratado com AM e NP 0,1 μ M irradiado nos tempos 2,4,8 e 10 minutos
AM 10 μM NP 1,0 μM +LUZ	Inóculo tratado com AM e NP 1 μ M irradiado nos tempos 2,4,8 e 10 minutos

Fonte: A Autora (2017).

As amostras de cada grupo foram adicionadas a mini-tubos Eppendorfs de 200 μ L de volume, agitadas em um vórtex (IKA Agitadores MS 3 digital) (FIGURA 17) em velocidade máxima por aproximadamente 2 segundos em temperatura ambiente para completa homogeneização e, submetidas à irradiação, de comprimento de onda de emissão de $\lambda = 630$ nm.

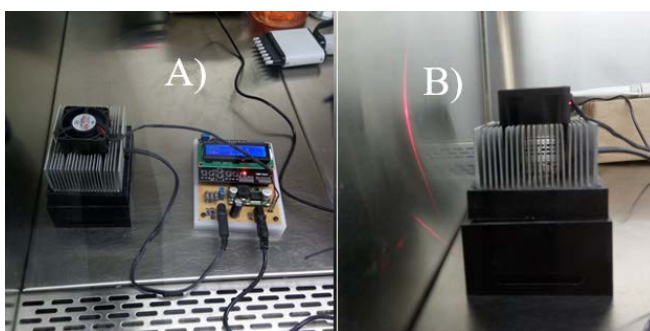
Figura 17 - Aparelho vórtex utilizado para homogeneizar os grupos antes da irradiação.



Fonte: A Autora (2017).

Na irradiação das amostras foi utilizado um sistema de iluminação composto por 4 LEDs, de comprimento de onda de emissão de $\lambda = 630$ nm, com corrente controlada. No sistema de iluminação, cada Eppendorf foi iluminado pela sua abertura superior com uma potência óptica de 40 mW. A figura 18 apresenta imagem do sistema de iluminação utilizado, constituído de módulo de controle de corrente e tempo de iluminação e do módulo de suporte e iluminação.

Figura 18 - Sistema de iluminação utilizado



Fonte: A Autora (2017).

A) Módulo de controle de corrente e tempo. B) Sistema de iluminação em funcionamento.

Sendo a área superficial de um Eppendorf de aproximadamente $0,35 \text{ cm}^2$ as densidades de energias (J/cm^2) utilizadas neste estudo, para diferentes tempos de irradiação, são indicadas na tabela 6.

Tabela 6 - Tempo de irradiação x Densidade de Energia.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (min)	Densidade de ENERGIA (J/cm^2)
0	0
2	13,7
4	27,4
8	54,8
10	68,5

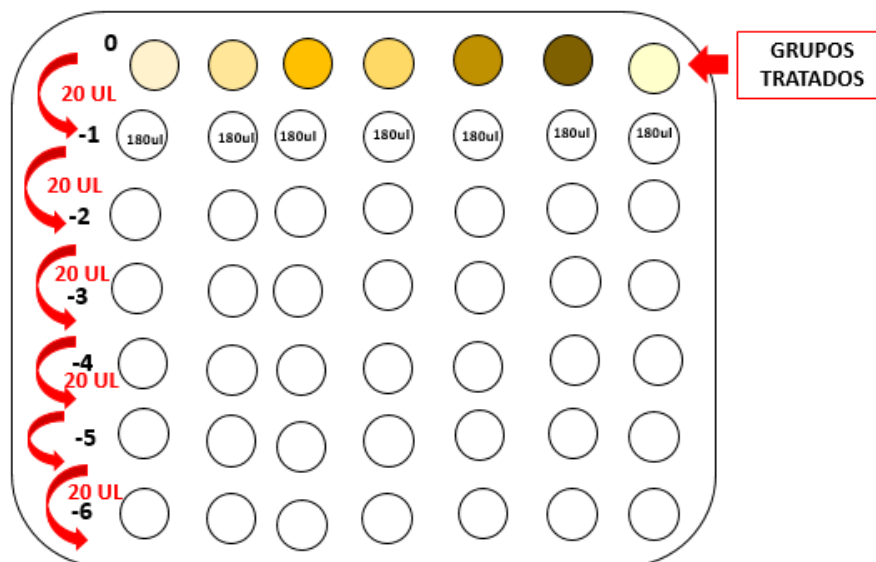
Fonte: A Autora (2017).

• PLAQUEAMENTO E CONTAGEM DAS UFCs

Todas as condições testadas foram realizadas no escuro à temperatura ambiente e em condições assépticas no interior de uma câmara de fluxo laminar.

Após a irradiação foi aspirado de cada mini-tubo Eppendorf uma alíquota e adicionado 20 µL em cada poço correspondente de uma placa de microtitulação de 96 poços fundo chato estéril, como esquematizado na figura 19 para a realização da diluição seriada. A diluição seriada ocorreu de $1:10^1$, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$.

Figura 19 - Esquema representativo da diluição seriada ($1:10^1$ a $1:10^6$).



Fonte: A Autora (2017).

Foi adotado a diluição seriada e o método de Jett, facilitando a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) pela técnica (Jett et al., 1997). Neste processo de plaqueamento (FIGURA 20) foi adicionado 10 µL de cada grupo após o tratamento e após a diluição seriada às placas de Petri com meio Ágar Sabouraud Dextrose, realizando-se a semedura (plaqueamento) sem que essas gotas se misturassem durante o escorrimento das mesmas na placa.

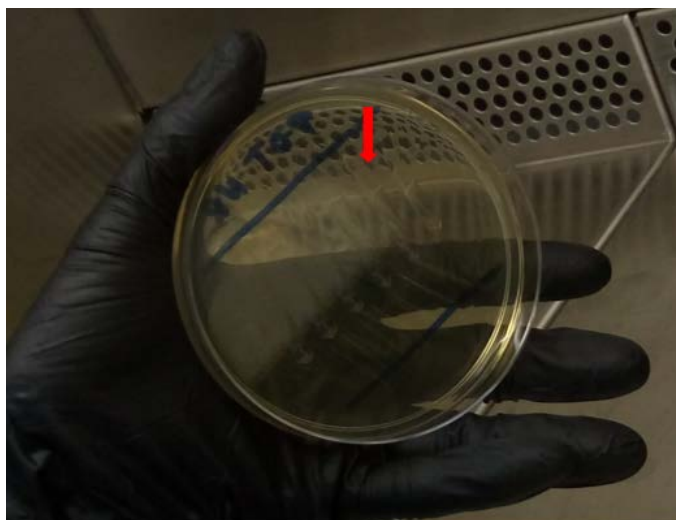
Figura 20 - Esquema do plaqueamento em placa de petri pelo Método de Jett *et al.*, 1997.



Fonte: A Autora (2017).

Tal procedimento possibilitou a contagem das colônias como proposto por Jett et al (1997), facilitando a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) em cada coluna formada (FIGURA 21) e fornecendo números mais exatos dos microrganismos. Essas placas ficaram em repouso para que o meio absorvesse as amostras.

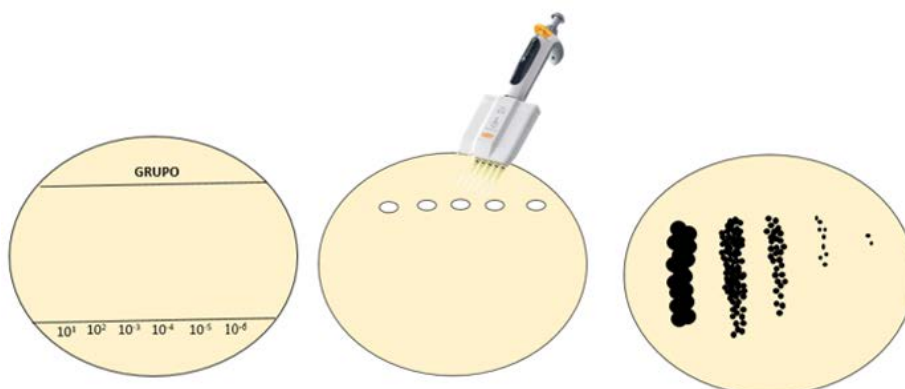
Figura 21 - Formação das colunas após corrida da gota no processo de plaqueamento.



Fonte: A Autora (2017).

Este procedimento foi chamado de método de Jett (JETT *et al.*, 1997), no qual, com o auxílio de uma pipeta multicanal uma alíquota de suspensão microbiana é adicionada à placa de Petri com meio após os tratamentos de cada grupo (FIGURA 22).

Figura 22 - Esquema do plaqueamento em placa de petri após diluição seriada.

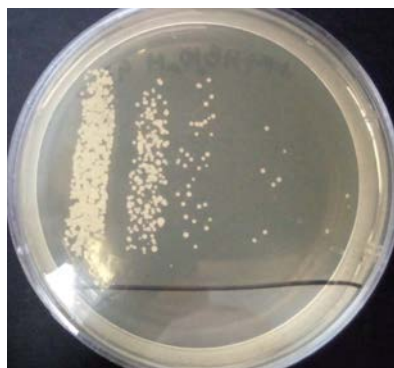


Fonte: A Autora (2017).

