

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

SANDRA REGINA DE SÁ

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE MICRO-ORGANISMOS
PATOGENICOS EXPLORANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA
E RIBOFLAVINA**

Recife - PE

2015

SANDRA REGINA DE SÁ

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE MICRO-ORGANISMOS
PATOGENICOS EXPLORANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA
E RIBOFLAVINA**

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.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de

Lima Neto

Recife

2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

S111i	<p>Sá, Sandra Regina de. Inativação fotodinâmica de micro-organismos patogênicos explorando nanopartículas de prata e riboflavina / Sandra Regina de Sá. - Recife: O Autor, 2015. 79 folhas, il., gráfs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo. Coorientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2015. Inclui Referências e Apêndice.</p> <p>1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. 3. Nanopartículas de Prata. 4. Riboflavina. 5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. 6. <i>Streptococcus mutans</i>. 7. <i>Candida albicans</i>. I. Araujo, Renato Evangelista de. (Orientador). II. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de. (Coorientador). III. Título.</p>
610.28 CDD (22. ed.)	UFPE BCTG/2015-279

SANDRA REGINA DE SÁ

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE MICRO-ORGANISMOS
PATOGENICOS EXPLORANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA
E RIBOFLAVINA**

Essa dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Aprovado em: 10 de Fevereiro de 2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo, UFPE
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil (Orientador).

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Fontes, UFPE
Doutor pela Universidade Estadual de Campinas – Campinas, Brasil (Membro interno).

Prof. Dr. Armando Marsden Lacerda Filho, UFPE
Doutor pela University of St. Andrews – Scotland - UK (Membro externo).

Coordenador do PPGEb: _____
Prof. Dr. Rosa Amalia Fireman Dutra

Recife, 10 de Fevereiro de 2015

DEDICATÓRIA

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore,dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

A minha mãe, **Gertrudes Maria de Sáe** aos meus irmãos **Sandro, Simone, Samire e João**,
por todo amor, carinho e incentivo, dedico.

AGRADECIMENTOS

O escrever desta dissertação de mestrado é o culminar de dois anos de estudo árduo.

Após a passagem por diversas dificuldades, principalmente ao nível pessoal, quero agradecer primeiramente a **Deus** pela possibilidade de realização desse sonho, em segundo o grande e incondicional apoio da minha mãe, Gertrudes Maria de Sá, e irmãos.

Agradeço ao Professor **Dr. Renato Evangelista de Araujo**, meu orientador que me instigou e proporcionou o desenvolvimento deste trabalho. O **Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto**, pela co-orientação e acima de tudo, por todas as oportunidades oferecidas ao longo desse caminho profissional.

Quero, ainda, agradecer a todas as equipes dos locais de realização da pesquisa realizados no ano de 2013 a 2014, o IPEN, em especial a **Marta Simões**, pela oportunidade de colaboração e realização deste trabalho, a **Luciana Meloe Alessandra Baphtista**, pela paciência e ensinamento durante o desenvolvimento desse trabalho.

Por último, mas não menos importante, um obrigado a todos os amigos e colegas presentes ao longo destes dois anos, que me ajudaram e apoiaram bastante, em especial as minhas amigas **Doia** (segunda mãe), e **Débora**, que foram meu porto seguro e minha fortaleza ao estar longe de minha família.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) tem sido proposta como um método alternativo para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos como bactérias e fungos. Tal técnica baseia-se na ação simultânea de uma fonte luminosa e um agente fotossensibilizador, que na presença de luz, gera produção de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio que ao interagirem com componentes celulares, promovem a morte celular desses micro-organismos. Esse estudo teve como objetivo avaliar a ação da TFDa explorando nanopartículas de prata (com tamanho médio de 13 nm) e moléculas de riboflavina (157 μ M) em conjunto com um LED (Light Emitting Diode) com comprimento de onda no azul ($\lambda=455 \pm 20$ nm), sobre cepas de *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. As cepas de *S. mutans* foram repicadas em BHI (Brain Infusion Heart) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 48 h e os inóculos de *P. aeruginosa* foram cultivados e estocados em TSA (Tryptic Soy Agar), em presença de O₂, a 37°C, por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, colônias dos micro-organismos foram suspensas em Phosphate Buffered Saline (PBS) a uma densidade de 1×10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL. As culturas de *Candida albicans* foram cultivadas em meio SAB+Y (Agar Sabouraud Dextrose enriquecido com extrato de levedura). A incubação foi realizada à temperatura de 37°C, durante período de 24 horas. Em seguida, foram preparadas suspensões com concentração de 5×10^6 células/mL, correspondente à turbidez de 0,5 na escala McFarland. O experimento foi dividido em doze grupos—o grupo controle, o grupo apenas com o tratamento com a luz (L), tratamento com a riboflavina (Rb), utilização da prata (Ag) e o sistema NPsAgRb+L. Posterior ao tratamento, foi realizada diluição seriada e as placas incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias e 48 h para *Candida* sp. Ao final foi realizada a contagem de UFC/mL de ambos os micro-organismos. Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva. Na redução de UFC/mL foi estatisticamente significativa em culturas de *S. mutans* com redução de 3 logs no número de células viáveis após 6 minutos de irradiação ($p < 0,05$). A inativação fotodinâmica contra *P. aeruginosa* não foi observada estatisticamente significativa após tratamento ($p > 0,05$). O mesmo foi observado nas culturas de *C. albicans* ($p > 0,05$), concluindo-se que a utilização de nanopartículas próximas ao fotossensibilizador foi eficiente contra bactérias Gram-positivas.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, Nanopartículas de Prata, Riboflavina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Antimicrobial Photodynamic Therapy (TFDA) has been proposed as an alternative method for treating infections caused by microorganisms such as bacteria and fungi. This technique is based on the simultaneous action of a light source and a photosensitizing agent, in the presence of light, generates the singlet oxygen and reactive oxygen species to interact with cellular components and promote cell death of these microorganisms. This study aimed to evaluate the action of TFDa exploring silver nanoparticles (with an average size of 13 nm) and riboflavin molecules (157 mM) in conjunction with an LED (Light Emitting Diode) with a wavelength in the blue ($\lambda = 455 \pm 20\text{nm}$) on *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The strains of *S. mutans* were subcultured in BHI (Brain Heart Infusion) and incubated in bacteriological incubator at 37 ° C in an atmosphere of 5% CO₂ for 48 h and the inocula of *P. aeruginosa* were grown and stored in TSA (Tryptic Soy Agar) in the presence of O₂ at 37°C for 24 hours. After the incubation time, colonies of microorganisms were suspended in Phosphate Buffered Saline (PBS) at a density of 1x10⁷ colony forming units (CFU)/mL. The *Candida albicans* cultures were grown in SAB + Y (Sabouraud Dextrose Agar enriched with yeast extract). Incubation was carried out at 37°C temperature for 24 hours. Then, suspensions were prepared with a concentration of 5x10⁶ cells/mL, corresponding to 0.5 on the McFarland turbidity scale. The experiment was divided into twelve groups - a control group, the only group with treatment with light (L), treatment with riboflavin (Rb), use of silver (Ag) and NPsAgRb + L system. After the treatment was carried out serial dilutions and the plates incubated at 37°C for 24 hours for bacteria and 48 hours for *Candida* sp. At the end it was performed CFU counts / ml of both microorganisms. The results were submitted to descriptive statistical analysis. The reduction of CFU/mL was statistically significant in cultures of *S. mutans* to 3 logs reduction in the number of viable cells after 6 minutes of irradiation ($p < 0.05$). The photodynamic inactivation against *P. aeruginosa* was no statistically significant after treatment ($p > 0.05$). The same was observed in cultures of *C. albicans* ($p > 0.05$), it was concluded that the use of nanoparticles next to the photosensitizer was effective against Gram-positive bacteria.

Keywords: Antimicrobial Photodynamic Therapy, Silver Nanoparticles, Riboflavin, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática do princípio que norteia a Terapia Fotodinâmica (TFD). O efeito terapêutico (necrose e/ou apoptose causadas pela ação de oxigênio singleto formado) somente se pronunciará caso haja ação conjunta de luz de comprimento de onda adequado, de um cromóforo (fotossensibilizador) e de oxigênio em seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$). 4
- Figura 2 – Diagrama de Jablonski – Esquema de transferência de elétrons pelos mecanismos tipo I e tipo II com produção de oxigênio singleto, ânions superóxidos e hidroxilas. 6
- Figura 3 – Estrutura da sulfadiazina de prata 10
- Figura 4 – Mecanismos de ação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata. As nanopartículas podem interagir com a parede celular bacteriana proporcionando lise, podem interagir com a fita de DNA inibindo a sua replicação, bem como interagir com os ribossomos inibindo a síntese de proteínas 11
- Figura 5 – Emissão de fluorescência espectral, $\lambda_{\text{ex}}= 502$ nm para sensor de oxigênio singleto. Riboflavina em água, prata sem revestimento com pectina e prata com revestimento com pectina e riboflavina. 13
- Figura 6: Esquema de excitação dos elétrons por uma onda eletromagnética em nanopartículas, gerando uma nuvem de elétrons na condução da nanopartícula, a qual é conhecida como oscilação dos plasmons em uma esfera.
- Figura 7: Estrutura da riboflavina com o sistema de anéis isoaloxazina e cadeia ribitol. 16
- Figura 8 – Morfologia da parede celular de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (adaptado de Tortora, 2012). 18

- Figura 9 – Esquema da síntese das nanopartículas de prata revestidas com pectina. Apresenta a mudança de coloração (do incolor, passando ao amarelo pálido, até o amarelo mais forte, porém transparente) observada durante o processo. 29
- Figura 10 – Esquema representativo da diluição seriada. A diluição ocorreu de 1:10 à 1:10⁻⁵ 33
- Figura 11 –Esquema do plaqueamento após diluição seriada (A e B). 34
- Figura 12: Esquema das placas de petri após as 24h em estufa para contagem das UFCs. 34
- Figura 13: Espectro de absorção no UV-Vis das nanopartículas de prata revestidas com pectina. 36
- Figura 14: Micrografia obtida por MET das nanopartículas de prata obtidas pelo método de síntese com revestimento com pectina. Em (A), nanopartículas esféricas, apresentado forma e tamanho quase uniforme e com diâmetro médio de 12 nm. Em (B) amostra sem revestimento com pectina, observando forma e tamanho variados das nanopartículas. 37
- Figura 15: Espectro de absorção no UV-Vis da riboflavina. 38
- Figura 16: Material utilizado para diluição seriada (a). B, semeadura de micro-organismos após tratamento na Placa de Petri com meio de cultura. C, Placa de Petri com unidades formadoras de colônia para contagem. 38
- Figura 17: Fração de sobrevivência do *S. mutans*, em A, e da *P. aeruginosa*, em B após tratamento com LED $\lambda=455 \pm 20\text{nm}$, densidade de potencia 90 mW/cm² explorando nanopartículas de prata e riboflavina. 38
- Figura 18: Resultado do espectro de absorção, em 412 nm, do sistema NPs Ag – riboflavina absorvido pelas células de *Streptococcus mutans* e

Pseudomonasaeruginosa. 41

Figura 19: Tratamento das células de leveduras em exposição ao LED usando nanopartículas de prata e riboflavina (A); (B): após tratamento e diluição seriada, sementeação dos micro-organismos em placas de petri; (C): crescimento fúngico após 48 horas de incubação e posterior contagem das UFC. 41

Figura 20: Fração de sobrevivência da *Candida albicans* diante do tratamento com associação entre NPsAg riboflavina e TFDa 42

Figura 21: Análise estatística dos 11 grupos tratados após 10 minutos com o sistema NpAg+Rb+L10. 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Isolados depositados na Micoteca URM – UFPE utilizados para o experimento *in vitro* na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. 31
- Tabela 2 – Grupos para avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana frente bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.e *Candida albicans* 31

LISTA DE ABREVIATURAS

TFDa	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
NPs	Nanopartículas
Rb	Riboflavina
Ag	Prata
<i>S. Mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
L	Luz
LED	Light Emitting Diode
FS	Fotossensibilizador
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
HpD	Hematoporphyrin derivate
SnCe6	Sn (IV) clorina e6
IgG	Imunoglobulina
ALA	5- ácido aminolevulínico

LISTA DE SÍMBOLOS/SIGLAS

%	Percentagem
°C	grau Celsius
cm ²	centímetro ao quadrado
mm	Milímetro
g	Gramma
mg	Miligramma
mL	Militro
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	4
2.1.1 Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica	5
2.2 Nanopartículas de Prata	9
2.3 Ressonância Localizada de Plasmons	13
2.4 Fotossensibilizadores	14
2.4.1 Riboflavina	15
2.5 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	17
2.5.1 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos	18
2.5.2 <i>Streptococcus mutans</i>	20
2.5.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.6 Leveduras de <i>Candida</i> spp.	24
2.6.1 <i>Candida albicans</i>	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Síntese das Nanopartículas de Prata revestidas com Pectina	29
4.1.1 Irradiação	30
4.2 Fotossensibilizador	30
4.3 Linhagens bacterianas	30
4.4. <i>Candida albicans</i>	30
4.4 Desenho do experimento	31
4.5 Análise estatística	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÕES	46
7 REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE A – ARTIGO	58

1 INTRODUÇÃO

As infecções têm sido uma das principais causas de morbidade e mortalidade ao longo da história da humanidade promovida principalmente por bactérias e fungos. Encontram-se por toda parte, na água, no solo e, inclusive, em nossos corpos. Contudo, o uso de próteses, pacientes imunodeprimidos, usos de antibióticos de largo espectro, pode alterar a relação parasito/hospedeiro, passando a serem patogênicos (Tabah et al., 2012).

A cavidade oral humana é colonizada por uma variedade de micro-organismos, dentre eles o *Streptococcus mutans*, uma bactéria Gram-positiva, que tem uma forte associação com a cárie dentária. A cárie dentária pode ser definida como uma doença infectocontagiosa, que determina, inicialmente, uma dissolução localizada dos componentes inorgânicos dos dentes, devido aos ácidos orgânicos provenientes do metabolismo bacteriano dos carboidratos fermentáveis da dieta. Com a progressão do processo, ocorre a dissolução dos minerais da dentina e desgaste total da polpa dentária. A redução de micro-organismos patogênicos da superfície dental é um dos principais fatores envolvidos na prevenção e controle das lesões de cárie (DeRosa; Crutchley, 2002).

Outro micro-organismo que faz parte da microbiota da cavidade oral é a *Candida* sp. com maior prevalência da *Candida albicans*. Esses micro-organismos na presença de fatores predisponentes como próteses removíveis mal-adaptadas e mal higienizadas, mudanças na microbiota bucal, feridas crônicas de mucosa, uso sistêmico prolongado de antibióticos, corticoterapia, uso de imunossupressores e doenças que causam imunodeficiência, como a AIDS, ocasiona o desenvolvimento de infecções na mucosa oral, chamada de candidíase oral ou ainda candidose, uma infecção altamente dolorosa que pode comprometer o indivíduo ao fazer a ingestão de alimentos por exemplo (PAZ-CRISTOBAL et al., 2014).

A *Pseudomonas aeruginosa*, é uma bactéria muito relacionada ao ambiente hospitalar que frequentemente coloniza pacientes queimados. Sua patogenicidade deve-se principalmente à resistência adquirida em relação aos antibióticos tornando difícil sua erradicação (Hazrati e col, 2010).

Com a descoberta dos antibióticos na década de 40 e sua introdução no tratamento dessas infecções, este problema tendeu a desaparecer. No entanto, os micro-organismos têm se adaptado a esses medicamentos – gentamicina, tobramicina, neomicina, bacitracina entre

outros -contrariando os avanços alcançados no tratamento de infecções (Tavares, 2000, Onaolapo J, 1994).

Diante deste cenário, novas modalidades de tratamento necessitam ser incorporadas no mercado como coadjuvante, sendo assim, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é uma alternativa promissora no mercado(Denis et al., 2011).

Essa técnica consiste na associação de um fotossensibilizador, e uma fonte de luz em comprimento de onda adequado, tendo como objetivo provocar morte celular através da produção de oxigênio singleto e espécies reativas de oxigênio que são altamente citotóxicos as células bacterianas e fúngicas (Caminos; Durantini, 2006).

A mesma vem se tornando uma ferramenta importantepor oferecer algumas vantagens em relação a agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte microbiana é rápida, diminuindo a necessidade de manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos períodos, como no caso do uso de agentes antimicrobianos. Em segundo lugar, pode ser seletiva, ou seja, nem o fotossensibilizador nem a luz empregados isoladamente possuem ação antimicrobiana. Finalmente, a resistência bacteriana também é improvável, porque a morte bacteriana não está ligada à mediação de radicais químicos. Outro aspecto importante é o caráter traumático da terapia fotodinâmica, pois não há necessidade de movimentação no local a ser administrado o tratamento e não causa dor nem efeitos colaterais. Além disso, não apresenta efeito citotóxico, diferentemente do que é observado em antibióticos e antifúngicos (Johnson, 2006).

Por estas razões, a terapia fotodinâmica antimicrobiana pode ser uma alternativa interessante na redução microbiana e, conseqüentemente, importante na prevenção e tratamento das lesões cariosas, infecções por bactérias e leveduras. Sendo assim, contribuições teórico-práticas nesta linha de pesquisa são importantes, não só para aumentar o acervo de conhecimentos científicos, mas também para fornecer respaldo científico à democratização do acesso aos usuários da terapia com laser (Baptista et al., 2012).

Como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana necessita de um fotossensibilizador para produção de oxigênio singleto e espécies reativas de oxigênio, diversos fotossensibilizadores com finalidade antimicrobiana são estudados e testados (Zhang et. al., 2008). A riboflavina (vitamina do complexo B2), possui características propícias ao seu uso, pois apresentam estabilidade biológica, eficiência fotoquímica, seletividade pela célula alvo e mínimo efeito tóxico às células normais (Rivlin et al., 2009). Outra característica importantedo fotossensibilizador está a banda e intensidade de absorção, bem como sua eficiência na

produção de espécies reativas de oxigênio, e o tempo de vida no estado tripleto (Ahmad et al., 2004).

Além disso, nanopartículas de prata podem ser associadas ao fotossensibilizador em terapia fotodinâmica, pois essas nanopartículas em interação com moléculas do agente fotossensível aumentam a produção de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio, por um mecanismo conhecido como ressonância localizada de plasmons (Melo et al., 2012). Nesse processo as nanopartículas metálicas irradiadas gera uma oscilação coletiva dos elétrons do metal, o qual chamamos de ressonância localizada de plasmons, induzindo alterações no campo elétrico próximo a nanoestrutura (Haes; Duyne, 2002).

Neste trabalho, foi utilizado um protocolo de inativação fotodinâmica explorando nanopartículas de prata em associação com moléculas de riboflavina sobre micro-organismos cariogênicos (*Streptococcus mutans*), bactéria do grupo das Gram- negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) e leveduras do gênero *Candida albicans* associando e fonte luminosa, um LED de emissão azul.

Este trabalho consiste de cinco capítulos. O capítulo 1 descreve o estado da arte em relação à TFDa e seus mecanismos de ação, nanopartículas de prata, fotossensibilizadores e micro-organismos patogênicos aos seres humanos.

O capítulo 2 refere-se ao objetivo geral e específicos desta dissertação.

As técnicas utilizadas na metodologia – como síntese das nanopartículas de prata e sua caracterização, fotossensibilizador utilizado, desenho do experimento e desenvolvimento do tratamento aos micro-organismos testados (Capítulo 3 – Materiais e Métodos).

O capítulo 4 refere-se à apresentação e discussão dos resultados.

Conclusão (Capítulo 5).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDa)

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, também conhecida como TFDa, do termo em inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*, constitui-se uma modalidade de tratamento para infecções fúngicas, bacterianas, virais. Tal técnica se baseia por um princípio de funcionamento, que envolve a ação conjunta de um fotossensibilizador, o qual absorve luz em comprimento de onda adequado e com certa eficiência, luz e oxigênio em seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$), como mostrado esquematicamente na Figura 1, induzindo a inviabilização do micro-organismo por dois mecanismos, apoptose e necrose. A combinação desses três elementos induz a produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (OH^-), induzindo assim a morte celular via necrose (por inviabilização direta do tecido ou por danos causados a sua vasculatura) e/ou apoptose (processo de morte celular programada) (Machado, 2000). Tal princípio foi reportado pela primeira vez por Oscar Raab em 1900. Ele observou a morte de micro-organismos quando expostos à luz solar, na presença do corante acridina (Camino; Durantini, 2006).

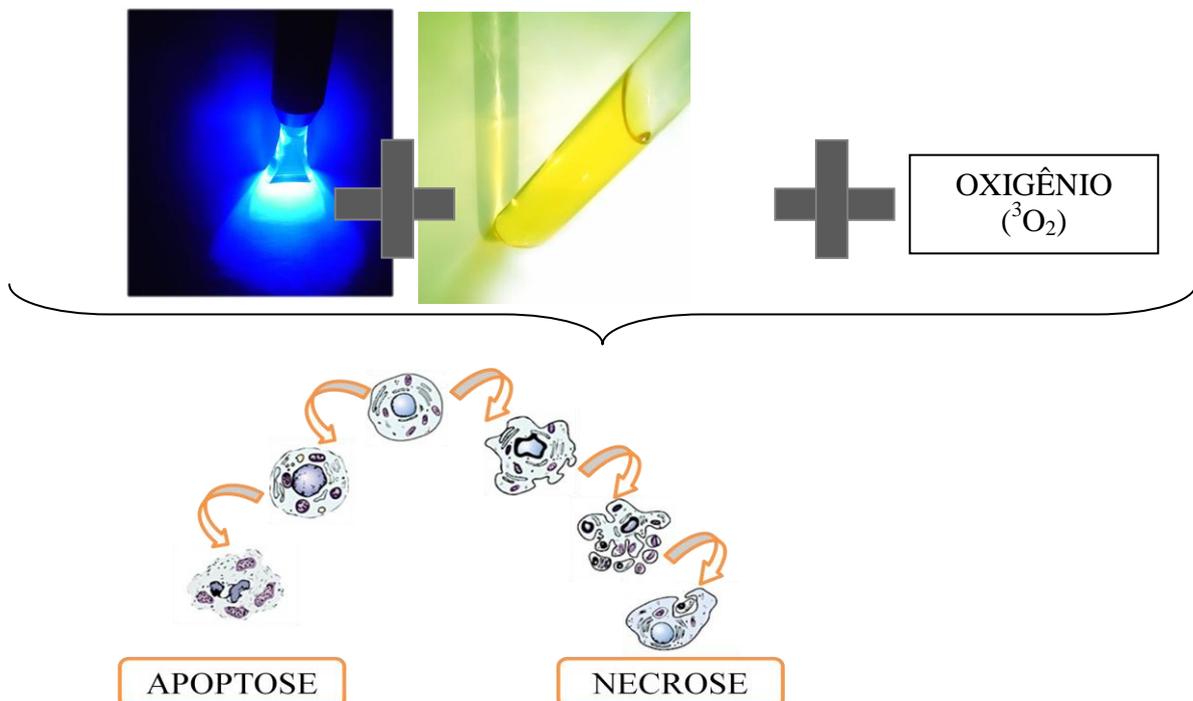


Figura 1. Representação esquemática do princípio que norteia a Terapia Fotodinâmica (TFD). O efeito terapêutico (necrose e/ou apoptose causadas pela ação de oxigênio singlete formado) somente se pronunciará caso haja ação conjunta de luz de comprimento de onda adequado, de um cromóforo (fotossensibilizador) e de oxigênio em seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$).

