

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliações das atividades fotossensibilizadoras do azul de metileno, da
cloro-alumínio ftalocianina e do nitrosilo de rutênio no fungo *Cryptococcus
neoformans***

Gabriela Braga Rodrigues

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliações das atividades fotossensibilizadoras do azul de metileno, da cloro-alumínio ftalocianina e do nitrosilo de rutênio no fungo *Cryptococcus neoformans*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Gabriela Braga Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

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

Rodrigues, Gabriela Braga Rodrigues

Avaliações das atividades fotossensibilizadoras do azul de metileno, da cloro-alumínio ftalocianina e do nitrosilo de rutênio no fungo *Cryptococcus neoformans*.

88 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Braga, Gilberto Úbida Leite.

1. Fotobiologia de fungos. 2. Fotossensibilização de fungos. 3. Inativação fotodinâmica de fungos. 4. Azul de metileno. 5. Nitrosilo de rutênio. 6. Ftalocianinas. 7. *Cryptococcus neoformans*

Autora: Gabriela Braga Rodrigues

Título do trabalho: Avaliações das atividades fotossensibilizadoras do azul de metileno, da cloro-alumínio ftalocianina e do nitrosilo de rutênio no fungo *Cryptococcus neoformans*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho:

- A minha avó Mayde (1928-2004) minha fonte de inspiração e orgulho;
- A minha mãe Graça e irmã Roberta por terem me ajudado e aconselhado em todas as horas de minha vida. Vocês são minha base, sem vocês não sou ninguém;
- Minha maravilhosa Tia Zelinda por me apoiar e ensinar como ser uma grande pesquisadora, me mostrando que é fácil ser feliz quando se faz o que se gosta;
- Ao meu namorado Luiz por sempre me lembrar dos meus objetivos e principalmente pela paciência (que paciência!!!). Por fazer parte da minha vida, tornando-a melhor;
- A Deus que esteve o tempo todo me guiando e protegendo.

Agradecimentos Especiais

- Ao meu orientador Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga, por acreditar no meu potencial e pelas críticas construtivas que ajudaram no meu desenvolvimento científico. Meu imenso respeito e admiração.

- A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de Mestrado;

Agradecimentos

- Ao técnico do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Homeopática José Orestes Del Ciampo por viabilizar as medidas de potencial zeta e tamanho de partícula;

- Ao Prof. Dr. Roberto Santana por ter nos cedido o composto nitrosilo de rutênio;

- A técnica do laboratório de Química Inorgânica, Juliana Cristina Biazzotto de Moraes, pelas exposições a luz visível e pelos experimentos com o nitrosilo de rutênio;

- Ao aluno de doutorado Fernando Lucas Primo pelo preparo das nanoemulsões com ftalocianina e azul de metileno, pelas exposições ao laser e por ter esclarecido dúvidas em relação aos compostos;

- Aos técnicos Sérgio Henrique da Silva e Ludmilla Tonani pela imensa contribuição na realização deste trabalho;

- Aos que foram e ainda estão no Laboratório de Fotobiologia e Genética de Microrganismos: Ana Luiza Calil, Bruno H. R. Barros, Letícia A. Schiave, Fernanda P. Gonzales, Érika Nascimento, Everaldo dos Reis Marques, Letícia Gonçalves

Salgado e Tiago A. Cocio pela paciência e por todos os dias de trabalho.

- A todos da minha família e a aqueles que considero minha família.

"Quando alguém evolui, evolui tudo que está à sua volta."

Paulo Coelho

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	2
1.2 Fotossensibilizadores	13
1.2.1 Fotossensibilizadores derivados da fenotiazina.....	14
1.2.2 Ftalocianinas	16
1.2.3 Nitrosilos de rutênio.....	18
1.3 Terapia fotodinâmica	20
1.4 Inativação fotodinâmica de microrganismos	24
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Linhagens de <i>C. neoformans</i>	31
3.2 Meio não indutor e indutor da melanização.....	31
3.3 Fotossensibilizadores	32
3.3.1 Preparação das nanoemulsões.....	33
3.4 Exposições à luz.....	34
3.4.1 Exposições à luz visível.....	34
3.4.2 Exposições ao laser.....	35
3.5 Obtenção de células melanizadas e não melanizadas	35
3.6 Curva de crescimento e de culturabilidade	35
3.7 Avaliação semiquantitativa da fotossensibilização de células melanizadas e não melanizadas com diferentes fotossensibilizadores	36
3.7.1 Azul de metileno.....	36
3.7.2 Ftalocianina e azul de metileno veiculados em nanoemulsão	37
3.7.3 Nitrosilo de rutênio	38
3.7.3.1 Avaliação da atividade do NO liberado pela fotossensibilização do complexo nitrosilo de rutênio e da toxicidade do complexo sem o óxido nítrico (Aquo complexo)	38

3.7.3.2 Avaliação da fotossensibilização com o nitrosilo de rutênio e do efeito de sua combinação com redutores	39
3.8 Avaliação semiquantitativa do efeito de diferentes diluentes na fotossensibilização de <i>C. neoformans</i> com ftalocianina.....	40
3.9 Avaliação quantitativa da fotossensibilização de células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i>	41
3.9.1 Azul de metileno.....	41
3.9.2 Ftalocianinas em nanoemulsão	42
3.10 Delineamento experimental e análise estatística	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Crescimento e melanização em meios com e sem L-dopa	44
4.2 Avaliação semiquantitativa da fotossensibilização de células melanizadas e não melanizadas.....	45
4.3 Avaliação quantitativa da fotossensibilização com MB de células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i>	48
4.4. Avaliação semiquantitativa da fotossensibilização com nanoemulsões contendo ftalocianinas e azul de metileno de células melanizadas e não melanizadas de <i>C. neoformans</i>	55
4.5 Avaliação quantitativa da fotossensibilização de células de <i>C. neoformans</i> com ftalocianinas em nanoemulsão	60
4.6 Avaliação semiquantitativa do efeito de diferentes diluentes na fotossensibilização de células de <i>C. neoformans</i>	61
4.7 Avaliação semiquantitativa da sensibilidade a fotossensibilização de células de <i>C. neoformans</i> ao nitrosilo de rutênio.....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
APÊNDICES	78

RESUMO

Rodrigues, G. B. **Avaliações das atividades fotossensibilizadoras do azul de metileno, da cloro-alumínio ftalocianina e do nitrosilo de rutênio no fungo *Cryptococcus neoformans***. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* é um fungo saprófita, com ampla distribuição geográfica, que é normalmente isolado de solos que contêm excretas de pombos e detritos vegetais. Apesar de saprófita, o fungo pode infectar e causar doença em uma grande variedade de hospedeiros animais, como mamíferos, aves e insetos. O número de casos de micoses graves, causadas por *C. neoformans* e por outros gêneros de fungos, tem aumentado em todo o mundo, principalmente devido ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos. Adicionalmente, a emergência de novas espécies de patógenos e a seleção de linhagens tolerantes aos antifúngicos comumente utilizados fazem com que o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de fungos seja extremamente desejável. A inativação fotodinâmica de fungos é um método novo e promissor, que pode ser utilizado tanto para o controle de micoses (em animais e em vegetais), como para a eliminação de fungos do ambiente. A fotoinativação de fungos é baseada no uso de fotossensibilizadores que se acumulam ou que são preferencialmente metabolizados pelas células do microrganismo-alvo. A seguir, o fotossensibilizador é exposto à luz visível, que, na presença de oxigênio, inicia processos fotoquímicos que produzem uma série de espécies reativas de oxigênio capazes de matar as células fúngicas sem provocar danos significativos nos tecidos do hospedeiro. Neste trabalho, foram avaliadas as eficácias do azul de metileno (MB) (em solução e em nanoemulsão), da cloro-alumínio ftalocianina (em nanoemulsão) e do complexo nitrosilo de rutênio (em solução) como fotossensibilizadores para a fotoinativação de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*. *C. neoformans* foi suscetível à fotoinativação pela cloro-alumínio ftalocianina, com uma inativação próxima de 100% quando foi utilizada uma combinação apropriada da concentração do fotossensibilizador e da dose de luz. A completa fotoinativação do fungo pela ftalocianina, em condições compatíveis com a terapia fotodinâmica, abre a perspectiva da utilização desse fotossensibilizador para o tratamento de micoses causadas por *C. neoformans*. A fotoinativação pelo MB foi apenas parcial e não ocorreu fotoinativação pelo nitrosilo de rutênio. Nenhum dos fotossensibilizadores matou o fungo na ausência da luz. Também foram feitos experimentos para se verificar a influência do tempo de crescimento e da melanização na tolerância de *C. neoformans* à fotoinativação pelo MB. Houve diferença significativa na tolerância entre diferentes linhagens de *C. neoformans*. Para a maioria dos tratamentos [linhagens e tempo de crescimento (4, 6 ou 8 dias)], não houve diferença significativa entre a tolerância de células melanizadas e não melanizadas. Também não foi observada diferença na tolerância entre células com idade de 4 a 8 dias.

Palavras-Chave: fotobiologia de fungos, fotossensibilização de fungos, inativação fotodinâmica de fungos, azul de metileno, nitrosilo de rutênio, ftalocianinas, *Cryptococcus neoformans*.

ABSTRACT

Rodrigues, G. B. **Estimate of the photosensitizing activities of the methylene blue, chloroaluminum phthalocyanine and nitrosyl ruthenium complex in the fungus *Cryptococcus neoformans***. 2008. 88f. Thesis (Master's Degree). College of Pharmaceutical Sciences – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2008

The basidiomycete *Cryptococcus neoformans* is a saprophytic worldwide fungus which is normally isolated from soils contaminated with pigeon excreta and plant detritus. Despite a saprophytic existence, the fungus can infect and cause disease in a wide variety of animal hosts such as mammals, birds and insects. Serious infections caused by *C. neoformans* and by other genera of fungi have emerged all over the world, primarily due to the increased numbers of immunocompromised individuals. Additionally, the emergence of new species and antimycotic-resistant strains of pathogenic fungi makes the development of new fungus-control techniques highly desirable. Photodynamic inactivation of fungi is a new and promising method that can be used to control localized mycoses or kill fungi in the environment. The photodynamic inactivation of fungi is based on the use of a photosensitizer that accumulates in, or preferentially is metabolized by, cells of the target microorganism. The photosensitizer is then exposed to visible light in the presence of oxygen, and this starts photochemical processes that produce a series of reactive oxygen species (ROS) capable of killing the fungal cells without causing significant damage to host tissues. We report here the efficacy of methylene blue (MB) (in solution and in nanoemulsion), chloroaluminum phthalocyanine (in nanoemulsion) and nitrosyl ruthenium complex (in solution) as photosensitizers in photoinactivation of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* yeast cells. *C. neoformans* were susceptible to photoinactivation by chloroaluminum phthalocyanine with inactivation close to 100% when the appropriate combination of photosensitizer concentration and light-exposure dose was used. Photoinactivation by MB was only partial and nitrosyl ruthenium complex was ineffective. In the dark, neither photosensitizers inactivated the fungus. Complementary experiments were performed to estimate the effect of the age of the cells and of melanization in the fungus tolerance to photoinactivation by MB. There was a significative difference in the tolerance among strains of *C. neoformans*. For most of the treatments (strains and time of growth) there was no difference between the tolerance of melanized and nonmelanized cells. There was no difference in the tolerance among 4 to 8-day cells either.

Keywords: fungal photobiology, photosensitization of fungi, photodynamic inactivation of fungi, methylene blue, nitrosyl ruthenium, phthalocyanines, *Cryptococcus neoformans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura molecular do azul de metileno	15
Figura 2.	Estrutura molecular da cloro-alumínio-ftalocianina (AlClPc)	17
Figura 3.	Estrutura molecular do complexo [Ru(NH.NHq)(tpy)NO](PF ₆) ₃ ; Ru (Rutênio), NH.NHq (benzoquinona-diimina), tpy (terpiridina), NO (óxido nítrico), (PF ₆) ₃ (ânion hexafluorofosfato).....	20
Figura 4.	Esquema das etapas fotoquímicas / fotofísicas, envolvidas na fotossensibilização. Diagrama de Jablonski.....	23
Figura 5.	Emissão espectral da lâmpada halógena de 300 W (Osran, Brasil).....	34
Figura 6.	Melanização das linhagens ATCC 90112 e ATCC 28957 de <i>C. neoformans</i> , crescidas em meio líquido com (esquerda) e sem L-dopa (direita), por 8 dias. Ao final do crescimento, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em PBS e a concentração foi ajustada para aproximadamente 10 ⁶ células mL ⁻¹	45
Figura 7.	Efeito de exposições apenas ao fotossensibilizador (A e C) e de exposições simultâneas à luz e ao fotossensibilizador (B e D) em células melanizadas (A e B) e não melanizadas (C e D) de <i>C. neoformans</i> ATCC 28957. Foram avaliadas células com 4, 6 e 8 dias de desenvolvimento. Colônias com 48 h de crescimento	47
Figura 8.	Culturabilidade relativa das células melanizadas (M) e não melanizadas (NM) com 4 (A e D), 6 (B e E) e 8 (C e F) dias de crescimento de <i>C. neoformans</i> expostas apenas à luz (L), apenas ao fotossensibilizador (F) e simultaneamente à luz e ao fotossensibilizador (L+F). A culturabilidade relativa foi estimada em relação a controles que não foram expostos nem à luz e nem ao fotossensibilizador. As UFCs foram contadas após 24 (A, B e C) e 96 (D, E e F) h.....	52
Figura 9.	Efeito da fotossensibilização (L + F) na culturabilidade de células melanizadas (M) e não melanizadas (NM) das linhagens ATCC 28957 e 90112 com 4 (A), 6 (B) e 8 (D) dias. A culturabilidade relativa foi estimada, após 24 e 96 h, em relação às células que foram expostas apenas ao fotossensibilizador	53
Figura 10.	Efeito do tratamento apenas com o fotossensibilizador (A e C) e com L + F (B e D) de células melanizadas e não melanizadas com 4, 6 e 8 dias de crescimento das linhagens ATCC 28957 e 90112 de <i>C. neoformans</i> . As células foram pré-incubadas por 10 min e expostas por 30 min. As fotografias foram tiradas após 24 e 48 h de desenvolvimento	54
Figura 11.	Fotossensibilização de <i>C. neoformans</i> com ftalocianina e com MB em nanoemulsões. As células foram expostas apenas à luz (L), apenas ao fotossensibilizador (F) e a L+F. Os controles não foram expostos nem à luz e nem ao fotossensibilizador (-L-F). O laser foi utilizado como fonte de luz e a dose recebida ao final das exposições foi 10 J cm ⁻² . (A) Nanoemulsões contendo ftalocianinas (AlClPc/NE). (B) Nanoemulsões contendo azul de metileno (MB/NE). Colônias com 48 h de crescimento.....	57

- Figura 12.** Fotossensibilização de *C. neoformans* com azul de metileno em solução (MB), com MB em nanoemulsão (MB/NE) e com ftalocianina em nanoemulsão (AICIPc/NE). Controles nos quais as células foram tratadas apenas com o PBS e apenas com a nanoemulsão (NE) também são mostrados. As células foram lavadas com PBS antes de serem expostas à luz para a retirada do excesso de fotossensibilizador. O laser foi utilizado como fonte de luz e a dose recebida ao final da exposição foi 10 J cm^{-2} (irradiância de 56 mW cm^{-2}). Colônias com 48 h de crescimento.....57
- Figura 13.** Fotossensibilização de células de *C. neoformans* com diferentes concentrações de ftalocianinas em nanoemulsão (0, 0,026; 0,26; 1,3 e 2,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 0, 0,045; 0,452; 2,261; 4,522 mM, respectivamente). As células foram pré-incubadas por 30 min, lavadas com PBS e expostas as doses de 5 e 10 J cm^{-2} através das irradiâncias de 28 e 56 mW cm^{-2} , respectivamente. As colônias foram fotografadas após 48 h de crescimento58
- Figura 14.** Fotossensibilização de células melanizadas de *C. neoformans* com azul de metileno em solução (MB) ou em nanoemulsão (MB/NE) na concentração de $26 \mu\text{g mL}^{-1}$ (69,56 mM). As células foram pré-incubadas por 30 min com os fotossensibilizadores, lavadas ou não com PBS e expostas a dose de 10 J cm^{-2} (irradiância de 56 mW cm^{-2}). Nos controles as células foram tratadas apenas com PBS ou foram tratadas com os fotossensibilizadores mas não expostas à luz. Colônia com 48 h e crescimento.....59
- Figura 15.** Fotoinativação de células melanizadas da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans* da linhagem ATCC 28957. As células foram pré-incubadas por 30 min, lavadas em PBS e posteriormente expostas à dose de 5 J cm^{-2} (28 mW cm^{-2} de irradiância). Contagem de UFCs após 96 h 60
- Figura 16.** Efeito de exposições simultâneas à luz e ao fotossensibilizador ftalocianina em nanoemulsão diluído em água, salina e PBS, na concentração de $2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (4,522 mM) de células melanizadas com 6 dias de crescimento da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas por 30 min e posteriormente lavadas ou não com água, salina e PBS e expostas à dose de 10 J cm^{-2} e irradiância de 56 mW cm^{-2} . Colônias com 48 h de crescimento 61
- Figura 17.** Efeito de exposições simultâneas à luz e ao fotossensibilizador ftalocianina em nanoemulsão na concentração de $2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (4,522 mM) diluído em água, salina em várias concentrações e PBS de células melanizadas com 6 dias de crescimento da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas por 30 min e posteriormente lavadas ou não com água, salina em várias concentrações e PBS e expostas ao laser numa dose de 10 J cm^{-2} e irradiância de 56 mW cm^{-2} . Células-controle ficaram abrigadas da luz durante todo o experimento. Resultado fotografado após 48 h de crescimento.....61

- Figura 18.** Efeito da exposição apenas ao Aquo (nitrosilo de rutênio previamente exposto à luz por 4 h) (-L+Aquo), da exposição simultânea à luz e ao Aquo (+L+Aquo) e da exposição simultânea à luz e ao nitrosilo de rutênio em células melanizadas da linhagem ATCC 28957. As concentrações finais dos compostos foram 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M. As células foram pré-incubadas por 30 min e expostas a uma lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão por 120 min. Controles não expostos à luz foram feitos para todos os tratamentos. Colônias om 48 h de crescimento 62
- Figura 19.** Efeito do nitrosilo de rutênio (10^{-3} M), de misturas do nitrosilo de rutênio (10^{-4} M) com os redutores ácido ascórbico (10^{-3} M) e noradrenalina (10^{-3} M) e do nitroprussiato de sódio (10^{-3} M) em células células melanizadas da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas por 30 min e expostas à luz por 120 min. Como fonte de luz foi utilizada uma lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão. Controles nos quais as células não foram expostas à luz e controles com células tratadas apenas com PBS foram feitos em paralelo para todos os tratamentos. Colônias após 48 h de crescimento63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão para as nanoemulsões contendo ftalocianina (AlClPc/NE), azul de metileno (MB/NE) e na ausência de agente fotossensibilizador (NE). Fator de diluição 1:1000 em água destilada	55
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (Acquired immune deficiency syndrome)
Al³⁺	Íon alumínio
AICIPc	Cloro-alumínio ftalocianina
ATCC	American type culture collection
DHN	1,8-Dihidroxi-naftaleno
DNA	Ácido desoxiribonucléico (Desoxyribonucleic acid)
Dopa	Dopamina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador (Photosensitizer)
FS⁰	Fotossensibilizador no estado fundamental
¹FS*	Fotossensibilizador no estado excitado singleto
³FS*	Fotossensibilizador no estado excitado tripleto
<i>g</i>	Gravidade
Ga³⁺	Íon gálio
g L⁻¹	Gramas por litro
h	Horas
HpD	Derivados de hematoporfirina (Hematoporphirin derivative)
J cm⁻²	Joules por centímetros quadrados
KDa	Quilodalton
L-Dopa	L-3,4 diidroxifenilalanina
LEDs	Diodos emissores de luz (Light-emitting diode)
M	Molar
MB	Azul de metileno (Methylene blue)
min	Minuto
mL	Mililitro
MLI	Meio líquido indutor
MLNI	Meio líquido não indutor
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mV	Milivolts
mW cm⁻²	Miliwatts por centímetros quadrados
NE	Nanoemulsão
nm	Nanômetro

NO	Óxido nítrico
ns	Nanosegundos
<i>o</i>	Orto
¹O₂	Oxigênio singleto (Singlet oxygen)
<i>ρ</i>	Para
PBS	Salina fosfato tamponada (Phosphate buffered saline)
PDA	Potato dextrose agar
PdI	Índice de polidispersão
PhBPs	Fotossensibilizadores baseados na fenotiazina (Phenothiazinum based photosensitizers)
RNM	Ressonância nuclear magnética
RPM	Rotações por minuto
s	Segundos
TFD	Terapia fotodinâmica (Photodynamic therapy)
TFDA	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TBO	Azul de ortotoluidina (Toluidine blue)
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultra violeta
UVA	Ultra violeta A (320-400 nm)
UVB	Ultra violeta B (280-320 nm)
W	Watts
W m⁻²	Watts por metro quadrado
Zn²⁺	Íon zinco
ZnPc	Zinco ftalocianina
μg mL⁻¹	Micrograma por mililitro
μL	microlitro
μm	Micrometro
Φ_T	Rendimento quântico do estado excitado triplete

1. INTRODUÇÃO

O estudo da fotobiologia de fungos tem adquirido importância crescente nos últimos anos, tanto por fornecer contribuições relevantes para o entendimento do efeito das radiações visível e UV nas células eucarióticas (BRAGA et al., 2001; BRAGA et al., 2006; SCHIAVE et al., 2008), como pelo surgimento de novas áreas com aplicações importantes, como é o caso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA), que utiliza fotossensibilizadores exógenos para o controle de microrganismos (JORI, 2006; TEGOS et al., 2005; MAISCH et al., 2004). O uso indiscriminado de antimicrobianos, o surgimento de doenças como a AIDS, a adoção de novas práticas médicas, como a imunossupressão em transplantados e a quimioterapia, têm criado um cenário favorável para a emergência de novas espécies de fungos patogênicos e para o surgimento de microrganismos que apresentam tolerância múltipla aos antimicrobianos atualmente utilizados (HOLZHEIMER; DRALLE, 2002; PHILIP et al., 2005). Embora *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* continuem sendo os principais fungos oportunistas responsáveis por micoses invasivas em humanos, infecções sérias causadas por *Aspergillus* spp. e por outros gêneros de fungos filamentosos têm emergido em todo o mundo (ESPINEL-INGROFF et al., 2005). Nesse cenário, o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de microrganismos é extremamente desejável. A identificação e o desenvolvimento de fotossensibilizadores com potencial para serem empregados como antimicrobianos terão aplicações importantes e serão de extrema utilidade para o desenvolvimento de novos fungicidas com mecanismo de ação diferente dos atualmente utilizados e para os quais a seleção de microrganismos tolerantes seja menos provável.