Após a absorção das amostras pelo meio, essas placas foram invertidas, para que a água de condensação formada na tampa da placa não entrasse em contato com o meio de

cultura, sendo estas devidamente identificadas e condicionadas em locais específicos onde ficaram por 24h a 37°C. Após 24h as placas foram então retiradas da incubação para a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (FIGURA 23).

Figura 23 - Placa de Petri com meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose com semeio de *C. albicans* pela técnica de Jett após 24 horas de crescimento.



Fonte: A Autora (2017).

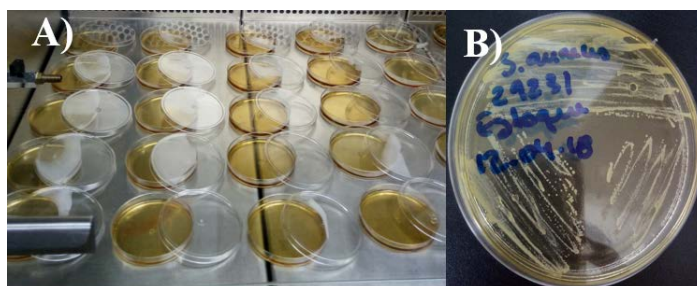
4.1 SEGUNDA ETAPA - *S. aureus* (ATCC 29231)

A segunda etapa de ensaios foi realizada no Centro de Lasers e Aplicações-IPEN/SP.

• PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para preparação do inóculo de *S. aureus* foi utilizada a cepa de ATCC 29231. Foi realizada a preparação do meio Brain Heart Infusion Agar (BHI) da Kasvi em placas de petri descartáveis e estéreis (FIGURA 24 A) onde foram subcultivadas aerobicamente (FIGURA 24 B), por aproximadamente 12 horas, a 37°C em estufa, conforme recomendado no Manual de Microbiologia Clínica (SHADOMY *et al.*, 1985).

Figura 24 - A) Placas de petri com meio BHI para cultivo de *S. aureus*. B) Cultura de *S. aureus*.



Fonte: A Autora (2018).

Após 12 h de incubação, as células foram colhidas por swab e posteriormente suspensas em solução salina tamponada com fosfato a 0,85 % (PBS) em pH aproximado de 7,2. A partir dessa suspensão foi realizada a padronização do inóculo com o auxílio do padrão 0,5 da escala de MacFarland (Padrão de turbidez) em espectrofotômetro (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 1990; NCCLS, 2002).

A turbidez da suspensão celular foi medida em espectrofotômetro (Spectrophotometer SP220, Biospectro, Brasil). Suspensões de aproximadamente $1,9 \times 10^7$ UFC/mL foram padronizadas, definindo uma transmitância de 80% a 540 nm. A figura 25 apresenta o espectrofotômetro utilizado (A) e a mensuração da turbidez do inóculo (B).

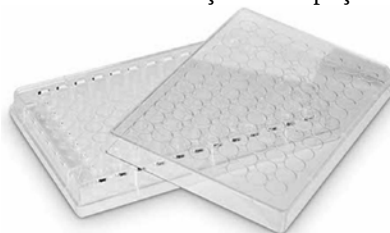
Figura 25 - A) Espectrofotômetro. B) Mensuração da turbidez do inóculo.



Fonte: A Autora (2018).

Na segunda etapa de ensaios com *S. aureus* (ATCC 29231) utilizou-se placas de microtitulação de 96 poços com fundo chato, conforme figura 26.

Figura 26 - Placa de microtitulação de 96 poços e fundo chato.



Fonte: e-labcommerce.

• INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Nos testes realizados com *S. aureus* foi adicionado a suspensão com inóculo de 70 μ L por grupo a cada poço da placa de microtitulação.

Para o ensaio com os grupos tratados apenas com azul de metileno (80 μ M) com concentração final de 4 μ M e irradiados os grupos testados foram os seguintes:

- **Grupo 1:** azul de metileno 80 μM (concentração final de 4 μM por poço) - 30 segundos.
- **Grupo 2:** azul de metileno 80 μM (concentração final de 4 μM por poço) - 1 minuto.
- **Grupo 3:** azul de metileno 80 μM (concentração final de 4 μM por poço) - 3 minutos.
- **Grupo 4:** azul de metileno 80 μM (concentração final de 4 μM por poço) - 5 minutos.

Estes grupos tratados com azul de metileno foram irradiados em 4 tempos distintos, como mostra a tabela 7:

Tabela 7 - Grupos testes tratados apenas com azul de metileno 80 μM (concentração final de 4 μM por poço).

GRUPO	INÓCULO	AZUL DE METILENO (4 μM)	SOLVENTE (PBS 0,85 %)	PIT	TEMPO DE IRRADIAÇÃO
GRUPO 1	70 μL suspensão de <i>S. aureus</i> ($1,9 \times 10^7$ UFC/ μL)	10 μL	120 μL	10 minutos	30 segundos
GRUPO 2	70 μL suspensão de <i>S. aureus</i> ($1,9 \times 10^7$ UFC/ μL)	10 μL	120 μL	10 minutos	1 minuto (60 segundos)
GRUPO 3	70 μL suspensão de <i>S. aureus</i> ($1,9 \times 10^7$ UFC/ μL)	10 μL	120 μL	10 minutos	3 minutos (180 segundos)
GRUPO 4	70 μL suspensão de <i>S. aureus</i> ($1,9 \times 10^7$ UFC/ μL)	10 μL	120 μL	10 minutos	5 minutos (300 segundos)

Fonte: A Autora (2018).

Nos grupos 1, 2, 3 e 4 foram adicionados a cada poço 70 μL da suspensão bacteriana de *S. aureus* ($1,9 \times 10^7$ UFC/ μL), mais 120 μL de PBS (0,85 %) e 10 μL de AM (80 μM) com concentração final em cada poço da placa de microtitulação de 4 μM , mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos (PIT).

Após o PIT os poços foram irradiados nos tempos: 30 segundos, 1 minuto (60 segundos), 3 minutos (180 segundos) e 5 minutos (300 segundos).

Para os grupos tratados com AM (80 μM) e nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionados a cada poço 70 μL da suspensão de *S. aureus* e em seguida adicionado 10 μL da solução de AM (10 μM) e 120 μL da solução de nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$, resultando no volume final de 200 μL e mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação por 10 minutos (PIT), para posteriores irradiação nos mesmos tempos dos grupos anteriores. Tais grupos foram descritos como:

- **Grupo 5:** azul de metileno 80 μM e nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$ - 30 segundos.
- **Grupo 6:** azul de metileno 80 μM e nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$ - 1 minuto.
- **Grupo 7:** azul de metileno 80 μM e nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$ - 3 minutos.
- **Grupo 8:** azul de metileno 80 μM e nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$ - 5 minutos.

Após os 10 minutos do PIT os grupos 5,6,7 e 8 foram irradiados por 30 segundos, 1 minuto (60 segundos), 3 minutos (180 segundos) e 5 minutos (300 segundos), como mostra a tabela 8 abaixo:

Tabela 8 - Grupos tratados com azul de metileno 80 μM (concentração final de 4 μM por poço) e nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$.

GRUPO	INÓCULO	AZUL DE METILENO (4 μM)	NANOCASCAS DE OURO 30 $\mu\text{g/ mL}$	PIT	TEMPO DE IRRADIAÇÃO
GRUPO 5	70 μL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/ μL)	10 μL	120 μL	10 minutos	30 segundos
GRUPO 6	70 μL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/ μL)	10 μL	120 μL	10 minutos	1 minuto (60 segundos)
GRUPO 7	70 μL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/ μL)	10 μL	120 μL	10 minutos	3 minutos (180 segundos)
GRUPO 8	70 μL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/ μL)	10 μL	120 μL	10 minutos	5 minutos (300 segundos)

Fonte: A Autora (2018).

Foram feitos também grupos-controle:

- **Grupo 9:** apenas azul de metileno 4 μM – sem iluminação (0 segundos).
- **Grupo 10:** apenas nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$ - sem iluminação (0 segundos).
- **Grupo 11:** azul de metileno 4 μM e nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$ – sem iluminação (0 segundos).
- **Grupo 12:** apenas irradiação - 5 minutos (sem azul de metileno e sem nanocasca de ouro).
- **Grupo 13:** controle negativo (sem a adição de tratamento e sem inóculo) – PBS.
- **Grupo 14:** controle positivo (sem a adição de tratamento) – apenas o inóculo.