Esta forma de tratamento teve início a mais de 4.000 anos, quando os egípcios ingeriam plantas contendo psoralenos e se expunham à luz solar para tratar doenças como o vitiligo (Simplício et al., 2002). No início do século XX, Raab e Von Tappeiner (1900), constataram acidentalmente, durante um estudo da ação da acridina sobre culturas de paramécios, expostos a luz intensa (neste caso a luz solar), que estes organismos morriam sob essas condições.

Von Tappeiner e Jesionek na década de 1910 utilizaram a aplicação tópica do corante eosina e exposição de uma luz branca para o tratamento de tumores de pele. Juntamente com Jodlbauer, Von Tappeiner demonstrou a presença de oxigênio nestas reações de fotossensibilização onde introduziram o termo “Ação Fotodinâmica” para descrever este fenômeno. Em 1924, Policard relata a fluorescência de tumores, induzidos experimentalmente, com o auxílio de uma lâmpada de Wood e porfirina. Em 1942, Auler e Benzer, demonstram a formação de necrose tumoral após uso de porfirina e luz. Na década de 70, os estudos se voltaram para a utilização desta terapia para bactérias e fungos (Schackley, 1999).

Nos anos 90, a microbiologia passou a utilizar-se da terapia fotodinâmica, a qual ficou conhecida como Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, como alternativa de tratamento para bactérias que ocasionalmente adquirem resistência aos antibióticos tradicionalmente utilizados, e a partir de 1992, Wilson e colaboradores, utilizaram a terapia fotodinâmica em bactérias que compõem a microbiota da cavidade oral (Johnson, 2006).

2.1.1 Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica

A molécula do fotossensibilizador ao absorver energia pela irradiação de uma fonte de luz em comprimento de onda adequado, essas moléculas saíram do seu estado fundamental passando a um estado de maior energia, o estado excitado. Em seguida, estas moléculas podem retornar ao seu estado fundamental, perdendo energia em um processo conhecido pela emissão de fluorescência, ou passar por um sistema e chegar a um estado intermediário de energia, doando energia ou carga. Nesse estado intermediário, as moléculas podem interagir com o oxigênio, resultando em espécies altamente reativas de oxigênio, como é o caso do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), e os radicais livres, hidroxilas e ânions superóxidos (Calzavara-Pinton, 2006).

Há dois mecanismos principais de atuação da TFDa; o tipo I e o tipo II, de interação com as biomoléculas, como evidenciado na Figura 2.

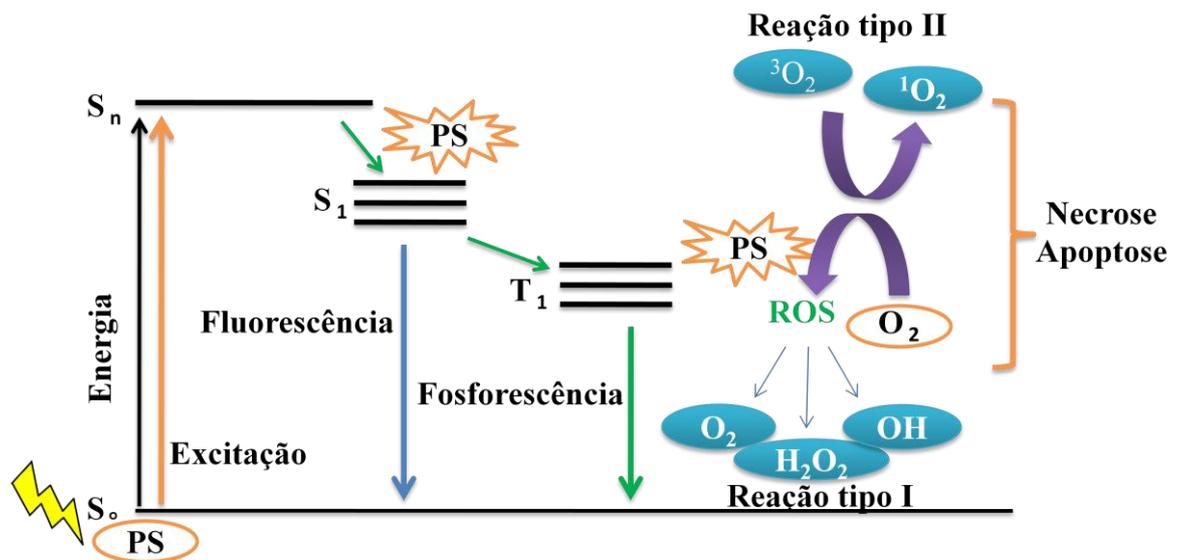


Figura 2 – Diagrama de Jablonski – Esquema de transferência de elétrons pelos mecanismos tipo I e tipo II com produção de oxigênio singleto, ânions superóxidos e hidroxilas.

O mecanismo tipo I envolve a transferência de elétrons ou capturação de átomos de hidrogênio entre o fotossensibilizador no estado de maior energia e o O_2 , gerando radicais livres altamente reativos (ROS) tais como peróxidos, ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, que agem na membrana celular desses micro-organismos (Amaral et al., 2010).

Já o mecanismo tipo II ocorre transferência de energia. Ou seja, o fotossensibilizador no estado excitado de energia (T_3), transfere energia para a molécula de oxigênio, cujo estado fundamental (3O_2), gerando uma espécie de oxigênio altamente reativa, conhecido como oxigênio singleto (1O_2), que pode interagir com um grande número de substratos biológicos, induzindo danos a parede celular de bactérias, fungos, etc (Rezusta et al., 2012).

O oxigênio singleto é o fator intermediário no processo fotodinâmico, apresentando um papel importante na inativação celular. Em sistemas biológicos, o oxigênio singleto possui tempo de vida extremamente baixo, cerca de aproximadamente $0,3 \mu s$, em função disso, seu raio de ação é muito reduzido. Apesar disso, o 1O_2 exerce fortes efeitos citotóxicos aos componentes moleculares da célula, tais como as suas organelas, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, DNA, mitocôndrias, tendo como resultado a morte celular. Por causa da difusão limitada de 1O_2 em decorrência da meia vida curta, a reação leva a uma resposta localizada, o qual a torna ideal para aplicação em infecções localizadas, sem afetar outras moléculas ou células. Além disso, a reação para imediatamente após a luz ser desligada (Biel et al., 2011).

O oxigênio singlete é o principal agente citotóxico responsável pelos efeitos biológicos do processo de foto-oxidação. Então o processo da terapia fotodinâmica antimicrobiana é, geralmente, mediada pela reação tipo II, principal via de danos às células microbianas (Chen et al., 2007).

Durante o processo de fotossensibilização, pode ocorrer apoptose ou necrose celular, ou os dois, sendo que na maioria dos casos ocorre apoptose. A morte celular pode ser causada por dano à membrana, liberação de enzimas lisossomais, dano ao DNA e inibição do metabolismo energético. O alvo crítico pode ser distinto em diferentes células, ainda que seja empregado o mesmo fotossensibilizador (Issa M C A, Manela-Azulay M., 2010).

Em decorrência do estresse sofrido pela célula na TFD, há alterações no metabolismo de cálcio e lipídeos. Muitas das respostas celulares estão centradas na mitocôndria. Esses efeitos levam à indução de apoptose via mitocôndria envolvendo caspases e liberação de citocromo C (Paz-Cristobal, 2014). A liberação de citocromo C está associada à perda do potencial de membrana mitocondrial, e a ativação de caspases é necessária para o aparecimento da morfologia apoptótica, mas não para a perda do potencial de membrana.

Porém, apenas a liberação de citocromo C já é suficiente para iniciar uma resposta apoptótica. Após a liberação do citocromo C pela mitocôndria, há a ativação das caspases e subsequente ativação de vias para estágios finais de apoptose. Na cascata apoptótica, o passo após ativação da caspase é a clivagem de numerosos fatores protéicos, os quais são, normalmente, envolvidos na manutenção da estrutura celular, incluindo reparo do DNA (Paz-Cristobal, 2014).

Ball et al. (1998) avaliaram, *in vitro*, o dano ocasionado pela TFD utilizando um derivado catiônico do azul de metileno e luz proveniente de lâmpada halógena em células leucêmicas P388. O comprimento de onda de 610 e 700 nm, a 5 mW/cm² e 1,5 J/cm², associado ao uso da concentração de 0,02 µM e 0,05 µM do fotossensibilizador, seguido pela aplicação de luz por três minutos, resultou em 50% e 90% de diminuição das células sobreviventes, respectivamente, em relação aos controles.

Os diferentes tipos de laser também acarretam diferentes tipos de morte celular. Miyamoto, Umebayashi e Nishisaka (1999) avaliaram a ação da TFD em células HeLa, utilizando HpD por uma hora, na concentração de 1 µg/mL e lasers contínuo e pulsado, na dosimetria de 1 a 10 J/cm². Ao utilizarem o laser pulsado, a viabilidade das células foi maior, e a morte ocorreu por apoptose três a seis horas após o tratamento. Já o laser contínuo apresentou ação citotóxica maior que o pulsado, levando as células à necrose.

O tempo de interação do fotossensibilizador com o micro-organismo também deve ser considerado. Um fotossensibilizador que é absorvido lentamente deve primeiro, causar dano na parede celular, enquanto efeitos como quebra de cadeia de ácidos nucleicos ocorrerão, aparentemente, em tempos de incubação mais longos (Wainwright, 1998).

Rovaldi et al. (2000) investigaram, *in vitro*, a ação da TFDa sobre bactérias da cavidade oral. Utilizando um laser com comprimento de onda de 662 nm, 100 mW/cm² durante 150 minutos e dois derivados da clorina, o Ce6 e Ce6-5K, este último conjugado, verificaram que o tratamento das células com luz ou com o fotossensibilizador de forma isolada não afetou a viabilidade das mesmas. Quando empregados em conjunto, ocorria atividade bactericida. Segundo os autores, o Ce6 tem atividade contra bactérias Gram-positivas e o Ce6- 5K, em combinação com a luz, eliminou tanto bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas.

Embleton et al. (2002) verificaram, *in vitro*, a seletividade da TFDa na inativação de dois micro-organismos Gram-positivos. O fotossensibilizador utilizado foi uma clorina, e o laser He-Ne, 35 mW, 632,8 nm. A TFDa foi capaz de inativar o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina com inativação de 99,1% deste, mas não afetou o *Streptococcus sanguinis*. Observaram, também, que o fotossensibilizador conjugado a uma imunoglobulina G (IgG), mostrou-se mais eficaz contra o *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente do que o fotossensibilizador não-conjugado. A exposição a 8,4 J/cm² e 25 µg/mL eliminou 99,7% dos isolados de *Staphylococcus aureus*. Já a dosimetria de 21 J/cm² em cinco minutos de exposição e 6,9 µg/mL de IgG-SnCe6, acarretou inativação de 99,99% dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

Lee et al. (2004), ao estudarem a TFDa com LED na taxa de fluência de 100 mW/cm² e ALA (5-ácido aminolevulínico), verificaram que nenhuma célula viável de *Pseudomonas aeruginosa* foi detectada após o tratamento com ALA a 20 mM seguido por aplicação do LED a 120 J/cm².

Krespi et al. (2005) avaliaram a ação da TFDa, *in vitro*, sobre as bactérias orais *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*, associadas à periodontite. Como material utilizaram uma lâmpada de luz halógena, potência de 250 W e comprimento de onda de 650 nm, cuja taxa de fluência foi de 50 mW/cm², o azul de metileno como FS e com exposição de um minuto. Como resultado, foi observado uma taxa de inativação de 50% na concentração de 0,075% e de 0,1% de azul de metileno com exposição à luz por um minuto.

Lambrechts, Aalders e Van Marle (2005) avaliaram a ação da TFDa utilizando uma porfirina catiônica, a TriP e lâmpada halógena (luz branca) 30 mW/cm² sobre cultura de *C.*

albicans. A organela-alvo era a membrana citoplasmática. Os seguintes eventos foram observados: antes da irradiação, a TriP liga-se à parede da *C. albicans* e, após irradiação, a membrana celular é danificada e torna-se permeável a ela. Com o dano letal à membrana instalado, grande quantidade de TriP penetra na célula. De acordo com os autores, após a aplicação de uma dosimetria de $5,4 \text{ J/cm}^2$, 99,8% das células foram foto-inativadas.

Bastos et al., 2013, analisaram a ação da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT) com Ftalocianina cloro-alumínio (FC-CIAI) sobre os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -) e *Staphylococcus aureus* (Gram +). As aplicações foram realizadas com laser de comprimento de onda de 670 nm (vermelho), com doses de 35 J/cm^2 , $P = 100 \text{ mW}$. Os testes observaram que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais com *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Foi possível também observar uma ação bactericida das substâncias testadas, encorajando a realização de análises mais detalhadas para averiguar se esse resultado se mantém com biofilmes mais maduros e se é mais eficaz com substâncias outras associadas à Ftalocianina Cloro-Alumínio.

2.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Com os avanços na área da tecnologia e desenvolvimento de novos nanomateriais, têm-se descoberto novas propriedades eletrônicas, ópticas e catalíticas únicas para aplicações nanotecnológicas de materiais em escalas nanométricas (Santos, 2011).

O estudo em nanotecnologia permite a construção e manipulação de partículas em tamanhos nanométricos. O nanômetro, a unidade de medida utilizada, equivale a 1 bilionésimo do metro ($1,0 \times 10^{-9} \text{ m}$). O termo nanotecnologia foi usado pela primeira vez em 1959, pelo físico Richard Feynman (vencedor do prêmio Nobel de física em 1965) em uma palestra proferida durante a reunião anual da Sociedade Americana de Física no Instituto de Tecnologia da Califórnia (Caltech). O referido pesquisador descreveu um campo sobre o qual poucos estudiosos tinham pensado, e muito menos investigado. Feynman apresentou a ideia de manipular e controlar coisas numa escala extremamente pequena através da construção e modelagem da matéria átomo a átomo.

Porém, o termo "nanotecnologia" foi definido pelo Professor Norio Taniguchi da Universidade de Ciência de Tóquio, num artigo de 1974 intitulado "Sobre o conceito básico de Nano-tecnologia" da seguinte forma: "Nanotecnologia consiste principalmente em processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula". No seu artigo, Taniguchi desenvolveu as ideias de Feynman em mais detalhe

afirmando que “nanotecnologia é a tecnologia de produção de materiais em escala nanométrica a partir de um material de maior tamanho. As ideias básicas neste campo foram popularizadas e exploradas em maior profundidade na década de 1980, quando K. Eric Drexler promoveu o significado tecnológico de fenômeno e dispositivos à nanoescala através de discursos e dos livros *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology* (1986) e *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*. (Choi; Mody, 2009).

Na antiguidade, os romanos se tornaram nanotecnologistas sem saber, quando eles misturavam o cloreto de ouro com vidro derretido para fazer vitrais. Esse processo resultava em partículas de ouro em tamanhos nanométricos os quais, em função do tamanho, quando expostos a luz, refletia cores diferentes de outras vidrarias. Evidentemente que naquela época os romanos não tinham ideia que se tratava de partículas nanométricas. O mais conhecido deles é a taça de Lycurgo, cuja a presença de nanopartículas de ouro e prata com diâmetro médio de 40 nm, quando excitadas pela luz, atribui a taça mudanças de coloração. Essas nanopartículas absorvem e espalham luz verde ou azul, sendo assim, quando a luz é refletida na taça ela apresenta uma coloração esverdeada, enquanto se colocada dentro da taça, apresentará uma coloração avermelhada (Clement; Jarrett, 1994).

No final da década de 80 descobriu-se que nanopartículas metálicas, como as de prata, têm propriedades diversas - ópticas e catalíticas, por exemplo - com campo de aplicações em sensores, conversores de energia e chips eletrônicos, entre outros, exibindo propriedades importantes não observadas em materiais em sua forma volumétrica. As propriedades físicas passaram a ser influenciadas pela relação superfície/volume. Sendo assim, diante do interesse científico referentes às nanopartículas, novos estudos foram feitos, e observaram que as nanopartículas de prata tinham ação antimicrobiana (Zang et al., 2008).

O emprego da prata e de seus compostos na medicina se deve à atividade antibacteriana e antifúngica dos íons Ag^+ . O fármaco denominado sulfadiazina de prata (Figura 3), é muito utilizado em pacientes queimados para evitar e tratar infecções. Este composto possui amplo espectro de atividade, sendo muito eficiente contra *Pseudomonas aeruginosa*, sendo um dos principais organismos responsáveis pelas infecções decorrentes de queimaduras (Sousa, et al.; 2013).

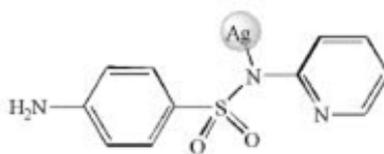


Figura 3. Estrutura da sulfadiazina de prata.

Dentre as nanopartículas, as de prata são de fundamental importância, pois apresentam um amplo espectro de atuação que inclui atividade antimicrobiana frente micro-organismos em geral, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e vírus. A atividade antifúngica e antibacteriana das nanopartículas de prata já foi relatada por diversos pesquisadores (Kim et al., 2009; Falkiewicz-Dulik & Macura, 2008; Akhavan & Ghaderi, 2009).

A ação das nanopartículas de prata podem ser bem observadas na Figura 4 de acordo com os autores Morones, J.R. et al. (2005), Shrivastava, S. (2007), Yang, W.J. et al. (2009), Lok, C.N. et al. (2007), Yamanaka, M. et al. (2005), Jung, W.K. et al. (2008).

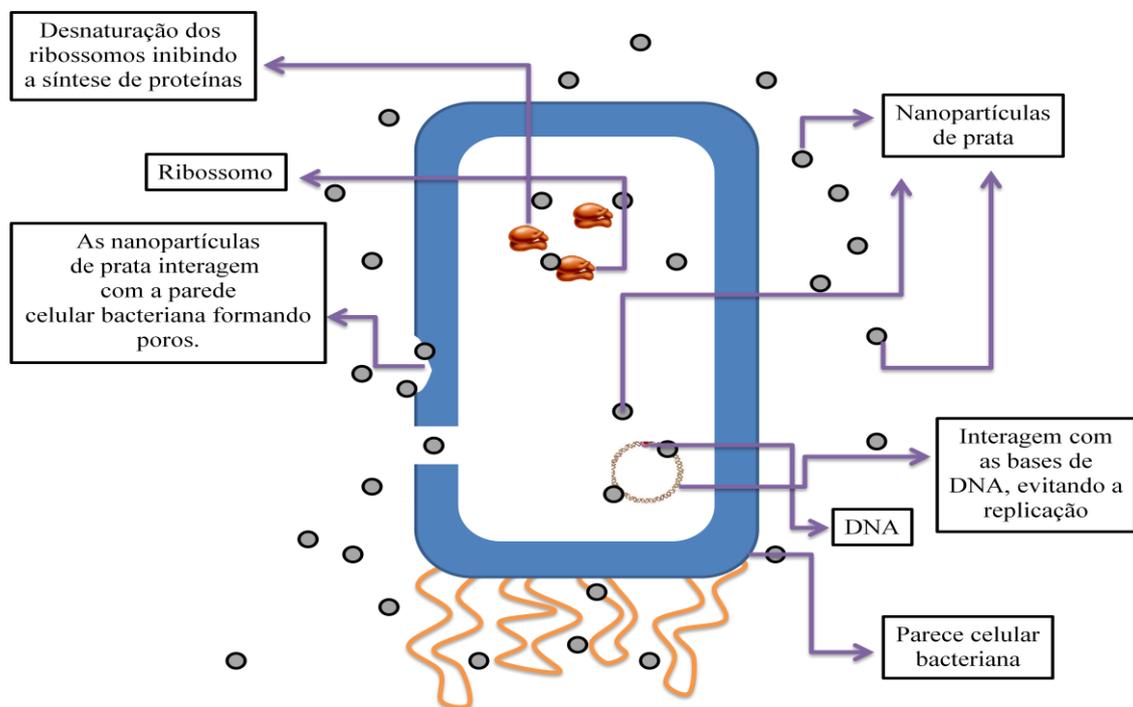


Figura 4: Mecanismos de ação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata. As nanopartículas podem interagir com a parede celular bacteriana proporcionando lise, podem interagir com a fita de DNA inibindo a sua replicação, bem como interagir com os ribossomos inibindo a síntese de proteínas.

Sua interação ocorre com a membrana celular causando danos a parede celular e, no interior destas células, interagem com o DNA provocando a sua desnaturação e impedindo a divisão celular (NETO et al., 2008). Agem também na superfície da membrana celular e interferem de forma negativa em suas funções de permeabilidade. Pode-se afirmar que a ligação destas partículas na célula depende da área superficial disponível para a interação (Marcato, et al., 2012, Morones et al., 2005).

Em alguns países é determinada por lei a necessidade de administrar nos olhos de crianças recém-nascidas soluções aquosas contendo sais de prata para evitar infecções oculares neonatais. A administração de íons de prata como medicamento é vantajosa, pois esses íons, geralmente, não apresentam efeitos adversos em seres humanos. De fato, o uso de compostos de prata como medicamento é muito antigo e vale destacar que seus sais, como o AgNO_3 , tem sido utilizados durante séculos como agentes antimicrobianos e que o uso destes, diminuiu drasticamente quando os antibióticos foram introduzidos nas práticas médicas. Entretanto, em decorrência do aumento de casos envolvendo resistência aos antibióticos, os compostos de prata têm ganhado espaço. Outra importante aplicação de compostos de prata na medicina é no revestimento de cateteres, válvulas cardíacas e outros dispositivos médicos com polímeros impregnados de prata a fim de retardar o desenvolvimento de biofilme microbiano (Silver, 2003).