1.1 *Cryptococcus neoformans*

O basidiomiceto encapsulado *Cryptococcus neoformans* é um fungo saprófita, cosmopolita, que normalmente é isolado de solos contaminados com excretas de aves e de detritos vegetais em decomposição. Apesar da existência saprofítica, o fungo é capaz de infectar e de causar doença em uma grande variedade de hospedeiros animais, como mamíferos, aves e insetos (SORRELL; ELLIS, 1997; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003; HEITMAN; LIN, 2006).

C. neoformans era considerada uma espécie homogênea até 1942, quando a existência de quatro sorotipos distintos, baseados nas propriedades antigênicas de sua cápsula de polissacarídeos, foi revelada (revisado por HEITMAN; LIN, 2006). A heterogeneidade da espécie, entretanto, permaneceu desconhecida até meados da década de 70, quando foram descobertos dois teleomorfos morfológicamente distintos de *C. neoformans*: *Filobasidiella neoformans*, produzido por linhagens dos sorotipos A e D, e *Filobasidiella bacillispora*, produzido por linhagens dos sorotipos B e C. A correlação entre os sorotipos e os dois diferentes teleomorfos indicou que as diferenças entre os dois sorogrupos não estavam limitadas às suas propriedades antigênicas. Estudos posteriores mostraram que as duas espécies também diferiam em características como nicho ecológico, epidemiologia, bioquímica e genômica estrutural (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

À medida que novos métodos foram utilizados para a genotipagem das linhagens, foi observada a existência de uma grande diversidade intraespecífica, de modo que a determinação do número de espécies crípticas dentro de *C. neoformans* tornou-se um assunto polêmico (HEITMAN; LIN, 2006). Atualmente, o agente etiológico da criptococose é classificado em duas espécies, *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) e variedade *neoformans* (sorotipo D) e *C. gattii* (sorotipos B e C) (KWON-CHUNG et al., 2000). Kwon-

Chung e Varma (2006) revisaram as características taxonômicas do grupo e validaram, com base nos três maiores conceitos de espécie, a divisão atual do grupo em apenas duas espécies.

As variedades *neoformans* e *grubii* apresentam distribuição cosmopolita e causam doença principalmente em indivíduos imunocomprometidos (HEITMAN; LIN, 2006). As duas variedades são freqüentemente isoladas de solos contaminados com excretas de pombos (SOARES et al., 2005). *C. gattii* é usualmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais e pode infectar indivíduos imunocompetentes (HARRISON, 2000; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Tanto as espécies *neoformans* como *gattii* são colonizadores perenes de espécies arbóreas e de detritos vegetais em decomposição (HAJJEH; BRANDT; PINNER, 1995; NOSANCHUK et al., 1999; RANDHAWA; MUSSA; KHAN, 2001; CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

O surgimento da AIDS e a utilização de novas práticas médicas, como as terapias imunossupressoras, aumentaram muito o número de indivíduos acometidos pela doença (BICANIC; HARRISON, 2005; MITCHELL; PERFECT, 1995). Considerada uma condição definidora da AIDS, a meningite criptocócica é a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central e a terceira causa mais freqüente de complicações em pacientes com AIDS (DEL VALLE; PINA-OVIEDO, 2006; BICANIC; HARRISON, 2005).

A identificação da fonte ambiental e da natureza das células infectivas de *C. neoformans* é extremamente importante para o entendimento da patogenicidade e da ecologia do fungo. Acredita-se que a infecção por *Cryptococcus* inicia-se com a inalação de leveduras desidratadas ou basidiósporos (HEITMAN; LIN, 2006). Apesar de a inalação de células de *C. neoformans* ser comum, a doença é rara e ocorre predominantemente em indivíduos imunocomprometidos (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). *Cryptococcus* raramente é isolado como comensal humano e a transmissão de indivíduo para indivíduo não ocorre, de

modo que a infecção humana é considerada um evento acidental e terminal no ciclo de vida do fungo (HEITMAN; LIN, 2006).

Apesar dos recentes avanços na genética e na biologia molecular obtidos após o seqüenciamento completo do genoma de diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*, diversos aspectos da ecologia, da estrutura populacional e da reprodução desses patógenos ambientais ainda não foram estabelecidos (HEITMAN; LIN, 2006).

A presença de pigmentos, como as melaninas, pode, em maior ou menor extensão, aumentar a tolerância à radiação solar e a diversos fatores ambientais geradores de estresse, tanto em leveduras, como em conídios de diversas espécies de fungos filamentosos (GUNASEKERA; PAUL; AYRES, 1997; BRAGA et al., 2006; RANGEL et al., 2006; SCHIAVE et al., 2008). A importância evolutiva desse grupo de pigmentos é evidenciada pelo fato de os mesmos serem produzidos por organismos de praticamente todos os grupos taxonômicos, desde procariotos até vertebrados superiores (BUTLER; DAY, 1998; PLONKA; GRABACKA, 2006). Apesar de as melaninas serem os pigmentos protetores mais estudados, diversos aspectos relacionados à sua estrutura química, biossíntese e função permanecem desconhecidos, principalmente devido às dificuldades técnicas encontradas para o seu estudo.

Melaninas são pigmentos hidrofóbicos, de alto peso molecular, negativamente carregados e formados pela polimerização de compostos fenólicos e/ou indólicos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006). A estrutura das melaninas é pouco conhecida devido à incapacidade de as técnicas bioquímicas e biofísicas atuais fornecerem suas estruturas moleculares definitivas (KAXIRAS et al., 2006). A dificuldade deve-se principalmente ao fato de as melaninas serem amorfas e inapropriadas para os estudos estruturais, tanto cristalográficos, como em soluções. Dessa maneira, as informações sobre a estrutura das melaninas foram obtidas de análises de seus produtos de degradação e de

análises espectroscópicas (WILLIAMSON; WAKAMATSU; ITO, 1998; WAKAMATSU; ITO, 2002). Além disso, *in vivo*, as melaninas geralmente encontram-se, quase sempre, complexadas com proteínas e com carboidratos. As proteínas e os carboidratos são completamente destruídos pelos tratamentos drásticos a que a célula é submetida durante a extração das melaninas, impossibilitando a determinação da natureza dos ligantes e da estrutura dos complexos que contêm melaninas (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1996; BUTLER; DAY, 1998). A estrutura molecular das melaninas e o tipo/tipos de monômeros que fazem parte da sua constituição variam muito de organismos para organismo. Apesar de a estrutura molecular do polímero intacto não ser conhecida, algumas substâncias biológicas vêm sendo historicamente classificadas como melaninas por possuírem características físicas e químicas comuns. Embora não haja um consenso universal, o critério físico-químico geralmente aceito para a caracterização das melaninas baseia-se nas seguintes características: (1) cor escura (marrom ou negra) ou avermelhada; (2) insolubilidade em água quente ou fervente e em solventes orgânicos; (3) resistência à degradação por ácidos concentrados quentes ou frios; (4) branqueamento por agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio; (5) solubilização e degradação por soluções alcalinas; (6) presença de centros persistentes de radicais livres na molécula e (7) capacidade de ligação a íons multivalentes (revisto por MEREDITH; SARNA, 2006; BUTLER; DAY, 1998).

Os microrganismos normalmente sintetizam melaninas através de fenoloxidasas (como tirosinases, lacases ou catecolases) e/ou através da via da “polyketide syntase” (revisto por LANGFELDER et al., 2003; KROKEN et al., 2003; BUTLER; DAY, 1998). Os dois tipos mais comuns de melaninas em fungos são as DHN-melaninas (denominação devida a um de seus intermediários metabólicos, o 1,8-diidroxinaftaleno) e a dopa-melanina (denominação devida a um de seus precursores, a L-3,4-diidroxifenilalanina, conhecido como L-dopa). *C. neoformans* sintetiza melaninas através da via L-dopa-melanina, da qual fazem

parte a enzima lacase e diversas proteínas acessórias (WALTON; IDNURM; HEITMAN, 2005; WILLIAMSON; WAKAMATSU; ITO, 1998; WILLIAMSON, 1997).

As melaninas sintetizadas a partir da L-3,4-diidroxifenilalanina por fenoloxidasas, denominadas eumelaninas, são normalmente pretas ou marrons. As melaninas amarelas ou vermelhas, chamadas feomelaninas, têm, além da L-dopa, a cisteína incorporada durante a sua biossíntese. As melaninas marrons sintetizadas por tirosinases a partir do ácido homogentísico são chamadas piomelaninas. As melaninas formadas a partir do acetato pela via da “polyketide syntase”, chamadas diidroxinaftaleno melaninas, são tipicamente pretas ou marrons (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006; PLONKA; GRABACKA, 2006).

A lacase de *C. neoformans* faz parte de uma classe de multicobre oxidases que são primariamente proteínas extracelulares expressas em bactérias, fungos, plantas e insetos (NAKAMURA; GO, 2005). Dentre as supostas funções da enzima, estão a polimerização de lignanas (fenol) para a produção de lignina (polifenol) na parede celular de plantas e a decomposição da lignina por fungos decompositores ou fitopatogênicos (WATERMAN et al., 2007; NAKAMURA; GO, 2005). Waterman et al. (2007) especularam que, no meio ambiente, *C. neoformans* utiliza a lacase para hidrolisar lignina, já que o fungo é comumente encontrado em ocos de árvores e em solos contendo detritos vegetais em decomposição. Isso explicaria a localização da enzima na parede celular, onde tem fácil acesso aos polímeros de lignina. Adicionalmente, a localização da lacase na parede, que é única em fungos, também poderia ter evoluído para proteger a célula contra a fagocitose por predadores ambientais. A localização periférica da enzima também permite que, no hospedeiro animal, a lacase tenha acesso a substratos pequenos, como catecolaminas e metais, que são capazes de permear através dos poros da cápsula (ZHU; WILLIAMSON, 2004).

Zhu et al. (2001) verificaram que a enzima está covalentemente ligada à parede celular, provavelmente por pontes dissulfeto ou tioéster. Linhagens de *C. neoformans* com

mutações em genes necessários para a integridade da parede (como o gene para a quitina sintase) podem apresentar um extravasamento da lacase e, conseqüentemente, podem melanizar o meio extracelular, enquanto a melanização, na linhagem selvagem, está restrita à célula fúngica (WALTON; IDNURM; HEITMAN, 2005).

Em *C. neoformans*, existem dois genes parálogos, *LAC1* e *LAC2*, que codificam para lacases (MISSALL et al., 2005). O gene *LAC1*, anteriormente chamado de *CNLAC1*, codifica para um polipeptídeo com 624 aminoácidos. O produto funcional é uma enzima glicosilada, contendo cobre, com 75 kDa e atividade de difenol oxidase. A enzima é capaz de oxidar diversos substratos difenólicos e diamínicos nas posições orto e meta, mas não grupamentos monofenólicos, como o fenol, a tiramina ou a tirosina (WILLIAMSON, 1994).

Os genes *LAC1* e *LAC2* possuem uma estrutura muito parecida entre os seus 14 éxons e possuem uma identidade de 76% nos nucleotídeos e de 72% nos aminoácidos codificados. Entretanto, a similaridade é muito menor em suas regiões promotoras, sugerindo a existência de diferenças entre a expressão e a regulação dos dois genes (MISSALL et al., 2005). Tendo L-dopa como substrato, tanto a lacase produzida por *LAC1* como a produzida por *LAC2* contribuem para a produção de melaninas; entretanto, a análise funcional dos genes deixou claro que *LAC1* é o principal responsável pela síntese (MISSALL et al., 2005).

A regulação da expressão das lacases em *C. neoformans* é complexa e ocorre através de vias que respondem a múltiplos sinais (PUKKILA-WORLEY et al., 2005; HEUNG et al., 2005). A síntese de lacase é induzida por diversos fatores ambientais, como cálcio, ferro e cobre, e reprimida por nutrientes, como glicose e nitrogênio, e por temperaturas elevadas (ZHU; WILLIAMSON, 2004). Ambos os genes são induzidos pela ausência de glicose; entretanto, o nível de transcrição basal de *LAC2* é muito menor do que de *LAC1* (PUKKILA-WORLEY et al., 2005). A regulação da expressão de *LAC1* pela fonte de carbono apóia a hipótese de que a enzima é importante para a utilização da lignina como fonte de carbono no

meio ambiente (PANEPINTO; WILLIAMSON, 2006). Zhang et al. (2006) verificaram que a proteína Ssa1 de *C. neoformans*, que é homóloga à Hsp70, atua como um co-ativador transcricional da lacase em resposta à privação de glicose, ferro, cobre, cálcio e à temperatura. A enzima Lac1 localiza-se na parede celular, enquanto a enzima Lac2, aparentemente, localiza-se no citoplasma; entretanto, sua localização pode ser alterada pela ausência da enzima Lac1 (MISSALL et al., 2005). Valderrama et al. (2003) sugerem que as lacases de *Filobasidiella neoformans* e de *Aspergillus nidulans*, por pertencem a um grupo evolutivo distinto do ramo principal das *bona fide* lacases, não são lacases verdadeiras, apesar de serem capazes de utilizar os substratos típicos do grupo.

Em *C. neoformans*, a biossíntese de melanina por lacases requer a presença de substratos exógenos, já que o fungo é incapaz de sintetizar os precursores necessários à síntese. Esse é um caso raro, já que a maioria dos fungos melanogênicos produz o pigmento através de substratos endógenos (BUTLER; DAY, 1998). A lacase inicia a conversão de catecolaminas, como a dopamina, oxidando-a em *o*-quinona (DAQ). As DAQs, por serem extremamente reativas, condensam-se, de maneira não enzimática, entre si e/ou com outros metabólitos, para formar a melanina (ZHU; WILLIAMSON, 2004).

Wang e Casadevall (1994) acompanharam o crescimento e a melanização de *C. neoformans* (sorotipo D) em meio líquido, com e sem L-dopa, e verificaram que, em meio contendo L-dopa, a melanização aumentou com o tempo de crescimento. As curvas de crescimento e a viabilidade das células foram muito semelhantes para os dois tipos de meio. Wang, Aisen e Casadevall (1996) verificaram que a melanização de *C. neoformans*, em meio contendo 1 mM de L-dopa, aumentou linearmente durante um período de 14 dias de crescimento e que a intensidade da melanização variou muito entre as diferentes linhagens estudadas. Em algumas situações, a melanina representou até 15% da massa seca das células (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1996).

Como a síntese de melanina por *C. neoformans* requer substratos exógenos, o tipo do pigmento sintetizado varia, dependendo das características do substrato presente no meio (CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003). Pigmentos sintetizados a partir de *o*-difenóis com grupamentos hidroxilas nas posições 2,3- ou 3,4- são escuros e predominantemente associados à parede celular, enquanto pigmentos produzidos a partir de *p*-difenóis, com grupamentos hidroxilas nas posições 1,4- ou 2,5-, são solúveis e difundem-se para o meio (CHASKES; TYNDALL, 1975). Garcia-Rivera et al. (2005) observaram que as características do pigmento produzido por *C. neoformans* variaram dependendo do substrato utilizado (L-dopa, metil-dopa, epinefrina e norepinefrina) e que nem todos os pigmentos produzidos apresentaram as características necessárias para serem considerados melaninas. Curiosamente, Eisenman et al. (2005) observaram que melaninas sintetizadas por *C. neoformans* a partir de diferentes substratos possuem estrutura semelhante. Mesmo na presença de substratos apropriados, a biossíntese de melaninas ou de pigmentos semelhantes a melaninas é dependente da fonte de nitrogênio. As melhores fontes para a melanização são a glutamina, a glicina e a asparagina (CHASKES; TYNDALL, 1975).

Melaninas isoladas de *C. neoformans* retêm a forma das células, resultando em esferas ocas chamadas de “fantasmas de melaninas” (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1996). Estudos de microscopia de força atômica e de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que essas estruturas são constituídas por grânulos discretos de melanina, com diâmetro de aproximadamente 40-130 nm, distribuídos em múltiplas camadas concêntricas na parede celular (EISENMAN et al., 2005). A espessura da camada, aparentemente, depende da idade da célula. A RNM-crioporometria revelou que os “fantasmas de melanina” possuem poros com diâmetros entre 1 e 4 nm e poros, em número menor, localizados mais internamente, com diâmetro de aproximadamente 30 nm. O diâmetro do poro diminuiu com o aumento da idade das células (EISENMAN et al., 2005). Estudos de exclusão molecular

conduzidos por Jacobson e Ikeda (2005) mostraram que células melanizadas são menos porosas do que as células não melanizadas e que o tamanho máximo dos poros é de 4 e de 10,4 nm nas células melanizadas e não melanizadas, respectivamente.

Os substratos utilizados pelo fungo para sintetizar pigmentos podem estar presentes no hospedeiro animal (WILLIAMSON; WAKAMATSU; ITO, 1998; TIAN et al., 2003), na matéria orgânica que serve como substrato para o desenvolvimento do fungo ou podem ser sintetizados por microrganismos, como bactérias, que compartilham o mesmo nicho ecológico com *C. neoformans*. Frases et al. (2007) observaram que linhagens de todos os sorotipos de *C. neoformans* são capazes de produzir melanina, utilizando o ácido homogentísico (precursor da síntese de melanina em bactéria) e sugerindo uma nova fonte de substrato para a melanização do fungo no meio ambiente. A produção de dopamina por *Klebsiella aerogenes* permitiu a melanização de *C. neoformans* quando os dois microrganismos cresceram juntos em meio de cultura (FRASES; SALAZAR; CASADEVALL, 2006). Com base nessas observações, é possível especular que, no meio ambiente, outras espécies de microrganismos também forneçam substratos para a melanização do fungo.