Nos grupos tratados apenas com azul de metileno 80 μM (4 μM concentração final por poço da placa de microtitulação) foi adicionado 70 μL em cada poço da suspensão de *S. aureus* ($1,9 \times 10^7$ UFC/ μL), depois adicionado 10 μL do AM e 120 μL do PBS para completar o volume para 200 μL . Em seguida, foi feito o PIT por 10 minutos, mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação. Também foi adicionado ao grupo tratado apenas com nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$ 70 μL da suspensão de *S. aureus*, 120 μL das nanocascas de ouro e completado o volume com 10 μL de PBS e, igualmente realizado o PIT.

Nos grupos tratados com azul de metileno 80 μM associado às nanocascas de ouro 30 $\mu\text{g/ mL}$, também foi adicionado 70 μL do inóculo, 10 μL do AM e 120 μL das nanocascas de ouro, mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação (PIT) por 10 minutos.

Para os grupos-controle positivo e negativo, foi adicionado 70 μL do inóculo e 130 μL de PBS para o primeiro e 200 μL de PBS para o segundo. Ambos, não foram expostos à tratamento com azul de metileno e/ou nanocascas de ouro, bem como, também não foram irradiados.

O grupo que não recebeu tratamento com azul de metileno e/ou nanocascas de ouro, mas foi irradiado no maior tempo proposto de 5 minutos (300 segundos) foi adicionado apenas o inóculo (70 μL) e adicionado 130 μL de PBS, mantendo-se sem agitação, à temperatura ambiente e sem receber iluminação (PIT) por 10 minutos.

Para em seguida ser irradiado por 5 minutos. Esses grupos foram expressos na tabela 9.

Tabela 9 - Grupos – controle.

GRUPO	INÓCULO	AZUL DE METILENO (4 µM)	SOLVENTE (PBS 0,85 %)	PIT	NANOCASCAS DE OURO (30µg/ mL)	TEMPO DE IRRADIAÇÃO
GRUPO 9	70 µL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/µL)	10 µL	120 µL	10 minutos	-	-
GRUPO 10	70 µL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/µL)	-	10 µL	10 minutos	120 µL	-
GRUPO 11	70 µL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/µL)	10 µL	-	10 minutos	120 µL	-
GRUPO 12	70 µL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/µL)	-	200 µL	10 minutos	-	5 minutos (300 segundos)
GRUPO 13	-	-	200 µL	10 minutos	-	-
GRUPO 14	70 µL suspensão de <i>S. aureus</i> (1,9x10 ⁷ UFC/µL)	-	200 µL	10 minutos	-	-

Fonte: A Autora (2018).

A divisão dos grupos para os testes de inativação fotodinâmica antimicrobiana para *S. aureus* foi a seguinte:

Tabela 10 - Grupos dos testes da Segunda Etapa.

GRUPOS	DESCRIÇÃO DOS GRUPOS
AM 4 (GRUPO 1)	Inóculo tratado apenas com MB 4 μM + iluminação 30 segundos
AM 4 (GRUPO 2)	Inóculo tratado com MB 4 μM + iluminação 1 minuto
AM 4 (GRUPO 3)	Inóculo tratado com MB 4 μM + iluminação 3 minutos
AM 4 (GRUPO 4)	Inóculo tratado com MB 4 μM + iluminação 5 minutos
AM 4 + NP 30 (GRUPO 5)	Inóculo tratado com MB 4 μM + NP 30 $\mu\text{g/ mL}$ + iluminação 30 segundos
AM 4 + NP 30 (GRUPO 6)	Inóculo tratado com MB 4 μM + NP 30 $\mu\text{g/ mL}$ + iluminação 1 minuto
AM 4 + NP 30 (GRUPO 7)	Inóculo tratado com MB 4 μM + NP 30 $\mu\text{g/ mL}$ + iluminação 3 minutos
AM 4 + NP 30 (GRUPO 8)	Inóculo tratado com MB 4 μM + NP 30 $\mu\text{g/ mL}$ + iluminação 5 minutos
AM 4 (GRUPO 9)	Inóculo tratado apenas com MB 4 μM (sem iluminação)
NP 30 $\mu\text{g/ mL}$ (GRUPO 10)	Inóculo tratado apenas com NP 30 $\mu\text{g/ mL}$ (sem iluminação)
AM 4 + NP 30 (GRUPO 11)	Inóculo tratado com MB 4 μM + NP 30 $\mu\text{g/ mL}$ (sem iluminação)
SÓ ILUMINAÇÃO (GRUPO 12)	Inóculo tratado apenas com iluminação por 5 minutos
CONTROLE NEGATIVO (GRUPO 13)	Apenas PBS. Sem inóculo e sem tratamento
CONTROLE POSITIVO (GRUPO 14)	Apenas inóculo

Fonte: A Autora (2018).

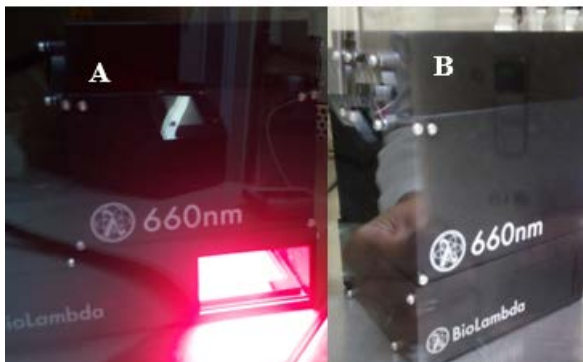
Os testes foram realizados em triplicata para todos os grupos da segunda etapa de ensaios. Foram adotados 14 grupos de amostras para a segunda etapa de testes de inativação fotodinâmica antimicrobiana para *S. aureus*.

Todos os grupos que foram submetidos à irradiação com o sistema de LED utilizado, foram testados em tempos diferentes de iluminação. Todas as condições testadas foram realizadas no escuro, sem agitação, à temperatura ambiente e em condições assépticas no interior de uma câmara de fluxo laminar.

A irradiância foi de 47 mW/cm^2 e os tempos de exposição de 30, 60, 180 e 300 s exibiram exposições radiantes de 1,4, 2,8, 8,5 e 14,1 J/cm^2 . Controles apropriados sem irradiação também foram usados.

As amostras foram irradiadas de cima para baixo na placa de micro-titulação. Alíquotas de 200 μl foram colocadas em uma placa de 96 poços e irradiadas com uma caixa de diodo emissor de luz vermelha (LED) (FIGURA 27 A) emitindo a $659 \pm 9 \text{ nm}$ (BioLambda, SP, Brasil) (FIGURA 27 B).

Figura 27 - A) Caixa de diodo emissor de luz vermelha (LED) em funcionamento emitindo a $65 = 659 \pm 9$ nm (BioLambda). B) Caixa de diodo emissor de luz vermelha (LED).



Fonte: A Autora (2018).

Após o tratamento, 20 μ l da suspensão foram coletados e diluídos em série em 180 μ l de PBS até a diluição de 10^{-6} vezes a concentração original. 10 μ L de cada diluição foram semeados em placas de Ágar BHI para os grupos de *S. aureus* através método de Jett (JETT *et al.*, 1997) para o plaqueamento, que foi realizado em triplicata com o auxílio de uma pipeta multicanal como feito nos ensaios com *Candida albicans*.

Após a absorção das amostras pelo meio, essas placas foram invertidas, para que a água de condensação formada na tampa da placa não entrasse em contato com o meio de cultura, sendo estas devidamente identificadas e condicionadas em estufa (FIGURA 28) onde ficaram por 24h a 37°C.

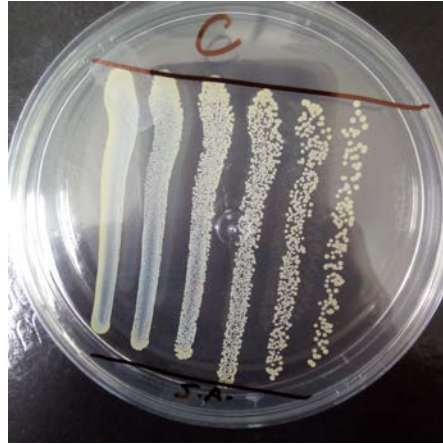
Figura 28 - Placas semeadas na estufa.



Fonte: A Autora (2018).

Após 24h as placas foram então retiradas da incubação para a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (FIGURA 29).

Figura 29 - Placa semeada após 24 horas em estufa a 37°C.



Fonte: A Autora (2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir os resultados do presente estudo.