Em 2008, Hernández-Sierra et al., estava observando culturas de *Streptococcus mutans* frente a nanopartículas de prata, ouro e zinco. Durante o estudo, foi possível observar que o ouro e o zinco não foram capazes de inativar cepas de *S. mutans*, porém as nanopartículas de prata apresentaram uma diferença estatística significativa apresentando um MIC de $4.86 \pm 2.71 \mu\text{g}/\text{m}$ a esse micro-organismo.

O único efeito negativo conhecido para o ser humano por uso da prata é a *Argyria*, um irreversível escurecimento da pele causado por uso contínuo e prolongado tratamento com prata. Este envenenamento pela prata, porém, só ocorre com partículas em escala micrométrica e uso prolongado ao longo de anos, pois estas obstruem as membranas celulares. Por outro lado, as nanopartículas em tão baixa concentração podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos a organismos superiores, haja vista que a concentração efetiva para atuação contra micro-organismos é de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a concentração tóxica a seres humanos é de 10 mg.L^{-1} (Berni; Ribeiro; Zucolotto, 2008).

Melo et al., (2012), analisando o uso das nanopartículas de prata e fotossensibilizadores, observou que essas nanopartículas quando próxima a um agente fotossensível induzia a uma maior geração de oxigênio singlete. Essa descoberta possibilitou uma nova modalidade no uso das nanopartículas de prata, ampliando a exploração suas utilidades.

A síntese das nanopartículas de prata foi através do método de revestimento com pectina. Como agente fotossensível, foi utilizado a riboflavina – uma vitamina do complexo B2. As NPsAg possuíam tamanho em torno de 13 nm e a riboflavina em uma concentração de $157 \mu\text{M}$. Durante os experimentos realizados, observaram uma geração de oxigênio singlete

com aumento em 28.5%. Esse fato também é em decorrência que fluoróforos perto de nanopartículas metálicas gera uma oscilação coletiva dos elétrons das nanopartículas, característica conhecida como ressonância localizada de plasmons. observado na Figura 5.

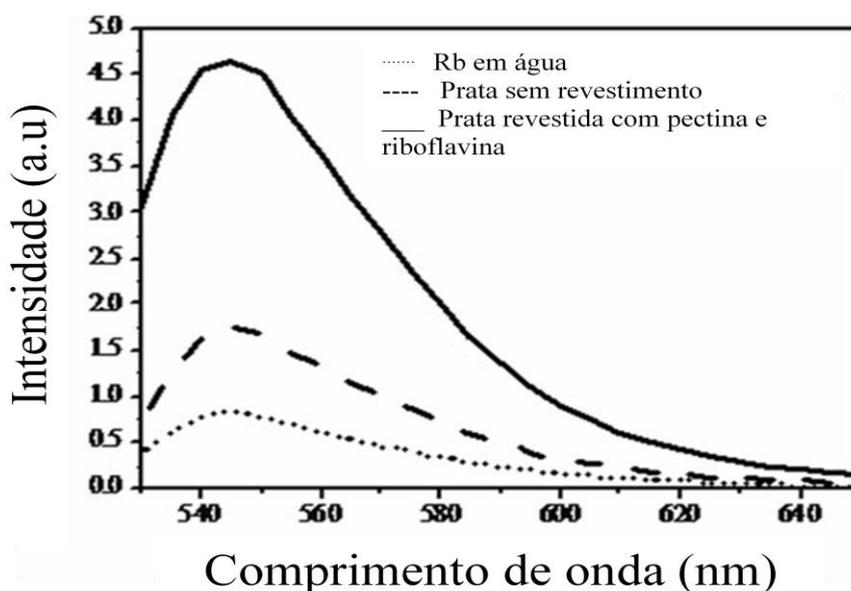


Figura 5: Emissão de fluorescência espectral, $\lambda_{ex}= 502$ nm para sensor de oxigênio singlete. Riboflavina em água (.....), Prata sem revestimento com pectina (---) e prata com revestimento com pectina e riboflavina (—) (Adaptado de Melo et al., 2012).

2.3 RESSONÂNCIA LOCALIZADA DE PLASMONS

Podemos entender um plasmon como onda referente a oscilação coletiva de elétrons de nanopartículas (Plasmons localizados) presentes em um meio (Xia.; Halas, 2005).

Na condição de ressonância associada à excitação de plasmons localizados, grande parte da energia do feixe de luz incidente na NP metálica é transferida para a oscilação dos elétrons. Sendo essa uma onda confinada à NP. (Prado et al., 2014).

Quando plasmon é formado, acontece uma separação de cargas elétricas na partícula, em função da oscilação coletiva dos elétrons. Em outras palavras, por períodos muito curtos de tempo, os elétrons acumulam-se mais em uma região da partícula do que em outra, conforme é ilustrado pela Figura 6 (Rycenga et al., 2011). O que induz mudanças significativas no campo externo próximo as partículas possibilitando o aumento da absorção por moléculas próximas as NPs, resultando em aumento de absorção (Zang et al., 2007), alteração de emissão fluorescente (Tang et al., 2005) e geração de oxigênio singlete (Melo et al., 2012).

Para se obter a condição de geração de plasmons localizados, parâmetros como material e tamanho das nanopartículas, composição do meio externo e comprimento de onda da radiação incidente são essenciais.

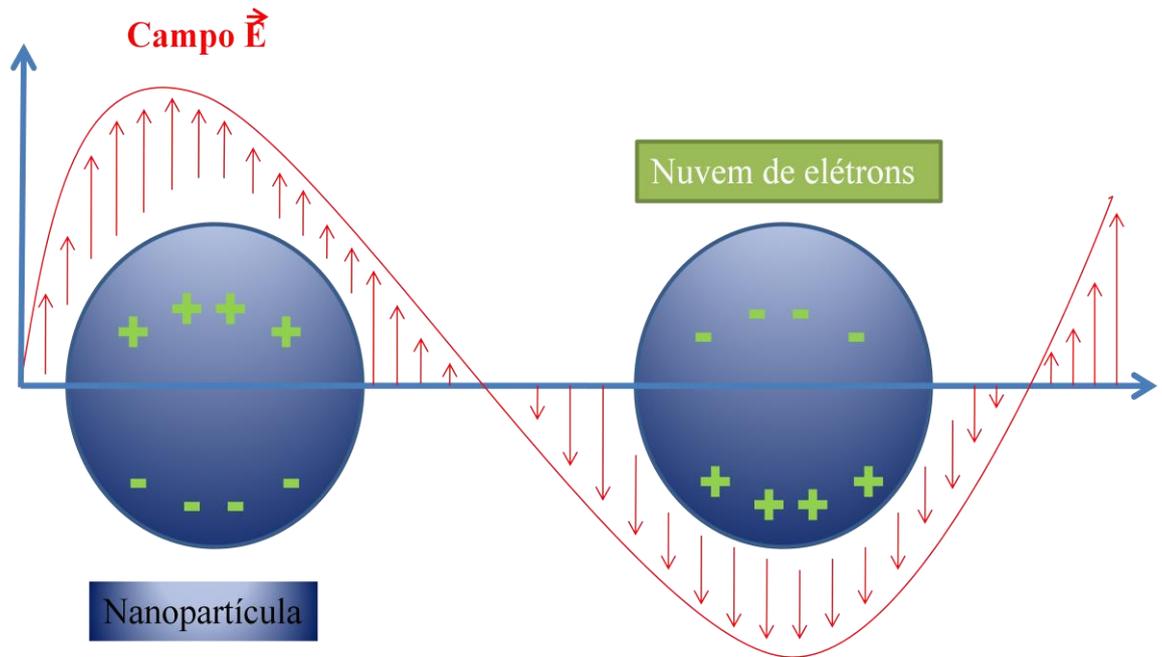


Figura 6: Esquema de excitação dos elétrons por uma onda eletromagnética em nanopartículas, gerando uma nuvem de elétrons na condução da nanopartícula, a qual é conhecida como oscilação dos plasmons em uma esfera.

2.4 FOTOSSENSIBILIZADORES

Fotossensibilizadores são moléculas com capacidade de absorver luz numa determinada região do espectro e transferir energia para outras moléculas. O interesse por sensibilizador vem sendo desenvolvidos em virtude do uso destas substâncias no tratamento de tumores e na fotoinativação de micro-organismos em diversos sistemas biológicos, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (Babstista et al., 2012).

As propriedades físico-químicas dos fotossensibilizadores e dos sistemas biológicos em que irão atuar são extremamente importantes para a eficiência do processo de fotossensibilização. A habilidade de um componente em absorver luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Outros requisitos são importantes para ser considerado ideal, dentre elas, não apresentar características tóxicas para as células do hospedeiro, apresentar toxicidade local apenas após a ativação da luz, permanecer em estado excitado por tempo suficiente para permitir a sua interação com as

moléculas vizinhas e produzir espécies citotóxicas capazes de causar morte celular (Correa; Rettore Junior; De Sousa, 2012).

Didaticamente os fotossensibilizadores são classificados em três gerações – primeira geração, segunda geração e terceira geração. Foram classificados assim, em relação a ordem de descoberta, bem como as alterações a que foram submetidos ao longo do tempo. Os fotossensibilizadores de primeira geração incluem as hematoporfirinas (Hp) e os derivados de hematoporfirinas (HpD) sendo os fotossensibilizadores mais utilizados na década de 70 através da terapia fotodinâmica. Os mais conhecidos são Photogem® (Timtec Corp., Newark, USA) e o Photofrin® (Dahl et al., 1989).

Os fotossensibilizadores de segunda geração são as ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas e as purpurinas, desenvolvidos em laboratório em decorrência das limitações das drogas de primeira geração. Esses fotossensibilizadores são sintetizados quimicamente e apresentam características que se assemelham a mais de um fotossensibilizador ideal, como por exemplo, o deslocamento do pico de absorção em comprimentos de onda maiores (650nm – 850nm), alta produção de oxigênio singlete, baixa acumulação tecidual, etc. (Hönigsmann et al., 2013).

Os fármacos de terceira geração correspondem aos fármacos de primeira e segunda geração, porém estão associados a sistemas como lipossomas, nanopartículas, micelas, e anticorpos conjugados (Maftoum-Costa et., 2008).

2.4.1 Riboflavina

A riboflavina (Rb) é uma vitamina do complexo B2, que foi isolada pela primeira vez pelo químico inglês Wynter Blyth no ano de 1879, porém não foi purificada. Esse estudo foi realizado no leite da vaca, onde era observado um pigmento amarelado o qual na época foi denominado lactocromo (Massey, 2000). Cinquenta anos se passaram e nenhuma mudança aconteceu ao estudo sobre aquele pigmento e então na década de 30 é que foi descoberta que essa vitamina era constituinte do complexo B, sendo a purificação da própria vitamina amplamente facilitada (Massey, 2000).

Os químicos da época, como Richard Kuhn, em Heidelberg, e Paul Karrer, em Zurich, entraram em uma corrida acirrada para determinar a estrutura, sendo que ambos obtiveram sucesso quase que concomitantemente. Vários nomes foram propostos para a “nova” vitamina, dentre eles lactoflavina e ovoflavina, mas o prefixo ribo ficou consagrado entre a

área acadêmica. Apresenta coloração amarela e possui em sua estrutura uma cadeia ribitol e um sistema de anéis isoaloxazina, como observado na figura 7 (Souza et al., 2005).

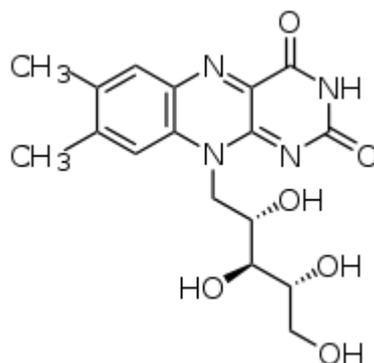


Figura 7: Estrutura química da riboflavina

Hoje, sabe-se que essa vitamina é componente das coenzimas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), as quais participam de diversas reações de óxido-redução importantes no metabolismo (Hustad et al., 1999). Coenzimas derivadas da Rb são requeridas para o metabolismo do ácido fólico, piridoxina e niacina, além de serem utilizadas por enzimas de eritrócitos, como a glutathione redutase que é uma enzima importante pertencente ao sistema de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas nessas células (Rivlin et al., 2009). Curiosamente, a Rb pode tanto contribuir quanto inibir o estresse oxidativo, através da sua dupla habilidade de produzir superóxido e, ao mesmo tempo, poder estar envolvida na redução de hidroperóxidos (Massey, 2000).

Na literatura há relatos que a Rb apresenta outras funções biológicas podendo atuar como quimioprotetor (Webster et al., 1996), modulador do estado redox (Massey, 2000) e agente citotóxico/antitumoral (Souza et al., 2006; de Souza Queiroz et al., 2007). Tal vitamina também é fotossensibilizador endógeno, apresentando sensibilidade à radiação ultravioleta (UV) e visível (La Rochette et al., 2000). A Rb ao absorver luz atinge o estado excitado e através de transferência de energia (cruzamento intersistemas), passa ao estado tripleto, que pode ser desativado seguindo mecanismos do tipo I ou II. No mecanismo do tipo I, a Rb no estado tripleto excitado age diretamente sobre um substrato levando a fotoxidação do mesmo e, como consequência, ocorre à geração de radicais intermediários, além de espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (La Rochette et al., 2000; Edwards; Silva, 2001). No mecanismo do tipo II, a Rb no estado excitado interage com oxigênio molecular gerando oxigênio singlete.

Kashiwabuch et al., 2012, observaram a inativação de *Staphylococcus aureus* utilizando a riboflavina como agente fotossensível em exposição a luz ultravioleta (UVA). A riboflavina estava na concentração de 1% e o comprimento de onda de aproximadamente 365 nm. Neste trabalho, não observou-se ação da atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

Arboleda et al 2014, avaliaram o uso do rosa de bengala e riboflavina na terapia fotodinâmica contra isolados de *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* como agentes causadores de ceratite fúngica. Em um grupo foi utilizado a riboflavina + irradiação de 375 nm; e em outro grupo o rosa bengala + 518 irradiação nm. A irradiação foi realizada usando um diodo (LED) matriz verde emissor de luz (comprimento de onda de pico: 518 nm) e um LED em comprimento de onda de 375 nm). As placas testes foram irradiadas com uma densidade de energia de 5,4 J/cm². O rosa de bengala apresentou ação inibitória em todas as três culturas, porém a riboflavina não foi capaz de apresentar inativação fotodinâmica diante dos isolados.

2.5 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

A maioria das bactérias apresenta parede celular, exceto micoplasmas, que são intracelulares. A parede celular é variável em sua composição química o que determina a existência de grupos de bactérias, denominadas de Gram-positivas e Gram-negativas (Jawetz, 2009).

A parede celular é um revestimento rígido que confere forma à célula, maior resistência às adversidades da pressão osmótica, mecanismos de resistência a antimicrobianos e constitui-se uma estrutura antigênica (antígeno O), que caracterizam e diferenciam tais bactérias (Mimset al., 2005).

As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede com várias camadas de peptideoglicano (mureína), composta por subunidades alternadas de N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM). Estas moléculas são ligadas de forma cruzada por tetrapeptídeos conferindo maior rigidez a parede. Encontra-se ainda na parede o ácido teicóico constituído por um carboidrato, fosfato e álcool (Trabulsi; Alterthum, 2005).

A estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa. Apresenta uma camada mais estreita de peptideoglicano, além da membrana externa, diferentemente das bactérias Gram-positivas, onde sua parede apresenta apenas peptideoglicanos, como observado na Figura 8 (Tortora, 2012).

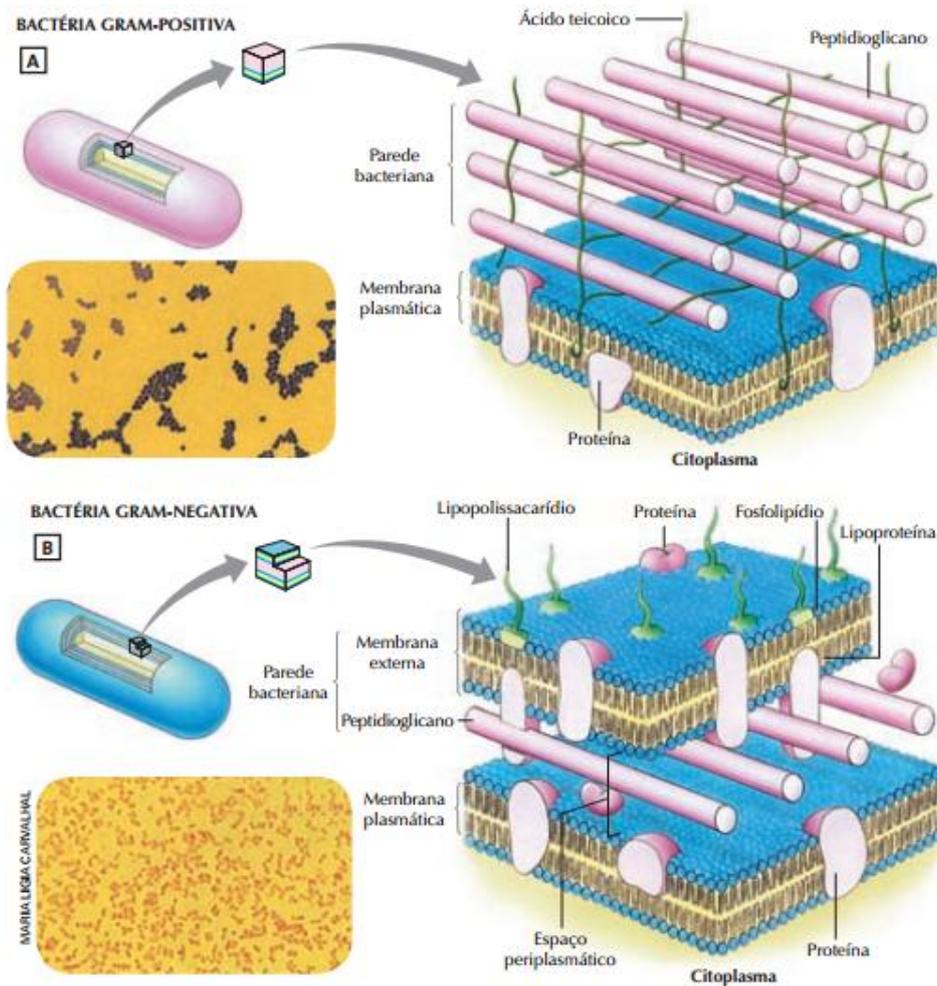


Figura 8: Morfologia da parede celular de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (adaptado de Tortora, 2012).

2.5.1 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

As infecções bacterianas têm sido uma das principais causas de morbidade e mortalidade ao longo da história da humanidade. Com o advento dos antibióticos, este problema tendeu a desaparecer. No entanto, esses micro-organismos têm vindo a desenvolver mecanismos de resistência que têm contrariado os avanços alcançados no tratamento de infecções (Goll & Faria, 2013).

Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos das bactérias ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação (Rice; Bonomo, 2005).

2.5.1.1 Alteração de permeabilidade

A possibilidade de um medicamento passar a barreira da parede celular bacteriana é chamada de permeabilidade e é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado, quer seja bactericida quer bacteriostático (Goodman & Gilman's, 2008).

Neste tipo de resistência, a modificação da permeabilidade do antibiótico se deve às alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas que estabelecem canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula. A permeabilidade limitada é responsável pela resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina e pela resistência de *Pseudomonas aeruginosa* ao trimetoprim. As bactérias utilizam esta estratégia na aquisição de resistência. Assim, uma alteração na porina específica da membrana celular externa de *P. aeruginosa*, pela qual o imipenem geralmente se difunde, pode excluir o antimicrobiano de seu alvo, tornando *P. aeruginosa* resistente a este antibiótico (Declour, 2009).

2.5.1.2 Alteração do sítio de ação do antimicrobiano

Cada tipo de antibiótico atua em um sítio alvo, quando ocorre alteração do local-alvo de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência. Essa alteração é em decorrência da aquisição de um gene a qual induz a bactéria à alteração do seu sítio-alvo, ou seja, codificada um novo produto resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original. Um exemplo é o *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e *Estafilococos* coagulase-negativos que adquiriram o gene cromossômico Mec A e produzem uma proteína de ligação da penicilina (PBP ou PLP) resistente aos β -lactâmicos, que é suficiente para manter a integridade da parede celular durante o crescimento, quando outras PBPs essenciais são inativadas por antimicrobianos β -lactâmicos. Alternativamente, um gene recém-adquirido pode atuar para modificar um alvo, tornando-o menos vulnerável a determinado antimicrobiano. Assim, um gene transportado por plasmídeo ou por transposon codifica uma enzima que inativa os alvos ou altera a ligação dos antimicrobianos como ocorre com eritromicina e clindamicina (Rice; Bonomo, 2005).

2.5.1.3 Bomba de efluxo

As bactérias possuem um sistema chamado de bomba de efluxo. Esse mecanismo é parte integrante da membrana plasmática bacteriana e têm sido responsabilizadas por diversos

casos de resistência a antibióticos. O bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos. A resistência às tetraciclina codificada por plasmídeos em *Escherichia coli* resulta deste efluxo ativo (Fabris et al., 2014).

2.5.1.4 Mecanismo enzimático

A resistência antimicrobiana mais importante se dá através do mecanismos enzimático onde o medicamento é degradado através da ação de enzimas. As β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se às PBPs bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano. As bactérias podem apresentar diferentes β -lactamases, sendo codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos através de plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou ser induzido. A resistência quase universal de *S. aureus* à penicilina é mediada por uma β -lactamase induzível, codificada por plasmídeo. (Rice; Bonomo, 2005).

O uso indiscriminado de antimicrobianos exerce uma enorme pressão seletiva para a manutenção e ampliação da resistência bacteriana. O uso extenso de antimicrobianos é seguido proporcionalmente pelo aumento de bactérias resistentes que passam a se disseminar em consequência de medidas insuficientes de prevenção de infecções. Embora não se possa eliminar o uso de antimicrobianos, a administração racional desses agentes não apenas exige uma seleção criteriosa do antimicrobiano e da duração da terapia, como também sua indicação apropriada (INSA, 2010).

2.5.2 STREPTOCOCCUS MUTANS

A cavidade oral humana comporta uma gama de micro-organismos, desde bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, fungos dentre outros organismos que se inter-relacionam de acordo com as condições fisiológicas e/ou patológicas do hospedeiro. Através de diversos estudos ficou constatado que mais de 19.000 tipos de micro-organismos estão presentes na cavidade oral, e que o desequilíbrio parasito/hospedeiro conduz ao processo de doença (Keijser et al., 2008).