Mesmo sendo um melanogênico facultativo, existem evidências de que *C. neoformans* encontra-se melanizado no meio ambiente. Estruturas semelhantes aos “fantasmas de melanina” obtidos de células melanizadas de *Cryptococcus* foram isoladas de excretas de pombos contaminadas com o fungo (NOSANCHUK et al., 1999).

As propriedades fotoprotetora e antioxidante das melaninas são, provavelmente, as principais responsáveis pelas diversas funções biológicas postuladas para esse grupo de pigmentos (MEREDITH; SARNA, 2006; GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005; BUTLER; DAY, 1998). Diversas funções têm sido atribuídas às melaninas produzidas por fungos e, de maneira geral, baseiam-se nas propriedades físico-químicas da molécula. Entretanto, é difícil avaliar qual dessas funções é realmente relevante durante a existência

saprofítica do fungo sem um conhecimento profundo da sua biologia e ecologia (BUTLER; DAY, 1998).

A produção de melaninas e de uma cápsula de polissacarídeos e a capacidade de se desenvolver à temperatura de 37°C são os fatores de patogenicidade mais bem estudados em *C. neoformans* (MAXSON et al., 2007; WALTON; IDNURM; HEITMAN, 2005; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; WILLIAMSON, 1997). Apesar de ser um importante fator de virulência, é muito provável que a melanização tenha sido selecionada por conferir ao fungo proteção contra fatores ambientais bióticos e abióticos (revisto por NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). A melanização aumenta a sobrevivência de *C. neoformans* após o fungo ser fagocitado ou ingerido por predadores, como amebas (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001) ou nematóides (MYLONAKIS et al., 2002). Células efectoras do sistema imune, como os macrófagos, utilizam espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio para inativar as células dos microrganismos fagocitados. Células melanizadas de *C. neoformans* são mais tolerantes a espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio do que células não melanizadas (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; WANG; CASADEVALL, 1994; JACOBSON; TINELL, 1993). A melanização também reduziu a sensibilidade do fungo a antifúngicos, como a anfotericina B, caspofungina e fluconazol (IKEDA et al., 2003; van DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002).

Células melanizadas foram mais resistentes do que células não melanizadas às enzimas capazes de degradar a parede celular (ROSAS; CASADEVALL, 2001). Enzimas capazes de hidrolisar componentes da parede do fungo são produzidas tanto por predadores ambientais como por antibióticos.

A melanização protegeu *C. neoformans* contra o frio e o calor. Células melanizadas de *C. neoformans* foram mais tolerantes ao calor do que células não melanizadas da mesma

idade. Células melanizadas, no início da fase estacionária, foram mais tolerantes ao frio do que células não melanizadas. Entretanto, células melanizadas provenientes da fase estacionária tardia foram mais sensíveis ao frio do que as células não melanizadas da mesma idade (ROSAS; CASADEVALL, 1997).

As dopa melaninas (eumelaninas) são capazes de converter a energia proveniente da absorção das radiações visível, UV e infravermelha em calor. No caso de excitação da melanina pela UV, mais de 99,9% de todos os fótons absorvidos tem a sua energia dissipada através de mecanismos não radiativos, o que é uma propriedade extremamente interessante para um fotoprotetor. Dessa forma, as melaninas protegem as células contra os efeitos danosos da radiação solar, convertendo rapidamente a energia dos fótons absorvidos em calor através de alterações vibracionais e rotacionais da molécula, sem que ela tenha tempo de participar de processos fotoquímicos (MEREDITH; SARNA, 2006).

1.2 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz na região do visível (JORI, 2006). Quando o fotossensibilizador é exposto à radiação com comprimentos de onda apropriados, sua molécula é excitada, levando a uma série de transferências moleculares de energia que normalmente originam espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ânion superóxido e o ânion radical hidroxila, que são extremamente reativos e citotóxicos (SOUKOS et al., 1998; FRIEDBERG et al., 2001; HAMBLIN et al., 2002; SMIJS et al., 2004). Embora o conceito de morte celular induzida pela interação entre a luz e substâncias químicas seja conhecido há mais de um século (ACKROYD et al., 2001), o interesse por fotossensibilizadores tem aumentado nos últimos anos e novos fotossensibilizadores estão sendo desenvolvidos em virtude do uso desse grupo de substâncias no tratamento de tumores e na fotoinativação de microrganismos em diversos sistemas biológicos, tanto *in vitro*, como *in vivo* (VENEZIO et al., 1985; ZEINA et al., 2001; STRAKHOVSKAYA; ZHUKHOVITSKII; MIRONOV, 2002; BLISS et al., 2004; TEGOS et al., 2005; GORMAN; BROWN; GRIFFITHS, 2006).

As propriedades físico-químicas dos fotossensibilizadores e dos sistemas biológicos nos quais eles estão atuando são extremamente importantes para a eficiência do processo de fotossensibilização (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). O fotossensibilizador ideal deve possuir as seguintes características: (1) atoxicidade ou pouca toxicidade no escuro; (2) estabilidade cinética e termodinâmica; (3) síntese rápida, barata e com alto rendimento; (4) especificidade pela célula-alvo; (4) curto intervalo de tempo entre a sua administração e a máxima absorção pelas células-alvo; (5) rápida eliminação pelas células não-alvo; (6) ativação em um comprimento de onda considerado ótimo para a absorção de luz; (7) alta

capacidade de produção de oxigênio singlete e (8) ausência de mutagenicidade (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005).

1.2.1 Fotossensibilizadores derivados da fenotiazina

Os fotossensibilizadores baseados na fenotiazina (PhBPs, phenothiazinum based photosensitisers), como o azul de metileno, possuem estrutura heteroaromáticas planas que conferem às suas moléculas propriedades fotossensibilizadoras (Figura 1). Os PhBPs têm mostrado potencial para serem utilizados na Terapia Fotodinâmica (TFD) como agentes antitumorais e na TFDA como antimicrobianos (HARRIS; CHATFDIELD; PHOENIX, 2006). A ação fotossensibilizadora de PhBPs, como o MB, em bactérias gram-negativas, gram-positivas, leveduras e vírus é conhecida há décadas (MACMILLAN; MAXWELL; CHICHESTER, 1966; ITO, 1977; AL-RUBEAI; EL-HASSI, 1986; WAINWRIGHT, 1996). Um dos fatores que determinam a seletividade desses compostos para células microbianas é a interação eletrostática entre as cargas positivas dos PhBPs e as cargas negativas da superfície externa da célula microbiana (HARRIS; CHATFDIELD; PHOENIX, 2006). Na maioria dos casos, o sítio primário de ação dos PhBPs é a membrana externa (no caso das bactérias gram-negativas) e a membrana plasmática (no caso de bactérias gram-positivas e de fungos) da célula-alvo. A ação do fotossensibilizador envolve a modificação de lipídios e/ou lipopolissacarídeos (no caso de bactérias gram-negativas) e a inativação de proteínas e enzimas essenciais, presentes na membrana plasmática, provocando a morte da célula. Esses compostos também podem ser internalizados pela célula durante o processo de fotossensibilização, infligindo danos a um grande número de sítios intracelulares. Em células bacterianas, embora o principal sítio interno de ação seja o DNA, os PhBPs podem exibir múltiplos sítios de ação dentro de um tipo específico de células e mostram diferentes sítios de

ação entre diferentes espécies de microrganismos (HARRIS; CHATFDIELD; PHOENIX, 2006). Em leveduras e em conídios, não foi observada a internalização significativa de PhBPs, como MB ou Azul de Ortotoluidina (TBO), e a morte celular é atribuída aos danos na membrana, provocados pelo oxigênio singlete produzido no meio extracelular (SHIMIZU; EGASHIRA; TAKAHAMA, 1979; AL-RUBEAI; EL-HASSI, 1986). A multiplicidade de sítios-alvo das EROs produzidos durante a inativação fotodinâmica faz com que a emergência de microrganismos resistentes à fotossensibilização seja extremamente improvável e torna os PhBPs uma alternativa interessante aos antibióticos convencionais.

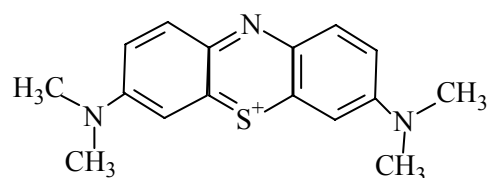


Figura 1. Estrutura molecular do azul de metileno

O MB é o protótipo dos PhBPs e está bem estabelecido que sua toxicidade para humanos é baixa. O uso seguro do MB é atestado há quase um século e suas aplicações, entre outras, incluem sua administração tópica oral como anti-séptico, desinfetante e antídoto para envenenamento por nitrato (HARRIS; CHATFDIELD; PHOENIX, 2006). A baixa toxicidade para humanos e o fato de serem fotossensibilizadores eficientes, tanto em células de leveduras, como em conídios de fungos filamentosos, podem apressar os estudos clínicos desses PhBPs na TFDA (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Uma grande variedade de fontes de luz, como lasers, light-emitting diode (LEDs) e vários tipos de lâmpadas incandescentes tem sido utilizada para a fotoativação dos PhBPs, tanto na TFD, como na TFDA (HARRIS; CHATFDIELD; PHOENIX, 2006). O MB, como

outros PhBPs, apresenta absorção máxima de luz na região do vermelho (pico de absorção em 665 nm), que é a janela desejável para a terapêutica. Essa região espectral é ideal para a TFD e para TFDA, pois as biomoléculas apresentam absorção mínima nessa região espectral, permitindo uma penetração mais profunda da luz nos tecidos humanos durante a TFD. A química do MB está bem estabelecida e diversos estudos têm mostrado que as modificações químicas do corante produzem derivados que mantêm as características desejáveis de absorção de luz do composto original, mas que apresentam uma maior fototoxicidade para as células-alvo (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006).

1.2.2 Ftalocianinas

As ftalocianinas foram descobertas no início dos anos 1900 como impurezas em preparações industriais de ftalamida e subsequentemente identificadas como parentes da família das porfirinas (GORMAN; BROWN; GRIFFITHS; 2006). As porfirinas são compostos exclusivamente sintéticos que podem ser facilmente preparados por métodos clássicos e minuciosos processos de purificação (SHARMAN; ALLEN; van LIER, 1999).

As ftalocianinas mimetizam as porfirinas em seu macrociclo central, que é constituído por uma unidade cíclica tetrapirrólica. Entretanto, suas subunidades pirrólicas são unidas por átomos de nitrogênio, enquanto nas porfirinas as subunidades são unidas via pontes de metileno. Além disso, nas ftalocianinas, a conjugação do macrociclo é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas, resultando em uma forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível. As ftalocianinas possuem muitas vantagens quando comparadas aos fotossensibilizadores de primeira geração (como as porfirinas), como alta absorção de luz ($\epsilon_{670} \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) nos comprimentos de onda de 600 a 800 nm (janela terapêutica) e baixa toxicidade *in vitro* (GOMER, 1991). As propriedades fotofísicas das

ftalocianinas são fortemente dependentes do íon metálico central. A complexação das ftalocianinas com íons metálicos diamagnéticos, tais como Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} dá origem a compostos com alto rendimento quântico do estado excitado triplete ($\Phi_T > 0,40$) e com tempos de vida longos (IDOWU; NYOKONG, 2007; IDOWU; NYOKONG, 2008). Entre as metalo-ftalocianinas, as zinco e as cloro-alumínio ftalocianinas (Figura 2) são as que apresentam as propriedades fotofísicas mais favoráveis para aplicação na TFD. Por exemplo, os estados singletes com tempo de vida relativamente longo (3-8 ns) e os estados tripletes são produzidos com alto rendimento quântico (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004).

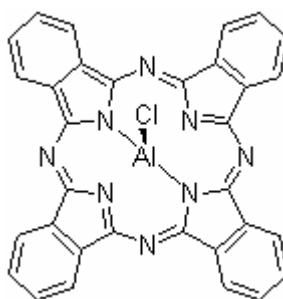


Figura 2. Estrutura molecular da cloro-alumínio ftalocianina (AlClPc)

Infelizmente, essas ftalocianinas ($ZnPc$ e $AlClPc$) são insolúveis em água ou em solventes compatíveis com os sistemas biológicos. Desta maneira, elas devem ser administradas *in vivo* através de sistemas de distribuição, como os lipossomos e as nanoemulsões (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004).

As nanoemulsões são sistemas coloidais obtidos por um processo de interação interfacial entre tensoativos e/ou polímeros que levam à diminuição da tensão superficial entre duas fases imiscíveis, as quais dão origem a um colóide por emulsificação, seja ela espontânea ou não, caracterizado por uma nanoestruturada como fase interna (OLIVEIRA et al., 2004). Esses sistemas isotrópicos possuem alta estabilidade físico-química (termodinamicamente estáveis), além de atuarem diretamente na constante de ionização de diversos fármacos, o que otimiza a uso de diversos compostos insolúveis com atividade

farmacêutica. A fase interna constitui um ambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades, atuando como agregados esféricos e com diâmetros geralmente menores que 1000 nm (BOUCHEMAL et al., 2004; PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008). A formação das nanoemulsões envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativos, fase aquosa, fase oleosa e, quando necessário, um co-tensoativo. O processo de emulsificação leva a emulsões do tipo óleo em água (o/a), água em óleo (a/o) ou emulsões mistas (o/a/o ou a/o/a), dependendo do mecanismo de preparo e quantidade de componentes da formulação (OLIVEIRA et al., 2004).

O desenvolvimento da tecnologia farmacêutica e cosmética conferiu a esses sistemas o *status* de nanocarreadores de fármacos (OLIVEIRA et al., 2004; BOUCHEMAL et al., 2004; PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000). Esses sistemas são utilizados em diversos tipos de aplicações, desde a veiculação de biomoléculas e princípios ativos para o tratamento de doenças, até a administração de agentes antioxidantes e substâncias exógenas de origem natural para tratamento estético ou cosmecêutico (ARAÚJO, et al., 2007; WEYENBERG, et al. 2007).

1.2.3 Nitrosilos de rutênio

O óxido nítrico (NO) é um gás instável, lipo e hidrossolúvel, altamente reativo e com meia-vida curta (0,1-6 s) (CARTER; BETTACHE; OGDEN, 1997; IGNARRO et al., 1999). O NO é uma molécula efetora importante em diversos processos biológicos, incluindo-se a transmissão neural, a vasodilatação, a angiogênese e a fagocitose, apenas para citar os processos mais estudados (IGNARRO, 1999). Por outro lado, exposições prolongadas a altas concentrações de NO têm sido associadas a diversos efeitos fisiológicos adversos, incluindo-

se choque séptico (EUM; YEOM; LEE, 2006), citotoxicidade (STAR, 1993; GHAFARI et al., 2006), carcinogênese (WINK et al., 1998) e danos no DNA (BURNEY et al., 1999).

Devido à grande importância biológica do NO e considerando-se que diversas doenças podem estar associadas a alterações no seu metabolismo (NAPOLI; IGNARRO, 2003), estão sendo desenvolvidos complexos capazes de liberar NO nos tecidos e na corrente sanguínea de maneira controlada, a partir de sistemas orgânicos (MAKINGS; TSIEN, 1994) e inorgânicos (BONAVENTURA et al., 2004; SAUAIA et al., 2005). Um caminho para o desenvolvimento de agentes liberadores de NO é a síntese de compostos termodinamicamente estáveis em condições fisiológicas, mas lábeis sob estimulação química, fotoquímica e/ou eletroquímica (SAUAIA et al., 2005). Recentemente, foram desenvolvidos complexos nitrosilos de rutênio capazes de liberar NO *in vitro* (BONAVENTURA et al., 2004; SAUAIA et al., 2005). O óxido nítrico reage facilmente com rutênio, produzindo compostos estáveis e suscetíveis à ação de certos estímulos químicos, eletroquímicos e fotoquímicos que promovem sua liberação (DE LIMA, 2006).

A atividade antimicrobiana de compostos, particularmente de derivados sol-gel, capazes de liberar óxido nítrico de maneira contínua e controlada, tem sido estudada e esses compostos têm sido capazes de evitar o desenvolvimento de bactérias e a formação de biofilmes na sua superfície (NABLO; CHEN; SCHOENFISCH, 2001). Poucas informações estão disponíveis a respeito da atividade fotossensibilizadora dos complexos nitrosilos de rutênio em microrganismos de maneira geral e em fungos. Com base nos resultados de ensaios de citotoxicidade celular (KARIDI et al., 2005) e dada a atividade antimicrobiana do NO em uma ampla variedade de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e leveduras (NABLO; CHEN; SCHOENFISCH, 2001; GHAFARI et al., 2006), decidiu-se avaliar a atividade antifúngica do complexo nitrosilo de rutênio liberador de óxido nítrico $[\text{Ru}(\text{NH}_2\text{NH}_2)(\text{tpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ (Figura 3).

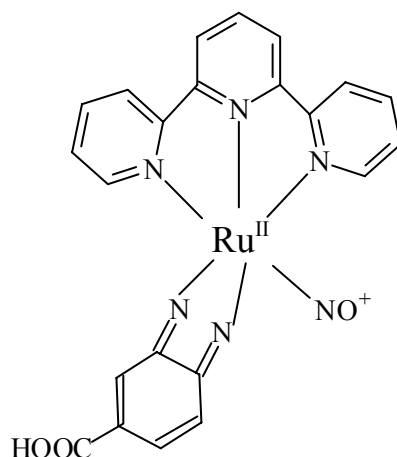


Figura 3. Estrutura molecular do complexo $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{tpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$; Ru (Rutênio), NH.NHq (benzoquinona-diimina), tpy (terpiridina), NO (óxido nítrico), $(\text{PF}_6)_3$ (ânion hexafluorofosfato)

Dentre os complexos nitrosilos de rutênio disponíveis, o $[\text{Ru}(\text{NH.NHq})(\text{tpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ foi escolhido para ser utilizado nos experimentos de fotossensibilização de células, por apresentar estabilidade cinética em solução fisiológica e possuir pico de absorção em 535 nm, na região visível do espectro (SAUAIA et al., 2005; DE LIMA et al., 2006). Não existe nenhuma informação a respeito da utilização desses compostos na TFDA no controle de fungos miceliais ou leveduriformes.

1.3 Terapia Fotodinâmica

O termo terapia fotodinâmica foi usado pela primeira vez por fisiologistas alemães, no início do século XX, para descrever danos em tecidos vivos, provocados pela combinação de três fatores: fotossensibilizador, luz e oxigênio (STRAKHOVSKAYA; ZHUKHOVITSKII; MIRONOV, 2002). A técnica tem sido empregada no tratamento de uma ampla variedade de doenças nos últimos 15 anos (DOS SANTOS; ERIKSSON, 2006).

A terapia fotodinâmica é um processo específico decorrente da acumulação e/ou metabolização preferencial do fotossensibilizador nas células-alvo e da exposição localizada à

luz visível (400-700 nm). A administração do fotossensibilizador é seguida pela exposição das células ou tecidos a radiações com comprimentos de onda capazes de ativar a molécula fotossensibilizadora, que, na presença de oxigênio, pode matar ou inativar as células-alvo devido à formação de diversas espécies reativas de oxigênio (EROs) (KOCHEVAR et al., 1996).