5.1 RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA - *Candida albicans*

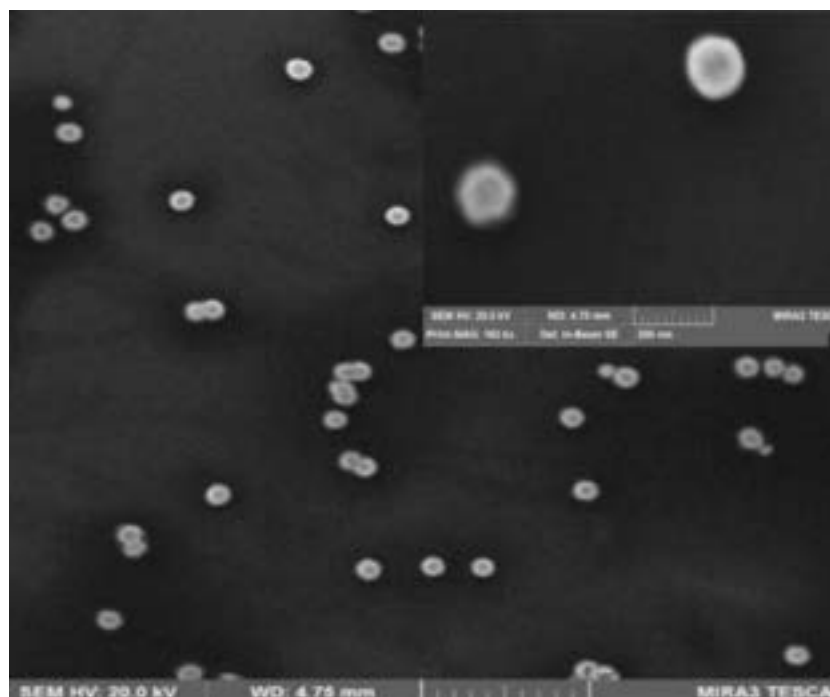
CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCASCAS DE OURO

Foi avaliado o uso das nanocascas de ouro com o azul de metileno, baseando-se no fato de que o pico de extinção (651 nm) da nanocascas se sobrepõe ao do espectro de AM.

Na caracterização das nanocascas de ouro foram feitas imagens de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de transmissão óptica. A figura 23 mostra essas imagens das nanocascas de ouro dispersas, indicando a sua forma esférica com diâmetro médio de 125 nm, confirmando as informações do fabricante.

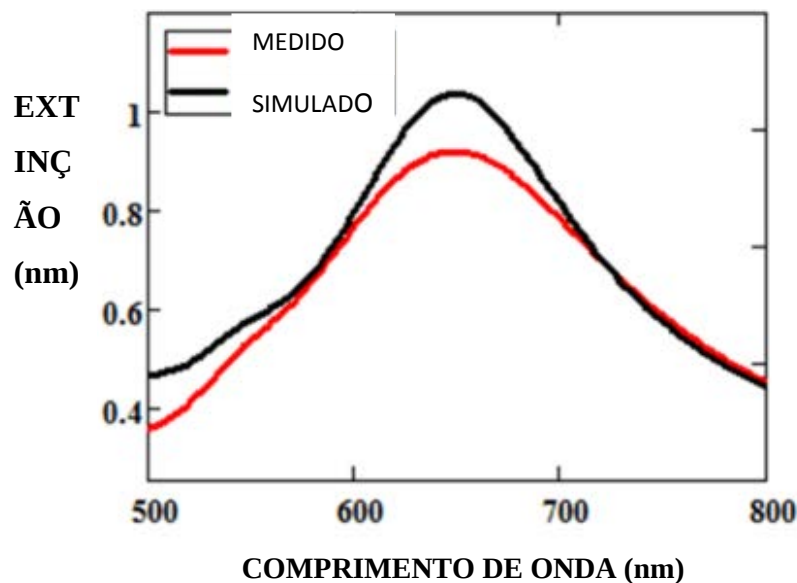
Análises espectroscópicas também foram realizadas na caracterização do colóide adquirido. As nanocascas de ouro exibem espectros de extinção com pico em 651 nm (FIGURA 30).

Figura 30 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura. Barra de escala da imagem: 1 μ m. Barra de escala da imagem inserida: 200 nm.



Fonte: A Autora (2017).

Figura 31 - Espectro de ressonância de ressonância plasmônica de superfície localizada das nanocascas de ouro.



Fonte: A Autora (2017).

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA – *Candida albicans*

Verificou-se que 10 minutos de irradiação isoladamente (na ausência do fotossensibilizador e das nanocascas de ouro) não alterou a viabilidade celular de *Candida albicans*, como mostra a figura 32 abaixo:

Figura 32 - Crescimento das Unidades Formadoras de Colônia tratadas apenas com irradiação de 10 minutos e sem a adição de nanocascas e azul de metileno.

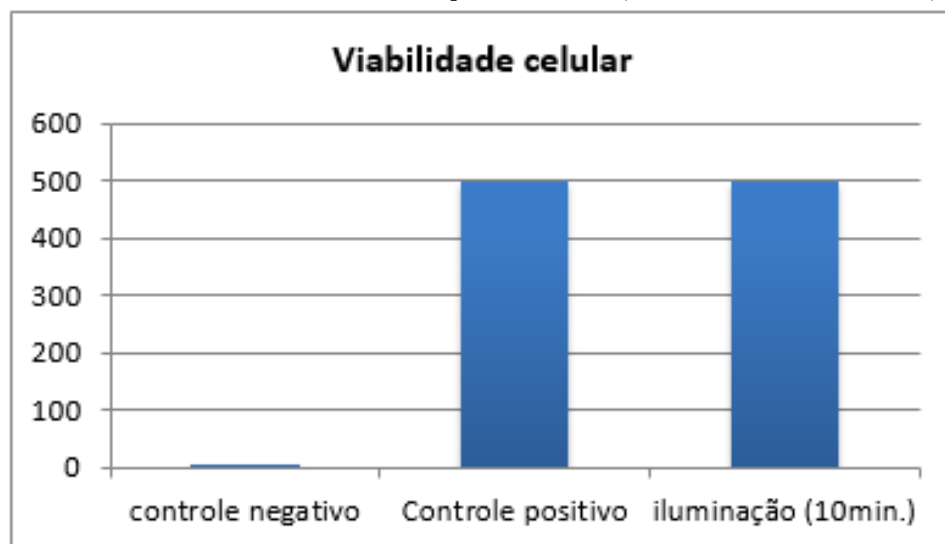


Fonte: A Autora (2017).

A figura 33 apresenta um gráfico apontando a viabilidade celular dos grupos: controle negativo (só PBS), controle positivo (só a suspensão fúngica) e o grupo com o

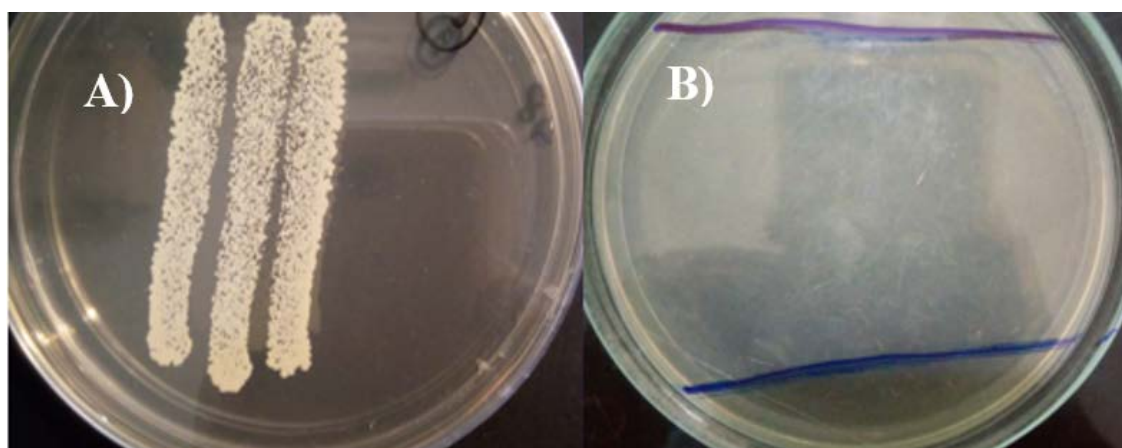
inóculo, sem azul de metileno, irradiado pelo tempo de 10 minutos. O que também pode ser demonstrado nas figuras 34 do controle positivo (A) e negativo (B) após semeio em placa e incubação em estufa em overnight.

Figura 33 - Gráfico de Contagem de UFCs/ml nos controles positivo, controle negativo e em suspensão de *Candida albicans* a 10^7 UFC/ml iluminada por 10 minutos (VIABILIDADE CELULAR).



Fonte: A Autora (2017).

Figura 34 - A) controle positivo *Candida albicans* 10^7 UFC/ml. B) Controle negativo (apenas PBS).



Fonte: A Autora (2017).

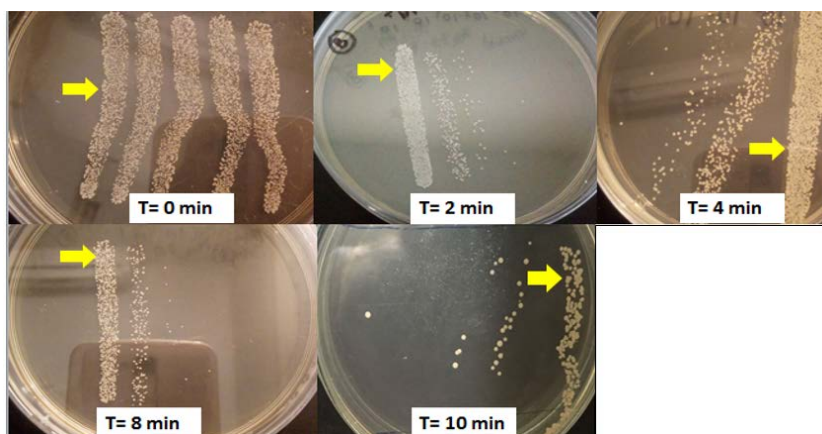
Verificou-se que o fotossensibilizador azul de metileno, na concentração de $1 \mu\text{M}$, isoladamente não apresentou citotoxicidade sobre *Candida albicans*, em nenhuma das condições (tempos) de irradiação testadas.