Fatores que promovem a infecção desses micro-organismos como a competição por nutrientes, sítios de adesão, produção de agentes antimicrobianos como peróxido de hidrogênio e as bacteriocinas podem ser fatores determinantes para o estabelecimento de

relações comensais dos micro-organismos com o hospedeiro (Vam Hoogmoed et al, 2008). Um dos estágios para ocorrer à infecção é a produção de biofilme por estes organismos, considerado um promotor da alteração da composição microbiológica local, e conseqüentemente, conduz ao estabelecimento da doença como a cárie dentária, gengivite e periodontite (Bhatti, Takeuchi, 2003).

Estudos realizados em 1987 por Nyvad e Kilian, observaram que as bactérias primárias de colonização de superfícies dentárias recém-higienizadas são constituídas principalmente por *Streptococcus mitis*, *S. oralis* e *S. sanguinis*, todos *Streptococcus* do grupo *mutans* (SGM). Nessa fase, apenas 2% dos micro-organismos são classificados como SGM. Já quando há colonização com formação de biofilme dentário, o número de *S. mutans* é de aproximadamente 30% do total da microbiota. Essa modificação em relação à percentagem é explicada devido à baixa adesividade que o SGM tem à película da dentina. Em contrapartida, quando não há higienização adequada, tais bactérias tem capacidade de formar glucanos eficientes e insolúveis em água, corroborando para um acelerado acúmulo de bactérias no biofilme dentário.

Em 2000, Rovaldi e colaboradores, usando um derivado de porfirina (clorina ce6-5k) associado a um laser de diodo (10mW, 632nm, 15J/cm²), observaram que a eficácia antimicrobiana do método foi melhorada em decorrência do aumento da concentração do fotossensibilizador, inibindo significativamente o crescimento de *S. mutans* e outras cepas de bactérias.

Zanin et al. (2006), utilizaram cepas de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguinis* organizados em biofilme sobre blocos de dentina, crescidos durante 5 dias. Nesse experimento um LED vermelho com 620-660 nm e 85,7J/cm² e o fotossensibilizador azul de orto-toluidina foram utilizados para irradiar os mesmos. Ao final do experimento observaram redução de 95% das células viáveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* e de 99% das células viáveis *S. sanguinis*.

Paschoal (2009) utilizando o azul de orto-toluidina (TBO) e LED no comprimento de onda vermelho demonstrou que a efetividade da TFD contra cepas de *S. mutans* dependia de uma concentração mínima do corante fotossensibilizador (2,5µg/mL), associada a uma densidade de energia mínima da fonte luminosa (24J/cm²).

Leles et al. (2013) utilizando três corantes diferentes, o TBO, verde malaquita, o azul de tripan e como luz excitante um feixe de luz vermelha na dose de 95J/cm². Os resultados observados foi que diminuindo a quantidade do corante aplicada e aumentando a densidade de energia mais cepas do micro-organismo se tornavam inviáveis. Além disso, o verde malaquita

utilizado na terapia fotodinâmica apresentou o melhor efeito antimicrobiano em biofilme de *S. mutans*.

Aurélio et al. (2014), utilizando os corantes curcumina e azul de toluidina expostos a $42\text{J}/\text{cm}^2$ de uma luz branca frente a *Streptococcus mutans*, observaram que houve um decaimento de 5log para ambos os fotossensibilizadores utilizados após o tratamento, concluindo que a combinação de uma luz não-coerente a iluminação com baixas concentrações de fotossensibilizador vem alcançado bons resultados na fotoinativação de *S. mutans*, e pode ser considerada um agente antimicrobiano eficaz *in vitro* para reduzir o número de micro-organismos pertencentes a classe das bactérias Gram-positivas.

2.5.3 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

As bactérias pertencentes a esse gênero são bacilos Gram-negativos, não fermentadores e considerados oportunistas causando infecções em pacientes imunodeprimidos.

P. aeruginosa é encontrada em diversos ambientes principalmente em hospitais, sendo considerado um patógeno de grande relevância no que se diz respeito às infecções hospitalares. Esta bactéria cresce em meios de cultura simples devido a sua versatilidade nos requerimentos energéticos e nutricionais. Sua patogenicidade deve-se principalmente à resistência adquirida em relação aos antibióticos tornando difícil sua erradicação (Sharma et al., 2014).

Inicialmente, a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* requer alteração no sistema de primeira linha, sendo resultado geralmente de interrupção das barreiras cutâneas ou das mucosas, por exemplo: traumas, queimaduras, o uso de cateteres, imunodepressão de ordem terapêutica, clínica ou fisiológica (Dean, 2011).

De modo geral, conforme pode ser visto os antimicrobianos tem se tornado progressivamente incapaz de atuar no sítio de ação das bactérias, ou seja, os micro-organismos têm desenvolvido mecanismos cada vez mais complexos adquirindo e transmitindo aos demais descendentes mutações e com isso conferindo resistência aos quimioterápicos antimicrobianos. Salientando-se que a automedicação, gera aumento da resistência bacteriana que conduz a um problema de saúde pública (ANVISA, 2007).

De acordo com Gonçalves (2010) as bactérias se utilizam de vários mecanismos de resistência aos antibióticos, dentre eles a destruição ou inativação da droga, destruição do anel beta-lactâmico, ou peniciliase produzida pelo micro-organismo, incapacidade do antibiótico

de penetrar na superfície das células bacterianas, alteração dos sítios-alvo das drogas, como pela troca de um aminoácido. A bactéria pode ainda possuir uma via bioquímica alternativa, a qual desvia da reação que é inibida pelo antibiótico na célula, além do efluxo rápido onde a droga é ejetada para fora antes que possa se tornar efetiva.

Os bacilos Gram-negativos fermentadores de glicose estão envolvidos em muitas das infecções em Unidades de Terapia Intensiva UTI's, sendo representados principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (ANVISA 2007). Tem sido mostrado que a humidade é um fator de risco para essas infecções, sendo a contaminação proveniente de equipamentos como respiradores, umidificadores, reservatórios de água e transmissão pessoa-pessoa através das mãos (Machado, 2009).

Para os micro-organismos deste grupo são relatadas elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos do grupo das quinolonas, aos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, principalmente devido à produção de beta-lactamases (Sader et al., 2001, ANVISA, 2007). Menezes et al. (2004) relata ainda resistência total da *P. aeruginosa* a cefotaxima, ampicilina e tetraciclina.

Nussbaum et al. (2003) utilizaram *laser* de 810 nm, com variação na irradiância de 0,015 W/cm² (0-50 J/cm²) e 0,03 W/cm² (0-80 J/cm²), em uma única sessão frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Após tratamento, houve aumento no crescimento bacteriano ($p=0,01$), similar nas duas irradiâncias ($p=0,36$), observando assim, que a variação da irradiância não influencia no resultado.

Em um estudo realizado por Sharma et al., em 2005, obtiveram uma redução de *P. aeruginosa* de 3log utilizando (TBO), um fotossensibilizador também pertencente à família das fenotiazinas, na concentração de 150 µM com 36 J/cm².

Tseng et al., em 2009, demonstraram efeitos similares em quatro cepas distintas de *P. aeruginosa*, após a TFD. Três cepas são multirresistentes e uma susceptível a antibióticos, Após os experimentos observaram que essas cepas, resistentes e não-resistentes, eram susceptíveis ao tratamento da mesma maneira.

Wardlaw et al., (2011) avaliaram a eficiência da TFD na inativação da *P. aeruginosa* de infecções de feridas. O fotossensibilizador utilizado foi o ácido aminolevulínico (ALA) em exposições de 15 segundos até duas horas e variando a concentração também do fotossensibilizador de 1 M a 0,1 mM. com comprimento de onda de 635 nm e uma dose entre 54 a 324 J/cm². Após o experimento observaram que não ocorreu redução significativa das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Orlandi et al., (2014), utilizando um fotossensibilizador sintetizado, o GD11, que pertence a classe de boro-dipirrometeno (BODIPY) e um laser observou que o tratamento foi eficaz permitindo um decaimento de 7log, sendo uma nova alternativa na terapêutica. Sendo assim, a TFD associada a um fotossensibilizador há uma grande perspectiva no tratamento das infecções causadas tanto por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

2.6 LEVEDURAS *DECANDIDA SP.*

Leveduras do gênero *Candida* são fungos comuns à microbiota do hospedeiro humano e constituem a principal causa de infecção fúngica da cavidade oral. Pelo menos 167 espécies desses microrganismos foram isolados do homem, mas apenas 40 espécies causam manifestação clínica nesse hospedeiro. O gênero *Candida* é, freqüentemente, encontrado como comensal nos tratos gastro-intestinal e genito-urinário (de Oliveira, 2010). A *C. albicans* é a espécie mais comumente encontrada na cavidade oral, seguida pela *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Kabawat, 2014).

O isolamento de leveduras da cavidade oral de pacientes sem manifestação clínica revela freqüência média de 34,4% de portadores para as espécies de *Candida sp.* em geral e de 17% para a *C. albicans* (Salerno et al., 2011). De acordo com Calcaterra et al., (2013), a língua, o palato e a mucosa são os locais mais afetados pela candidíase, já que são os sítios mais freqüente e densamente colonizados, sendo que, na presença de fatores predisponentes, são os primeiros locais a alcançar uma concentração de organismos suficiente para causar manifestação clínica.

Segundo Fotos, Vincent e Hellstein (2006), o eritema da mucosa constitui a apresentação clínica mais prevalente da candidíase oral. Os autores verificaram que 60% dos pacientes apresentavam candidíase eritematosa, 36% apresentavam candidíase pseudomembranosa e 24%, a forma hiperplásica.

Os fatores que predisõem o indivíduo à candidose oral são: idade avançada; infância; gravidez; diabetes melito; hipotireoidismo; deficiência de ferro, folato e vitamina B12; leucemia aguda; AIDS; aplasia do timo; uso de corticóides ou antibióticos de amplo espectro; xerostomia; leucoplasia; câncer de boca; tabaco e próteses dentárias removíveis, imunodepressão, tratamentos medicamentosos para AIDS, rádio e quimioterapia, transplantes de órgãos e de medula óssea e neutropenia, também são fatores predisponentes importantes .

Ruhnke et al. (2007) analisaram 305 amostras da cavidade oral de 65 indivíduos HIV-positivos, obtidas antes e após terapia com fluconazol, sendo 201 (66%) *C. albicans*, 50 (16,5%) *C. glabrata*, 35 (12%) *C. krusei*, 11 (4%) *C. tropicalis*, três (1,0%) *Geotrichum candidum* e dois (0,5%) *Saccharomyces cerevisiae*. A *C. albicans* foi isolada de todos os pacientes com candidíase orofaríngea antes da terapia com fluconazol e em mais de 75% de todos os pacientes após cura clínica da mesma. No mínimo duas espécies de *Candida* foram isoladas de 38 amostras.

Cross et al. (2004) verificaram que a *C. albicans* foi a única espécie isolada de amostras de 12 pacientes em um total de 22 portadores de estomatite protética, uma forma de candidose eritematosa. Nos dez restantes, havia associação da *C. albicans* com outras espécies do fungo como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Al-Abeid et al. (2004) avaliaram 95 pacientes portadores de câncer submetidos à quimioterapia, radioterapia e/ou tratamento cirúrgico, e 65 indivíduos saudáveis. Os autores coletaram amostras da cavidade oral e verificaram a prevalência de 31,5% de *C. albicans*, 23,2% de *C. glabrata*, 12,6% de *C. parapsilosis* e 5,3% de *C. tropicalis* nos pacientes portadores de câncer. Os indivíduos saudáveis exibiram prevalência de 27,7% de *C. albicans*, 6,2% de *C. glabrata* e nenhum caso de *C. parapsilosis* ou *C. tropicalis*. A *C. glabrata* e a *C. parapsilosis* foram mais frequentes em pacientes com leucemia do que em pacientes com tumores sólidos.

Em 2011, Hoshi et al., realizaram um estudo visando observar o principal micro-organismo de candidíase oral em pacientes com estomatite angular. Os resultados obtidos ao longo do trabalho, o principal micro-organismo isolado e identificado foi a *Candida albicans* representando de 15% a 70%.

Pereira et al., (2013) observaram 100 pacientes visando identificar os agentes etiológicos que mais causavam estomatite protética. Desses 100 pacientes avaliados, o micro-organismos mais incidente foi a *C. albicans* ($p < 0,05$).

2.6.1 *Candida albicans*

Candida albicans constitui uma levedura comensal da cavidade bucal sendo a espécie mais isolada do gênero. Alterações no ambiente do hospedeiro podem resultar em transição de *C. albicans* da fase comensal para a patogênica provocando infecções superficiais e até sistêmicas (Samaranayake et al., 2009; Wilson et al., 2009). Por se tratar de um micro-organismo oportunista, para o estabelecimento da infecção são requeridos fatores

predisponentes sistêmicos e ou locais, como o uso de agentes imunossupressores, antibióticos, estrogênios, uso de prótese e má higienização bucal (Naglik et al., 2008; de Souza et al., 2008).

Em pacientes imunodeprimidos, como os indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a candidose oral é a manifestação fúngica mais comum constituindo um indicador da progressão da infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), revelando falha imunológica dos pacientes, pois a imunidade celular adquirida desempenha papel importante na prevenção contra este quadro clínico (Gaitán-Cepeda et al., 2005). Episódios recorrentes e exposição prévia aos antifúngicos convencionais são as principais causas de falha terapêutica para o tratamento da candidose oral em pacientes com AIDS (Wilheim et al., 2009).

O tratamento de escolha para estas infecções é o uso de antifúngicos sistêmicos, porém a recorrência de candidíase é comum, além do risco de resistência ao medicamento e interações com outros fármacos (Paz-Cristobal et al., 2014). Além disso, os antifúngicos sistêmicos podem causar efeitos adversos, como náuseas, vômito, cefaléia, além do risco de desenvolver hepato-toxicidade.

Em virtude do acometimento de inúmeros indivíduos debilitados por infecções por leveduras do gênero *Candida* e a falha terapêutica observada nestas situações, são propostas novas opções de tratamento para a redução destas leveduras na cavidade bucal, como o uso da TFD. Esta terapia consiste em administrar um agente fotossensível não tóxico, por via tópica ou sistêmica, seguida de irradiação por uma fonte de luz em comprimento de onda adequado na presença ou não de oxigênio com consequente produção de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, os quais provocam danos inespecíficos nos micro-organismos podendo provocar o extravasamento dos constituintes celulares e inativação de sistemas de transporte de membrana e enzimas, porém não apresentam efeitos mutagênicos (Hamblin, Hasan, 2004; Maisch, 2007; Konopka, Goslinski, 2007; Donnelly et al., 2008).

A associação do laser de baixa potencia com o FS azul de metileno foi testada em algumas espécies de *Candida albicans* por Demidova e Hamblin (2005). Esse estudo demonstrou que 84,8% das colônias de *C. albicans* foram reduzidas com essa associação e que os elementos isolados, ou seja, somente o azul de metileno, ou somente a exposição ao laser, não obtiveram redução significativas nas colônias das amostras de *C. albicans*.

Peloi et al. (2008) avaliaram a ação fotodinâmica do azul de metileno na concentração de 35,2 μM irradiado por LED (2-12 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) com comprimento de onda de 663 nm por 10, 20, 30 e 60 minutos em *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* com redução em \log_{10} de 2,34-3,71, 1,61-

3,41 e 2,77-3,87, respectivamente. Os autores sugeriram que o LED pode ser promissor como fonte de luz para a TFD por apresentar uma alta eficiência e baixo custo, além de não ter efeito antifúngico quando aplicado sozinho ou apresentar pouca sensibilidade.

Junqueira et al. (2009) utilizaram a TFD, mediada por azul de metileno e laser Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl), aplicando *in vivo* para o tratamento de candidose bucal induzida em ratos demonstrando reduzir as alterações epiteliais e resposta inflamatória crônica, porém sem redução do número de leveduras.

Mima et al., (2010) em experimentos realizados com o fotossensibilizador Photogen® e azul de metileno alcançaram redução de leveduras do gênero *Candida*, como de $1,04 \log_{10}$ a $2,74 \log_{10}$ utilizando altas concentrações de fotossensibilizador, e longos períodos de irradiação por LED azul e vermelho e laser.

Com aplicação de LED de emissão de luz azul ($37,5 \text{ J.cm}^{-2}$), foi encontrado trabalho de Dovigo et al. (2011) que avaliaram o efeito antifúngico da TFD mediada por Photogen® na concentração de 25 mg/L em cepas padrão de *C. albicans* e *C. grabrata* e cepas resistentes ao fluconazol. Como resultado do experimento, todos os micro-organismos foram inativados nestes parâmetros.

Duarte et al. (2014) avaliaram a eficácia da TFD, utilizando Azul de Toluidina (AT) como fotossensibilizador e uma fonte de luz (LED) em biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* onde apresentou uma redução significativa da massa celular bioativa com uma percentagem de sobrevivência de 24,76% para o *E. faecalis* e 17,14% para a *C. albicans*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana utilizando nanopartículas de prata (NPsAg) e moléculas de riboflavina (Rb) em bactérias Gram-positiva e Gram-negativa e leveduras de *Candida albicans*.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar NPsAg;
- Realizar teste *in vitro* do potencial antimicrobiano das NPsAg associadas ou não à riboflavina em isolados de *Pseudomonas aeruginosae* *Streptococcus mutans* através da terapia fotodinâmica;
- Verificar *in vitro* a ação antimicrobiana das NPsAg em associação com a riboflavina ou não em isolados de *Candida albicans* utilizando um LED.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA REVESTIDAS COM PECTINA

A metodologia descrita neste trabalho tem como referência a utilizada por Melo et al., (2012a), respeitando os padrões de concentração do nanomaterial e fotosensibilizador.

Na síntese das nanopartículas revestidas com pectina, 1 mL pectina cítrica (CPKelco brand) a 0.5% foi adicionado a 25 mL de água e 3 mL de uma solução 10^{-3} M doprecursor (AgNO_3 da Sigma-Aldrich). O sistema ficou em aquecimento e agitação magnética e, ao atingir a temperatura de 80°C , 1 mL de uma solução de citrato de sódio (Sigma-Aldrich) 0.1 M foi adicionado. A partir da adição da solução de citrato de sódio, manteve-se o aquecimento e também a agitação magnética por 30 minutos. Durante este período, a solução, inicialmente incolor, tornou-se amarelo claro e, ao final da síntese, amarelo mais escuro, porém com aspecto transparente. A síntese está esquematizada na Figura 9.

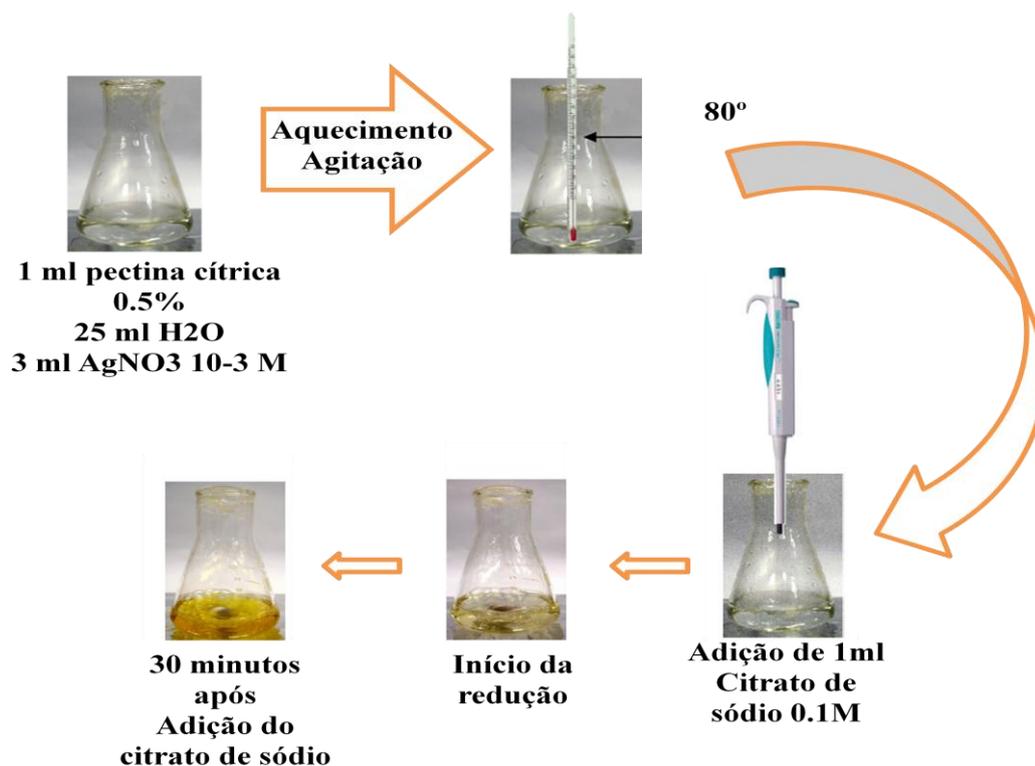


Figura 9 – Esquema da síntese das nanopartículas de prata revestidas com pectina. Apresenta a mudança de coloração (do incolor, passando ao amarelo pálido, até o amarelo mais forte, porém transparente) observada durante o processo (Adaptado de Melo et al., 2012).

4.2. IRRADIAÇÃO

O LED utilizado para a realização do experimento com culturas de bactérias, foi um LED $\lambda=455 \pm 20\text{nm}$ (MMOptics, São Carlos, Brasil) com densidade de potência de $90\text{mW}/\text{cm}^2$. Para as células de *Candida albicans* foi utilizado um Fotopolimerizador Optilight Max $\lambda=455 \pm 20\text{nm}$ (GNATUS), com densidade de potencia da luz $\geq 1200 \text{ mW}/\text{cm}^2$.

4.2 FOTOSSENSIBILIZADOR

O fotossensibilizador utilizado na pesquisa foi à riboflavina (Rb), composto orgânico que faz parte do complexo vitamínico B2. A mesma foi adquirida da Sigma-Aldrich. A capacidade fotossensibilizadora da riboflavina em sistemas biológicos está relacionada ao alto potencial redox de seu estado mais excitado de energia. Embora o potencial redox da riboflavina seja $-0,3 \text{ V}$, em pH 7,0 sua irradiação e ativação ao estado de maior energia, eleva o potencial redox a $1,7 \text{ V}$ que é bem maior que o potencial redox de importantes biomoléculas como aminoácidos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que, desta forma, podem sofrer fotodegradação em presença de riboflavina.