A exposição do fotossensibilizador a comprimentos de onda apropriados é capaz de excitá-lo. Após absorver um fóton, a molécula do fotossensibilizador passa de seu estado fundamental (FS^0) para o primeiro estado excitado singlete ($^1FS^*$). Esse estado tem um tempo de vida curto, da ordem de nanossegundos, o que dá à molécula pouco tempo para interagir com o meio circundante e limita muito o seu raio de ação (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). O fotossensibilizador pode dissipar a energia adicional de diversas maneiras. Ele pode retornar ao estado fundamental pela emissão da energia absorvida através de um processo radiativo (fluorescência) ou não radiativo (conversão interna ou relaxamento vibracional), em que a energia é perdida como calor para o meio circulante. Uma outra rota de desativação do estado $^1FS^*$ envolve o processo não radiativo cruzamento intersistemas, no qual a molécula do fotossensibilizador no estado excitado $^1FS^*$ passa para o primeiro estado excitado triplete $^3FS^*$. Apesar de essa transição não ser muito eficiente, deve-se ressaltar que um bom fotossensibilizador necessita desse processo para ser o mais eficiente possível, porque o estado triplete é a origem do seu efeito fotossensibilizante. Na ausência de outras moléculas para interagir, o estado excitado triplete pode perder energia pela emissão de energia luminosa através de fosforescência. Alternativamente, o estado triplete pode participar de um cruzamento intersistemas. Se estiver próximo de moléculas reativas (como oxigênio molecular ou substratos ricos em oxigênio), o estado triplete, devido a seu tempo de vida relativamente longo (10^{-4} segundos ou mais), pode participar de reações fotodinâmicas com produção de um ou mais tipos de EROs. Existem dois tipos básicos de processos

fotodinâmicos capazes de produzir EROs, que são conhecidos por fotoprocessos do Tipo I e do Tipo II. Ambos os processos requerem oxigênio para ocorrer. O fotoprocessos do Tipo I envolve reações de transferência de elétrons do estado triplete do fotossensibilizador, com a participação de um substrato, para produzir radicais iônicos que podem reagir com o oxigênio, produzindo espécies citotóxicas, como o ânion superóxido e radical hidroxila. O fotoprocessos do Tipo II envolve transferência de energia do estado triplete do fotossensibilizador para o oxigênio molecular, com nível basal de energia, produzindo o estado excitado oxigênio singlete. O efeito citotóxico do oxigênio singlete é decorrente de sua reação rápida e indiscriminada com todos os tipos de biomoléculas, provocando a oxidação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (HAMBLIM et al., 2002). Tanto nas reações do Tipo I como nas reações do tipo II, a molécula do fotossensibilizador retorna ao seu estado fundamental, podendo produzir continuamente altos níveis de EROs, enquanto a exposição à luz perdurar. Entretanto, quando o fotossensibilizador é exposto a altas intensidades de luz, pode ocorrer o fotobranqueamento, ou seja, a degradação permanente do fotossensibilizador (GORMAN; BROWN; GRIFFITHS, 2006). O fotoprocessos do Tipo II é geralmente aceito como o principal mecanismo de dano foto-oxidativo na célula microbiana. Um fotossensibilizador com suficiente população de estado triplete e disponibilidade de oxigênio tem o potencial de causar dano numa variedade de biomoléculas por um ou ambos os mecanismos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006). As etapas fotoquímicas/fotofísicas da fotossensibilização estão representadas no Diagrama de Jablonski (Figura 4).

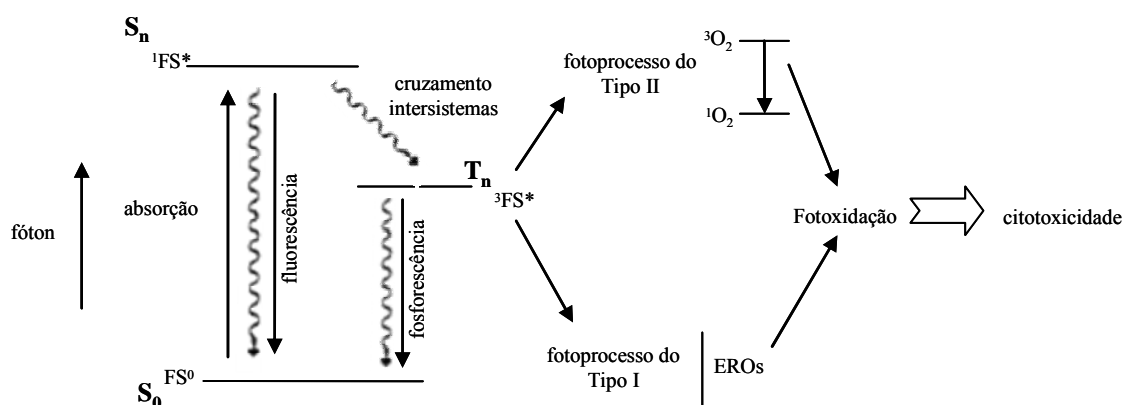


Figura 4. Esquema das etapas fotoquímicas / fotofísicas, envolvidas na fotossensibilização. Diagrama de Jablonski

Existe uma ampla variedade de fontes de luz, coerentes e não-coerentes, que podem ser utilizadas no processo de fotossensibilização, como os lasers (de diversos tipos), os diodos emissores de luz (LEDs), lâmpadas incandescentes e lâmpadas fluorescentes (BRANCALEON; MOSELEY, 2002). A hipótese equivocada de que o laser é essencial para TFD e para a TFDA é um dos fatores que têm atrasado o desenvolvimento e a aplicação dessas técnicas. O aspecto prioritário que deve ser considerado para a escolha da fonte de luz é sua habilidade de excitar o fotossensibilizador, provocando um efeito adverso mínimo nas células não-alvo (WAINWRIGHT, 1998; WAINWRIGHT, 2000). Usualmente, a TFDA tem sido realizada com lâmpadas incandescentes convencionais. O tratamento fotodinâmico de infecções superficiais e localizadas, como as micoses cutâneas, é simplificado pela acessibilidade da pele à exposição à luz e permite o uso de qualquer fonte de luz com comprimento de onda apropriado. Os valores de irradiância (intensidade de radiação), doses e tempo de exposição necessários para a eliminação dos microrganismos usualmente não provocam um efeito térmico significativo e podem ser facilmente obtidos através de fontes de luz não coerentes, de baixo custo, que requerem tecnologia simples e medidas de proteção mínimas, tanto para o operador, quanto para o paciente (JORI, 2006). Os lasers equipados

com fibras ópticas revolucionaram a TFD e TFDA por tornarem possível a distribuição da luz em praticamente todos os sítios do corpo humano (LUKSIENE, 2003).

1.4 Inativação fotodinâmica de microrganismos

O uso de fotossensibilizadores para a eliminação de microrganismos antecede a quimioterapia antimicrobiana baseada na utilização de antibióticos. A primeira demonstração da fotoinativação de células microbianas foi descrita em 1900 por Oscar Raab, que observou que corantes, como a acridina e a eosina, inativavam rapidamente *Paramecium caudatum* na presença de luz (DOUGHERTY et al., 1998; HOCKBERGER, 2002; MAISCH et al., 2004). A inativação fotodinâmica de microrganismos baseia-se no princípio de que, se um microrganismo demonstra seletividade por um determinado corante, que também é fotossensibilizador, deve ser possível destruí-lo expondo-o à luz após a aplicação do corante (WAINWRIGHT, 2000). Como a TFD, a fotoinativação de microrganismos também utiliza fotossensibilizadores e luz visível para promover uma resposta fototóxica, normalmente oxidativa, que é capaz de danificar virtualmente todos os tipos de biomoléculas e estruturas celulares, provocando a morte do microrganismo (WAINWRIGHT, 1996; WAINWRIGHT, 1998).

Os danos fotodinâmicos nas células estão bem estabelecidos em alguns sistemas biológicos, particularmente em bactérias e leveduras e, de maneira geral, não diferem muito dos danos observados nas células de eucariotos superiores (WAINWRIGHT, 1998). As reações do Tipo I com a água, no interior da célula microbiana, geram radicais hidroxila, que reagem com biomoléculas ou combinam-se, originando peróxido de hidrogênio *in situ* com efeitos citotóxicos. Tipicamente, as reações do tipo I incluem a remoção de hidrogênios de moléculas insaturadas, como os fosfolipídios presentes na membrana plasmática

(WAINRIGHT, 1998). A peroxidação de lipídios afeta a estrutura e o funcionamento da membrana celular, diminuindo a sua fluidez e aumentando sua permeabilidade a íons. Também pode ocorrer a inativação de receptores celulares e de enzimas localizados na membrana plasmática (WAINWRIGHT, 2000). Os processos do Tipo II são geralmente aceitos como os principais responsáveis pelo dano foto-oxidativo à célula microbiana. Como nas reações do Tipo I citadas anteriormente, o oxigênio singlete também poderá reagir com as moléculas envolvidas na manutenção da estrutura e do funcionamento da parede e da membrana celular, como os fosfolipídios, peptídeos e esteróides (no caso dos fungos). Também podem ocorrer reações entre o oxigênio singlete e outras moléculas da parede e da membrana. O aminoácido triptofano reage com o oxigênio singlete e o produto intermediário instável degrada-se, formando derivados reativos capazes de provocar ligações cruzadas nos peptídeos. Os resíduos de metionina são oxidados pelo oxigênio singlete, com a formação de sulfoxido de metionina. A reação com os ácidos nucleicos ocorre principalmente através dos resíduos de guanosina e, novamente, existe uma diferença entre a seletividade dos processos do Tipo I e do Tipo II. No primeiro caso, o açúcar é atacado pelo radical hidroxila e, no segundo, a base nitrogenada é atacada pelo oxigênio singlete. A multiplicidade de sítios-alvo afetados durante a TFDA faz com que a seleção de linhagens e/ou espécies tolerantes seja extremamente improvável, o que é uma das vantagens da técnica em relação à quimioterapia antimicrobiana convencional (MAISCH et al., 2004; KÖMERIK; MacROBERT, 2006). O padrão de modificação celular fotoinduzida também dificulta o reparo das moléculas danificadas e a expressão de genes envolvidos na resposta celular ao estresse oxidativo (JORI, 2006).

Embora o tipo predominante de ação fotodinâmica seja freqüentemente determinado pela classe do composto, o modo exato de ação do fotossensibilizador também é fortemente influenciado pelo sítio de ação (WAINWRIGHT, 2000). O sítio de ação, por sua vez, depende

das características físico-químicas da interação entre a célula e o fotossensibilizador. Os parâmetros importantes do fotossensibilizador para a interação incluem: solubilidade relativa em água e lipídios, constante de ionização (pK_a) e outros fatores mais específicos, como as características de absorção da luz (o comprimento de onda do pico de absorção, λ_{max} , e a intensidade de absorção, ϵ_{max}) e a eficiência da formação do estado excitado triplete ou da produção de oxigênio singlete (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; WAINRIGHT, 1998).

Fotossensibilizadores que exibem um efeito maior em microrganismos do que em células animais sugerem que o dano foto-oxidativo é direcionado a sítios específicos e altamente suscetíveis (como a membrana externa das bactérias) e a membrana plasmática das células fúngicas (KÖMERIK; MacROBERT; 2006). A morfologia da célula microbiana apresenta uma ampla variação, tanto entre espécies, como entre linhagens. A variação da morfologia do microrganismo modula a interação dos fotossensibilizadores exógenos com os constituintes celulares, afetando a eficiência e os caminhos dos processos de fotossensibilização (WAINRIGHT, 1998; HAMBLIM; HASAN, 2004; JORI, 2006; KÖMERIK; MacROBERT, 2006). A interação primária do fotossensibilizador ocorre geralmente com a parede celular, que envolve grande parte das células microbianas. A parede celular dos diferentes grupos de microrganismos apresenta uma grande variabilidade na sua complexidade, arquitetura estrutural, permeabilidade e capacidade de associação com moléculas externas (HAMBLIM; HASAN, 2004; JORI, 2006).

A célula fúngica é circundada por uma rígida parede celular composta principalmente por polissacarídeos solúveis e insolúveis, como quitina, β -glucana e glicoproteínas. A deposição de pigmentos, como as melaninas, na parede dos fungos, modifica as características físicas, químicas e estruturais da parede celular (EISENMAN et al., 2005). A melanização diminui a porosidade da parede de *C. neoformans* (JACOBSON; IKEDA, 2005) e é um dos

fatores responsáveis pela carga negativa da parede celular dos fungos (FRASES et al., 2007). As cargas negativas da parede podem facilitar a ligação de fotossensibilizadores catiônicos, como o MB e o TBO, à superfície celular. Por serem eficientes inativadores de radicais livres, as melaninas aumentam a tolerância das células fúngicas às espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (WANG; CASADEVAL, 1994). Se por um lado, devido à carga, a presença da melanina favorece a ligação de fotossensibilizadores catiônicos à superfície da célula fúngica, por outro, lado sua ação anti-oxidante pode favorecer a inativação das espécies reativas geradas durante o processo de fotossensibilização. O fato de a melanização poder ser controlada em *C. neoformans* torna esse fungo um modelo interessante para se estudar a influência da melanização na sensibilidade à fotossensibilização.

Mesmo sendo um alvo celular maior e mais complexo do que bactérias e vírus, os fungos podem ser inativados pelos mesmos fotossensibilizadores e sob condições similares às aplicadas aos outros grupos microbianos (ZEINA et al., 2001; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004). A eliminação de fungos pode ser obtida por condições moderadas de irradiação (pequeno tempo de exposição, baixas irradiâncias) e por concentrações do fotossensibilizador que garantem a seletividade da fotossensibilização em relação às células dos tecidos do hospedeiro, como fibroblastos e queratinócitos. Nas mesmas condições experimentais (por exemplo, concentração do fotossensibilizador e iluminação), a taxa de mortalidade para os fungos foi 18 vezes maior do que a taxa de mortalidade em queratinócitos (ZEINA et al., 2001; MAISCH et al., 2004).

A descoberta e a utilização dos antibióticos a partir de meados do século passado fizeram com que as propriedades antimicrobianas da TFDA fossem esquecidas, atrasando significativamente o desenvolvimento da técnica. A emergência de novas espécies de bactérias e de fungos patogênicas, o surgimento de linhagens tolerantes aos quimioterápicos utilizados, o reduzido número de antifúngicos disponíveis e o alto custo do desenvolvimento

de novos antibióticos criaram um cenário que favoreceu a retomada dos estudos para a utilização da TFDA como uma alternativa à quimioterapia convencional (MAISCH et al., 2004; KÖMERIK; MacROBERT, 2006). Apesar de extremamente promissora, a TFDA encontra-se em estágio inicial de desenvolvimento (ZEINA et al., 2001; HAMBLIN; HASAN, 2004).

A maioria dos estudos de fotossensibilização foi conduzida *in vitro* e os dados a respeito da TFDA *in vivo* para o tratamento de micoses em animais-modelo e em pacientes ainda são escassos (HAMBLIN; HASAN, 2004; KÖMERIK; MacROBERT, 2006). A fotossensibilização *in vivo* ou em sistemas biológicos mais complexos normalmente é mais difícil e requer concentrações maiores do fotossensibilizador e maiores doses de luz. Isso ocorre porque a matéria orgânica presente no meio pode inativar tanto o fotossensibilizador como as EROs produzidas durante a fotossensibilização (KÖMERIK; WILSON, 2002). Até o momento, nenhum fotossensibilizador foi licenciado para ser utilizado como agente antimicrobiano e os métodos de distribuição para tais fármacos ainda estão sendo estabelecidos (HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2006).

A utilização da TFDA pela área odontológica vem sendo amplamente estudada, a fim de se desenvolverem métodos auxiliares nos tratamentos preventivo e restaurador. Os alvos são os microrganismos envolvidos no desenvolvimento da cárie e da doença periodontal (DOBSON; WILSON, 1992). *Candida albicans*, microrganismo causador da afta oral, mostrou-se suscetível à fotossensibilização com MB e TBO. O desenvolvimento de técnicas alternativas para o controle de *Candida spp.* é de extrema importância devido à alta incidência de candidíase em paciente imunocomprometidos que atualmente são tratados com antifúngicos sistêmicos (WILSON; MIA, 1994). A utilização prolongada da quimioterapia convencional nesses pacientes favorece a seleção de linhagens tolerantes aos quimioterápicos.

Diversos estudos têm mostrado que a TFDA pode ser um método alternativo promissor para o controle de diversas espécies de fungos patogênicos capazes de causar micoses superficiais e/ou invasivas em humanos, como *Trichophyton rubrum* (SMIJS; SCHUITMAKER, 2003; SMIJS et al., 2004; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005), *Aspergillus fumigatus* (FRIEDBERG et al., 2001), *Neurospora crassa* (SHIMIZU; EGASHIRA; TAKAHAMA, 1979), *Kluyveromyces marxianus* (PAARDEKOOOPER et al., 1992; STRAKHOVSKAYA; ZHUKHOVITSKII; MIRONOV, 2002) e *Candida albicans* (WILSON; MIA, 1993; WAINWRIGHT, 1998; STRAKHOVSKAYA; ZHUKHOVITSKII; MIRONOV, 2002; BLISS et al., 2004). Embora as micoses superficiais e localizadas sejam as mais indicadas para serem tratadas pela TFDA, o tratamento de infecções profundas, como abscessos, será possível com o aperfeiçoamento das técnicas para a distribuição do fármaco e com a utilização de sistemas óticos mais sofisticados, que permitem levar a luz a diversas partes de organismo (DERYCKE; WITTE, 2004; JORI, 2006; KÖMERIK; MacROBERT, 2006).

Ainda pouco explorado, é cada vez mais evidente o potencial da TFDA para a inativação seletiva de microrganismos, tanto nas aplicações terapêuticas como nas não terapêuticas, como descontaminação de sangue e de hemoderivados, tratamento de água e efluentes, e no controle de populações de fitopatógenos (SCHÄFER et al., 2000; WAINWRIGHT, 2000; JORI; BROWN, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do azul de metileno, da cloro-alumínio ftalocianina e do nitrosilo de rutênio na fotossensibilização do fungo *Cryptococcus neoformans*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a influência de parâmetros, como a fonte de luz, a intensidade da radiação, a dose, o período de pré-incubação e a concentração dos fotossensibilizadores na fotossensibilização de *Cryptococcus neoformans*.
- Avaliar o efeito do estado fisiológico e da melanização das células na tolerância de *C. neoformans* à fotossensibilização com azul de metileno.
- Estimar a variabilidade na tolerância à fotossensibilização pelo azul de metileno entre linhagens de *C. neoformans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens de *C. neoformans*

As linhagens de *C. neoformans* var. *neoformans* ATCC 28957 (sorotipo D) e de *C. neoformans* var. *grubii* ATCC 90112 (sorotipo A) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). A linhagem ATCC 28957 foi isolada de lesão óssea, em local desconhecido, e a linhagem ATCC 90112 foi isolada de líquido cerebrospinal, na Pensilvânia, EUA. As linhagens foram mantidas a -20°C em meio adaptado de Kirsop e Doyle (1991).

3.2 Meio não indutor e indutor da melanização

O meio líquido não indutor (MLNI) e o meio líquido indutor (MLI) da melanização foram preparados como descrito por Rosas e Casadevall (2001). O MLNI da melanização é composto por $2,7\text{ g L}^{-1}$ (15 mM) de glicose (Vetec, RJ, Brazil), 4 g L^{-1} (29,4 mM) de KH_2PO_4 (Labsynth, SP, Brazil), $2,5\text{ g L}^{-1}$ (10 mM) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Labsynth, SP, Brazil), 1 g L^{-1} (13 mM) de glicina (Sigma) e $0,001\text{ g L}^{-1}$ (0,003 mM) de tiamina (Sigma). O MLI foi preparado adicionando-se $0,197\text{ g L}^{-1}$ (1 mM) de L-3,4 diidroxifenilalanina (Sigma) ao MLNI. Todos os componentes foram solubilizados em água destilada e os meios foram filtrados a vácuo em uma membrana porosa (éster de celulose, poros com $0,22\text{ }\mu\text{m}$, 47 mm de diâmetro) (Millipore, SP, Brasil).

3.3 Fotossensibilizadores

Foram utilizados os seguintes fotossensibilizadores: (1) azul de metileno ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) (Sigma-Aldrich, EUA), (2) nanoemulsões contendo ftalocianinas (AICIPc/NE) (Sigma-Aldrich, EUA) (3) nanoemulsões contendo azul de metileno (MB/NE) (Sigma-Aldrich, EUA) e (4) complexo nitrosilo de rutênio $[Ru(NH.NHq)(tpy)NO](PF_6)_3$. As nanoemulsões contendo ftalocianinas e azul de metileno foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. O complexo nitrosilo de rutênio foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. O nitrosilo foi preparado como descrito por De Lima (2006).