Não foi verificada nenhuma ação antimicrobiana das nanocascas de ouro (sem a adição do azul de metileno), nas concentrações de $0,1$ e $1 \mu\text{M}$, em nenhuma das condições de

irradiação exploradas. Esses resultados indicam que a iluminação aplicada nas amostras com NP ou AM (isoladamente) não induz efeitos fotoquímico ou fototérmico significativos.

Os resultados obtidos com a aplicação da Terapia fotodinâmica Antimicrobiana explorando azul de metileno (10 μ M) e nanocascas de ouro (0,1 μ M) sobre a cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 na concentração de 10^7 UFC/ml após tratamento, irradiado por 0, 2, 4, 8 e 10 minutos, são apresentados nas imagens das Figuras 35 e 36.

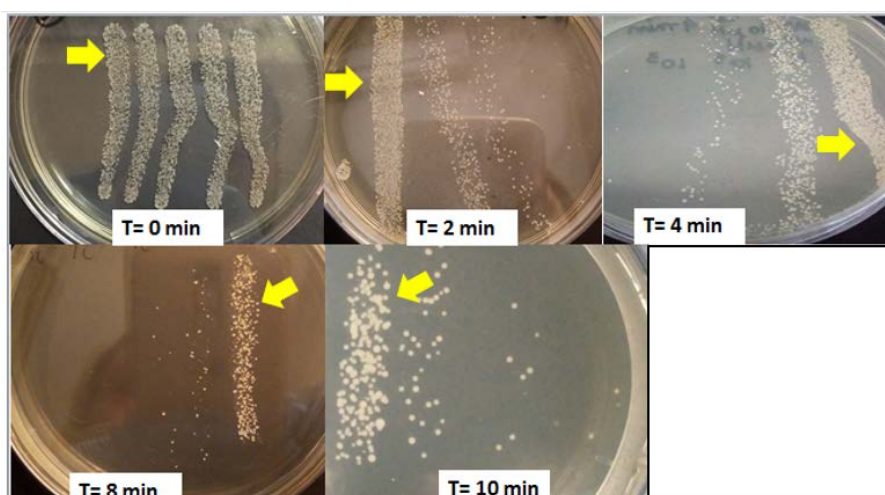
Figura 35 - Crescimento fúngico da suspensão fúngica (10^7 UFC/mL nas setas)*



Fonte: A Autora (2017).

*tratadas com azul de metileno (10 μ M) e nanocascas de ouro (0,1 μ M).

Figura 36 - Crescimento fúngico da suspensão fúngica (10^7 UFC/mL nas setas)*



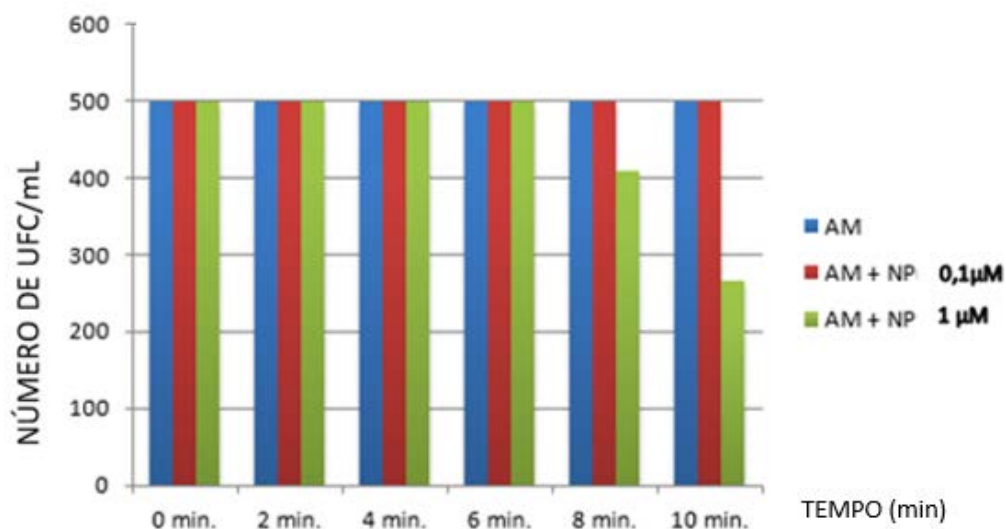
Fonte: A Autora (2017).

*tratadas com azul de metileno (10 μ M) e nanocascas de ouro (1 μ M).

Nesses ensaios verificou-se que a diminuição do crescimento fúngico na concentração de 10^7 UFC/mL no tratamento composto pela associação das nanocascas de ouro com 1 μ M com azul de metileno 10 μ M no tempo 8 e 10 minutos de irradiação. Demonstrando que a

atividade antifúngica da TFDa assistida por nanocascas de ouro trata-se de um processo mais eficiente na eliminação de *Candida albicans*, do que o tratamento fotoquímico sem a associação de NPs, como mostra a figura 37.

Figura 37 - Gráfico demonstrando o número de UCF/ml após tratamentos com azul de metileno isolado e associado às nanocascas de ouro nas concentrações.



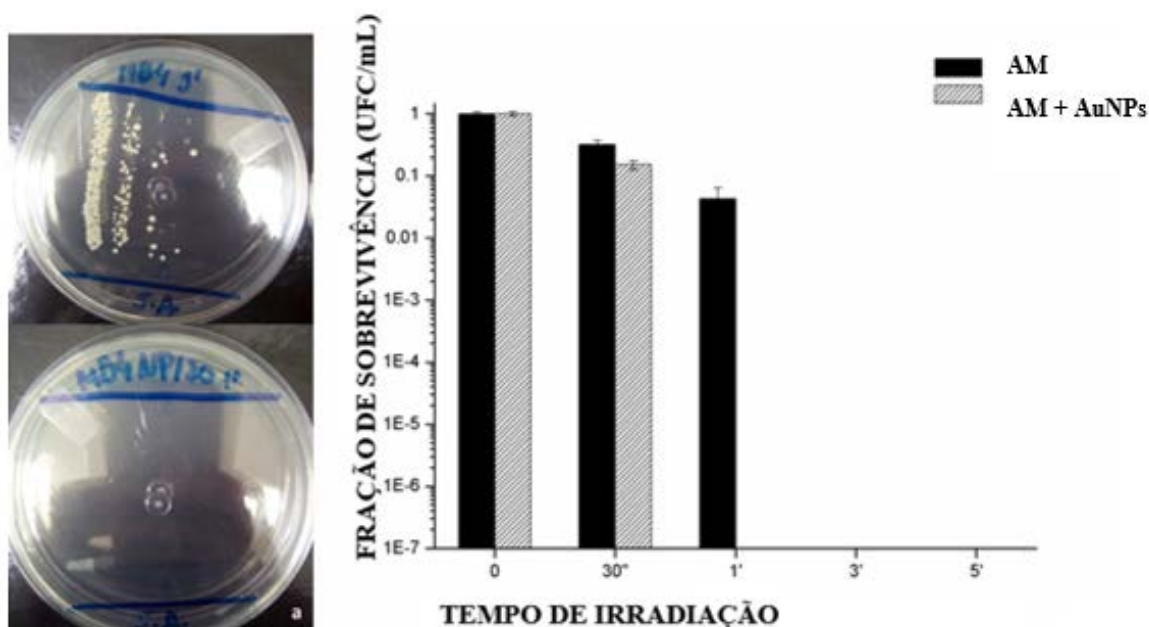
Fonte: A Autora (2017).

5.2 RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA- *Staphylococcus aureus*

Como esperado, apenas a irradiação LED vermelha também não influenciou a viabilidade celular de *S. aureus*. Por outro lado, a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por AM foi capaz de erradicar completamente o *S. aureus* após 3 min de irradiação (8,5 J / cm²).

A Figura 38 (A) e (B) mostra, respectivamente, as imagens das placas e a fração de sobrevivência de *S. aureus* após os tratamentos.

Figura 38 - Imagens das placas (a) e a fração de sobrevivência (b) de *S. aureus* após os tratamentos.



Fonte: A Autora (2018).

Curiosamente, quando o AM foi combinado com as nanocascas de ouro, a redução total foi notada após 1 min de irradiação (2,8 J / cm²) (FIGURA 32 b). As nanocascas de ouro reduziram (3x) o tempo de iluminação no procedimento terapia fotodinâmica antimicrobiana, para erradicação total das células bacterianas.