4.3 LINHAGENS BACTERIANAS

Foram utilizadas nesse trabalho, cepas padrão *American Type Culture Collection*, de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Os inóculos de *P. aeruginosa* foram cultivados e estocados em TSA (Tryptic Soy Agar), em presença de O_2 , a 37°C , por 24 horas. *Streptococcus mutans* foram cultivados em meio anaeróbico, em meio Infusão Cérebro-Coração (*brain heart infusion* – BHI), a 37°C , por 2 dias.

4.4. CANDIDA ALBICANS

Para realização dos testes *in vitro* de leveduras de *Candidas albicans* foram utilizadas cepas da Micoteca URM – UFPE, depositadas desde o ano de 2010, conforme tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados depositados na Micoteca URM – UFPE utilizados para o experimento *in vitro* na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

Número	Espécie	Local	Doença de base	Ano
6349	<i>Candida albicans</i>		ATCC	
6550	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Câncer de pulmão	2012
6549	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Câncer de testículo	2012
6548	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Câncer	2012
6547	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Câncer	2012
6546	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Tumor gástrico	2012
6545	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Câncer de mama	2012
6544	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Tumor na cavidade oral	2012
6543	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Tumor raquimedular	2012
6542	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Linfoma não-Hodgkin	2012
6250	<i>Candida albicans</i>	Cavidade oral	Leucemia	2010

4. 4. DESENHO DO EXPERIMENTO

Para a realização do experimento, doze grupos foram criados, como podemos observar na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos utilizados para avaliação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente bactérias Gram-positiva e Gram-negativa

GRUPOS	TRATAMENTOS
Grupo 1 – Controle	Não foi submetido a nenhum tratamento
Grupo 2 – LED	Amostras irradiadas por 10 minutos, sem AgNPs ou Riboflavina.
Grupo 3 – Ag	Apenas Ag NPs foi adicionada aos micro-organismos.
Grupo 4 - Ag + LED	Ag NPs e irradiação com LED por 10 minutos.
Grupo 5 – Rb	Apenas riboflavina foi adicionada aos micro-organismos.
Grupo 6 - Rb + LED 10 minutos	Depois da adição da riboflavina, a amostra foi irradiada por 10 minutos.
Grupo 7 – Rb + NPs Ag	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos sem irradiação.
Grupo 8 – NPs Ag + Rb + LED 2 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 2 minutos.
Grupo 9 - NPs Ag + Rb + LED 4 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 4 minutos.
Grupo 10 - NPs Ag + Rb + LED 6 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 6 minutos.
Grupo 11 - NPs Ag + Rb + LED 8 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 8 minutos.
Grupo 12 - NPs Ag + Rb + LED 10 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 10 minutos.

O grupo controle, 350µL da suspensão do micro-organismo em PBS e 150 µL de água destilada estéril foram depositados em tubos Eppendorf totalizando um volume final de 500 µL, que posteriormente foram levados ao vortex e agitados. Depois de agitada a suspensão

ficou em repouso por um período de 10 minutos (tempo adotado para todas as amostras). Após os 10 minutos a suspensão foi levada novamente ao vortex e agitada. Em seguida uma alíquota de 20 μL foi adicionada ao poço A-1 marcado em uma placa de microtitulação na qual foi realizada uma diluição seriada. Para isso cada poço a partir do -1 já continha 180 μL de PBS de forma que ao final da diluição o volume final do poço foi de 200 μL e com concentração final de 10^{-5} .

Nos grupos 2 (LED), 3 (NPsAg), 4 (Ag+LED), 5 (Rb), 6 (Rb +10 min), e 7 (Rb+Ag), o mesmo protocolo definido no grupo controle será o utilizado neste grupo.

Nos grupos 8, 9, 10, 11 e 12 inicialmente 350 μL da suspensão do micro-organismo suspenso em PBS e 150 μL do sistema (Ag, Rb, Ag+Rb), foram depositados em tubo Eppendorf chegando a um volume final de 500 μL e levados ao vortex e agitado. Depois de agitada em vortex, essa suspensão ficou em repouso por um período de 10 minutos para todas as amostras. Ao final desse período, a amostra foi novamente agitada em vortex e uma alíquota de 150 μL foi retirada e colocada em um poço da placa de microtitulação e então foram irradiados com LED com $\lambda=455\pm 20\text{nm}$ (MMOptics, São Carlos, Brasil) com taxa de fluência de $90\text{mW}/\text{cm}^2$ por um período de 2, 4, 6, 8 e 10 minutos.

Em seguida foi adotado a diluição seriada e o método de Jett, facilitando a contagem das unidades formadoras de colônias e fornecendo números mais exatos dos micro-organismos inviabilizados pela técnica (Jett et al., 1997). Uma alíquota de 20 μL dos micro-organismos submetido ao tratamento foi utilizado para a realização da diluição seriada. A diluição seriada ocorreu de 1:10, 1:100, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$, como observado na Figura 10.

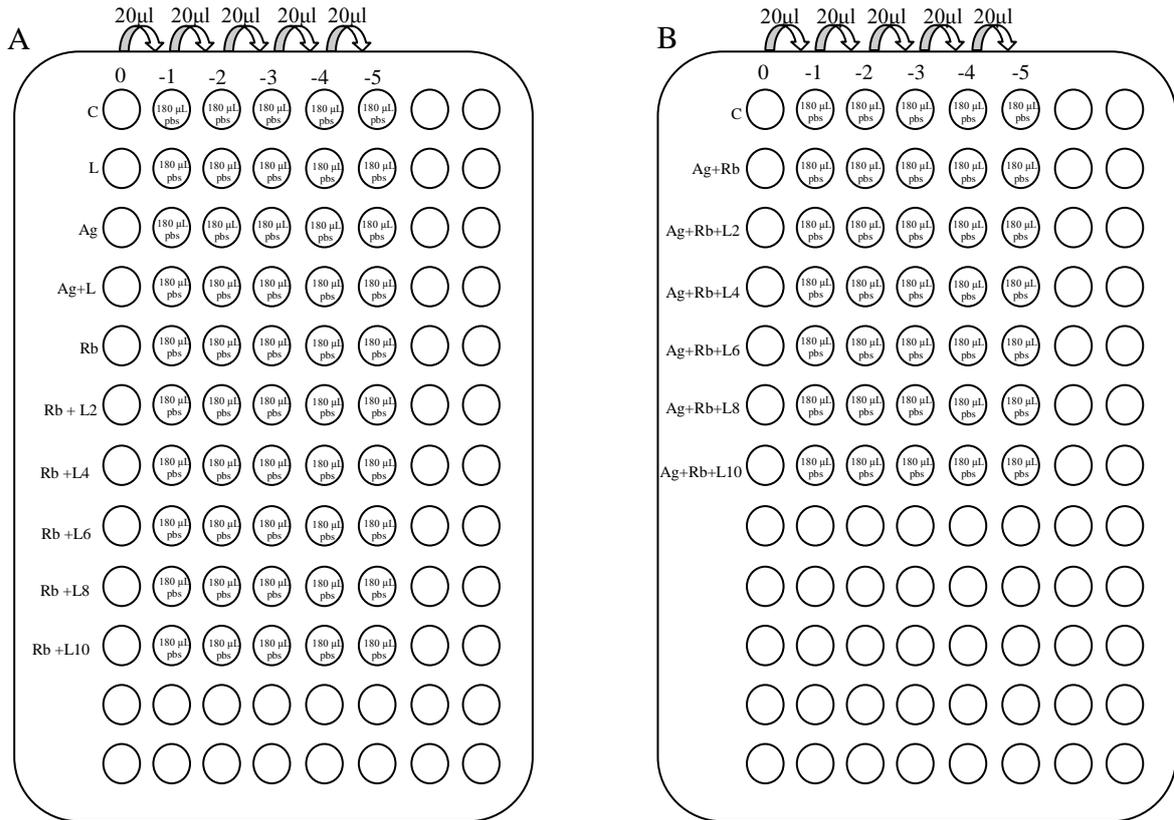


Figura 10: Esquema representativo da diluição seriada. A diluição ocorreu de 1:10 à 1:10⁻⁵

Após o final da diluição, uma alíquota de 10 µL de cada grupo do poço foi retirada e dispensada em placa de petri (Meio TSH para *Pseudomonas aeruginosa* e BHI para *Streptococcus mutans*) com auxílio de uma micropipeta multicanal, como observado na figura 9 (A e B). Essas placas ficaram em repouso para que o meio absorvesse as amostras. Após este período as 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) utilizando o contador de colônias, como observado na Figura 11(A e B) e Figura 12 (A e B).

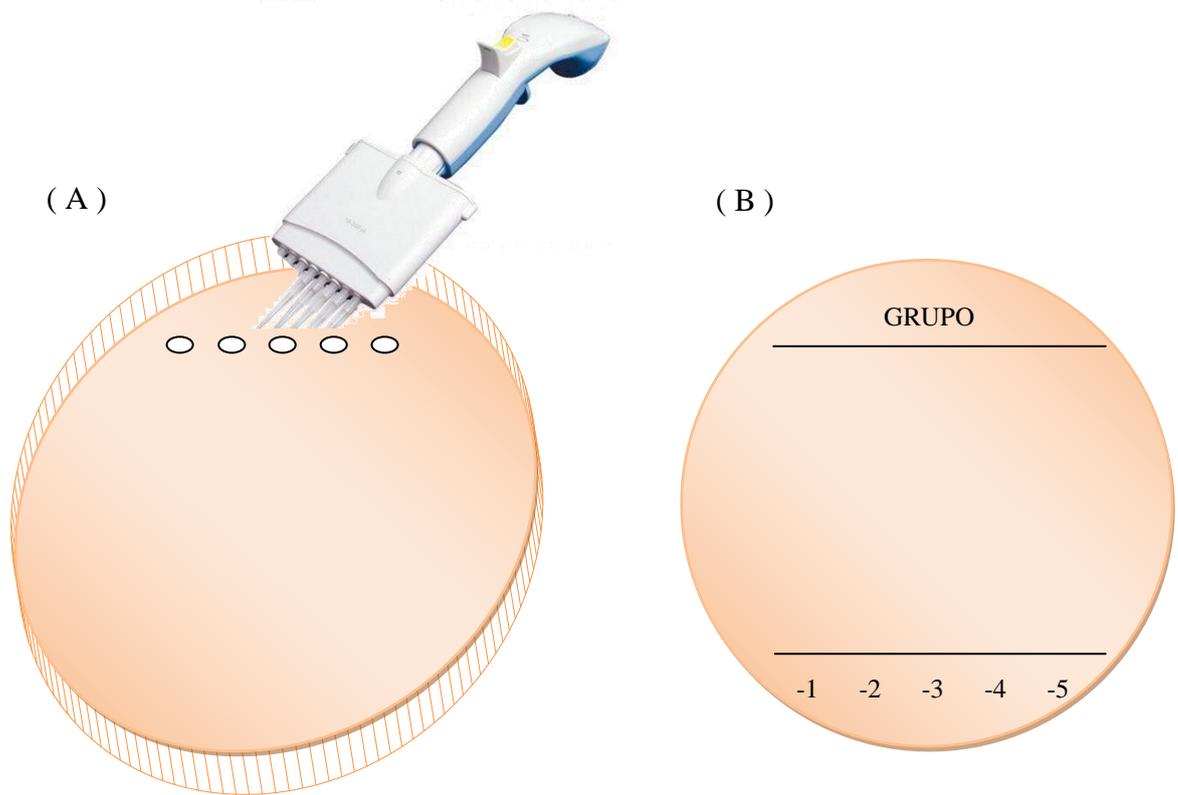


Figura 11: Esquema do plaqueamento em placa de petri após diluição seriada (A-anterior e B-posterior).

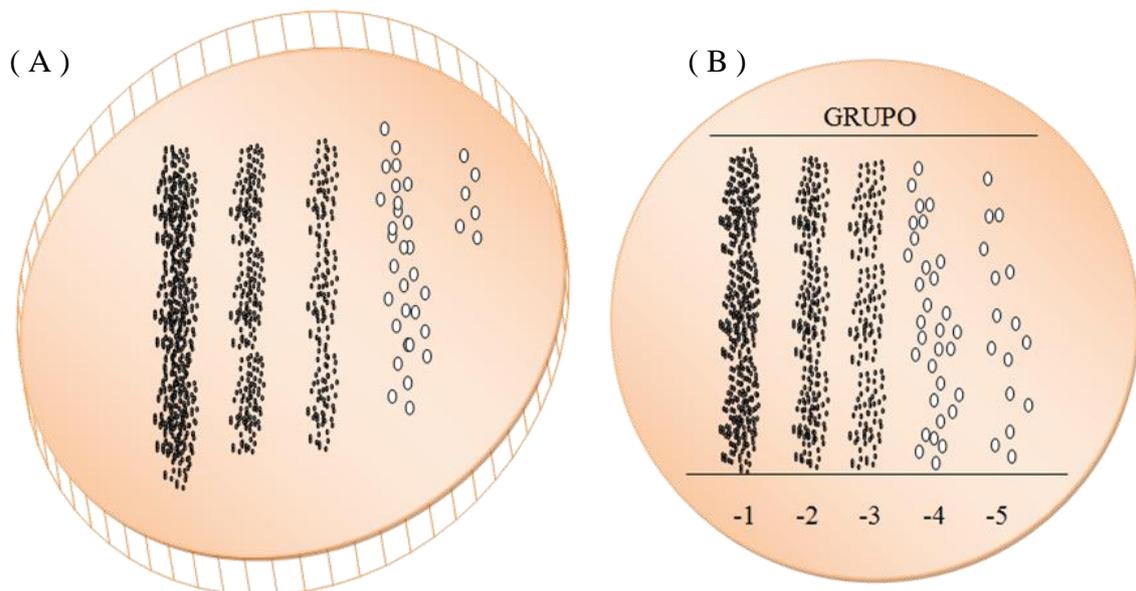


Figura 12: Esquema das placas de petri após as 24h em estufa para contagem das UFCs (A-anterior e B posterior).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise estatística dos resultados com o auxílio do programa GraphPad Prism, considerando-se nível de significância de 5%. Para a análise dos dados de UFC/mL, foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) seguido de teste de t estudent para amostras pareadas, também com nível de significância de 5%.

A análise estatística ANOVA, teve por finalidade comparar a variação existente devido aos tratamentos realizados ao acaso, ou seja, foi utilizada para avaliar a igualdade de várias médias populacionais.

Quando existe mais de dois tratamentos, neste caso, é necessário aplicar um teste de comparação de médias dos tratamentos, daí podendo concluir qual o melhor tratamento. Então testes de comparação de médias servem como um complemento para o estudo da análise de variância, dentre eles destacamos o teste de Tukey. É um dos testes de comparação de média mais utilizado, sendo adotado para testar toda e qualquer diferença entre duas médias de tratamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA REVESTIDAS COM PECTINA E RIBOFLAVINA

Para caracterização das nanopartículas de prata através do método de revestimento com pectina, foi empregada a técnica de absorção no UV-Vis. Avaliando o gráfico da Figura 13, observa-se a curva referente a absorbância das nanopartículas de prata revestidas com pectina. Pode-se observar ainda, a banda de plasmons correspondente a amostra revestida com pectina tendo seu máximo em 417 nm.

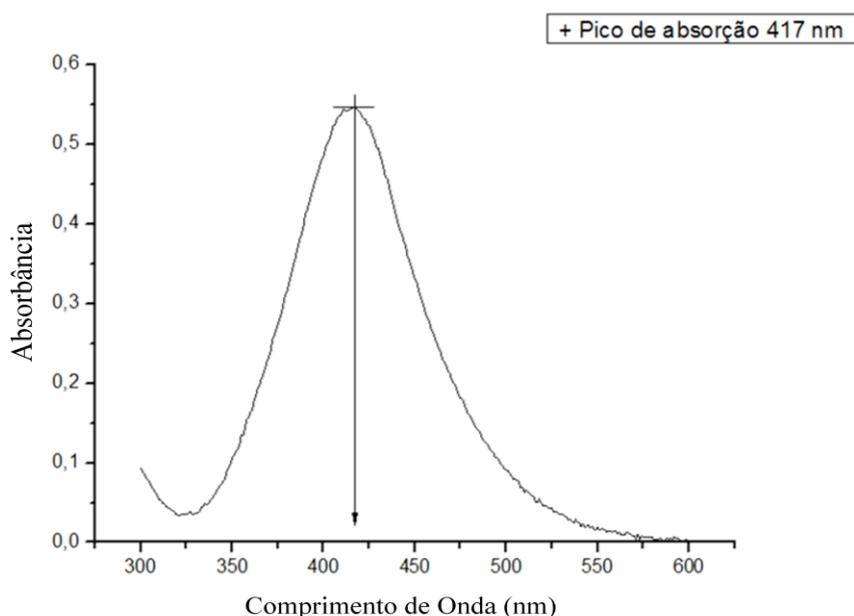


Figura 13: Espectro de absorção no UV-Vis das nanopartículas de prata revestidas com pectina.

Para confirmar e dar embasamento ao primeiro experimento foi então adotado a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Uma pequena amostra das nanopartículas de prata revestidas com pectina e sem revestimento foi levada ao MET, (Tecnai20), no Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE). Essa técnica é adequada para a obtenção de imagens das nanopartículas, permitindo a avaliação da distribuição de tamanho e forma, observado na Figura 14 (A e B).

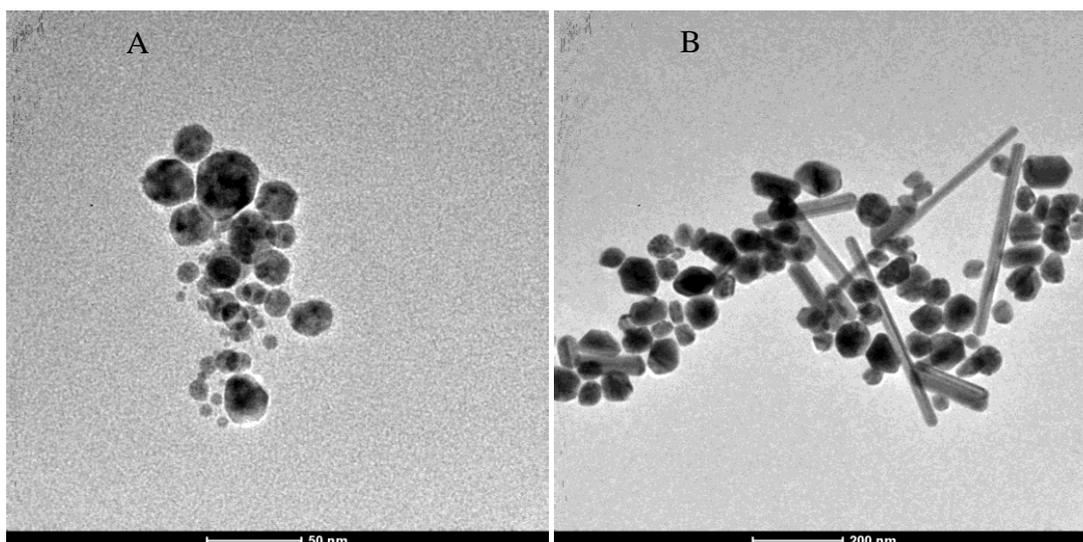


Figura 14: Micrografia obtida por MET das nanopartículas de prata obtidas pelo método de síntese com revestimento com pectina. Em (A), nanopartículas esféricas, apresentando forma e tamanho quase uniforme e com diâmetro médio de 12 nm. Em (B) amostra sem revestimento com pectina, observando forma e tamanho variados das nanopartículas.

O método de síntese com revestimento com pectina apresenta-se como uma técnica vantajosa, pois apresenta nanopartículas morfologicamente semelhante (formato esférico), o que diferentemente é observado sem a adição da pectina.

O segundo método, sem o revestimento com pectina, pode observar nanopartículas de vários formatos e tamanhos, não sendo viável ao estudo realizado nesta dissertação.

A característica que as nanopartículas apresentam quando revestidas com pectina, garante que as moléculas de fotossensibilizadores fiquem em uma distância razoável do núcleo metálico das partículas, propiciando um excelente resultado no aumento da produção de oxigênio singlete.

Essa característica é bem observada no trabalho de Melo et al., (2012), onde a síntese de nanopartículas de prata revestidas com pectina próximo a um fotossensibilizador aumentou em 28.5% a produção de oxigênio singlete.

A riboflavina em água possui dois picos de absorção. Um em 376 nm e outro em 450 nm como observado na Figura 15.

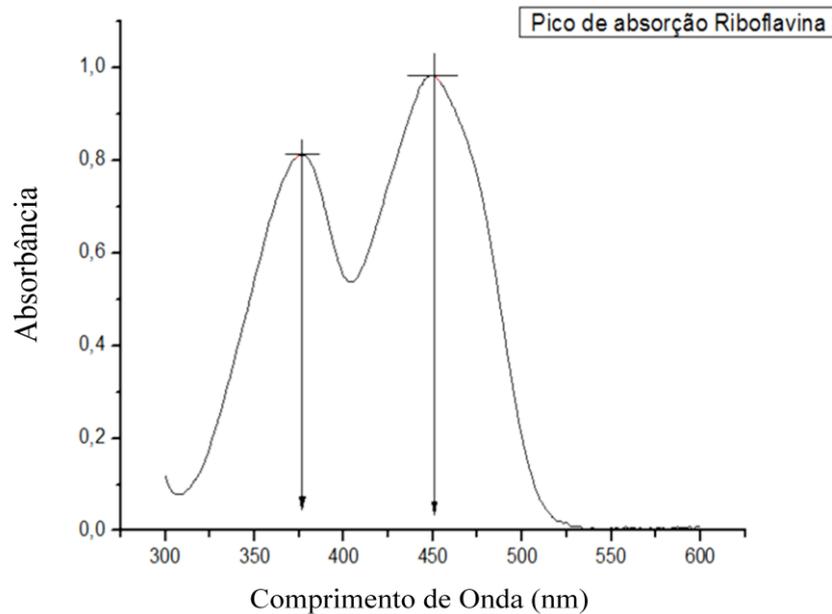


Figura 15: Espectro de absorção da riboflavina em água em UV-vis.

5.2 AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CRESCIMENTO DE CEPAS BACTERIANAS

Os resultados obtidos com a aplicação da Terapia fotodinâmica Antimicrobiana explorando nanopartículas de prata e riboflavina sobre as espécies de *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa* após tratamento e contagem das UFC (Figura 16 A, B, C) estão descritos estatisticamente na Figura 17 A e B.