Foram preparadas soluções-estoque de MB em phosphate buffered saline (PBS), pH = 7,4, com concentrações dez vezes maiores do que a maior concentração utilizada ($5200 \mu g mL^{-1}$ ou 13,9 mM) nos experimentos de fotossensibilização. As soluções foram aliqüotadas em tubos de polipropileno de 1,5 mL (Axygen Scientific, CA, EUA) e mantidas, no escuro, a $-18^\circ C$, por até duas semanas. Antes do uso, foram descongeladas e diluídas para a concentração de uso com PBS.

As soluções de nitrosilo de rutênio, na concentração de $10^{-3} M$, e as nanoemulsões contendo ftalocianina e azul de metileno, na concentração de $26 \mu g mL^{-1}$ (45,22 mM e 69,54 mM, respectivamente), foram preparadas em PBS, imediatamente antes da utilização.

3.3.1 Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões do tipo óleo em água, contendo azul de metileno e ftalocianina, foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, descrito por Primo, Bentley e Tedesco (2008). Inicialmente, foram preparadas duas soluções, uma fase aquosa contendo o biopolímero Poloxamer 188 (7,5%) (ICI, França) e uma fase orgânica, contendo os fosfolípidios emulsificantes Epikuron 170/Span 80 (7,5%) (Lucas Meyer, França/Aldrich, EUA) em acetona grau espectroscópico, sob agitação, a 55°C. Os agentes fotossensibilizadores foram previamente dissolvidos em Miglyol 812N (Stallergenes S.A., França), para uma concentração final de 26 µg ml⁻¹ e adicionados à fase orgânica. A etapa de emulsificação foi então realizada pela adição da fase orgânica diretamente sob a fase aquosa (20 min), com fluxo rigorosamente controlado e agitação a 55°C. Após homogeneização, o solvente orgânico foi totalmente rotaevaporado à pressão reduzida (125 rpm e temperatura entre 70 – 80 °C). As formulações foram estocadas a 7°C e protegidas da luz antes dos ensaios de caracterização físico-química e fotobiológicos.

Para a caracterização físico-química, o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das nanopartículas coloidais foram analisados por espectroscopia de fotocorrelação, utilizando-se um equipamento de espalhamento dinâmico de fótons (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, Reino Unido) em 633 nm e ângulo de dispersão de 90°, a 25°C. As medidas foram realizadas por 12 semanas, empregando-se um fator de diluição de 1:1000 em água destilada.

3.4 Exposições à luz

3.4.1 Exposições à luz visível

As exposições à luz visível foram realizadas em uma câmara com temperatura controlada e circulação interna de ar (Nova Ética modelo 410 D, Nova Ética, SP, Brasil). A iluminação foi fornecida por uma lâmpada halógena, do tipo palito, de 300 W (Osran, Brasil). A irradiância no visível (400-700 nm) foi medida com um espectrorradiômetro USB 4000 (Ocean Optics, FL, EUA). A intensidade de radiação no interior da câmara foi 50 W m^{-2} e o espectro de emissão da lâmpada é mostrada na Figura 5.

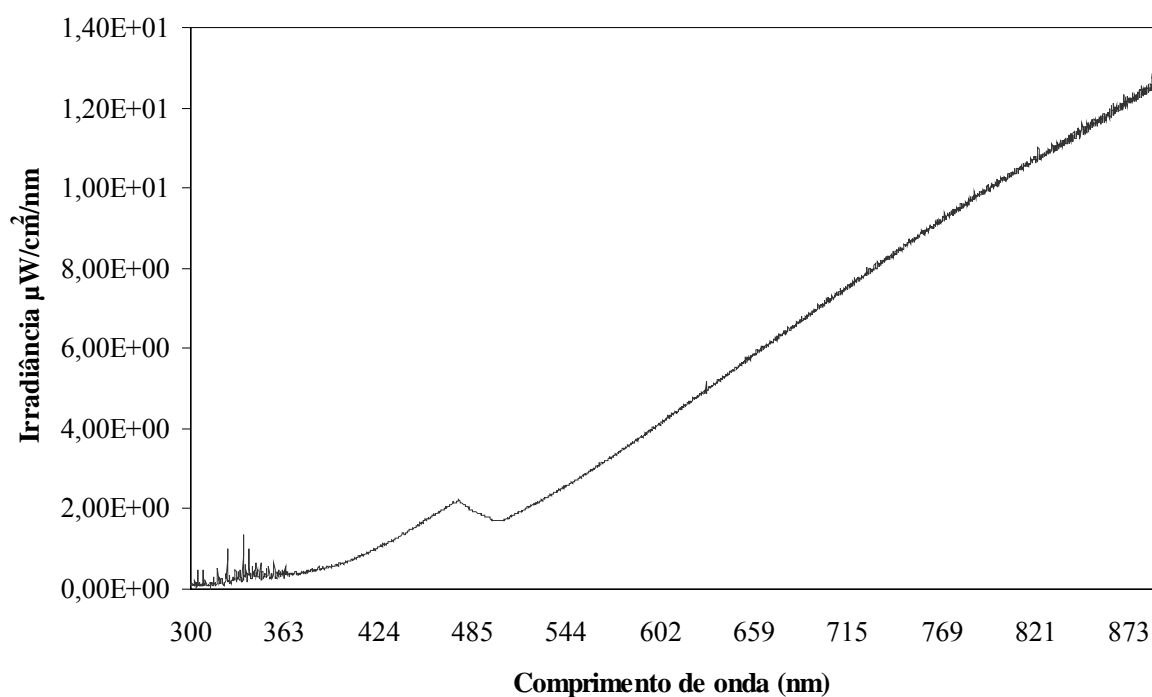


Figura 5. Emissão espectral da lâmpada halógena de 300 W (Osran, Brasil)

Nos experimentos com o nitrosilo de rutênio, foi utilizada uma lâmpada de descarga de alta intensidade com formato ovóide, composta por um tubo de descarga de quartzo, preenchido por vapor de mercúrio em alta pressão, de 250 W (HPLN, Philips, Brasil).

3.4.2 Exposições ao laser

As aplicações de laser foram realizadas utilizando-se um sistema de fibra óptica acoplada a um laser de diodo modelo Eagle (Quantum Tech, Brazil), calibrado para doses de 5 e 10 J.cm⁻², operando em comprimento de onda fixo (675 nm) e irradiância de 28 e 56 mW cm⁻², respectivamente.

3.5 Obtenção de células melanizadas e não melanizadas

As linhagens de *C. neoformans* cresceram em meio PDA (Potato Dextrose Agar) (Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI, EUA), a 28°C, por 48 h. Células provenientes de colônias isoladas foram transferidas para tubos de polipropileno de 50 mL, com fundo cônico (TPP, Suíça), contendo 10 mL de MLNI. Os tubos foram incubados a 30°C, com agitação de 150 rpm, no escuro, por 24 h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e 1 mL de suspensão de células na concentração de 10⁶ células mL⁻¹ foi transferido para tubos de polipropileno de 50 mL, contendo 19 mL de MLNI e MLI. Esses tubos foram incubados a 30°C, com agitação de 200 rpm, no escuro, por 4, 6 e 8 dias. Após os períodos de crescimento, os tubos foram centrifugados a 1.100 g por 30 min, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS e a concentração foi ajustada para o valor desejado com PBS.

3.6 Curva de crescimento e de culturabilidade

O crescimento e a culturabilidade (capacidade de a célula formar uma colônia) das células das duas linhagens foram avaliados nos dois meios de cultura (não indutor e indutor). Após cada período de crescimento (0, 2, 4, 6 e 8 dias), foram retiradas alíquotas das culturas

para a determinação da concentração celular através de contagens em hematímetro. A culturabilidade foi determinada, plaqueando-se as alíquotas (após diluições apropriadas), que foram retiradas ao longo do crescimento, em placas de Petri contendo 5 mL de meio PDA. As placas foram incubadas a 28°C, por 48 h, para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs).

3.7 Avaliação semiquantitativa da fotossensibilização de células melanizadas e não melanizadas com diferentes fotossensibilizadores

3.7.1 Azul de metileno

Em tubos de vidro com tampa com rosca (borosiliato, 12 × 100 mm, Normax, Portugal), foram colocados 100 µL de suspensão de células (10^7 células mL⁻¹) e 900 µL da solução de MB. As concentrações finais nas misturas foram 10^6 células mL⁻¹ e 26 (0,0695 mM) ou 52 µg mL⁻¹ (0,139 mM) de MB. Os tubos foram mantidos, no escuro, por 10 min (pré-incubação) e, a seguir, expostos à luz por 30 e 60 min. Tubos-controle, que foram protegidos da luz durante as exposições, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Após as exposições, os tubos foram agitados e foram retiradas alíquotas que foram diluídas (1:10) seqüencialmente. Dez microlitros de cada diluição foram colocados na superfície de meio PDA (23 mL, em placa de Petri). As placas foram incubadas, a 28°C, por 48 h. O desenvolvimento das colônias foi avaliado após 24 e 48 h de crescimento e as placas foram fotografadas. Esses experimentos foram feitos para a determinação dos parâmetros (período de pré-incubação, tempo de exposição e concentração do fotossensibilizador) mais apropriados para serem utilizados nos experimentos quantitativos, nos quais os efeitos dos diferentes tratamentos foram estimados através da contagem das UFCs.

3.7.2 Ftalocianina e azul de metileno veiculados em nanoemulsão

Em microtubos de 1,5 mL (polipropileno, Axygen Scientific, CA, EUA) foram colocados 50 μL da suspensão de células e 450 μL das nanoemulsões de azul de metileno ou ftalocianina em diferentes concentrações. A concentração final das suspensões de células foi de 10^6 células mL^{-1} . As concentrações finais do fotossensibilizador ftalocianina em nanoemulsão foram 2,6; 1,3; 0,26 e 0,026 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (4,522; 2,261; 0,452 e 0,045 mM, respectivamente). As concentrações finais do fotossensibilizador azul de metileno em nanoemulsão foram 26 e 2,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (69,56 e 6,956 mM, respectivamente). Os microtubos foram mantidos, no escuro, por 30 min (pré-incubação). Posteriormente, as células foram divididas em dois grupos: lavadas com PBS e não-lavadas após a pré-incubação. Para a lavagem, as células foram centrifugadas a 1.100 g, por 15 min, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em PBS. Em seguida, a concentração de células foi ajustada para 10^5 células mL^{-1} e 400 μL dessa suspensão foi colocada em placas de cultura de células com 24 poços (poliestireno, TPP, Suíça). As exposições ao laser foram realizadas como descrito no item 3.4.2. As doses recebidas pelas suspensões foram 5 e 10 J cm^{-2} (irradiâncias de 28 e 56 mW cm^{-2} , respectivamente) em um comprimento de onda fixo de 675 nm.

Microtubos-controle, que foram protegidos da luz durante as exposições, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Após as exposições, as células foram resuspenso e 10 μL de cada suspensão foram colocados na superfície de meio PDA (23 mL, em placa de Petri). As placas foram incubadas, a 28°C , por 48 h. O desenvolvimento das colônias foi avaliado após 48 h de crescimento e as placas foram fotografadas. Esses experimentos foram conduzidos para: (1) avaliar se o azul de metileno veiculado em nanoemulsão é capaz de fotoinativar células de *Cryptococcus*; (2) avaliar a atividade fotossensibilizadora de um derivado de ftalocianina em nanoemulsão; (3) determinar os

melhores parâmetros das variáveis (dose e irradiância, lavagem e concentração do fotossensibilizador) para serem utilizados nos experimentos quantitativos.

3.7.3 Nitrosilo de rutênio

3.7.3.1 Avaliação da atividade do NO liberado pela fotossensibilização do complexo nitrosilo de rutênio e da toxicidade do complexo sem o óxido nítrico (Aquo complexo)

Em tubos de vidro com tampa com rosca (borosiliato, 12 × 100 mm, Normax, Portugal), foram colocados 50 µL de suspensão células melanizadas de *C. neoformans* da linhagem ATCC 28957 e 450 µL do nitrosilo de rutênio. Como um dos controles, o nitrosilo foi previamente exposto à luz por 4 h para formação do Aquo (nome do composto após a liberação de todo o NO, $[\text{RuIII}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi-COOH})(\text{terpy})]^{3+}$). As concentrações finais nas misturas foram 10^5 células mL^{-1} e 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , e 10^{-7} M do nitrosilo de rutênio e do Aquo. Os tubos foram mantidos, no escuro, por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, expostos à luz por 120 min. Tubos-controle, que foram protegidos da luz durante as exposições, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Após as exposições, os tubos foram agitados e foram retiradas alíquotas de 10 µL, que foram colocadas na superfície de meio PDA (23 mL, em placa de Petri). As placas foram incubadas, a 28°C, por 48 h. O desenvolvimento das colônias foi avaliado após 48 h de crescimento e as placas foram fotografadas. Esses experimentos foram conduzidos para: (1) avaliar a atividade fotossensibilizadora do nitrosilo de rutênio e (2) avaliar a toxicidade da molécula sem o óxido nítrico (Aquo).

3.7.3.2 Avaliação da fotossensibilização com o nitrosilo de rutênio e do efeito de sua combinação com redutores

Em tubos de vidro com tampa com rosca (borosiliato, 12 × 100 mm, Normax, Portugal), foram colocados 100 µL de suspensão de células melanizadas de *C. neoformans* da linhagem ATCC 28957 e 900 µL dos seguintes compostos em cada tubo: apenas nitrosilo de rutênio, nitrosilo de rutênio com ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EUA), nitrosilo de rutênio com noradrenalina (Sigma-Aldrich, EUA) e apenas nitroprussiato de sódio (Merck, Alemanha). As concentrações finais nas misturas foram: (1) 10^5 células mL⁻¹ e 10^{-3} M do nitrosilo de rutênio; (2) 10^5 células mL⁻¹, 10^{-4} M do nitrosilo de rutênio e 10^{-3} M do ácido ascórbico; (3) 10^5 células mL⁻¹, 10^{-4} M do nitrosilo de rutênio e 10^{-3} M de noradrenalina, e (4) 10^5 células mL⁻¹ e 10^{-3} M de nitroprussiato de sódio. Nos controles, as células foram incubadas apenas em PBS. Os tubos foram mantidos, no escuro, por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, expostos à luz emitida por uma lâmpada de vapor de mercúrio em alta pressão por 120 min. Tubos-controle, protegidos da luz durante as exposições, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Após as exposições, os tubos foram agitados e foram retiradas alíquotas de 10 µL que foram colocadas na superfície de meio PDA (23 mL, em placa de Petri). As placas foram incubadas, a 28°C, por 48 h. O desenvolvimento das colônias foi avaliado após 48 h de crescimento e as placas foram fotografadas. Esses experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito do NO liberado pelo nitrosilo de rutênio, pelo nitrosilo de rutênio com ácido ascórbico, pelo nitrosilo de rutênio com noradrenalina e pelo nitroprussiato de sódio.

3.8 Avaliação semiquantitativa do efeito de diferentes diluentes na fotossensibilização de *C. neoformans* com ftalocianina

Cinco mililitros de células melanizadas de *C. neoformans* da linhagem ATCC 28957 (6 dias de crescimento) foram colocados em tubos de polipropileno de 15 mL, fundo cônico (TPP, Suíça), centrifugados a 1100 g por 15 min. A seguir, as células foram lavadas e ressuspensas com água, salina (nas concentrações de 0,9; 0,8; 0,7; 0,5; 0,3 e 0,1%) ou PBS.

Em microtubos de 1,5 mL (polipropileno, Axygen Scientific, CA, EUA), foram colocados 50 μL da suspensão de células e 450 μL do fotossensibilizador ftalocianina em nanoemulsão. As concentrações finais nas misturas foram de 10^6 células mL^{-1} de *C. neoformans* e 2,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (4,522 mM) da ftalocianina. Os microtubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, centrifugados (1.100 g, 15 min). As células foram lavadas uma vez e ressuspensas em 500 μL de água, salina (nas concentrações de 0,9; 0,8; 0,7; 0,5; 0,3 e 0,1%) ou PBS. Posteriormente, a concentração de células foi ajustada para 10^5 células mL^{-1} e 400 μL dessa suspensão foi colocada em placas de 24 poços (poliestireno, TPP, Suíça). As exposições ao laser foram realizadas como descrito no item 3.4.2. A dose ao final da exposição foi de 10 J cm^{-2} , num comprimento de onda de 675 nm e irradiância de 56 mW cm^{-2} .

Microtubos-controle, que foram protegidos da luz durante as exposições, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Após as exposições, as suspensões foram ressuspensas e 10 μL de cada suspensão foram colocados na superfície de meio PDA (23 mL, em placa de Petri). As placas foram incubadas, a 28°C , por 48 h. O desenvolvimento das colônias foi avaliado após 24 e 48 h de crescimento e as placas foram fotografadas. Esses experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito do diluente (água, salina e PBS) nas fotossensibilizações com ftalocianina em nanoemulsão.

3.9 Avaliação quantitativa da fotossensibilização de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*

3.9.1. Azul de metileno

Em tubos de vidro com tampa de rosca, foram colocados 100 μL da suspensão de células e 900 μL da solução de MB. As concentrações finais nas misturas foram 2×10^4 células mL^{-1} e $26 \mu\text{g mL}^{-1}$ (0,0695 mM). Os tubos foram pré-incubados, no escuro, por 10 min e, a seguir, expostos à luz visível (50 W m^{-2}) por 30 min. Controles nos quais as células foram expostas à luz, na ausência do fotossensibilizador, e controles nos quais as células foram tratadas com o fotossensibilizador mas não foram expostas à luz, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Após a exposição, os tubos foram agitados e 50 μL das suspensões foram espalhadas na superfície de 5 mL de meio PDA. Foram preparadas três placas-réplica por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C , no escuro, e a determinação das UFCs foi feita com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de $8 \times$) após 24 e 96 h de desenvolvimento. O efeito dos diferentes tratamentos foi estimado através da determinação da culturabilidade relativa (culturabilidade das células tratadas em relação a controles não tratados). Células que não originaram colônias após 96 h foram consideradas inativadas (mortas) pelo tratamento. A culturabilidade relativa das células expostas apenas à luz, apenas ao fotossensibilizador e expostas à luz + fotossensibilizador foi estimada em relação aos controles não expostos nem à luz e nem ao fotossensibilizador. A contagem das UFCs após dois períodos de desenvolvimento (24 e 96 h) permitiu observar a recuperação das células submetidas a um estresse subletal.

3.9.2. Ftalocianinas em nanoemulsão

Em microtubos de 1,5 mL (polipropileno, Axygen Scientific, CA, EUA) foram colocados 50 μL da suspensão de células melanizadas da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans* e 450 μL de ftalocianina em nanoemulsão em diferentes concentrações. As concentrações finais nas misturas foram de 10^7 células mL^{-1} e 2,6; 0,26; 0,026 e 0,0026 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (4,522; 0,452; 0,045; 0,004 mM, respectivamente) do fotossensibilizador. Os microtubos foram mantidos, no escuro, por 30 min (pré-incubação) e, a seguir, centrifugados (1.100 g, 15 min). As células foram lavadas uma vez e ressuspensas em 500 μL de PBS. Posteriormente, a concentração de células foi ajustada para $1,4 \times 10^4$ células mL^{-1} e 400 μL dessa suspensão foram colocados em placas de cultura de células com 24 poços (poliestireno, TPP, Suíça). A seguir, as placas foram expostas ao laser (dose de 5 J cm^{-2}) com comprimento de onda de 675 nm e irradiância de 28 mW cm^{-2} . Controles nos quais as células foram expostas apenas à luz, na ausência do fotossensibilizador, e controles nos quais as células foram tratadas com o fotossensibilizador, mas não foram expostas à luz, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. Após as exposições, as células foram ressuspensas e 50 μL foram espalhados na superfície de 5 mL de meio PDA. Foram preparadas três placas-réplica por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C , no escuro, e a contagem das UFCs foi feita com auxílio de estereomicroscópio (ampliação de $8 \times$) após 48 h de desenvolvimento. O efeito das diferentes concentrações do fotossensibilizador foi estimado através da determinação da fração de sobreviventes (n/n_0). Células que não originaram colônias após 96 h foram consideradas inativadas (mortas) pelo tratamento.