Tais resultados mostraram a necessidade de revisar a maneira que se estava empregando a metodologia utilizada, bem como, mudar alguns pontos na técnica, como por exemplo, a diluição seriada, que na etapa de experimentos feitas na UFPE, acontecia antes do processo de irradiação das amostras. Passando a ser feita após a irradiação na etapa de experimentos realizados no IPEN. O volume de amostras dos grupos usado na técnica de Jett também foi alterado de 20 µL para 10 µL, que facilitou a gota escorrer nas placas de petri, como também na contagem de unidades formadoras de colônia de cada diluição.

Outro ponto relevante foi o sistema de iluminação utilizado. Pois o equipamento usado na UFPE só comportava o máximo de 4 mini-Eppendorfs por vez. O que tornava ainda mais laboriosa a técnica, deixando-a mais demorada, como também expondo às amostras a mais tempo de teste contribuindo com possíveis contaminações e erros de manipulação.

No IPEN, foi usado um sistema que comportava a iluminação de uma placa com 96 poços capaz de serem iluminados de uma só vez. Além de facilitar a manipulação das amostras, diminuindo as chances de erro de manipulação e contaminação, facilitando toda a

técnica, diminuindo consideravelmente o tempo total de experimentos e otimizando todo o processo.

Os resultados obtidos demonstram o potencial da associação das nanocascas de ouro com a inativação fotodinâmica antimicrobiana para *S. aureus* e *C. albicans*, embora haja a necessidade de mais ensaios laboratoriais a fim de padronizar a metodologia , bem como encontrar uma concentração de nanocascas ideal que associada ao azul de metileno desempenhem uma maior inativação dos microrganismos.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esse estudo permitiu concluir que:

- A irradiação pelo tempo de 10 minutos de isoladamente (na ausência do fotossensibilizador azul de metileno e das nanocascas de ouro) não altera a viabilidade celular de *Candida albicans*;
- Não houve efeito antifúngico do azul de metileno, das nanocascas de ouro ou da luz quando utilizados isoladamente;
- O uso das nanocascas de ouro associados a um fotossensibilizador e comprimento de onda adequado é um tratamento promissor frente à cepa de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*;
- O tempo de irradiação e concentração de nanocascas de ouro são parâmetros determinantes da TFDa;

Perspectivas

- Com este trabalho foi possível concluir que o uso de nanocascas de ouro é uma alternativa promissora na inativação de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. Porém novos estudos necessitam ser abordados verificando diferentes concentrações do FS, bem como, diferentes concentrações das nanocascas de ouro.

REFERÊNCIAS

- ACKROYD, Roger et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- ALCARÁZ, Lucía E. et al. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian journal of microbiology**, v. 34, n. 1, p. 45-51, 2003.
- ALSULAMI, Seham O.; AL DOGHAITHER, Huda A.; IYER, Archana P. Detection of methicillin resistant. *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriage of health care workers by polymerase chain reaction. **Journal of experimental biology**, v. 5, p. 3, 2017.
- ALVES, Denise Ramos Silveira. **Efeito da terapia fotodinâmica sobre biofilme de enterococcus faecalis e estrutura dentinária**. 2017. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017. 108 f.
- ALOUINI, Z.; JEMLI, M. Destruction of helminth eggs by photosensitized porphyrin. **Journal of environmental monitoring**, v. 3, n. 5, p. 548-551, 2001.
- ARANTES, Paula Tamião. **Expressão dos fatores de virulência em Candida albicans: confiabilidade dos métodos microbiológicos e efeito do tratamento fotodinâmico**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas - Área de Dentística Restauradora, Universidade Estadual Paulista, Araquara, 2015. 101 f.
- ANWAR, Khan P.; MALIK, A.; SUBHAN, Khan H. Profile of candidiasis in HIV infected patients. **Iranian journal of microbiology**, v. 4, n. 4, p. 204, 2012.
- BANDEIRA, Yeska Reichow Santos Vieira; SABADIN, Clarice Elvira Saggin. Presença de candidíase e fungos do gênero candida em pacientes submetidos à quimioterapia. **Journal of oral investigations**, v. 5, n. 2, p. 33-39, 2017.
- BHATTACHARYA, Resham; MUKHERJEE, Priyabrata. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 11, p. 1289-1306, 2008.
- BAPTISTÃO, Livia Gramolini. **Pesquisa do cluster de imuno evasão e tipagem molecular em Staphylococcus aureus meticilina-sensíveis (MSSA)**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014. 45 f.
- BESSELINK, G. A. J. et al. Additive effects of dipyrdamole and Trolox in protecting human red cells during photodynamic treatment. **Vox sanguinis**, v. 85, n. 1, p. 25-30, 2003.
- BLANKENSHIP, Jill R.; MITCHELL, Aaron P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.
- BOISSELIER, Elodie; ASTRUC, Didier. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical society reviews**, v. 38, n. 6, p. 1759-1782, 2009.

BOUCHER, Helen W.; COREY, G. Ralph. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical infectious diseases**, v. 46, Suppl. 5, p. S344-S349, 2008.

BUCHARSKAYA, Alla et al. Towards effective photothermal/photodynamic treatment using plasmonic gold nanoparticles. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1295, 2016.

BUSETTO, Mario et al. Predictive factors for oropharyngeal mycosis during radiochemotherapy for head and neck carcinoma and consequences on treatment duration. Results of mycosis in radiotherapy (MIR): a prospective longitudinal study. **Radiotherapy and oncology**, v. 109, n. 2, p. 303-310, 2013.

CANELA, Heliara Maria Spina. **Perfil fenotípico e genotípico de isolados de candida spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP**. 2017. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

CARMELLO, Juliana Cabrini. **Eficácia da terapia fotodinâmica em modelo murino de candidíase oral e efeito genotóxico em células de candida albicans**. 2015. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015. 139 f.

CARVALHO, Moisés Lopes et al. Biofilm formation by candida albicans is inhibited by photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), using chlorin e6: Increase in both ROS production and membrane permeability. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 3, p. 647-653, 2018.

CARVALHO, Maria Auxiliadora Neves de. **Caracterização epidemiológica e molecular de staphylococcus aureus isolado em Manaus- Amazonas**. 2016. Tese (Doutorado) - Curso de Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016. 143 f.

CHREPA, Vanessa et al. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. **Journal of endodontics**, v. 40, n. 7, p. 891-898, 2014.

COLOMBO AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por candida spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, 36:599-07, 2003.

CORBI, Sâmara Cruz Tfaile. **Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina na doença periodontal induzida em ratos**. 2017. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Odontologia, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara, 2017. 33 f.

CORREAL, Julio CD et al. Staphylococcus aureus infections: change in epidemiology at Pedro Ernesto University Hospital/infecções por staphylococcus aureus: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitario Pedro Ernesto. **Revista HUPE**, v. 12, n. 3, p. 31-47, 2013.

CORREIA, Gemina Barros. **Síntese e caracterização de nanopartículas de níquel para óptica não linear**. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

COSTA, Letícia Daniela da Silva. **Síntese e caracterização de porfirinas como potenciais agentes fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Curso da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013. 138 f.

COUTO, Evanice Maria Pereira; CARLOS, Daniela; MACHADO, Eleuza Rodrigues. Candidíase em neonatos: uma revisão epidemiológica. **Ensaio e ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, 2015.

CUNHA NETO, Adelino da; SILVA, Celiane Gomes Maia da; STAMFORD, Tânia Lúcia Montenegro. Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco. **Food Sci Technol**. Campinas, p. 263-271. set. 2002.

DAI, Tianhong et al. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous Candida albicans infections in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5710-5717, 2011.

DAMASCO, Paulo V. et al. Involvement of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus related to sequence type 25 and harboring pvl genes in a case of carotid cavernous fistula after community-associated sepsis. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 1, p. 196-198, 2012.

DAVIES, A. et al. Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of candida biofilms and the effect of miconazole. **JPP**, n. 5, p. 15, 2016.

DELEO, Frank R.; DIEP, Binh An; OTTO, Michael. Host defense and pathogenesis in staphylococcus aureus infections. **Infectious Disease Clinics**, v. 23, n. 1, p. 17-34, 2009.

ECK, Wolfgang et al. Anti-CD4-targeted gold nanoparticles induce specific contrast enhancement of peripheral lymph nodes in X-ray computed tomography of live mice. **Nano letters**, v. 10, n. 7, p. 2318-2322, 2010.

EL-ANSARY, A.; AL-DAIHAN, S. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview. **Journal of toxicology**, v. 2009, 2009.

FARIA, Clara Maria Gonçalves de. **Distribuições de limiar de dose e suas causas e consequências em terapia fotodinâmica**. 2017. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. 88 f.

FLOREZ, Fernando Luis Esteban. **Terapia fotodinâmica em microrganismos cariogênicos – estudo in vitro**. 2012. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012. 151 f.