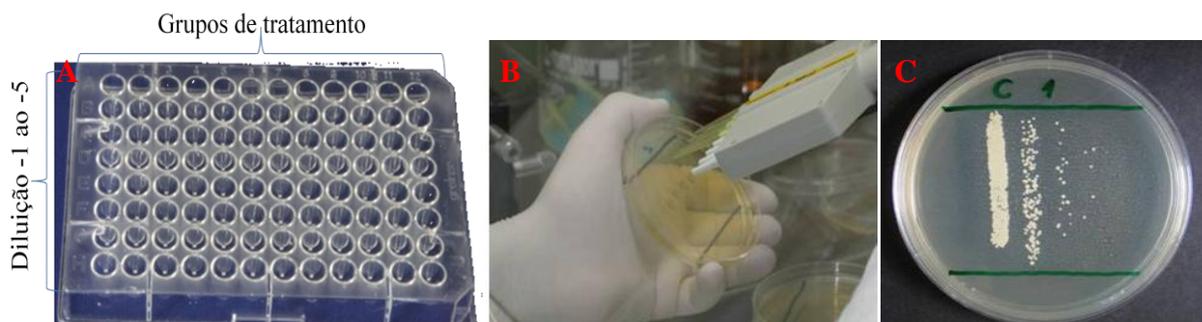


Figura 16 – A, Placa de microtitulação para diluição seriada. B, sementeação de micro-organismos após tratamento na Placa de Petri com meio de cultura. C, Placa de Petri com unidades formadoras de colônia para contagem.

Dos resultados alcançados após o tratamento utilizado, foi observado que, a fração de sobrevivência dos micro-organismos testados (Figura 17 A e B), com a TFDa, apresenta

inibição do crescimento microbiológico do *S. mutans* (ATCC 25175), por outro lado, mostrou-se indiferente para os experimentos realizados com *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

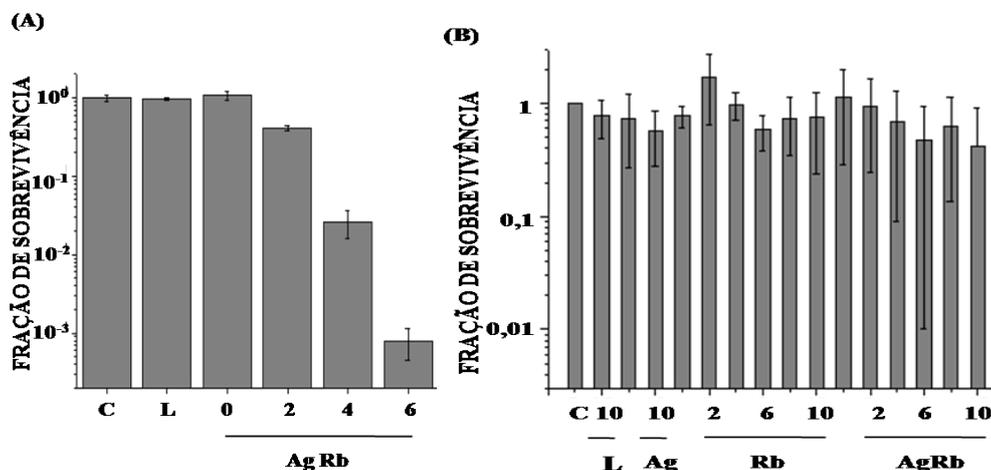


Figura 17: Fração de sobrevivência do *S. mutans*, em A, e da *P. aeruginosa*, em B após tratamento com LED $\lambda=455 \pm 20\text{nm}$, densidade de potência 90 mW/cm^2 explorando nanopartículas de prata e riboflavina. Legenda: C = grupo controle; L = luz; Rb = riboflavina; Ag = prata; AgRb 0, 2, 4, 6, 10 representa o sistema Nanopartículas de ouro + Riboflavina e o uso do laser irradiando as colônias por esses períodos de tempos estabelecidos.

Após observação dos gráficos e análise estatística dos resultados, observamos que o *S. mutans* já apresenta uma variação na taxa de mortalidade das UFC após dois minutos de tratamento. Aos quatro minutos, é possível observar a diminuição de mais de 100x e o resultado mais satisfatório foi no tempo de 6 minutos com a diminuição de 300x, porém não foi observado nenhuma inativação para a *P. aeruginosa*.

Deve-se ressaltar também que não houve redução de micro-organismos na utilização da luz isoladamente como observado na Figura 17^a, ou fotossensibilizador irradiado sem prata como observado na Figura 17B, caracterizando assim que o emprego da luz sem o fotossensibilizador ou o uso apenas do fotossensibilizador excitado não possui efeito citotóxico na dose escolhida. Vale salientar ainda, que após o uso das NPs de prata + riboflavina e laser, houve um aumento significativo à inativação das UFC aos grupos tratados como é observado nos tratamentos de 2, 4 e 6 minutos na figura 17A.

Este resultado corrobora com dados da literatura que relatam a maior susceptibilidade das Gram-positivas à TFDa, mesmo quando o tratamento convencional foi intensificado com a presença das NPsAg ao fotossensibilizador.

A diferença na parede celular das bactérias Gram-negativas como a *P. aeruginosa*, utilizada neste trabalho, pode ser a justificativa de menor inatividade das UFCs pela TFDa. E como foi apresentado nas revisões de literatura, os micro-organismos Gram-positivos como o

S. mutans são mais susceptível a TFDa, do que bactérias Gram-negativas como a *P. aeruginosa*.

Levinson, (2010) relata que esse este tratamento (Np+Rb+L) é mais eficaz por existir diferenças na parede celular dessas bactérias. As bactérias Gram-positivas possuem a parede celular mais espessa, formada basicamente por peptidoglicano, por ácidos teiônicos e proteínas. Já as Gram-negativas possuem uma parede mais complexa formada por uma dupla camada lipídica e uma camada de peptidoglicano conferindo a essas bactérias características bem peculiares Essa parede confere uma barreira hidrofóbica adicional dificultando a entrada de algumas substâncias como antibióticos.

Nas culturas de *P. aeruginosa* não foi observada inativação fotodinâmica após tratamento com riboflavina sozinha, LED, ou até mesmo em associação com as nanopartículas de prata, potencializando ainda mais a produção de oxigênio singlete.

Um estudo realizado por Makdoui et al., (2010), utilizou culturas de *Pseudomonas aeruginosa* através da inativação por luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm durante 30 minutos ($5,4 \text{ J/cm}^2$) em associação com o fotossensibilizador riboflavina em uma molaridade de $400 \mu\text{M}$. Após o tratamento pré-estabelecido, foi possível observar uma pequena inativação do micro-organismo. Posteriormente aos 30 minutos irradiados, mais 30 minutos foi acrescentado ao tratamento com $10,8 \text{ J/cm}^2$ da luz ultravioleta. Nos 60 minutos depois do tratamento, foi possível observar uma inativação $p > 0,5$ do micro-organismo testado.

O resultado encontrado em nosso trabalho contra a *P. aeruginosa*, observamos um nível de significância $<5\%$ indicando que não houve inativação fotodinâmica contra este micro-organismo, isso pode ser em decorrência do tempo de irradiação, pois quanto maior o período de irradiação, maior poderá ser a inativação.

Em um estudo realizado por Niakan et al., (2013), verificou a ação antimicrobiana das nanopartículas de prata em culturas de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ao final do experimento observaram que não houve significância estatística da inativação por nanopartículas de prata em *S. aureus* and *P. aeruginosa*, porém o *S. mutans* foi sensível as nanopartículas de prata em uma solução de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para um resultado mais completo, foi possível observar a quantidade de nanopartículas e fotossensibilizador que penetraram na célula de cada tipo de bactéria estudada.

Para isso, inóculos das duas bactérias avaliadas foram incubados com riboflavina e NPs Ag por 30 minutos, em seguida as células foram lavadas com PBS (Tampão fosfato-salino). Alíquotas de 1 mL, de cada amostra, foram centrifugadas e os precipitados suspensos

em 1 mL de NaOH (0.1 M) e SDS (dodecil sulfato 12 poliacrilamida, 1%), por 24h. Em seguida, a absorbância foi medida e, conforme observado na Figura 18, o *S. mutans*, apresentou maior quantidade de nanopartículas de prata e riboflavina no interior de suas células, propondo que houve uma maior captação do sistema NPsAg – Riboflavina, usado em TFDa. Esse resultado reforça os estudos citados anteriormente que mostram uma susceptibilidade maior das Gram-positivas à técnica estudada.

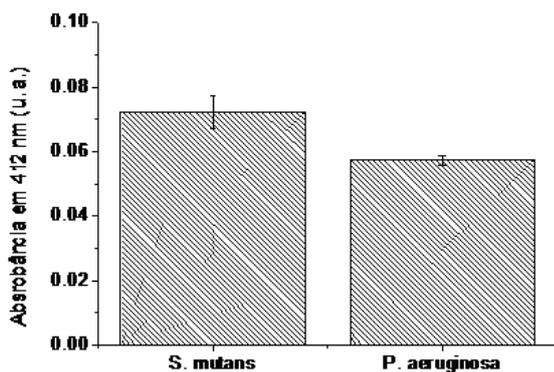


Figura 18: Resultado do espectro de absorção, em 412 nm, do sistema NPs Ag – riboflavina absorvido pelas células de *S. mutans* e *P. aeruginosa*. (Figura cedida por Kato, I. T.; Melo, L. S. A.; Ribeiro, M. S.)

5.3 CANDIDA ALBICANS

A ação da TFDa mediada por riboflavina e LED explorando nanopartículas de prata sobre espécies de *Candida albicans* sem tratamento e contagem das UFC (Figura 19), e resultados analisados através do gráfico (Figura 20).

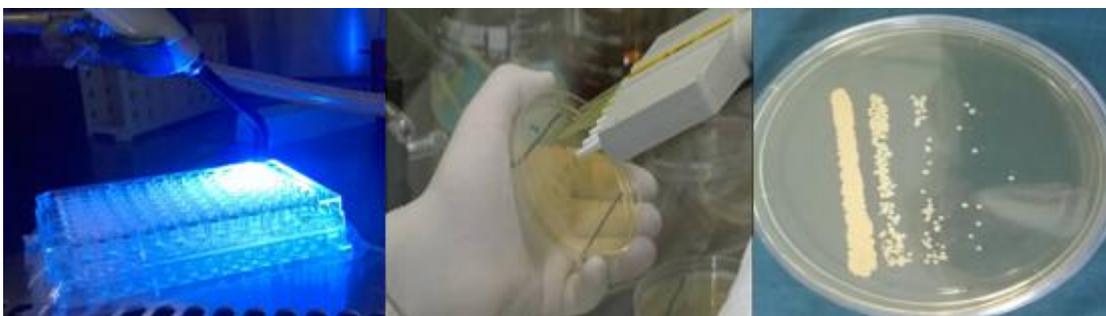


Figura 19: (A): Tratamento das células de leveduras em exposição ao LED usando nanopartículas de prata e riboflavina; (B): após tratamento e diluição seriada, sementeira dos micro-organismos em placas de petri; (C): crescimento fúngico após 48 horas de incubação e posterior contagem das UFC.

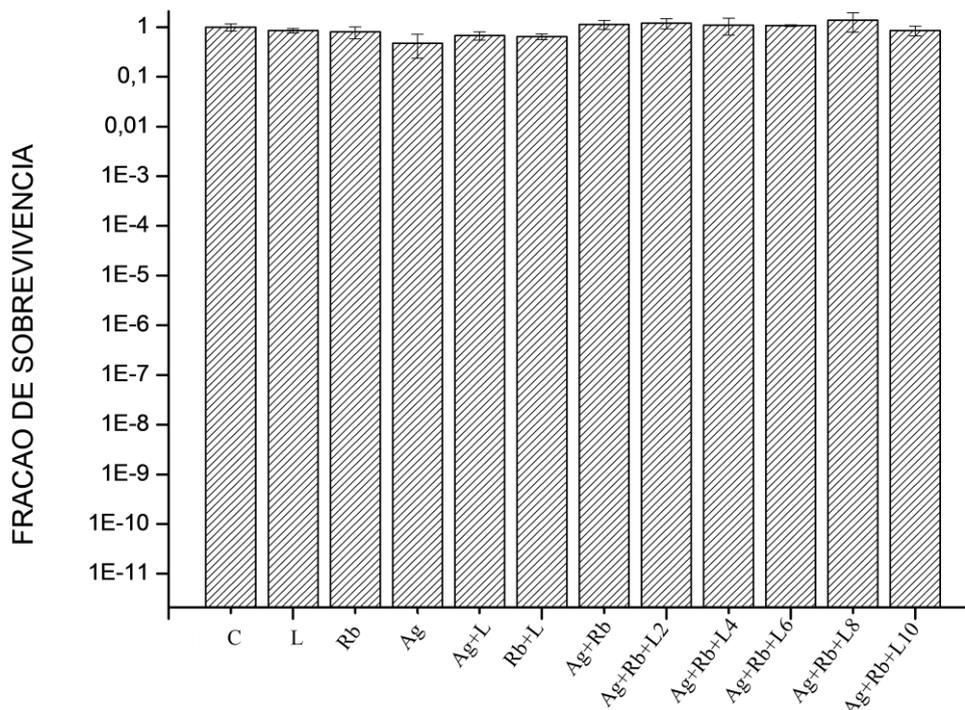


Figura 20: Fração de sobrevivência de células de *Candida albicans* (ATCC), após tratamento com o sistema NpAg+Rb+Luz

O gráfico acima se refere aos resultados do desenho do experimento. C = grupo controle; L = tratamento utilizando apenas um led; Rb = riboflavina; Ag = prata, Ag+Rb = prata e riboflavina juntas; Ag+L = prata irradiada com led; Rb+L = riboflavina irradiada com led e Ag+Rb+L2, Ag+Rb+L4, Ag+Rb+L6, Ag+Rb+L8, Ag+Rb+L10 refere-se ao complexo prata e riboflavina irradiadas por um led em comprimento de onda específico por o tempo de 2, 4, 6, 8 e 10 minutos respectivamente.

A fração de sobrevivência remete a função do número de células viáveis em decorrência do tratamento proposto, ou seja, células que após tratamento permaneceram vivas.

Como observado na Figura 20, a irradiação apenas com LED durante 10 minutos, não foi observado inativação fotodinâmica, bem como o uso isolado de nanopartículas de prata, não apresenta ação antimicrobiana.

O uso apenas do fotossensibilizador, neste caso a riboflavina, também não apresentou nenhuma inativação frente às células de levedura. Quando o sistema NPsAgRb em meio as células de leveduras foi irradiado com LED também não foi observado diferenças significativas nos tempos de irradiação de 2, 4, 6, 8, e 10 minutos.

O tratamento de escolha para estas infecções é o uso de antifúngicos sistêmicos, porém a recorrência de candidíase é comum, além do risco de resistência ao medicamento e interações com outros fármacos. Além disso, os antifúngicos sistêmicos podem causar efeitos adversos, como náuseas, vômito, cefaléia, além do risco de desenvolver anormalidades hepáticas, surgindo assim a necessidade de um tratamento coadjuvante ao convencional (Paz-Cristobal et al., 2014).

Estudos comprovam a utilização de luz associada a fotossensibilizantes como procedimento efetivo para inativação microbiológica. Porém, pode haver parâmetros que influenciam essa terapia, como o tipo e a concentração do fotossensibilizador, a fonte de luz e a dose empregada (JORI, 2006).

Melo et al., (2012) analisando a efetividade da riboflavina em associação com nanopartículas de prata usando uma câmara de iluminação baseada em LEDs com comprimento de onda na região do azul do espectro eletromagnético (415 nm), com irradiância de 17 mW/cm^2 em espécies de *Candida albicans* não obteve resultados estatisticamente significantes ao percentual de inativação fotodinâmica ($p < 0,03$).

Kashiwabuchiet al., (2013), avaliaram a inativação fotodinâmica em culturas de *Candida albicans* e *Fusarium solani* utilizando uma luz ultravioleta com um comprimento de onda de 365 nm a uma densidade de potência de 3 mW/cm^2 , durante 30 minutos na presença de riboflavina. Os resultados apresentados no trabalho qualitativamente foram corroborados com os resultados quantitativos que não mostraram significância estatística entre as amostras.

Sun et al., (2014), em culturas de *Candida albicans*, usou uma luz ultravioleta (365 nm) em associação com a riboflavina, visando a diminuição das unidades formadoras de colônias. Após tratamento, os autores não observaram nenhuma atividade antifúngica da luz ultravioleta em associação com a riboflavina frente ao fungo teste.

Na Figura 21, observa-se as onze espécies de *Candida albicans* que foram utilizadas para experimentação. Após irradiação por 10 minutos, nenhuma das espécies testadas apresentou sensibilidade ao sistema NPsAgRb, com $p < 5$.

Os resultados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva e dos testes t de Student e análise da variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando-se o nível de significância de 5%, onde evidenciou a não significância dos tratamentos que apresentaram comportamentos similares na resposta à PDT, diferindo em um leve aumento da susceptibilidade quando comparado o Ag+R+10 em relação ao grupo controle (FIGURA 22 e TABELA 3).

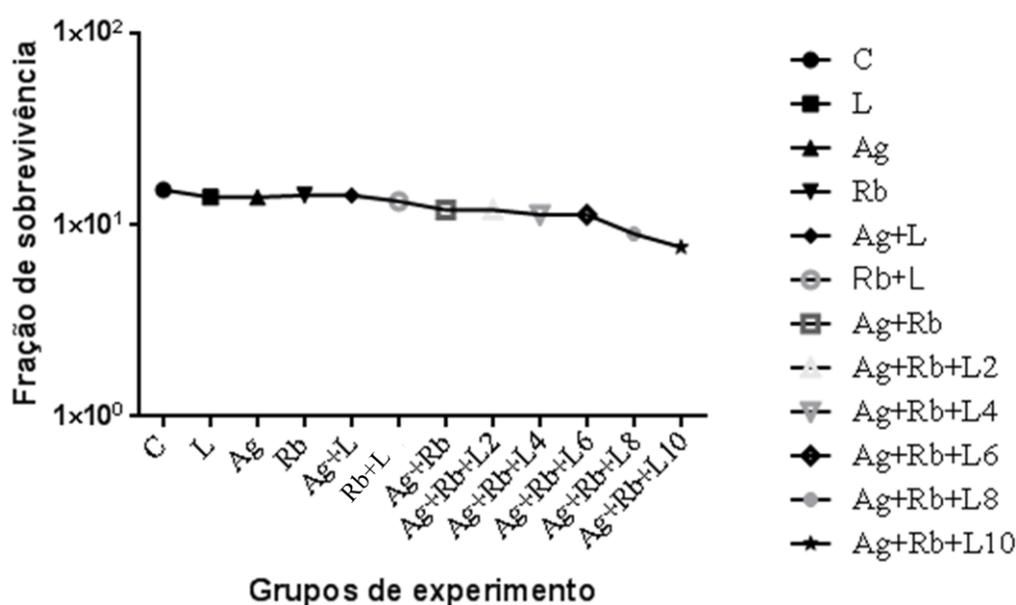


Figura 21: Análise estatística dos 11 isolados referenciando grupo controle (C), grupo Luz (L), grupo prata (Ag), grupo riboflavina (Rb), grupo prata e luz (Ag+L), grupo riboflavina e luz (Rb+L), grupo prata e riboflavina (Ag+Rb) e o complexo prata com riboflavina excitados por um Led em período de tempo de 2, 4, 6, 8 e 10 minutos.

Tabela 3: Estatística realizada através do teste T student para amostras pareadas.

Grupo controle e tratamentos	Média	Intervalo de confiança (DP)	Significante	Sumário
C vs. L	0,666	7,641 - 8,974	NÃO	NS
C vs. Ag	1,333	6,974 - 9,641	NÃO	NS
C vs. Rb	1,667	6,641 - 9,974	NÃO	NS
C vs. Ag+L	1,333	6,974 - 9,641	NÃO	NS
C vs. Rb+L	1,000	7,307 - 9,307	NÃO	NS
C vs. Ag+Rb	0,333	7,974 - 8,641	NÃO	NS
C vs. Ag+Rb+L2	1,000	7,307 - 9,307	NÃO	NS
C vs. Ag+Rb+L4	2,000	6,307 - 10,31	NÃO	NS
C vs. Ag+Rb+L6	2,333	5,974 - 10,64	NÃO	NS
C vs. Ag+Rb+L8	2,546	5,307 - 10,73	NÃO	NS
C vs. Ag+Rb+L10	5,333	2,974 - 13,64	NÃO	NS

Os resultados encontrados não foram significantes entres os grupos, uma vez que $p < 0.5$. Quando observado a média entre o grupo controle (C) e os demais tratamentos, seja ele apenas com luz, riboflavina ou o complexo em si, não houve inibição fotodinâmica, portanto não sendo significante estatisticamente entre eles.

Os resultados foram observados para todas as espécies testadas, não apresentando diferenças estatísticas entre os tratamentos da mesma espécie e nem em comparação com várias espécies em todos os tratamentos.

Em trabalhos relatados por Teichert et al.;2002 e Mima et al.; 2010 não evidenciaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados. Isso evidencia que novos estudos necessitam ser feitos utilizando TFD e fotossensibilizadores na busca de um tratamento adequado e eficaz para inativação de micro-organismos. Ressaltando que não existia na literatura anteriormente trabalhos utilizando nanopartículas de prata e riboflavina associada a TFDa com finalidade de inativação fotodinâmica para fungos analisando vários grupos.

6 CONCLUSÕES

Esse estudo permite concluir que:

- ✓ O uso das NPs de prata associados a um fotossensibilizador e comprimento de onda adequado é um tratamento promissor frente a bactérias Gram-positivas;
- ✓ Bactérias Gram-negativas são mais resistentes a TFDa do que bactérias Gram-positivas;
- ✓ O tempo de irradiação do sistema influi diretamente no resultado da efetividade da TFD, variando de acordo com cada micro-organismo e suas diferenças estruturais. O micro-organismo Gram-negativo *P. aeruginosa* é mais resistente a TFD com o FS Rb, entretanto o micro-organismo Gram-positivo *S. Mutans* apresentou maior sensibilidade à inativação fotodinâmica, o que pode ser justificado pela diferença na composição de parede celular em cada um;
- ✓ Leveduras do gênero *Candida albicans* mesmo após a adição de nanopartículas de prata associadas ao fotossensibilizador não promoveu diferenças na morte celular dessas células fúngicas;
- ✓ Com este trabalho foi possível concluir que levando em conta o tempo de incubação do FS, comprimento de onda específico da iluminação e o uso de NPs de prata é uma alternativa promissora na inativação de micro-organismo, principalmente os Gram-positivos, porém novos estudos necessitam ser abordados para bactérias Gram-negativas e leveduras de *Candida albicans*.