3.10 Delineamento experimental e análise estatística

Na avaliação quantitativa da fotossensibilização com MB, as duas linhagens foram avaliadas simultaneamente em três experimentos independentes. Não houve necessidade de nenhum tipo de transformação dos dados para a análise estatística. A análise da influência das variáveis [linhagens, meio de crescimento (sem e com L-dopa), período de crescimento (4, 6 e 8 dias) e período de avaliação (24 e 96 h após a fotossensibilização)] na culturabilidade, foi feita através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o procedimento PROC GLM do programa SAS/STAT, versão 9.0. Quando foram verificadas diferenças entre pelo menos dois tratamentos, as médias foram comparadas através de contrastes ortogonais (MONTGOMERY, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento e melanização em meios com e sem L-dopa

As duas linhagens de *C. neoformans* apresentaram curvas de crescimento semelhantes em meio líquido indutor (com L-dopa) e não indutor (sem L-dopa) (dados não mostrados). As linhagens, em ambos os meios, encontravam-se na fase estacionária após dois dias de crescimento. Estudos com outras linhagens de *C. neoformans* mostraram que a presença de L-dopa no meio não reduziu a velocidade de crescimento (WANG; CASADEVALL, 1994; ROSAS; CASADEVALL, 1997), apesar de o brotamento em células melanizadas requerer mecanismos complexos para a degradação e síntese da melanina depositada na parede celular (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). *C. neoformans* não é capaz de utilizar a L-dopa como fonte de carbono ou nitrogênio (POLACHEK et al., 1990).

A viabilidade (eficiência de plaqueamento) das duas linhagens, nos dois meios, manteve-se inalterada até o 4º dia de crescimento; a partir daí, observou-se uma redução gradual da viabilidade das células, das duas linhagens, em ambos os meios (dados não mostrados).

As duas linhagens melanizaram-se em meio contendo L-dopa e a melanização aumentou com o tempo de crescimento; entretanto, o processo foi mais rápido e mais intenso na linhagem ATCC 90112 do que na linhagem ATCC 28957 (Figura 6). A variabilidade na cinética e na intensidade da melanização foi observada em outras linhagens de *C. neoformans* (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1996). Em meio contendo L-dopa, *C. neoformans* acumula melanina de maneira progressiva e linear ao longo da fase estacionária. Em algumas linhagens, a melanina representou até 15% da massa seca da célula (ROSAS; CASADEVALL, 1997).

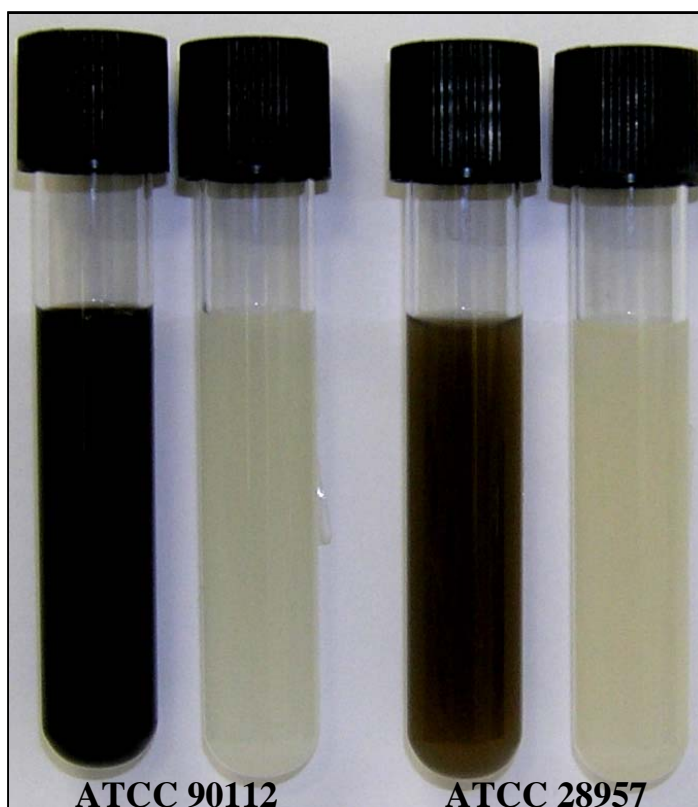


Figura 6. Melanização das linhagens ATCC 90112 e ATCC 28957 de *C. neoformans*, crescidas em meio líquido com (esquerda) e sem L-dopa (direita), por 8 dias. Ao final do crescimento, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em PBS e a concentração foi ajustada para aproximadamente 10^6 células mL^{-1}

4.2 Avaliação semiquantitativa da fotossensibilização de células melanizadas e não melanizadas

O efeito de exposições à luz e ao MB na culturabilidade de células melanizadas e não melanizadas da linhagem ATCC 28957, com 4, 6 e 8 dias, é mostrado na Figura 7. A fotossensibilização foi observada em todos os tratamentos em que as células foram expostas simultaneamente à luz visível (50 W m^{-2}) e ao fotossensibilizador, independentemente do tempo de exposição (30 ou 60 min) e da concentração do fotossensibilizador (26 ou $52 \mu\text{g mL}^{-1}$). Como nós não sabíamos se ocorria a ligação e/ou a penetração do MB nas células, as células não foram lavadas para a retirada do excesso de fotossensibilizador antes das

exposição à luz. A partir dos resultados, foram escolhidos os parâmetros (10 min de pré incubação, 30 min de exposição à luz visível e $26 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MB) para os experimentos quantitativos. A avaliação semiquantitativa da fotossensibilização mostrou-se rápida, confiável e útil para a avaliação preliminar das diversas combinações entre as variáveis testadas (período de pré-incubação, tempo de exposição, idade das células, melanização e concentração dos fotossensibilizador).

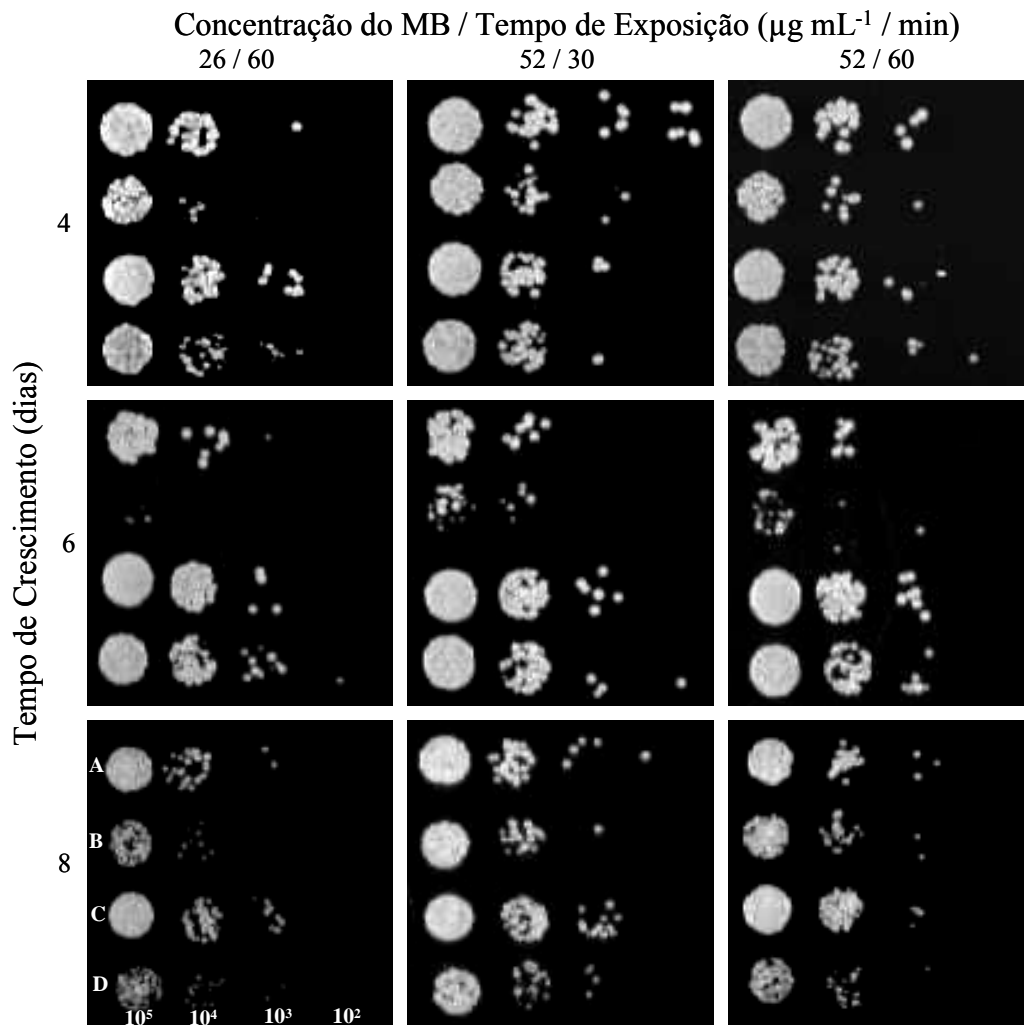


Figura 7. Efeito de exposições apenas ao fotossensibilizador (A e C) e de exposições simultâneas à luz e ao fotossensibilizador (B e D) em células melanizadas (A e B) e não melanizadas (C e D) de *C. neoformans* ATCC 28957. Foram avaliadas células com 4, 6 e 8 dias de desenvolvimento. Colônias com 48 h de crescimento

4.3 Avaliação quantitativa da fotossensibilização com MB de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*

A Figura 8 mostra a culturabilidade relativa (culturabilidade das células tratadas em relação a controles não tratados) de células melanizadas e não melanizadas das duas linhagens de *C. neoformans*. Células em diferentes fases do desenvolvimento (4, 6 e 8 dias) foram pré-incubadas com o fotossensibilizador (10 min) e, a seguir, expostas à luz (30 min, 50 W m⁻²), ao MB (26 µg mL⁻¹) ou a luz + MB. As avaliações da culturabilidade foram feitas após 24 (Figuras 8A, 8B e 8C, Apêndices A e B) e após 96 h (Figuras 8D, 8E e 8F, Apêndices C e D) de desenvolvimento.

Efeito das exposições apenas à luz ou apenas ao fotossensibilizador. Exposições apenas à luz ou apenas ao fotossensibilizador não reduziram, de maneira significativa, a culturabilidade de nenhum dos tratamentos (linhagens, células melanizadas ou não melanizadas e células com 4, 6 ou 8 dias de crescimento) (Figura 8). Apenas as células melanizadas da linhagem ATCC 90112, com 8 dias de crescimento, que mostraram-se mais sensíveis ao MB (Figura 8C).

Não se observaram diferenças significativas na sensibilidade à luz ou ao fotossensibilizador entre células com 4, 6 ou 8 dias de crescimento, independentemente da melanização, nas avaliações com 24 h (Figuras 8A, 8B e 8C) e nem nas avaliações com 96 h (Figuras 8D, 8E e 8F).

Em nenhum dos tratamentos (linhagens, células melanizadas ou não melanizadas e células com 4, 6 ou 8 dias de crescimento) houve diferenças significativas entre a culturabilidade das células expostas apenas à luz ou apenas ao fotossensibilizador. Novamente, a única exceção foi o caso das células melanizadas da linhagem ATCC 90112, com 8 dias, que se mostraram mais sensíveis ao fotossensibilizador ($P < 0,001$).

Também não houve diferenças significativas na tolerância à luz ou ao fotossensibilizador entre células melanizadas e não melanizadas da mesma linhagem, em nenhum dos tratamentos (linhagens e células com 4, 6 ou 8 dias).

A comparação entre as linhagens mostrou que as células melanizadas com 6 e 8 dias da linhagem ATCC 90112 foram mais sensíveis ao fotossensibilizador do que as células melanizadas da linhagem ATCC 28957 ($P = 0,01$ e $P < 0,01$, respectivamente). Não houve diferença entre as linhagens na sensibilidade à luz em nenhum dos tratamentos (células melanizadas e não melanizadas e células com 4, 6 ou 8 dias).

Efeito das exposições simultâneas à luz e ao fotossensibilizador. A linhagem ATCC 90112 foi muito mais sensível à fotossensibilização com MB do que a linhagem ATCC 28957. No caso da linhagem ATCC 90112, tanto nas avaliações com 24 como com 96 h, o tratamento luz + fotossensibilizador reduziu a culturabilidade tanto em relação às exposições apenas à luz, como em relação às exposições apenas ao fotossensibilizador. A redução foi significativa para todos os tratamentos (células melanizadas ou não melanizadas com 4, 6 ou 8 dias) ($P < 0,01$ para todas as comparações). No caso da linhagem ATCC 28957, nas avaliações com 24 h, em apenas um caso (células melanizadas com 8 dias) houve redução significativa na culturabilidade das células tratadas com a combinação luz + fotossensibilizador em relação às células tratadas apenas com a luz ou apenas com o fotossensibilizador ($P < 0,01$ para ambas as comparações) (Figuras 8A, 8B e 8C). Nas avaliações com 96 h, a fotoinativação não foi observada em nenhum dos tratamentos, indicando que, no caso da linhagem ATCC 28957, mesmo as células mais sensíveis (células com 8 dias, em fase estacionária adiantada) foram capazes de se recuperar do estresse causado pela fotossensibilização com o MB.

O efeito fotossensibilizador do MB sobre as células melanizadas e não melanizadas das duas linhagens é individualizado na Figura 9 (Apêndices E e F). Para a maior parte dos tratamentos (linhagens, células com 4, 6 ou 8 dias), não foi observada diferença significativa

entre a fotoinativação das células melanizadas e não melanizadas de uma mesma linhagem; entretanto, as células melanizadas com 6 dias da linhagem ATCC 90112 foram mais tolerantes à fotoinativação com MB do que as células não melanizadas (Figura 9B). No caso da linhagem ATCC 90112, uma fração significativa das células recuperou-se dos danos provocados pela fotossensibilização, já que a culturabilidade das células fotossensibilizadas foi significativamente maior nas avaliações após 96 h do que nas avaliações após 24 h. ($P < 0,01$, tanto para células melanizadas como para células não melanizadas, com 4, 6 e 8 dias). A melanização aumenta a sobrevivência de *C. neoformans* após o fungo ser fagocitado por macrófagos, que utilizam espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio para inativar as células dos microrganismos fagocitados. Células melanizadas de *C. neoformans* foram mais tolerantes a espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio do que células não melanizadas em experimentos conduzidos *in vitro* (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; WANG; CASADEVALL, 1994; JACOBSON; TINELL, 1993). As diferenças observadas entre as duas linhagens nesse experimento reforça a idéia de que é muito difícil prever o efeito da melanização na tolerância a fotossensibilização. O fato de a melanina estar localizada na parede celular e o fato de apresentar propriedades antioxidantes poderiam favorecer a inativação das espécies reativas de oxigênio produzidas durante a fotossensibilização. Adicionalmente, a melanização muda a estrutura e as características físicoquímicas da parede do fungo que são fatores capazes de influenciar a ligação e/ou penetração do fotossensibilizador. As paredes celulares dos fungos são carregadas negativamente e a melanização é um dos fatores que contribui para o balanço final de cargas. As cargas negativas da parede facilitam a a ligação de fotossensibilizadores catiônicos. Isso pode ser um dos fatores responsáveis pela maior sensibilidade dos fungos à fotossensibilização em relação as células animais.

A Figura 10 mostra o efeito do tratamento de células melanizadas e não melanizadas das linhagens ATCC 28957 e 90112 apenas com o fotossensibilizador e com L + F no desenvolvimento das colônias. Os resultados coincidem com os obtidos nos experimentos quantitativos, baseados na análise da culturabilidade relativa.

Em conjunto, os resultados mostraram que, nas condições utilizadas, houve a fotossensibilização de células melanizadas e não melanizadas de ambas as linhagens pelo MB, entretanto, em todos os casos a fotoinativação foi apenas parcial.

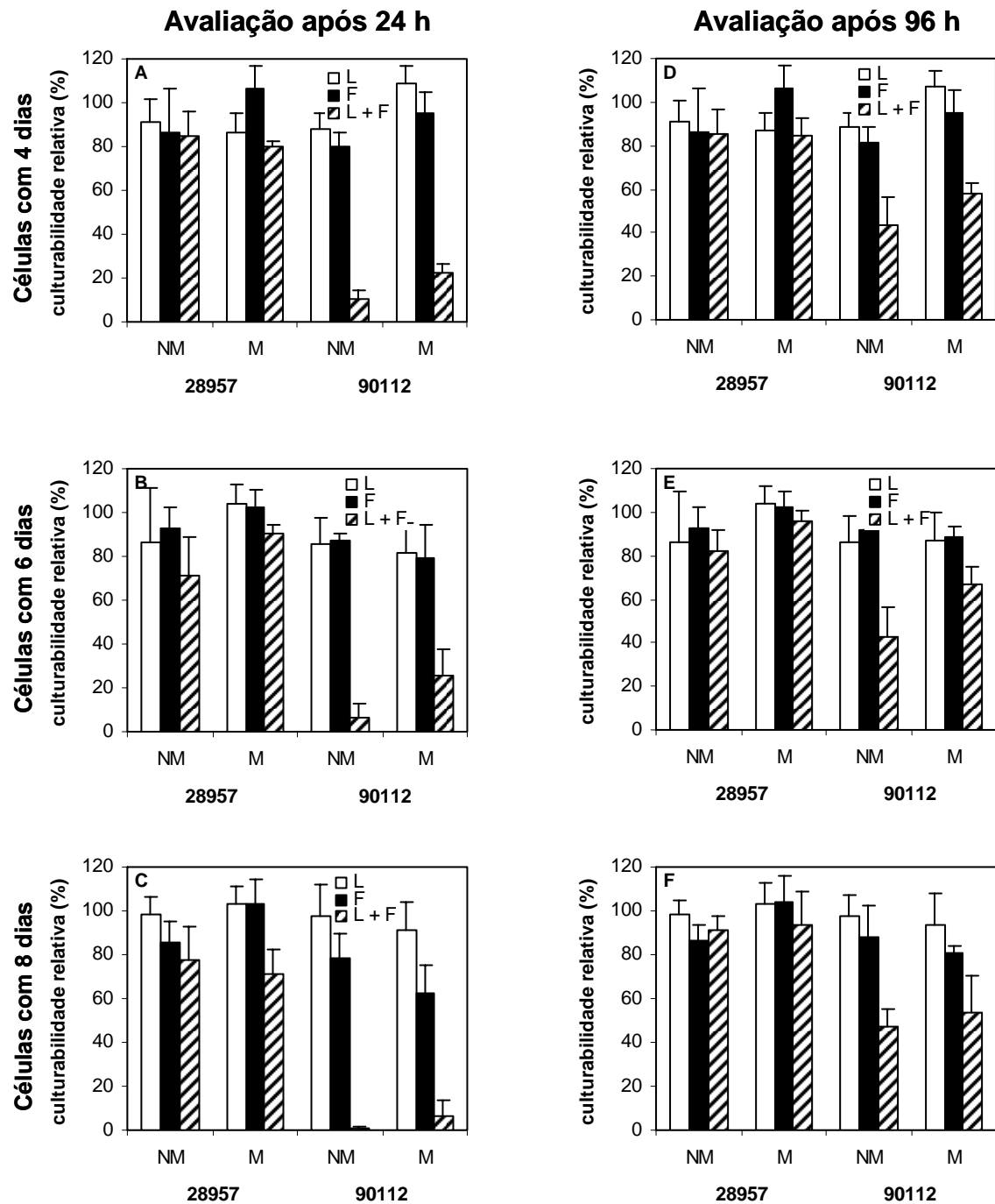


Figura 8. Culturabilidade relativa das células melanizadas (M) e não melanizadas (NM) com 4 (A e D), 6 (B e E) e 8 (C e F) dias de crescimento de *C. neoformans* expostas apenas à luz (L), apenas ao fotossensibilizador (F) e simultaneamente à luz e ao fotossensibilizador (L+F). A culturabilidade relativa foi estimada em relação a controles que não foram expostos nem à luz e nem ao fotossensibilizador. As UFCs foram contadas após 24 (A, B e C) e 96 (D, E e F) h