FREIRAS, Manuela Figueiroa Lyra de. et al. Exotoxinas estafilocócicas. **Ciência veterinária nos trópicos**, v. 7, n. 2/3, p. 63-74, 2004.

FREITAS, Mirian Alves et al. Terapia fotodinâmica com azul de metileno sobre cepa de staphylococcus aureus resistente à meticilina. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 329, 2017.

GARCEZ, A. S. **Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

GARCEZ, Aguinaldo S.; NUNES, Silva C. Bacterial reduction in root canals using antimicrobial photodynamic therapy. In: GARCEZ, Aguinaldo S. **Lasers in dentistry: guide for clinical practice**. Pondicherry: Offices, 2015. p. 133-135.

GARCIA, Maíra Terra. **Laser em baixa clorina com fotossensibilizador para terapia fotodinâmica sobre streptococcus mutans. Intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico**. 2018. Dissertação (Mestrado) - Curso de Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2018. 68 f.

GARG, Tarun et al. Nanotechnology-based photodynamic therapy: concepts, advances, and perspectives. **Critical reviews™ in therapeutic drug carrier systems**, v. 32, n. 5, 2015.

GASPARIN, Adriano Baraciol et al. Prevalência e fatores associados às manifestações bucais em pacientes HIV positivos atendidos em cidade sul-brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p.1307-1315, 2015.

GELATTI, Luciane Cristina et al. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 5, p. 501-6, 2009.

GHOSH, Partha et al. Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 11, p. 1307-1315, 2008.

GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GULLO, A. Invasive fungal infections: the challenge continues. **Drugs**, v.69, Suppl., p. 65-73, 2009.

HAAN, Timo R. de. et al. Neonatal gram negative and candida sepsis survival and neurodevelopmental outcome at the corrected age of 24 months. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59214, 2013.

HAMBLIN, Michael R.; HASAN, Tayyaba. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & photobiological sciences**, v. three, n. 5, p. 436-450, 2004.

HSU, Li Yang et al. Epidemiology of invasive fungal diseases among patients with haematological disorders in the Asia-Pacific: a prospective observational study. **Elsevier**, Singapore, p. 594-597. jun. 2015.

HU, Dengfeng et al. Surface-adaptive gold nanoparticles with effective adherence and enhanced photothermal ablation of methicillin-resistant staphylococcus aureus biofilm. **ACS nano**, v. 11, n. 9, p. 9330-9339, 2017.

IZADPANA, Mandana; KHALILI, Hossein. Antibiotic regimens for treatment of infections due to multidrug-resistant gram-negative pathogens: an evidence-based literature review. **Journal of research in pharmacy practice**, v. 4, n. 3, p. 105, 2015.

KASHEF, Nasim; HUANG, Ying-Ying; HAMBLIN, Michael R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. **Nanophotonics**, v. 6, n. 5, p. 853-879, 2017.

KESSEL, David. Photodynamic therapy: from the beginning. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 1, p. 3-7, 2004.

KHAN, Shakir et al. Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit candida albicans biofilm. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 3245, 2012.

KLINGENBERG, C. et al. Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. **Clinical microbiology and infection**, v. 13, n. 11, p. 1100-1111, 2007.

KOBA, Chiharu et al. Determination of candida species nestled in denture fissures. **Biomedical reports**, v. 1, n. 4, p. 529-533, 2013.

KOŁACZKOWSKA, Anna; KOŁACZKOWSKI, Marcin. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans candida species. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1438-1450, 2016.

KUHN, D. M. et al. Comparison of biofilms formed by *candida albicans* and *candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 878-888, 2002.

LIMA, Máira Ferreira Pinto et al. Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares—revisão de literatura. **Revista uninga review**, v. 21, n. 1, 2018.

LIM, CS-Y. et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 1, p. 21-31, 2012.

LINARDI, Valter Roberto et al. Isolamento de staphylococcus aureus MRSA entre os funcionários de um hospital geral da região leste de Minas Gerais. **Gerais: revista de saúde pública do SUS/MG**, v. 2, n. 2, p. 59-64, 2017.

LONGO, J. P. F; AZEVEDO, R. B. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. **Archives of oral research**, v. 6, n. 3, 2017.

LOPES, Lillian Kelly de Oliveira et al. Epidemiologia das infecções relacionadas à assistência à saúde em unidade de terapia intensiva pediátricas do estado de Goiás, 2016. **Journal of Infection Control**, v. 7, n. 2, 2018.

LYON, Juliana Pereira et al. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. **Mycoses**, v. 54, n. 5, 2011.

MAISCH, Tim. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?. **Lasers In Medical Science**, London, v. 22, n. 2, p.83-91, 21 nov. 2006. Springer Nature.

MAJEWSKI, Dra Marta et al. Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana em leveduras do gênero *Candida*. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 35, n. 4, 2015.

MARCHANT, Elizabeth A. et al. Neonatal sepsis due to coagulase-negative staphylococci. **Clinical and developmental immunology**, v. 2013, 2013.

MARINHO, Sandra Aparecida. **Efeito da Terapia Fotodinâmica (PDT) sobre culturas de *Candida sp.* e de células epiteliais**: estudo in vitro. 2006. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Porto Alegre, 2006.

MARTINS, Jarbas Eduardo. **Avaliação de diferentes parâmetros de soldagem a laser em liga de níquel-cromo levando em consideração estruturas aplicáveis à prótese fixa**. 2014. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, 2014. 119 f.

MEDEIROS, Ketsia Bezerra; LINS, Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa; LEMOS, Janaína Cavalcante. Terapia fotodinâmica: aplicações e efeitos na doença periodontal. **Revista UNIRN**, v. 16, n. 1/2, p. 172, 2018.

MELO, Luciana S. A. de. Singlet oxygen generation enhanced by silver-pectin nanoparticles. **Journal Of Fluorescence**. Maryland, p. 1633-1638. 28 jul. 2012.

MIMA, Ewerton Garcia de Oliveira et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology**, v. 109, n. 3, p. 392-401, 2010.

MODRZEWSKA, Barbara; KURNATOWSKI, Piotr. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. **Ann Parasitol**, v. 59, p. 57-66, 2013.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Medical microbiology**. Elsevier Health Sciences, 2015.

NETT, Jeniel E.; ANDES, David R. Antifungal agents. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.

NEVES, Wendell Wons. **Biossensor óptico para *Candida albicans* baseado em ressonância de plasmon localizado**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015. 54 f.

NOVOTNY, Lukas; HECHT, Bert. **Principles of nano-optics**. Cambridge university press, 2006.

NOVICK, Richard P.; SCHLIEVERT, Patrick; RUZIN, Alexey. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbes and infection**, v. 3, n. 7, p. 585-594, 2001.

NUNES, Emmanuel Borges et al. Perfil de sensibilidade do gênero *candida a* antifúngicos em um hospital de referência da região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. Princípios da terapia fotodinâmica. **Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**, p.312, 2013.

OLIVEIRA, Daiane Buzzatto et al. Caracterização de *staphylococcus aureus* isolados da barra de mão de carrinhos e alças de cestas de supermercados. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 36, n. 3, 2016.

OLIVEIRA, J. P. et al. Polarização plasmônica de superfície em nanopartículas de ouro. **Blucher Physics Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 77-78, 2014.

OLIVEIRA, Kleber Thiago de et al. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista virtual de química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2014.

PAPAVASSILIOU, George C. Optical properties of small inorganic and organic metal particles. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 12, n. 3-4, p. 185-271, 1979.

PAPPAS, Peter G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2015.

PEIXOTO, Juliana Vieira et al. Candidíase: uma revisão de literatura. **Bras J Surg Clin Res**, v. 8, p. 75-82, 2014.

PEMÁN, Javier; QUINDÓS, Guillermo. Current aspects of invasive diseases caused by candida and other yeast fungi. **Revista iberoamericana de micología**, v. 33, n. 3, p. 133-139, 2015.

PERUSSI, Janice Rodrigues. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química nova**, v. 30, n. 4, p. 988, 2007.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366-1377, 2010.

PINHATI, Henrique Marconi Sampaio. **Surto de candidemia por Candida parapsilosis resistente ao fluconazol, em um hospital em Brasília: caracterização clínica, molecular e avaliação dos fatores associados**. 2016. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2016. 107 f.

PLANTINGA, Theo S. et al. Human genetic susceptibility to candida infections. **Medical mycology**, v. 50, n. 8, p. 785-794, 2012.

PRATES, Renato A. et al. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. **Laser Physics**, v. 19, n. 5, p. 1038-1044, 2009.

PRATES, Renato A. et al. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n. 1, p. 53-57, 2010.

PREVENTION, Centers for Disease Control and. **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mrsa/community/photos/photo-mrsa-1.html>>. Acesso em: 03 dez. 2017.

RAIMUNDO, et al. Plantas com atividade antifúngica no tratamento da candidíase: uma revisão bibliográfica. **Revista Uningá Review**, v. 29, n. 2, 2018.