8. REFERÊNCIAS

- Aguirre Urizar, J. M. Candidiasis orales. Rev. Iberoam. Micol., Bilbao, v. 19, n. 1, p. 17-21, 2002.
- Ahmad, I.; Fasihullah, Q.; Vaid, F. H. M. J. Photochem. Photobiol., v. 75, p. 13, 2004.
- Akhavan, O.; Ghaderi, E. "Enhancement of antibacterial properties of Ag nanorods by electric field" Sci. Technol. Adv. Mater, v. 10, p. 5, 2009.
- Amaral, R.; Amorim, J.; Faria J.; Nunes, E.; Soares, J.; Silveira, F. Photodynamic therapy in endodontics - review of literature. RFO, Passo Fundo, v. 15, n. 2, p. 207-211, 2010.
- Arboleda, A.; Miller, D.; Cabot, F.; Taneja, M.; Aguilar, M. C.; Alawa, K.; Amescua, G.; Yoo, S. H.; Parel, J. M. Assessment of rose bengal versus riboflavin photodynamic therapy for inhibition of fungal keratitis isolates. Am J Ophthalmol, v. 158, n. 1, p. 64-70, 2014.
- Avila, M.; Ojcius, D.; Yilmaz, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. DNA and Cell Biology, Nova York, v.28, n. 8, p. 405-411, 2009.
- Avisa. Investigação e controle de bactérias multirresistentes. Disponível em http://www.professores.uff.br/jorge/manual%20controle_bacterias.pdf. Acessado em 22/10/2014.
- Ball, D.J. et al. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. J. Photochem. Photobiol. B, Lausanne, v. 42, n. 2, p. 159-163, 1998.
- Baptista, A.; Kato, I. T.; Prates, R. A.; Suzuki, L. C.; Raele, M. P.; Freitas, A. Z.; Ribeiro, M. S. Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model. Photochemistry and Photobiology, v. 88, p. 584-589, 2012
- Baptista, A.; Kato, I. T.; Prates, R. A.; Suzuki, L. C.; Raele, M. P.; Freitas, A. Z.; Ribeiro, M. S. Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model. Photochemistry and Photobiology, v. 88, p. 584-589, 2012.
- Berni, E.; Ribeiro, C.; Zucolotto, V. Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens. Brasil: ISSN 1517-4786 São Carlos, SP Novembro, 2008.
- Bhatti, M.; Takeuchi, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm associated oral diseases. Oral dis, v. 9, n. 1, p. 23-29, 2003.
- Biel, M. A.; Sievert, C.; Usacheva, M.; Teichert, M.; Wedell, E.; Loebel, N.; et al. Reduction of endotracheal tube biofilms using antimicrobial photodynamic therapy. J Sci Lasers Surg Med, v. 4, p. 586-590. 2011.

Brandt, O.; Mildner, M.; Egger, A. E.; Groessel, M.; Rix, U.; Posch, M.; Keppler, B. K.; Strupp, C.; Mueller, B.; Stingl, G. Nanoscale silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* In press, 2011.

Calcaterra, R.; Pasquantonio, G.; Vitali, L. A.; Nicoletti, M.; Di Girolamo, M.; Mirisola, C.; Prena, M.; Condomínio, R.; Baggi, L. Occurrence of *Candida* species colonization in a population of denture-wearing immigrants. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 26, n. 1, p. 239-46, 2013.

Calzavara-Pinton, P. G.; Venturini, M.; Sala, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v. 21, p. 293-302, 2007.

Camino, D. A.; Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.14, p. 4253-9, 2006.

Carrera, C. M. Análise in vitro do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartícula de prata. Tese. Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo. p. 119, São Paulo, 2009.

Cavalcanti, T. M. Avaliação do efeito antibacteriano da terapia fotodinâmica a laser: estudo in vitro. 71 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Campina Grande, 2011.

Chen, C. P.; Chen, C. T.; Tsai, T. Chitosan nanoparticles for antimicrobial photodynamic inactivation: characterization and in vitro investigation. *J Sci Photochem Photobiol*, v. 88, p. 22-30, 2007.

Choi, H.; Mody, C. C. M. „The long history of molecular electronics: microelectronics origins of nanotechnology“. *Social Studies of Science*, v. 39, n. 11, 2009.

Clement, J. L.; Jarrett, P. S. Antibacterial silver. *Metal based drugs*, v. 1, p. 467. 1994. complete denture – case report. *Full dent sci*, v. 5, n. 17, p. 199-205, 2014.

Correa, R. O.; Rettore Junior, R.; De Sousa, G. R. A terapia fotodinâmica antimicrobiana como opção de tratamento não invasivo da Peri-implantite – Revisão de Literatura. *Brazilian Journal of Periodontology*, Belo Horizonte, v. 22, n. 2, p. 11-16, 2012.

Dahl, T. A.; McGowan, W. M.; Shand, M. A.; Srinivasan, V. S. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol*, v. 151, p. 183-5. 1989.

Decloux, A. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *National Institutes of Health*, v. 1749, n. 5, p. 808-816, 2009.

Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Effect of cell- photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents Chemother*, v. 49, n. 6, p. 2329-35, 2005.

- Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 49, p. 2329-2335, 2005.
- DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 233, p. 351-371, 2002.
- Donnelly, R. F.; McCarron, P. A.; Tunney, M. M. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.
- Dorjnamjin, D.; Ariunaa, M. e Shim, Y. K. Synthesis of silver nanoparticles using hydroxyl functionalized ionic liquids and their antimicrobial activity. *Int. J. Mol. Sci*, v.
- Dovigo, L. N.; Pavarina, A. C.; Mima, E. G. O.; Giampaolo, E. T.; Vergani, C. E.; Bagnato, V. S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*, v. 54, n. 2, p. 123-30, 2011.
- Duarte, D.; Martins, M.; Sousa, J.; Carvalho, M. F.; Pina-Vaz, I. Terapia fotodinâmica num biofilme de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. XXXII Congresso Anual da SPEMD, 2014.
- Edwards, A.M.; Silva, E. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 63, n. 1-3, p. 126-131, 2001.
- Embleton, M. L. et al. Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG-tin (IV) chlorin e6 conjugate. *J. Antimicrobial Chemother.*, London, v. 50, n. 6, p. 857-864, 2002.
- Fabris, A. S.; Nakano, V.; Avila-Campos, M. J. Bacteriological analysis of necrotic pulp and fistulae in primary teeth. *Journal of Applied Oral Science*, v. 22, n. 2, p. 118-124, Abr. 2014.
- Falkiewicz-Dulik, M.; Macura A. B. 2008. Nanosilver as substance biostabilising footwear materials in the foot mycosis prophylaxis. *Mikologia Lekarska*, v. 15, p. 145-50, 2008.
- Falkiewicz-Dulik, M.; Macura A. B. Nanosilver as substance biostabilising footwear materials in the foot mycosis prophylaxis. *Mikologia Lekarska*, v. 15: p. 145-50, 2008.
- Forestier, C.; Guelon, D.; Cluytens, V.; Gillart ,T.; Sirot, J.; de Champs, C. Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in ICU-patients. *Crit Care*, v. 19, n.12, p. 3, 2008.
- Garcez et al. Efficiency of NaCL and laser-assisted photossensibilization on reduction of *Enterococcus faecales* in vitro. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 2006.
- Garcez, A. S.; Nuñez, S. C.; Hamblin, M. R. et al. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant Microflora: A Preliminary Report. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 9, p. 1463-66, 2010.

Goll, A. S.; Faria, M. G. I. Bacterial resistance as a result of use unsuitable of antibiotics, v. 5, n.1, p. 69-72, 2013.

Goll, A. S.; Faria, M. G. I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR*, v. 5, n.1, p. 69-72, 2013.

Gonçalves, F. S. Mecanismos de ação dos antibióticos. Disponível em <http://www.infoescola.com/farmacologia/mecanismos-de-acao-dos-antibioticos/>> Acesso em 22/10/2014.

Goodman, Gilman's. *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. Nova Iorque: McGraw Hill, 2008.

Haddad, M. F.; Filho, M. S. H.; Simonato, L. E. Eficácia da nanopartícula de prata sobre microrganismos da boca e tubo orotraqueal em pacientes de UTI. *Encontro de pós-graduação e iniciação científica*, p. 365-366, 2013.

Hamblin, M. R.; Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*, v. 3, n. 5, p. 436- 50, 2004.

Hernández-Sierra, J. F.; Ruiz, F.; Pena, D. C. C.; Martínez-Gutiérrez, F.; Martínez, A. E.; Guillén, A. J. P.; Tapia-Pérez, H.; Castañón, G. M. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 4, p. 237–240, 2008.

Hönigsmann, H. History of phototherapy in dermatology. *Photochemical Photobiological Sciences*, v. 12, p. 16, 2013.

Hoshi, N.; Mori, H.; Taguchi, H.; Taniguchi, M.; Aoki, H.; Sawada, T.; Kawabata, M.; Kuwabara, A.; Oono, A.; Tanaka, K.; Hori, N.; Toyoda, M.; Kimoto, K. Management of oral candidiasis in denture wearers. *J Prosthodont Res*, v. 55, n. 1, p. 48-52, 2011.

Hustad, S.; Ueland, P.M.; Scheneede, J. Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Clinical Chemistry*, v.45, n. 6, p. 862-868, 1999.

INSA. Resistência aos antimicrobianos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2010.

Issa, M. C. A.; Manela-Azulay, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An Bras Dermatol*, v. 85, n. 4, p. 501-11, 2010.

Jawetz, E.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A. *Microbiologia Médica*. 24. ed., McGraw-Hill Medical, p. 820, 2009.

Johnson, E. M.; Flannagan, S. E.; Sedgley, C. M. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, v. 32, n. 10, p. 946-50, 2006.

Jung, W.K. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 74, p. 2171–2178, 2008.

Junqueira, J. C.; da Silva Martins, J.; Faria, R. L.; Colombo, C. E. D.; Jorge, A. O. C. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers in medical science*, v. 24, n. 6, p. 877-884, 2009.

Kabawat, M.; de Souza, R. F.; Badaró, M. M.; de Koninck, L., Barbeau, J., Rompre, P., Emami, E. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont*, v. 27, n. 4, p. 311-9, 2014.

Kashiwabuchi, R. T.; Khan, T.; Carvalho, F. R. S.; Flavio Hirai, F.; Campos, M. S.; McDonnell, P. J. Antimicrobial susceptibility of photodynamic therapy (UVA/riboflavin) against *Staphylococcus aureus*. *Bras. Oftalmol.*, v. 75, n. 6, 2012.

Kashiwabuchi, T. R.; Carvalho, F. R. S.; Khan, Y. K.; Hirai, F.; Campos, M. S.; McDonnell, P. J. Assessment of fungal viability after long-wave ultraviolet light irradiation combined with riboflavin administration, v. 251, n. 2, p. 521-527, 2013.

Keijsers, B. J. F.; Zaura, E.; Huse, S. M.; Van der Vossen, J. M. B. M.; Schuren, F. H. J.; Montijn, R. C.; Ten Cate, J. M.; Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the Oral Microflora of healthy adults. *J Dent Res*, v. 87, n. 11, p. 1016-1020, 2008.

Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G.C. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B*, v. 107, p. 668, 2003.

Kim, K. J.; Sung, W. S.; Moon, S. K.; Choi, J. S.; Kim, J. G. et al. Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticles on *Candida albicans*. *Biometals*, v. 22, p. 235-242, 2009.

Kim, K. J.; Sung, W. S.; Moon, S. K.; Choi, J. S.; Kim, J. G. et al. Antifungal activity and mode of action of silver nanoparticles on *Candida albicans*. *Biometals*, v. 22, p. 235-242, 2009.

Kim, K. J.; Sung, W. S.; Moon, S. K.; Choi, J. S.; Kim, J. G.; Dong, G. L. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.18, p.1482-1484, 2008.

Kittel, C. “Introduction to Solid State Physics,” Cap. 14, 8a. edição, Wiley, 2005.

Konopka, K.; Goslinski, T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

Krespi, Y. P. et al. Lethal photosensitization of oral pathogens via red-filtered halogen lamp. *Oral Dis.*, Copenhagen, v. 11, n. 1, p. 92-95, 2005.

La Rochette, A.; Silva, E.; Birlouez-Aragon, I.; Mancini, M.; Edwards, A. M. and Morlière, P. Riboflavin photodegradation and photosensitizing effects are highly dependent on oxygen and ascorbate concentration. *Photochemistry and Photobiology*, v. 72, n. 6, p. 815-820, 2000.

Lambrechts, S. A. G.; Aalders, M. C.; Van Marle, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, Washington, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005.

Lee, C. F. et al. δ -Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. *J. Photochem. Photobiol. B*, Lausanne, v. 75, n. 1-2, p. 21-25, 2004.

Leles, S. B.; Schneider, L. R.; Dutra, A. L.; Peralta, S. L.; Lund, R. G. XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2013.

Lok, C. N.; Ho, C. M.; Chen, R.; He, Q. Y.; Yu, W. Y.; Sun, H.; et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*, v. 5, n.4, p. 916-924, 2006.

Lok, C.N. et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem*, v. 12, p. 527-534, 2007.

Machado, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova*, v. 23, p. 237-243, 2000.

Machado, A. R. L. Microrganismos multiresistentes em Unidade de Terapia Intensiva. *Prática Hospitalar*, ano V, n. 28, 2009.

Maftoum-Costa, M.; Naves, K. T.; Oliveira, A. L.; Tedesco, A. C.; da Silva, N. S.; Pacheco-Soares, C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and filament behavior after PDT with chloroaluminium phthalocyanine liposomal in HeLa cells. *Cell biology international*, v. 32, n. 8, p. 1024-1028, 2008.

Maier, S. A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, Springer, 2007.

Maisch, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*, v. 22, n. 2, p. 83-91, 2007.

Makdoui, K.; Bäckman, A.; Mortensen, J; Crafoord, S. Evaluation of antibacterial efficacy of photo-activated riboflavin using ultraviolet light (UVA), v. 248, n. 2, p. 207-212, 2010.

Marcato, P. D.; Nakasato, G.; Brocchi, M.; Melo, P. S.; Huber, C. S.; Ferreira, R. I.; Alves, L. O.; Durán, N. Biogenic silver nanoparticles: antibacterial and cytotoxicity applied to textile fabrics. *Journal of Nano Research*, v. 20, p. 69-76, 2012.

Marra, A. R.; Pereira, C. A.; Gales, A. C.; Menezes, L. C.; Cal, R. G. R.; Souza, J. M. A.; Edmond, M. B.; Faro, C.; Wey, S. B. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology and clinical outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 388-390, 2006.

Martins, S. A.; Combs, J. C.; Noguera, G.; Camacho, W.; Wittmann, P.; Walther, R.; Cano, M.; Dick, J.; Behrens, A. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 49, n. 8, p. 3402-8, 2008.

Massey, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Biochem. Soc. Trans*, v. 28, p. 283, 2000.

McManus, B. A.; Coleman, D. C.; Moran, G.; Pinjon, E.; Diogo, D.; Bounoux, M. E et al. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, v. 46, n. 2, p. 652-664, 2008.

Mehrab, R.; Imani Fooladi, A. A.; Amir Mozafari, N.; Nourani - See more, M. R. A Study on the Antibacterial Activity of Nanosilver Colloidal Solution against ESBL Producing *Pseudomonas aeruginosa*, v. 8, n. 5, p. 685-689, 2012.

Meisel, P.; Kocher, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 79, n. 2, p 159- 170, 2005.

Meisel, P; Kocher, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Alemanha*, v. 79, n. 2, p. 159-170, 2005.

Melo, L. S. A.; Bonfim, F. S.; Souza, A. F.; Marsden, A. Araujo, R. E. XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2012b.

Melo, L. S. A.; Gomes, A. S. L.; Saska S.; Nigoghossian, K.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S. J. L.; Araujo, R. E. Singlet Oxygen Generation Enhanced by Silver-Pectin Nanoparticles. *Journal of Fluoresce*, v. 22, p. 1633–1638, 2012a.

Mima, E. G. O.; Pavarina, A. C.; Dovigo, L. N.; Vergani, C. E.; Costa, C. A. S.; Kurachi, C.; et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 109, n. 3, p. 392-401, 2010.

Mims, C. et al. *Microbiologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Medicina Brasil, p. 728, 2005.

Miyamoto, Y.; Umebayashi, Y.; Nishisaka, T. Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B, Lausanne*, v. 53, n. 1-3, p. 53-59, 1999.

Moghimi, S. M.; Hunter, A. C. e Murray, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB Journal*, v. 19, p. 311, 2005.

Morones, J.; Elechiguerra, J.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.; Ramirez, J. T.; Yacaman, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology, Bristol*, v. 16, p. 234-235, 2005.

Morones, J.R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, p. 2346–2353, 2005.

Morton, C. A. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer - and more? *Archives of Dermatology, Reino Unido*, v. 140, p. 116-120, Jan. 2004.

Nakoneczna, J.; Rapacka-Zdonczyk, A.; Kawiak, A.; Bielawska, K. P.; Grinholc, M. Sublethal photodynamic inactivation renders *Staphylococcus aureus* susceptible to silver nanoparticles. *Photochem. Photobiol. Sci.*, v. 12, p. 1622, 2013.

Neto, E. A. B.; Ribeiro, C.; Zucolotto, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Comunicado técnico. São Carlos-SP, 2008.

Neto, M. M.; Danesi, C. C.; Unfe, D. T. Candidíase bucal: Revisão da literatura. *Saúde*, v. 31, n. 1 – 2, p. 16-26, 2005.

Niakan, M.; Azimi, H. R.; Jafarian, Z.; Mohammadtaghi, G.; Niakan, S.; Mostafavizade, S. M. Evaluation of Nanosilver Solution Stability against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 6, n. 6, 2013.

Nussbaum, E. L.; Lilge, L.; Mazzulli T. Effects of lowlevel laser therapy (lllt) of 810 nm upon in vitro growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. *J Clin Laser Med Surg*, v. 21, n. 5, p. 283-90., 2003.

Nyvad, B.; Kilian, M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res*, v. 95, n. 5, p. 369-380, 1987.

Oleinick, N. L.; Morris, R. L.; Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem. Photobiol. Sci.*, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2002.

Oliveira, C. E.; Gasparoto, T. H.; Dionísio, T. J.; Porto, V.C.; Vieira, N. A.; Santos, F. C.; Lara, V. S. *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont*, v. 23, 2, p. 158-9, 2010.

Orlandia, V. T.; Rybtke, M.; Caruso, E.; Banfia, E.; Tolker-Nielsen, T.; Barbieria, P. Antimicrobial and anti-biofilm effect of a novel BODIPY photosensitizer against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biofouling: The Journal of bioadesão e biofilme Research*, v. 30, n. 8, 2014.

Paschoal, M. A. Avaliação in vitro dos efeitos da terapia fotodinâmica sobre microrganismos cariogênicos presentes na saliva de crianças. Tese (Mestrado em Paz-Cristobal, M. P. et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*, Espanha, v. 57, n. 1, p. 35-42, Jan. 2014.

Paz-Cristobal, M. P. et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*, v. 57, n. 1, p. 35-42, 2014.

Paz-Cristobal, M. P. et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses*, Espanha, v. 57, n. 1, p. 35-42, 2014.

Peloi, L. S. Estudos da aplicação do corante azul de metileno em terapia fotodinâmica. 67 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Química, Maringá, 2008.

Peloi, L. S.; Soares, R. R. S.; Biondo, C. E. G.; Souza, V. R.; Hioka, N.; Kimura, E. Photodynamic effect of light emitting-diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci*, v. 33, n. 2, p. 231-7, 2008.

Pereira, C. A.; Toledo, B. C.; Santos, C. T.; Pereira Costa, A. C.; Back-Brito, G. N.; Kaminagakura, E.; Jorge, A. O. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 76, n. 4, p. 419-24, 2013.

Petica, A.; Gavrilu, S.; Lungua, M.; Buruntea, N.; Panzarub, C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Mater. Sci. Eng. B*, v. 152, p. 22-27, 2008.

Pomarico L. et al. Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV infected children. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, Rio de Janeiro, v. 108, n. 2, p. 203–210, 2009.

Prado, A. R.; Oliveira, J. P.; Keijok, W. J.; Nogueira, B. V.; Guimarães, M. C. C.; Frizera Neto, A.; Pontes, M. J.; Ribeiro, M. R. N.; "Polarização plasmônica de superfície em nanopartículas de ouro", p. 77-78 . In: *Anais do V Encontro Científico de Física Aplicada* [= *Blucher Physics Proceedings*, v.1, n.1 São Paulo: Blucher, 2014.

Reszka, K. J.; Denning, G. M.; Britigan, B. E. Photosensitized oxidation and inactivation of pyocyanin, a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Photochem Photobiol*, v. 82, p. 466-473, 2006.

Rezusta, A. et al. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. *Photochemistry and Photobiology*, Zaragoza, v. 88, n. 3, p. 613-619, 2012.

Rice, L.; Bonomo, R. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. Em Victor Lorian, M. D. (Eds), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5ª ed., p. 441-476, 2005.

Rodrigues, M. A.; Ruggiero, R.; Guerra, W. Compostos inorgânicos como fármacos, *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, v. 115, p. 25–30, 2009.

Rovaldi, C. R.; Pievsky, A.; Sole, N. A.; Friden, P. M.; Rothstein, D. M.; Spacciapoli, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum active against oral pathogens in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, . 12, p. 3364-3367, 2000.

Rovaldi, C. R.; Pievsky, A.; Sole, N. A.; Friden, P. M.; Rothstein, D. M.; Spacciapoli, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum active against oral pathogens in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, . 12, p. 3364-3367, 2000.

Rycenga, M. et al. Controlling the Synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chem. Rev*, v. 111, p. 3669-3712, 2011.

Sader, H. S.; Mendes, R. E.; Gales, A. C.; Jones, R. N.; Pfaller, M. A.; Zoccoli, C.; Sampaio, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultado do programa SENTRY, 1997e 1998. *J. Pneumologia*, v. 27, n. 2, 2001.

Salerno, C.; Pascale, M.; Contaldo, M.; Esposito, V.; Busciolano, M.; Milillo, L.; Guida, A.; Petruzzi, M.; Serpico, R. Candida-associated denture stomatitis. *Med Patol Oral Oral Cir Bucal*, v. 1, n. 2, p. 139-43, 2011.

Santos, H. W. L. Síntese de nanopartículas metálicas por deposição física de vapor em líquidos iônicos e óleos vegetais. Tese de doutorado. Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), p. 146, 2011.