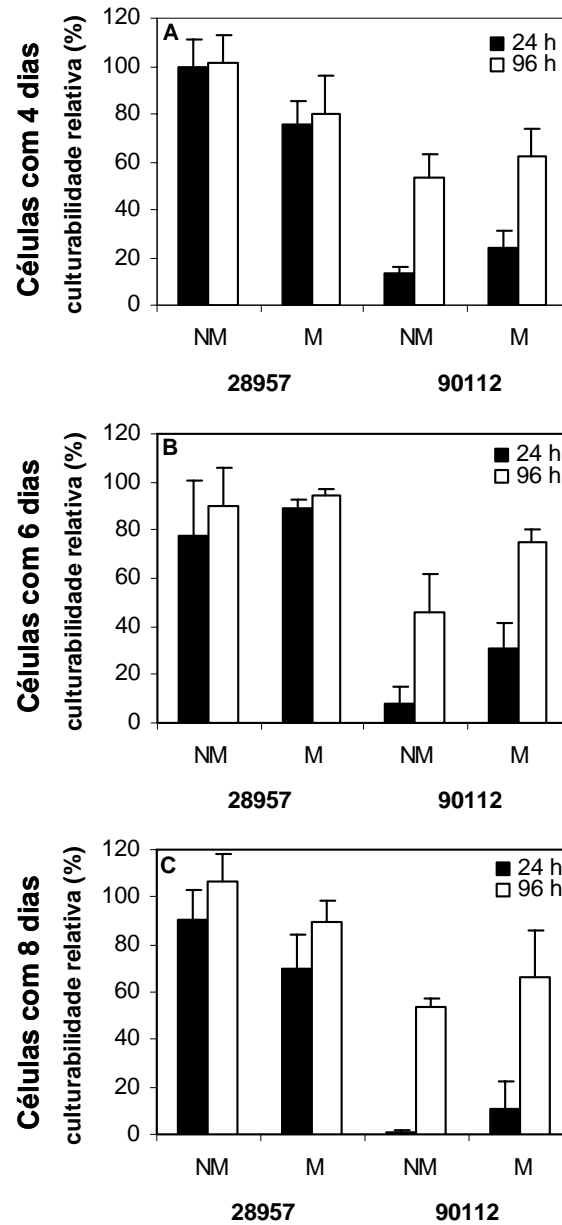


Figura 9. Efeito da fotossensibilização (L + F) na culturabilidade relativa de células melanizadas (M) e não melanizadas (NM) das linhagens ATTC 28957 e 90112 com 4 (A), 6 (B) e 8 (D) dias. A culturabilidade relativa foi estimada, após 24 e 96 h, em relação às células que foram expostas apenas ao fotossensibilizador

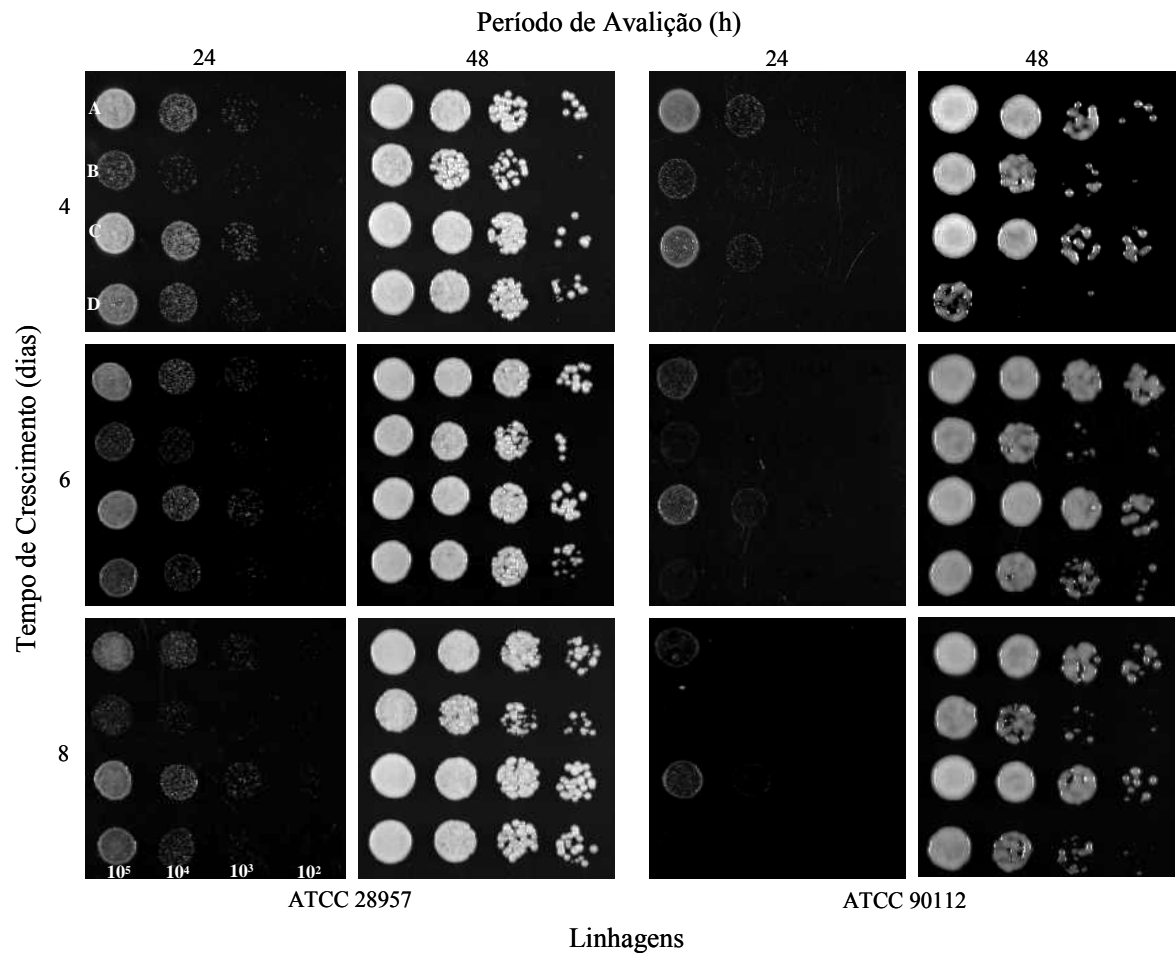


Figura 10. Efeito do tratamento apenas com o fotossensibilizador (A e C) e com L + F (B e D) de células melanizadas e não melanizadas com 4, 6 e 8 dias de crescimento das linhagens ATCC 28957 e 90112 de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas por 10 min e expostas por 30 min. As fotografias foram tiradas após 24 e 48 h de desenvolvimento

4.4 Avaliação semiquantitativa da fotossensibilização com nanoemulsões contendo ftalocianinas e azul de metileno de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*

O diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta das nanopartículas coloidais contendo os fotossensibilizadores ftalocianina e azul de metileno são mostrados na Tabela 1. Os dados da formulação não carregada foram utilizados como parâmetros de comparação para verificar a influência da incorporação dos corantes. A estabilidade físico-química das formulações foi avaliada em função do tempo por um período de 12 semanas. A associação da ftalocianina não ocasionou um aumento significativo no tamanho das partículas coloidais, que apresentaram um diâmetro médio de 192,27 nm. Entretanto, observou-se um acréscimo substancial no diâmetro após a incorporação do azul de metileno, levando a uma nanoemulsão com um diâmetro médio de partículas de 272,36 nm (Tabela 1). O índice de polidispersão médio (Pdl) demonstrou uma distribuição homogênea de partículas monodispersas em solução, o que está de acordo com os critérios necessários para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. O potencial zeta das formulações permaneceu dentro da faixa de estabilidade de interação de cargas, demonstrando uma alta estabilidade físico-química por um período de 84 dias.

Tabela 1. Tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão para as nanoemulsões contendo ftalocianina (AICIPc/NE), azul de metileno (MB/NE) e na ausência de agente fotossensibilizador (NE). Fator de diluição 1:1000 em água destilada

	AICIPc/NE	MB/NE	NE
Tamanho Partícula (nm)	192,27	272,36	186,67
Pdl	0,295	0,273	0,355
Potencial Zeta (mV)	-37,28	-35,89	-37,09

Os resultados da fotossensibilização de células melanizadas e não melanizadas das linhagens ATCC 28957 e ATCC 90112 de *C. neoformans* com ftalocianina e azul de metileno em nanoemulsões e laser como fonte de luz são mostrados na Figura 11. As células não foram lavadas para a retirada do excesso de fotossensibilizador antes da exposição à luz. Foi observada a fotoinativação das células tratadas com ftalocianina em nanoemulsão (AlClPc/NE). O azul de metileno em nanoemulsão (MB/NE) não foi capaz de fotoinativar completamente as células melanizadas das linhagens ATCC 28957 e 90112 e as células não melanizadas da linhagem ATCC 28957. Se comparados aos resultados obtidos com o MB em solução, a veiculação do azul e metileno em nanoemulsão, aparentemente, não aumentou a sua eficácia para a fotoinativação de *C. neoformans*.

A Figura 12 mostra a fotossensibilização das mesmas linhagens com os mesmos fotossensibilizadores mas, neste caso, as células foram lavadas com PBS, para a retirada do fotossensibilizador não ligado antes de serem expostas à luz. A lavagem das células não impediu a fotoinativação pela ftalocianina, mas inibiu a fotoinativação pelo azul de metileno (MB) e pelo azul de metileno em nanoemulsão (MB/NE), indicando que os dois fotossensibilizadores interagem de maneira diferente com a célula fúngica. No caso da ftalocianina em nanoemulsão deve ocorrer a penetração e/ou a ligação do fotossensibilizador na superfície das células. O fato de a lavagem ter impedido a fotossensibilização, por MB, indica que a fotossensibilização era devida a formação de espécies reativas a partir do fotossensibilizador em solução, no meio extracelular. Nós observamos o mesmo efeito da lavagem em outras espécies de fungos. A lavagem para a retirada do fotossensibilizador não ligado (MB) reduziu drasticamente a fotoinativação de conídios do fungo *Aspergillus nidulans* e reduziu, apenas discretamente, a fotoinativação de conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* (GONZALES, 2007).

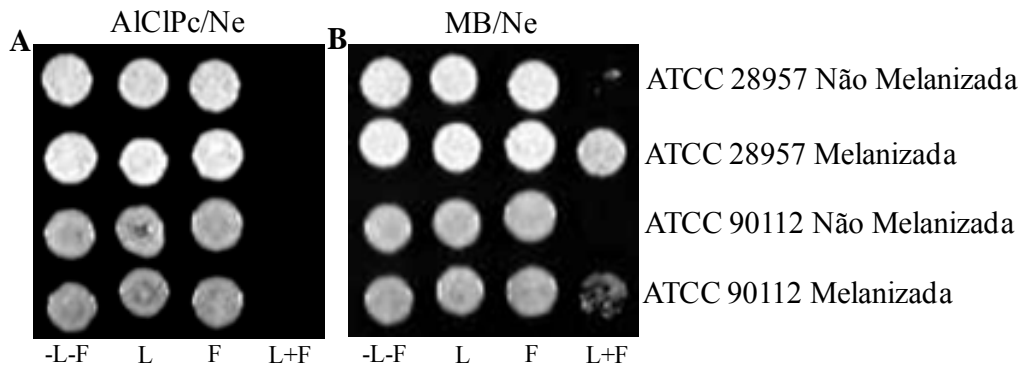


Figura 11. Fotossensibilização de *C. neoformans* com ftalocianina e com MB em nanoemulsões. As células foram expostas apenas à luz (L), apenas ao fotossensibilizador (F) e a (L+F). Os controles não foram expostos nem à luz e nem ao fotossensibilizador (-L-F). O laser foi utilizado como fonte de luz e a dose recebida ao final das exposições foi 10 J cm^{-2} . (A) Nanoemulsões contendo ftalocianinas (AICIPc/NE). (B) Nanoemulsões contendo azul de metileno (MB/NE). Colônias com 48 h de crescimento

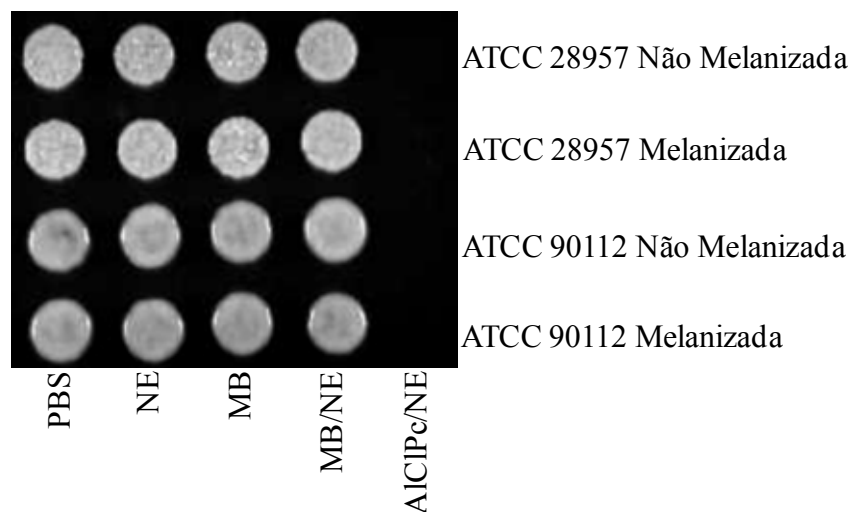


Figura 12. Fotossensibilização de *C. neoformans* com azul de metileno em solução (MB), com MB em nanoemulsão (MB/NE) e com ftalocianina em nanoemulsão (AICIPc/NE). Controles nos quais as células foram tratadas apenas com o PBS e apenas com a nanoemulsão (NE) também são mostrados. As células foram lavadas com PBS antes de serem expostas à luz para a retirada do excesso de fotossensibilizador. O laser foi utilizado como fonte de luz e a dose recebida ao final da exposição foi 10 J cm^{-2} (irradiância de 56 mW cm^{-2}). Colônias com 48 h de crescimento

A Figura 13 mostra os efeitos das diferentes doses (5 e 10 J cm⁻²) do laser e diferentes concentrações de ftalocianina em nanoemulsão na fotossensibilização de células melanizadas da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans*. Em todas as concentrações de ftalocianina e em ambas as doses testadas foi observada a fotoinativação das células. A fotoinativação ocorreu apenas quando as células foram expostas simultaneamente à luz e ao fotossensibilizador.

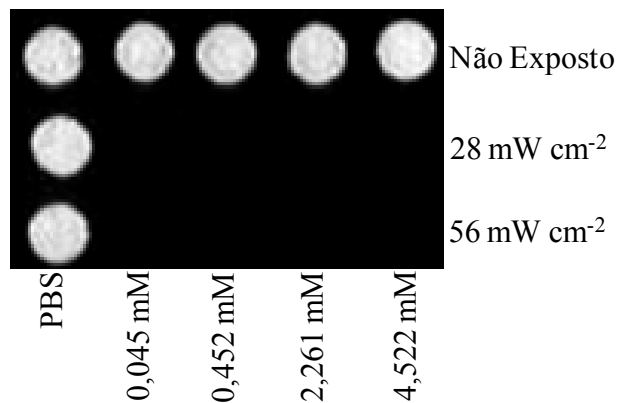


Figura 13. Fotossensibilização de células de *C. neoformans* com diferentes concentrações de ftalocianinas em nanoemulsão (0; 0,026; 0,26; 1,3 e 2,6 µg mL⁻¹ ou 0; 0,045; 0,452; 2,261; 4,522 mM, respectivamente). As células foram pré-incubadas por 30 min, lavadas com PBS e expostas às doses de 5 e 10 J cm⁻², através das irradiâncias de 28 e 56 mW cm⁻², respectivamente. As colônias foram fotografadas após 48 h de crescimento

A Figura 14 mostra a fotossensibilização com MB em solução (MB) e em nanoemulsão (MB/NE) de células melanizadas, com 6 dias de crescimento, da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas no escuro por 30 min com o fotossensibilizador, lavadas ou não com PBS e expostas ao laser. Em nenhum dos tratamentos, a fotoinativação foi completa, embora, aparentemente, a fotoinativação foi maior com o MB em solução do que em nanoemulsão (MB e MB/NE, respectivamente). No caso do MB em solução (MB), a lavagem das células antes da exposição reduziu a fotoinativação.

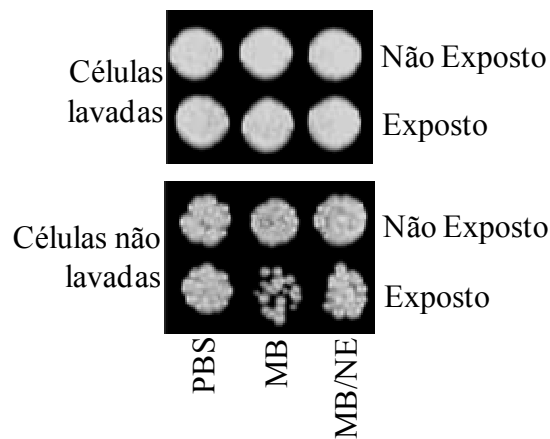


Figura 14. Fotossensibilização de células melanizadas de *C. neoformans* com azul de metileno em solução (MB) ou em nanoemulsão (MB/NE) na concentração de $26 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($69,56 \text{ mM}$). As células foram pré-incubadas por 30 min com os fotossensibilizadores, lavadas ou não com PBS e expostas à dose de 10 J cm^{-2} (irradiância de 56 mW cm^{-2}). Nos controles, as células foram tratadas apenas com PBS ou foram tratadas com os fotossensibilizadores, mas não expostas à luz. Colônia com 48 h de crescimento

4.5 Avaliação quantitativa da fotossensibilização de células de *C. neoformans* com ftalocianinas em nanoemulsão

A Figura 15 mostra a fotoinativação de células melanizadas da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans* com diferentes concentrações de ftalocianina em nanoemulsão. As células foram pré-incubadas por 30 min com o fotossensibilizador, lavadas com PBS e expostas ao laser. A contagem das UFCs foi feita após 96 h. As sobrevivências dos diferentes tratamentos foram determinadas em relação a controles que não foram expostos à luz. A fotoinativação aumentou com o aumento da concentração de ftalocianina, atingindo um valor maior do que 99 % na concentração de $0,26 \mu\text{g mL}^{-1}$. A eficácia da ftalocianina na fotossensibilização foi muito maior do que a do MB, como apresentado anteriormente. A fotoinativação do fungo pela ftalocianina, em condições compatíveis com a terapia fotodinâmica, abre a interessante perspectiva de se utilizar esse fotossensibilizador para o controle de micoses causadas pelo fungo.

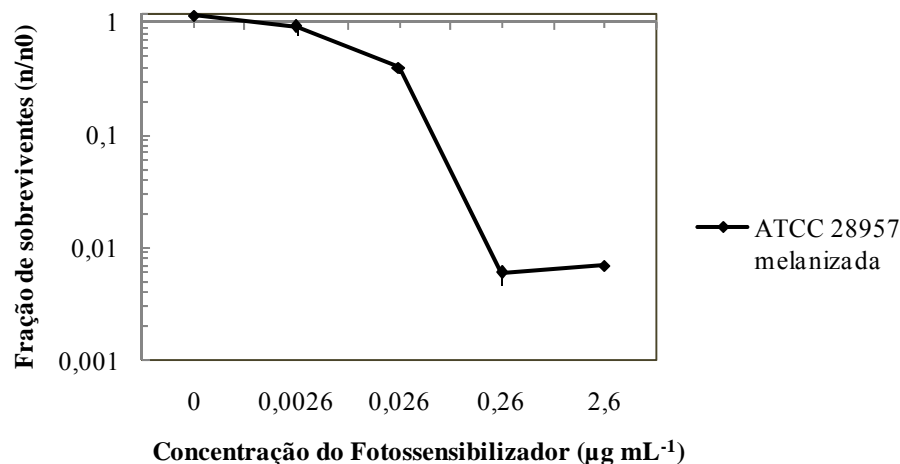


Figura 15. Fotoinativação de células melanizadas da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans* da linhagem ATCC 28957. As células foram pré-incubadas por 30 min, lavadas em PBS e posteriormente expostas à dose de 5 J cm^{-2} (28 mW cm^{-2} de irradiância). Contagem de UFCs após 96 h

4.6 Avaliação semiquantitativa do efeito de diferentes diluentes na fotossensibilização de células de *C. neoformans*

A Figura 16 mostra a fotossensibilização de células melanizadas da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans* por ftalocianina em nanoemulsão, diluída em água, salina ou PBS.