RIBOLI, Danilo Flávio Moraes. **Significância clínica e epidemiologia molecular de Staphylococcus spp. nas infecções da corrente sanguínea em UTI neonatal**. 2018. 38 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

YAMADA JÚNIOR, Aécio Massayoshi. **Estudo dos Efeitos da terapia fotodinâmica em periodontite induzida em ratos**. 2007. 91 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.

RODRIGUES, Célia F.; SILVA, S.; HENRIQUES, Mariana. Candida glabrata: a review of its features and resistance. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 33, n. 5, p. 673-688, 2014.

RODRIGUES, Fabiana Monks; SANTOS, Odelta; GELATTI, Luciane Cristina. Staphylococcus aureus: uma revisão. **Revista Fasem Ciências**, v. 2, n. 2, p. 90-101, 2012.

ROSSETI, Isabela Bueno. **Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana e de compostos organocalcogêneos sobre Candida Albicans**. 2015. 38 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2015.

RYCENGA, Matthew et al. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. **Chemical reviews**, v. 111, n. 6, p. 3669-3712, 2011.

SÁ, Sandra Regina de. **Inativação fotodinâmica de micro-organismos patogênicos explorando nanopartículas de prata e riboflavina**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015. 78 f.

SANTOS, Heberton Wender Luiz dos. **Síntese de nanopartículas metálicas por deposição física de vapor em líquidos iônicos e óleos vegetais**. 2011. 146 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SANTOS, Luíza Beatriz de Medeiros. **Aplicação de zinco-porfirina e azul de metileno em gel e avaliação para uso em terapia fotodinâmica**. 2016. 69 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

SANTOS, Paula Slomp. **Candida auris: emergência e epidemiologia de uma levedura altamente patogênica**. 2017. 19 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SARDI, J. C. O. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SHERWANI, Mohd Asif et al. Gold nanoparticle-photosensitizer conjugate based photodynamic inactivation of biofilm producing cells: potential for treatment of C. albicans infection in BALB/c mice. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131684, 2015.

SENA, Rosa Maria Machado de. **Efeitos da terapia fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul de metileno em vaginite induzida por "candida albicans"**. 2013. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2013. 88 f.

SILVA, Renato Cavalcante da. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007. 90 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. Y. **Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays**. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985. (Manual of clinical microbiology). p. 991-999.

SHARMA SK, Chiang LY, Hamblin MR. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? **Nanomedicine** (Lond); 6(10):1813-25. doi: 10.2217/nnm.11.144, 2011.

SHERWANI, Mohd Asif et al. Gold nanoparticle-photosensitizer conjugate based photodynamic inactivation of biofilm producing cells: potential for treatment of C. albicans infection in BALB/c mice. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0131684, 2015.

SILVA, Bruna Grazielle Marques da. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using toluidine blue inhibits both growth and biofilm formation by Candida krusei. **Lasers in medical science**, p. 1-8, 2018.

STROMMENDER, Birgit; LAYER, Franziska; WERNER, Guido. Staphylococcus aureus and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Workers in the Food Industry. In: **Staphylococcus aureus**. 2018. p. 163-188.

SOUZA, Luanda Barbara Ferreira Canário de. **Capacidade de adesão e formação de biofilme de Candida ssp. isoladas da cavidade oral de pacientes transplantados renais na presença do extrato de Eugenia uniflora**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2015.

SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C.Y.; MUNIN, E., JORGE, A. O. C. Photosensitization of diferente *Candida* species by low power laser light. **J. Photochem Photobiol B Biol.** v. 83, p. 34-38, 2006.

STRAKHOVSKAYA, M. G. et al. The photodynamic inactivation of the yeast *candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. **Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 298-301, 2002.

TALLY, F. P.; BARG, N. L. Estafilococos: abcessos e outras doenças. In: SCHAECHTER et al. (Orgs.). **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.120-7.

TAMURA, Nathalie Kira et al. Fatores de virulência de *candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TARDIVO, João Paulo et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

TEICHERT, M. C. et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology**, v. 93, n. 2, p. 155-160, 2002.

TEIXEIRA, A. H. et al. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. **Caries research**, v. 46, n. 6, p. 549-554, 2012.

TEIXEIRA L.M., Santos KRN, Bueris V, Trabulsi LR. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi LR, Altherthum F (Org). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRINDADE, Alessandra Cesar et al. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. **Photomedicine and laser surgery**, v. 33, n. 3, p. 175-182, 2015.

VANDENESCH, François; LINA, Gérard; HENRY, Thomas. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 12, 2012.

VAZIRI, Shahram et al. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against enterococcal faecalis in root canals; an in vitro study. **Dental research journal**, v. 9, n. 5, p. 613, 2012.

VERBOON-MACIOLEK, Malgorzata A. et al. Inflammatory mediators for the diagnosis and treatment of sepsis in early infancy. **Pediatric research**, v. 59, n. 3, p. 457, 2006.

VIEIRA, JULIANA et al. Candidíase - uma revisão de literature. **Brazilian journal of surgery and clinical research**, v.8, n.2, p.75-82, 2014.

VIEIRA, Francisca; NASCIMENTO, Teresa. Resistência a fármacos antifúngicos por *candida* e abordagem terapêutica. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 9, n. 3, p. 29-36, 2017.

VOOS AC, Kranz S, Tonndorf-Martini S, Voelpel A, Sigusch H, Staudte H, et al. Photodynamic antimicrobial effect of safranin O on an ex vivo periodontal biofilm. **Lasers Surg Med**; 46(3): 235-43; 2014.

WAINWRIGHT, Mark. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 4, p. 263-272, 2005.

WEBBER, A. **Estudo comparativo entre terapia fotodinâmica e imiquimod tópico pra o tratamento de ceratoses actínicas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. 113f.

WEBBER, Analupe et al. Terapia fotodinâmica e imiquimode no tratamento de ceratoses actínicas múltiplas da face: um estudo comparativo e randomizado. **Surgical & cosmetic dermatology**, v. 6, n. 4, p. 325-329, 2014.

WIKIPÉDIA. **Candida albicans**. Disponível em: < https://pt.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans>. Acesso em 22 dez. 2017.

WIKIPÉDIA. **Clorina**. Disponível em:< <https://it.wikipedia.org/wiki/Clorina>>. Acesso em: 22 dez. 2017.

WIKIPÉDIA. **Riboflavina**. Disponível em: < <https://pt.wikipedia.org/wiki/Riboflavina>>. Acesso em 22 dez. 2017.

WILLIAMS, David W. et al. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontology** 2000, v. 55, n. 1, p. 250-265, 2011.

WINTER JS, Santos RP, Azambuja AZ, Cechinel AB, Goldani LZ. Microbiologic isolates and risk factors associated with antimicrobial resistance in patients admitted to the intensive care unit in a tertiary care hospital. **Am J Infect Control**. Sep;41(9):846-8. doi: 10.1016/j.ajic.2012.11.010; 2013.

XIA, Younan; HALAS, Naomi J. Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. **MRS bulletin**, v. 30, n. 5, p. 338-348, 2005.

ZOLFAGHARI, Parjam S. et al. In vivo killing of Staphylococcus aureus using a light-activated antimicrobial agent. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 27, 2009.

APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA

o **Resumo apresentado em congresso nacional e internacional:**

Diogo De Fraga Rosa, Alex José de Melo Silva, Josefa Elaine Silva Germinio, Pedro Henrique Marques Correia, Thâmara Tallita da Silva Correia e Mayara Priscyla Ferreira. **Superexpressão da família BCL-2 e o seu papel na resistência terapêutica no tratamento da Leucemia Mieloide Aguda**, XV Congresso Brasileiro de Biomedicina e III Congresso Internacional de Biomedicina Bento Gonçalves – RS Brasil 2016.

o **Resumo apresentado em congresso internacional:**

Correia, T.T.S., S. Farooq, R. de Araujo; **Photodynamic Inactivation of Candida Yeast Assisted by Gold Nanoshells**, VIII Interactional Symposium on Diagnostics and Therapeutic (SINATER) Recife-PE Brazil 2017.

o **Revisão do artigo:**

“Bacterial multiresistant to a antibiotics diagnosed in urine cultures os transplanted patients” Jornal of Pharmacy and Pharmacology 2017.

o **Artigo aprovado em congresso nacional:**

Sajid Farooq, Thâmara Tallita da Silva Correia, Tania Matheus Yoshimura, Saulo de Toledo Pereira, Martha Simões Ribeiro and Renato E. de Araujo. **Methylene blue-mediated photoinactivation of Staphylococcus aureus assisted by gold nanoshells**, XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB) Búzios-RJ Brasil 2018.

o **Resumo apresentado no 1º Curso de Inverno em Biociências:**

Perspectivas do Uso de Nanopartículas Deouro na Fotoinativação de *Staphylococcus aureus*, 1º Curso de Inverno em Biociências, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-Recife-PE 2018.