Schackley, D. C.; Whitehurst, C.; Clarke, N. W. et al. Photodynamic therapy. *Journal of Royal Society of Medicine*, v. 92, p. 562-5, 1999.

Schrier, A.; Greebel, G.; Attia, H.; Trokel, S.; Smith, E. F. In Vitro Antimicrobial Efficacy of Riboflavin and Ultraviolet Light on *Staphylococcus aureus*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*, v. 25, 2009.

Sharma, G.; Rao, S.; Bansal, A.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, v. 42, p. 1-7, 2014.

Sharma, M.; Bansal, H.; Gupta, P. K. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. *Curr Microbiol*, v. 50, p. 277-280, 2005.

Shrivastava, S. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 18, p. 225103–225112, 2007.

Silver, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds, *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, p. 341–353, 2003.

Simplício, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, v. 275, n.1, p. 177-182, 2004.

Sousa, G. R.; Leite, N. F.; Silveira, L. B.; Soares, B. M.; Greco, G. D.; Ferreira, M. V. L. Candidiasis treatment with antimicrobial photodynamic therapy in patient with upper. *Educ. Quím*, v. 24, n.1, 2013.

Sun, B.; Li, Z. W.; Yu, H. Q.; Tao, X. C.; Zhang, Y.; Mu, G. Y. Evaluation of the in vitro antimicrobial properties of ultraviolet A/riboflavin mediated crosslinking on *Candida albicans* and *Fusarium solani*. *International journal of ophthalmology*, v. 7, n. 2 p. 205 -210, 2014.

Tabah, A.; Koulenti, D.; Laupland, K.; Misset, B.; Valles, J.; Bruzzi de Carvalho, F.; et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Med*, v. 38, n. 12, p. 1930-1945, 2012.

Tang, W.; Xu, H.; Kopelman, R.; Philbert, M. A. Photodynamic characterization and In vitro application of methylene blue containing nanoparticles platforms. *Photochem Photobiol*, v. 81, p. 242–249, 2005.

Tavares, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, 2000.

Tortora, G. J.; Funke B. R. Case, C. L. *Microbiologia*. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p. 718, 2005.

Tseng, S. P.; Teng, L. J.; Chen, C. T.; Lo, T. H.; Hung, W. C. Chen, H. J.; Hsueh, P. R.; Tsai, J. C. Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Surg Med*, v. 41, p. 391-397, 2009.

Van Hoogmoed, C. G.; Geertsema-Doornbusch, G. I.; Teughels, W.; Quirynen, M.; Busscher, H. J.; Van der Mei, H. C. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. *Oral Microbiol Immunol*, v. 23, n. 1, p. 43-48, 2008.

Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v. 42, n. 1, p. 13-28, July 1998.

Wardlaw, J. L.; Sullivan, T. J.; Lux, C. N.; Austin, F. W. Photodynamic therapy against common bacteria causing wound and skin infections. *The Veterinary Journal*, v. 192, n. 3, p. 374-377, 2011.

Webster, R.P.; Gawde, M.D.; Bhattacharya, R.K. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repairs enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Letters*, v. 98, n. 2, p. 129-135, 1996.

Wong, K. K. Y.; Liu, X. Silver Nanoparticles – The Real “Silver Bullet” in Clinical medicine? *Med. Chem. Commun*, v.1, p.125-131, 2010.

Xia, Y. N.; Halas, N. J. Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. *Materials Research Bulletin*, n. 30, p. 338, 2005.

Yamanaka, M. et al. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 71, p. 7589–7593, 2005.

Yang, W.J. et al. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology*, v. 20, p. 85-102, 2009.

Zanin, I. et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 56, n. 2, p. 324-330, 2006.

Zhang, Y.; Aslan, K.; Previte, M. J. R.; Geddes, C. D. Metal enhanced singlet oxygen generation: a consequence of plasmon enhanced triplet yields. *J Fluoresc*, v. 17, p. 345–349, 2007.

Zhang, Y.; Aslan, K.; Previte, M. J. R.; Geddes, C. D. Plasmonic engineering of singlet oxygen generation. PNAS, v. 105, n. 6, p. 1798 -1802, 2008.

Zhang, Y.; Peng, H.; Huang, W.; Zhou, Y.; Yan, D. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. J Colloid Interface Sci, v. 325, n. 2, p: 371-376, 2008.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EXPLORANDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA: UM ESTUDO COM *S. MUTANS* E *P. AERUGINOSA*

S. R. Sá*, L. S. A. Melo*, A. Baptista***, M. S. Ribeiro***, S. C. Núñez***, I. T. Kato***, R. G. Lima-Neto**, R. E. Araujo*

*Departamento de Eletrônica e Sistemas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

**Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

***Laboratório de Terapia Óptica, Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, Brasil

e-mail: gi_212@hotmail.com

Resumo: A Terapia Fotodinâmica (TFD) baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante fotossensibilizador (FS) seguida da irradiação com luz visível de comprimento de onda adequado. É conhecido que a presença de nanopartículas (NPs) metálicas próximas a FS, utilizados em TFD, pode induzir a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, que induzem a morte celular via necrose e/ou apoptose. Neste trabalho exploramos o efeito antimicrobiano da associação de NPs de prata e do fotossensibilizador Riboflavina na TFD em culturas de *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi verificado que o uso de NPs e Riboflavina foi eficiente na ação antimicrobiana em culturas de *S. mutans* e mostrou-se estatisticamente indiferente para os experimentos realizados com *P. aeruginosa*. Os resultados reforçam a viabilidade do uso de NPs metálicas em TFD e contribuem para melhor entendimento da técnica fotoquímica.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Nanopartículas de Prata, Riboflavina, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) is based on topical or systemic administration of a photosensitizer dye (FS) followed by low dose irradiation with visible light. It is known that the presence of metallic NPs near FS used in PDT can induce a greater production of reactive oxygen species, thereby inducing cell death via necrosis and / or apoptosis. In this study we explored the antimicrobial effect of silver nanoparticles and riboflavin photosensitizer on *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* cultures. We observed that the use of NPs and Riboflavin succeed on the antimicrobial action on *S. mutans* cultures and it was inefficient in the experiments performed on *P. aeruginosa* cultures. The results reinforce the use of metallic NPs on PDT, and contribute to a better understanding of the photochemical technique.

Keywords: Photodynamic therapy, silver nanoparticles, riboflavin, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Introdução

Atualmente, pesquisas buscam por novas modalidades de tratamento antimicrobiano com menores possibilidades de efeitos colaterais para o paciente. Dessa forma, o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica para aplicações biomédicas, tem despertado interesse devido às mudanças nas propriedades físicas quando suas dimensões são reduzidas a dimensões nanométricas [1]. Inúmeras aplicações são atribuídas a nanopartículas metálicas (NPs), em especial as nanopartículas de prata (NPs Ag), possibilitando novas perspectivas para o tratamento de infecções fúngicas, bacterianas e virais, que frequentemente adquirem resistência aos fármacos tradicionalmente administrados [2].

Quando NPs metálicas são irradiadas, geram uma oscilação coletiva dos elétrons do metal (ressonância localizada de plasmons), que induzem a uma alteração do campo elétrico próximo a nanoestrutura [3].

Esse fenômeno pode promover amplificação da fluorescência de agentes de contraste em técnicas de diagnóstico [4] e também permite o acompanhamento de processos dinâmicos de proteínas em técnicas de microscopia [5]. Também foi verificado que a presença de NPs metálicas próximas a fotossensibilizadores (FS), utilizadas em Terapia Fotodinâmica (TFD), podem induzir a uma maior produção de oxigênio singleto (1O_2), que é altamente citotóxico, e espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxila), induzindo assim a morte celular via necrose (por inviabilização direta do tecido ou por danos causados a sua vasculatura) e/ou apoptose (processo de morte celular programada) e melhorar o desempenho da técnica [6].

A TFD tem a vantagem de dupla seletividade: o FS pode ser direcionado às células ou ao local da infecção e o procedimento pode ser repetido várias vezes, se necessário, visto que não há efeitos tóxicos cumulativos e é usualmente não invasivo [7].

Micro-organismos tais como bactérias, fungos e vírus também podem ser mortos pela combinação de luz visível e FS, depois de tratados em um processo denominado Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa). Segundo [8], o efeito bactericida da TFDa pode

ser explicado por dois mecanismos: o primeiro refere-se aos danos causados sobre o DNA e o segundo é causado pela deterioração da membrana citoplasmática por espécies citotóxicas geradas pela TFDa, levando a eventos como a inativação do sistema de transporte da membrana, peroxidação e outros.

Neste trabalho visamos observar a ação antimicrobiana da TFD, devido a interação de NPs de prata e moléculas de Riboflavina em culturas de bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans* ATCC 25175, e outra Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Materiais e métodos

Síntese das Nanopartículas de Prata– As NPs Ag com pectina foram sintetizadas de acordo com o protocolo [9]. Para isso, 1 mL de uma solução de pectina (0.5%) e 3mL de uma solução de AgNO₃ (10⁻³ M) foram adicionadas sob agitação a 25 mL de água destilada. A solução foi aquecida até atingir a temperatura de 90°C e então 1 mL de solução de Citrato de sódio (0.1M) foi adicionada. O aquecimento a 90°C e a agitação foi mantido durante 30 minutos.

A morfologia das NPs Ag foi determinada a partir da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) Tecnai20. Os colóides também foram caracterizados utilizando um espectrômetro UV-visível (UV-3150/3101; SHIMADZU).

Riboflavina – O agente fotossensibilizador usado na pesquisa foi a riboflavina (Rb), composto orgânico que faz parte do complexo vitamínico B2. Aqui foram utilizadas soluções aquosas de riboflavina com concentração de 157 µM.

LED – Para o experimento foi utilizado um LED λ=455+20nm (MMOptics, São Carlos, Brasil) com densidade de potência de 90mW/cm².

Micro-organismos – Foram avaliados 2 tipos de bactérias: uma Gram-positiva (*Streptococcus mutans*, ATCC 25175) e uma Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853).

Os inóculos de *P. aeruginosa* foram cultivados e estocados em TSA (Tryptic Soy Agar), em presença de O₂, a 37°C, por 24 horas. *S. mutans* cresceram em meio anaeróbio, em BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C por 2 dias.

Teste em cultura dos biocolóides – Na avaliação da ação dos biocolóides (NPs Ag – Rb) foram classificadas em 12 grupos, de acordo com o tratamento que receberam (Tabela 1).

No grupo controle, 350µL da suspensão do micro-organismo em PBS e 150 µL de água destilada estéril foram depositados em tubos Eppendorf totalizando um volume final de 500 µL, que posteriormente foram levados ao vortex e agitados. Depois de agitada a suspensão ficou em repouso por um período de 10 minutos (Tempo adotado para todas as amostras). Após os 10 minutos a suspensão foi levada novamente ao vortex e agitada. Em seguida uma alíquota de 20 µL foi adicionada ao poço A-1 marcado em uma placa de

microtitulação na qual foi realizada uma diluição seriada. Para isso cada poço a partir do -1 já continha 180 µL de PBS de forma que ao final da diluição o volume final do poço foi de 200 µL e com concentração final de 10⁻⁵.

Tabela 1: Grupos utilizados para avaliação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente bactérias Gram-positiva e Gram-negativa

GRUPOS	TRATAMENTOS
Grupo 1 - Controle	Não foi submetido a nenhum tratamento
Grupo 2 – LED	Amostras irradiadas por 10 minutos, sem AgNPs ou Riboflavina.
Grupo 3 – Ag	Apenas Ag NPs foi adicionada aos micro-organismos.
Grupo 4 - Ag + LED	Ag NPs e irradiação com LED por 10 minutos.
Grupo 5 - Rb	Apenas riboflavina foi adicionada aos micro-organismos.
Grupo 6 - Rb + LED 10 minutos	Depois da adição da riboflavina, a amostra foi irradiada por 10 minutos.
Grupo 7 – Rb + NPs Ag	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos sem irradiação.
Grupo 8 – NPs Ag + Rb + LED 2 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 2 minutos.
Grupo 9 - NPs Ag + Rb + LED 4 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 4 minutos.
Grupo 10 - NPs Ag + Rb + LED 6 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 6 minutos.
Grupo 11 - NPs Ag + Rb + LED 8 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 8 minutos.
Grupo 12 - NPs Ag + Rb + LED 10 minutos	Foram adicionadas riboflavina e NPs Ag aos micro-organismos, em seguida amostras foram irradiadas com LED por 10 minutos.

O grupo que recebeu o biocolóide Rb ou Ag, 350 µL da suspensão do micro-organismo em PBS foi alíquotado e 150 µL do biocolóide foi adicionado em tubo Eppendorf chegando a um volume final de 500 µL, ficando em repouso por 10 minutos. Após o final do

tempo pré-estabelecido, foi levado novamente ao vortex e agitado. Dessa suspensão 20 μL foi alíquotado e adicionado a placa de microtitulação para posterior diluição seriada. Na placa de microtitulação cada poço já continha previamente 180 μL de PBS. Sendo assim, o volume final foi de 200 μL e com concentração final de 10^{-5} .

Nos grupos 8, 9, 10, 11 e 12 inicialmente 350 μL da suspensão do micro-organismo suspenso em PBS e 150 μL do sistema (Ag, Rb, Ag+Rb), foram depositados em tubo Eppendorf chegando a um volume final de 500 μL e levados ao vortex e agitado. Depois de agitada em vortex, essa suspensão ficou em repouso por um período de 10 minutos para todas as amostras. Ao final desse período, a amostra foi novamente agitada em vortex e uma alíquota de 150 μL foi retirada e colocada em um poço da placa de microtitulação e então foram irradiados com LED com $\lambda=455\pm 20\text{nm}$ (MMOptics, São Carlos, Brasil) com taxa de fluência de $90\text{mW}/\text{cm}^2$ por um período de 2, 4, 6, 8 e 10 minutos.

Diluição seriada e plaqueamento – Após tratamento, uma alíquota de 20 μL dos micro-organismos foi retirada e feita diluição seriada. A diluição seriada ocorreu de 1:10, 1:100, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$. Ao final do processo, uma alíquota de 10 μL de cada grupo do poço foi retirada e dispensada em placa de petri (Meio TSH para *Pseudomonas aeruginosa* e BHI para *Streptococcus mutans*) com auxílio de uma micropipeta multicanal. Essas placas ficaram em repouso para que o meio absorvesse as amostras. Após este período as 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) utilizando o contador de colônias.

Após a contagem das UFC, foi utilizado o teste estatístico ANOVA com teste de Turkey, e os resultados apresentados em gráficos.

Resultados e Discussão

Ao avaliar a fração de sobrevivência dos micro-organismos testados, presente nos gráficos da Figura 1 A e B, conclui-se que a PDT que associou a riboflavina (fotossensibilizador) com as NPs Ag foi eficiente nas culturas de *S. mutans*, usando o teste estatístico ANOVA com teste de Turkey. A significância foi aceita em $p<0,05$ (Figura 1 A), e mostrou-se estatisticamente indiferente para os experimentos realizados com *P. aeruginosa*, $p>0,05$ (Figura 1 B). Esse resultado comprova dados da literatura que relatam a maior suscetibilidade das Gram-positivas à PDT, mesmo quando o tratamento convencional foi intensificado com a presença das NPs Ag.

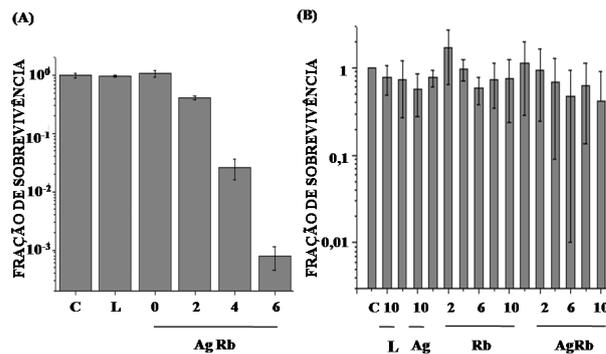


Figura 1 – Fração de sobrevivência do *S. mutans*, em A, e da *P. aeruginosa*, em B.

Para justificar os resultados obtidos a partir da análise dos gráficos da fração de sobrevivência, foi realizado um estudo que permitiu avaliar a quantidade e fotossensibilizador que penetrou na célula de cada tipo de bactéria estudada.

Os inóculos das duas bactérias avaliadas foram incubados com riboflavina e NPs Ag por 30 minutos, em seguida as células foram lavadas com PBS. Alíquotas de 1 mL, de cada amostra, foram centrifugadas e os precipitados suspensos em 1 mL de NaOH (0.1 M) e SDS (dodecil sulfato 12 poliacrilamida, 1%), por 24h. Em seguida, a absorbância foi medida e, conforme observado na Figura 2, a intensidade maior foi observada nas amostras que continham *S. mutans*, propondo que houve uma maior captação do sistema NPsAg – Riboflavina, usado para a PDT, por esse tipo de bactéria. Esse resultado reforça os estudos citados anteriormente que mostram uma suscetibilidade maior das Gram-positivas à técnica estudada.

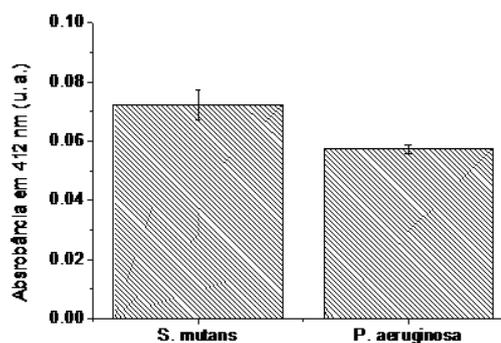


Figura 2: Resultado do espectro de absorção, em 412 nm, do sistema NPs Ag – riboflavina absorvido pelas células de *S. mutans* e *P. aeruginosa*.

Quando irradiadas, as NPs metálicas podem gerar um aumento do campo eletromagnético em região próxima as nanoestruturas. O aumento do campo induz uma melhor excitação das moléculas fotossensibilizadoras e consequentemente aumenta a produção de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio no meio [3]. Alguns parâmetros são importantes nesse processo, como a separação espacial entre NPs e FS, e a sobreposição espectral da banda de plasmon e de absorção da molécula

fotossensibilizadora. Em solução, a distância entre os colóides é determinada pela concentração das nanoestruturas e das moléculas fotossensíveis, pela espessura da camada de pectina que envolve as NPs e também pela interação eletrostática molécula-NPs [9].

Essa interação entre o fotossensibilizador, luz e oxigênio, gera oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais hidroxila), capazes de induzir a inviabilização de células e a morte de micro-organismos, como observado por Raab [9]. Isso é resultado da reação envolvida, que decorre da excitação eletrônica do corante pela luz em comprimento de onda adequado, seguidos de dois mecanismos principais de reação, a partir de seu estado excitado: transferência de elétrons (conhecido como mecanismo tipo 1) e transferência de energia (mecanismo tipo 2). O mecanismo o tipo 2 é o que ocorre com maior frequência, conferindo oxigênio singlete, sendo altamente citotóxico aos micro-organismos, levando a um processo de apoptose [8].

Com a crescente resistência dos micro-organismos aos antibióticos tradicionalmente empregados, é importante encontrar novas técnicas de tratamento que atuem por mecanismos de ações diferentes aos fármacos em uso. Nesse contexto, a TFDa tem sido proposta como uma terapia antimicrobiana alternativa, sendo efetiva contra bactérias, fungos e vírus [10].

Quanto a resistência no tratamento contra bactérias usando TFDa, é conhecido que bactérias Gram-positivas, são mais susceptíveis ao tratamento que bactérias Gram-negativas, isso pode ser em decorrência pelas diferenças estruturais da parede celular [11] [12].

A escolha do fotossensibilizador utilizado é essencial para um tratamento eficaz, pois é baseado na capacidade do mesmo em absorver luz em comprimento de onda específico ao LED. Por isso, novos fotossensibilizados estão sendo empregados, dentre eles a Rb, uma vitamina do complexo B2. Segundo a referência [9], quantificaram em 28,5% a amplificação na produção de oxigênio singlete, sendo um fotossensibilizador propenso no tratamento de infecções por micro-organismos.

Conclusão

A TFDa pode conferir tratamento a infecções contra micro-organismos que frequentemente adquirem resistência aos antibióticos tradicionalmente empregados tornando-se um método alternativo no tratamento dessas infecções. Os resultados apresentados estimulam o uso de NPs metálicas e Riboflavina sendo eficiente antimicrobiano em culturas de *S. mutans* e mostrou-se estatisticamente indiferente para *P. aeruginosa*.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro da FACEPE e do CNPq. Os autores também agradecem o apoio do INCT de Fotônica.

Referências

- [1] Huang, T.; Xu, X. N. Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. *J Mater Chem*. 2010, 20, 9867.
- [2] Machado, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Rev Quím Nova*. 2010, 23(2): 237-3.
- [3] Aslan, K.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Matveeva, E.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Metal-enhanced fluorescence: An emerging tool in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 2005, 16, 55.
- [4] Ray, K.; Badugu, R.; Lakowicz, J. R. Metal-enhanced fluorescence from CdTe nanocrystals: A single-molecule fluorescence study. *J Am Chem Soc*. 2006, 128, 8998.
- [5] Barud, H. S.; Assunção, R. M. N.; Martines, M. A. U.; Dexpert-Ghys, J.; Marques, R. F. C.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S. J. L. Bacterial cellulose-silica organic-inorganic hybrids. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2008, 46, 363.
- [6] Zhang, Y.; Aslan, K.; Previte, M. J. R.; Gedds, C. D. Metal-enhanced singlet oxygen generation: a consequence of plasmon enhanced triplet yields. *J fluoresce*. 2007, 17, 345-9.
- [7] Perusssi, J. R. Inativação fotodinâmica de micro-organismos. *Rev Quim Nova*. 2007, 30(4): 988-4.
- [8] Takasaki, A. A.; Aoki, a.; Mizutani, K.; Schuwarz, F.; Sculean, a.; Wang, C. Y. et al. Application of antimicrobial photodynamic in periodontal and peri-implant diseases. *Pediodontol*. 2009, 51, 109-40.
- [9] Melo L. S. A.; Gomes, A. S. L.; Saska, S.; Nigoghossian, K. Y.; Messaddeq, R. S. J. L.; De Araujo, R. E. . Singlet Oxygen Generation Enhanced By Silver-Pectin Nanoparticles. *J Fluoresce*. 2012, 22, 230-35.
- [10] Souza, G. D.; Rodrigues, M. A.; Silva, P. P.; Guerra, W. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. *Educ. Quím*. 2013, 24(1): 1-4.
- [11] Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation Antimicrob agents. *Chemother*. 2005, 49, 2329.