A fotoinativação ocorreu apenas quando a diluição do fotossensibilizador foi feita em PBS. Não foi observada a fotoinativação nas diluições feitas em água ou nas diferentes concentrações de salina (Figura 17).

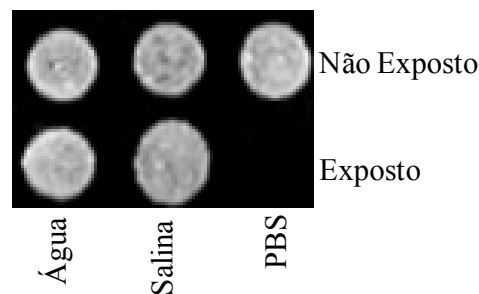


Figura 16. Efeito de exposições simultâneas à luz e ao fotossensibilizador ftalocianina em nanoemulsão diluído em água, salina e PBS, na concentração de $2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,522 \text{ mM}$) de células melanizadas com 6 dias de crescimento da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas por 30 min e posteriormente lavadas ou não com água, salina e PBS e expostas à dose de 10 J cm^{-2} e irradiância de 56 mW cm^{-2} . Colônias com 48 h de crescimento

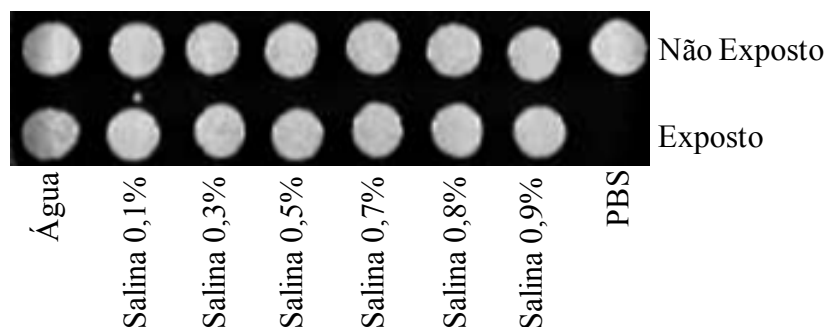


Figura 17. Efeito de exposições simultâneas à luz e ao fotossensibilizador ftalocianina em nanoemulsão na concentração de $2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,522 \text{ mM}$) diluído em água, salina em várias concentrações e PBS de células melanizadas com 6 dias de crescimento da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas por 30 min e posteriormente lavadas ou não com água, salina em várias concentrações e PBS e expostas ao laser numa dose de 10 J cm^{-2} e irradiância de 56 mW cm^{-2} . Células-controle ficaram abrigadas da luz durante todo o experimento. Resultado fotografado após 48 h de crescimento

4.7 Avaliação semiquantitativa da sensibilidade a fotossensibilização de células de *C. neoformans* ao nitrosilo de rutênio

A Figura 18 mostra o efeito da fotossensibilização de *C. neoformans* com diferentes concentrações de nitrosilo de rutênio. As células foram pré-incubadas por 30 min com o nitrosilo em diferentes concentrações e com o Aquo (nitrosilo previamente exposto à luz para a liberação do NO) e expostas à luz por 120 min. Nenhuma das concentrações de nitrosilo de rutênio foi capaz de fotoinativar as células de *C. neoformans*. As exposições das células ao Aquo, na presença ou na ausência da luz, não foram tóxicas para o fungo.

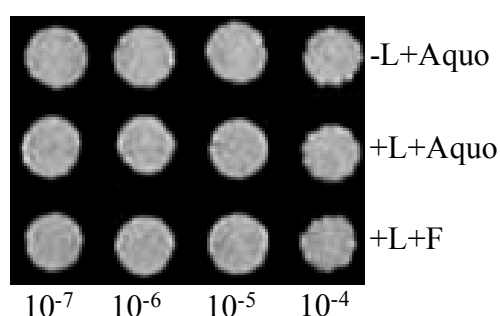


Figura 18. Efeito da exposição apenas ao Aquo (nitrosilo de rutênio previamente exposto à luz por 4 h) (-L+Aquo), da exposição simultânea à luz e ao Aquo (+L+Aquo) e da exposição simultânea à luz e ao nitrosilo de rutênio em células melanizadas da linhagem ATCC 28957. As concentrações finais dos compostos foram 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M. As células foram pré-incubadas por 30 min e expostas a uma lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão por 120 min. Controles não expostos à luz foram feitos para todos os tratamentos. Colônias em 48 h de crescimento

A Figura 19 mostra o efeito do tratamento de células de *C. neoformans* com o nitrosilo de rutênio, com misturas contendo o nitrosilo de rutênio e os redutores ácido ascórbico e a noradrenalina, e com o nitroprussiato de sódio. As células foram pré-incubadas com os compostos por 30 min e a seguir, foram expostas à luz por 120 min. O tratamento apenas com o PBS foi utilizado como controle. Controles não expostos à luz foram feitos em paralelo para todos os tratamentos. Nenhum dos tratamentos foi capaz de matar o fungo. Experimentos

anteriores, conduzidos no laboratório, mostraram que as concentrações de NO liberadas pelo nitrosilo durante a fotoestimulação foram insuficientes para matar os conídios dos fungos *M. anisopliae* e *A. nidulans* (GONZALES, 2007). Pode-se especular que as concentrações de NO liberadas pelos diferentes tratamentos também sejam insuficientes para inativar as células de *C. neoformans*.

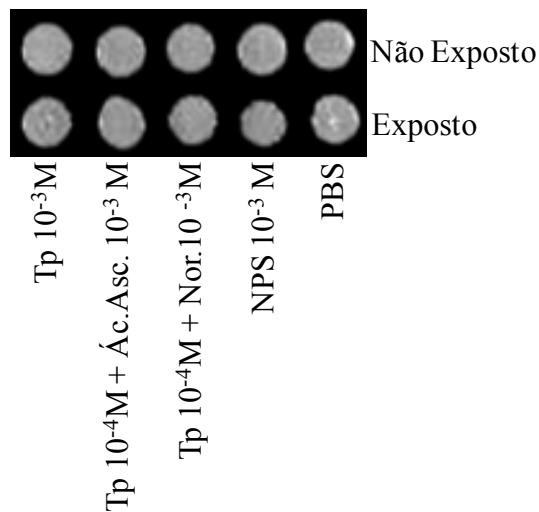


Figura 19. Efeito do nitrosilo de rutênio ($10^{-3}M$), de misturas do nitrosilo de rutênio ($10^{-4}M$) com os redutores ácido ascórbico ($10^{-3}M$) e noradrenalina ($10^{-3}M$) e do nitroprussiato de sódio ($10^{-3}M$) em células melanizadas da linhagem ATCC 28957 de *C. neoformans*. As células foram pré-incubadas por 30 min e expostas à luz por 120 min. Como fonte de luz foi utilizada uma lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão. Controles nos quais as células não foram expostas à luz e controles com células tratadas apenas com PBS foram feitos em paralelo para todos os tratamentos. Colônias após 48 h de crescimento

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, p.656-669, 2001.

AL-RUBEAI, M.; EL-HASSI, M. Inactivation of wild type and mutant *Aspergillus nidulans* conidia by far-UV, near-UV, visible and sun lights. **Environmental and Experimental Botany**, v.26, p.243-252, 1986.

ARAÚJO, S. C.; MATTOS, A. C. A.; TEIXEIRA, H. F.; COELHO, P. M. Z.; NELSON, D. L.; OLIVEIRA, M. C. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions, **International Journal of Pharmaceutics**, v.337, p.307-315, 2007.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal Meningitis. **British Medical Bulletin**, v.72, p.99-118, 2005.

BLISS, J. M.; BIGELOW, C. E.; FOSTER, T. H.; HAIDARIS, C. G. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.2000-2006, 2004.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. S.; TOGNILOLO, V.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, M. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces aorta relaxation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.10, p.83-91, 2004.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.280, p.241-251, 2004.

BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, p.734-739, 2001.

BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, v.73, p.140-146, 2001.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, p.418-422, 2006.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v.17, p.173-186, 2002.

BURNEY, S.; CAULFIELD, J. L.; NILES, J. C.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxy nitrite. **Mutation Research**, v.424, p.37-49, 1999.

BUTLER, N. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.1115-1136, 1998.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.78, p.1-6, 2005.

CARTER, T. D.; BETTACHE, N.; OGDEN, D. Potency and kinetics of nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation determined with flash photolysis of ruthenium nitrosyl chlorides. **British Journal of Pharmacology**, v.122, p.971-973, 1997.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. J.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.354-358, 2000.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUCK, J. D. "Ready made" virulence and "dual use" virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.332-337, 2003.

CHASKES, S.; TYNDALL, R. L. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.7, p.146-152, 1975.

DE LIMA, R.G. **Reatividade química e fotoquímica de complexos nitrosilos de rutênio do tipo [Ru(terpy)(L)NO]ⁿ⁺**. 2006. 259p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

DE LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; BENDHACK, L. M.; DA SILVA, R. S. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v.359, p.2543-2549, 2006.

DEL VALLE, L.; PINA-OVIEDO, S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.718-732, 2006.

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.

DERYCKE, A. S.; DE WITTE, P. A. Liposomes for photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.17-30, 2004.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Advances in Oral Biology**, v.37, p.883-887, 1992.

DOS SANTOS, D. J., ERIKSSON, L. Permeability of psoralen derivatives in lipid membranes. **Bioophysical Journal**, v.91, p.2464-2474, 2006.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, p.889-905, 1998.

EISENMAN, H. C.; NOSANCHUK, J. D.; WEBBER, J. B. W.; EMERSON, R. J.; CAMESANO, T. A.; CASADEVALL, A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemistry**, v.44, p.3683-3693, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A.; FOTHERGILL, A.; GHANNOUM, M.; MANAVATHU, E.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PFALLER, M.; RINALDI, M.; SCHELL, W.; WALSH, T. Quality control and reference guidelines for CSLI broth microdilution susceptibility method (M-38-A Document) for amphotericin B, itraconazole, posaconazole and voriconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.5243-5246, 2005.

EUM, H. A.; YEOM, D.H.; LEE, S. M. Role of nitric oxide in the inhibition of liver cytochrome P450 during sepsis. **Nitric Oxide**, v.15(4), p.423-431, 2006.

FRASES, S.; SALAZAR, A.; CASADEVALL, A. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a melanin-like pigment in *Cryptococcus neoformans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1542-1550, 2006.

FRASES, S.; SALAZAR, A.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.615-621, 2007.

FRIEDBERG, J. S.; SKEMA, C.; BAUM, E. D.; BURDICK, J.; VINOGRADOV, S. A.; WILSON, D. F.; HORAN, A. D.; NACHAMKIN, I. *In vitro* effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.105-107, 2001.

GARCIA-RIVERA, J.; EISENMAN, H. C.; NOSANCHUK, J. D.; AISEN, P.; ZARAGOZA, O.; MOADEL, T.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. **Fungal Genetics and Biology**, v.42, p.989-998, 2005.

GHAFFARI, A.; MILLER, C. C.; MCMULLIN, B.; GHAHARY, A. Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent. **Nitric Oxide**, v.14, p.21-29, 2006.

GOMER, C. J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v.34, p.1093-1107, 1991.

GONÇALVES, R. C. R.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.1129-1131, 2005.

GONZALES, F. P. **Triagem, identificação e determinação de parâmetros funcionais de fotossensibilizadores com ação antifúngica**. 2007. 78P. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

GORMAN, S. A.; BROWN, S. B.; GRIFFITHS, J. Overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.25, p.71-108, 2006.

GUNASEKERA, T. S.; PAUL, N. D.; AYRES, P. J. Responses of *Phylloplane* yeasts to UV-B (290-320 nm) radiation: inter-specific differences in sensitivity. **Mycological Research**, v.101, p.776-778, 1997.

HAIJEH, R. A.; BRANDT, M.E.; PINNER, R. W. Emergence of Cryptococcal disease: Epidemiologic perspectives 100 years after its discovery. **Epidemiologic Reviews**, v.17, p.303-320, 1995.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v.3, p.436-450, 2004.

HAMBLIN, M. R.; O'DONNELL, A.; MURTHY, N.; CONTAG, C. H.; HASAN, T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by *in vivo* bioluminescence imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v.75, p.51-57, 2002.

HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitizers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Current Drug Targets**, v.6, p.615-627, 2006.

HARRISON, T. S. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. **Journal of Infection**, v.41, p.12-17, 2000.

HEITMAN, J.; LIN, X. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **The Annual Review of Microbiology**, v.60, p.69-105, 2006.

HEUNG, L. J.; KAISER, A. E.; LUBERTO, C.; DEL POETA, M. The role and mechanism of diacylglycerol-protein kinase C1 signaling in melanogenesis by *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.31, p.28547-28555, 2005.

HOCKBERGER, P. E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v.76, p.561-579, 2002.

HOLZHEIMER, R. G.; DRALLE, H. Management of mycoses in surgical patients review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v.7, p.200-226, 2002.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminium phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.188, p.200-206, 2007.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of tetrasulfonated silicon and germanium phthalocyanines in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.197, p.273-280, 2008.

IGNARRO, L. J.; CIRINO, G.; CASINI, A.; NAPOLI, C. Nitric Oxide as signaling molecule in the vascular system: an overview. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.34, p.879-866, 1999.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology Immunology**, v.47, p.271-277, 2003.

ITO, T. Toluidine blue: the mode of photodynamic action in yeast cells. **Photochemistry and Photobiology**, v.25, p.47-53, 1977.

JACOBSON, E. S.; IKEDA, R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. **Medical Mycology**, v.43, p.327-333, 2005.

JACOBSON, E. S.; TINELL, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.7102-7104, 1993.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.25, p.505-520, 2006.

JORI, G.; BROWN, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, p.403-405, 2004.

KARIDI, K.; GAROUFIS, A.; TSIPIS, A.; NICK HADJILIADIS, N.; HANS DEN DULK, H.; REEDIJK, J. Synthesis, characterization, *in vitro* antitumor activity, DNA-binding properties and electronic structure (DFT) of the new complex *cis*-(Cl₂Cl)[RuII(Cl₂(NO⁺)(terpy)]Cl. **The Royal Society of Chemistry**, v.7, p.1176-1187, 2005.

KAXIRAS, E.; TSOLAKIDIS, A.; ZONIOS, G.; MENG, S. Structural model of eumelanin. **Physical Review Letters**, v.97, p.218102-1-218102-4, 2006.

KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. **Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells**. Academic Press, London, 1991.

KOCHEVAR, I. E.; LAMBERT, C. R.; LYNCH, M. C.; TEDESCO, A. C. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1280, p.223-230, 1996.

KÖMERIK, N.; MacROBERT, A. J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v.25, p.487-504, 2006.

KÖMERIK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.618-623, 2002.

KROKEN, S.; GLASS, N. L.; TAYLOR, J. W.; YODER, O. C.; TURGEON, B. G. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.15670-15675, 2003.

KWON-CHUNG, K. J.; SORREL, T.C.; DROMER, F.; FUNG, E.; LEVITZ, S. M. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Medical Mycology**, v.38, p.205-213, 2000.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. p.574-587, 2006.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.38, p.143-158, 2003.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina**, v.39, p.1137-1150, 2003.

MACMILLAN, J. D.; MAXWELL, W. A.; CHICHESTER, C. O.; Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser. **Photochemistry and Photobiology**, v.5, p.55-65, 1966.

MAISCH, T., SZEIMIES, R. M.; JORI, G.; ABELS, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v.3, p.907-917, 2004.

MAKINGS, L. R.; TSIEN, R. Y. Caged nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.6282-6285, 1994.

MAXSON, M. E.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O. Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Eukaryotic Cell**, v.6, p.95-109, 2007.

MEREDITH, P.; SARNA, T. The physical and chemical properties of eumelanin. **Pigment Cell Research**, v.19, p.572-594, 2006.

MISSALL, T. A.; MORAN, J. M.; CORBETT, J. A.; LODGE, J. K. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. **Eukaryotic Cell**, v.4, p.202-208, 2005.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS- 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p.515-548, 1995.

MONTGOMERY, D. C., **Design and Analysis of Experiments**, John Wiley & Sons, Inc. 5^a edição, Nova Iorque, 2000.

MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, p.15675-15680, 2002.

NABLO, B. J.; CHEN, T. Y.; SCHOENFISCH, M. H. Sol-gel derived nitric-oxide releasing materials that reduce bacterial adhesion. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, p.9712-9713, 2001.

NAKAMURA, K.; GO, N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins- Review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.1-17, 2005.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.43, p.97-123, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v.149, p.1945-1951, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v.5, p.203-223, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.3519-3528, 2006.

NOSANCHUK, J. D.; RUDOLPH, J.; ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implication for pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.67, p.5477-5479, 1999.

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminium phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37; p.273-284, 2004.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.1, p.132-138, 2004.

PAARDEKOOOPER, M.; VAN DEN BROEK, P.; DE BRUIJNE, A.; ELFERINK, J.; DUBBELMAN T.; VAN STEVENINCK, J. Photodynamic treatment of yeast cells with the dye toluidine blue: all-or-none loss of plasma membrane barrier properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1108, p.86-90, 1992.

PANEPINTO, J. C.; WILLIAMSON, P. R. Intersection of fungal fitness and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v.6, p.489-498, 2006.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v.53, p.429-443, 2006.

PHILIP, A.; ODABASI, Z.; RODRIGUEZ, J.; PAETZNICK, V. L.; CHEN, E.; REX, J. H.; OSTROVSKY-ZEICHNER, L. *In vitro* synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.3572-3574, 2005.

PRIMO, F. L.; BENTLEY M.V. L. B.; TEDESCO A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan[®]/Nanoemulsion (NE) applicable to Photodynamic Therapy skin cancer treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.8(1), p.340-347, 2008.

PUKKILA-WORLEY, R.; GERRALD, Q. D.; KRAUS, P. R.; BOILY, M.-J.; DAVIS, M. J.; GILES, S. S.; COX, G. M.; HEITMAN, J.; ALSPAUGH, J. A. Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukariotic Cell**, v.4, p.190-201, 2005.

RANDHAWA, H. S.; MUSSA, A. Y.; KHAN, Z. U. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. **Mycopathologia**, v.151, p.63-69, 2001.

RANGEL, D. E. N.; BUTLER, M. J.; TORABINEJAD, J.; ANDERSON, A. J.; BRAGA, G. U. L.; DAY, A. W.; ROBERTS, D. W. Mutants and isolates of *Metharhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.93, p.170-182, 2006.

ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v.153, p.265-272, 1997.

ROSAS, Á. L.; CASADEVALL, A. Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. **Mycopathologia**, v. 151, p.53-56, 2001.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v.208, p.71-80, 2000.

SAUAIA, M. G.; DE LIMA, R. G.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, R. S. Nitric oxide production by visible light irradiation of aqueous solution of nitrosyl ruthenium complexes. **Inorganic Chemistry**, v.44, p.9946-9951, 2005.

SCHÄFER, M.; SCHMITZ, C.; FACIUS, R.; HORNECK, G.; MILOW, B.; FUNKEN, K. H.; ORTNER, J. Systematic study of parameters influencing the action of rose bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. **Photochemistry and Photobiology**, v.71, p.514-523, 2000.

SCHIAVE, L. A.; PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Variability in UVB tolerances of melanized and nonmelanized cells of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus laurentii*. **Photochemistry and Photobiology**, 2008.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; van LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v.4(11), p.507-517, 1999.

SHIMIZU, M.; EGASHIRA, T.; TAKAHAMA, U. Inactivation of *Neurospora crassa* conidia by singlet molecular oxygen generated by a photosensitized reaction. **Journal of Bacteriology**, v.138, p.293-296, 1979.

SMIJS, T. G.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic inactivation of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v.77, p.556-560, 2003.

SMIJS, T. G.; VAN DER HASS, R. N.; LUGTENBURG, J.; LIU, H.; DE JONG, R. L.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v.80, p.197-202, 2004.

SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, p.31-36, 2005.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Review Iberoamerican Micology**, v.14, p.42-43, 1997.

SOUKOS, N. S.; FYVIE, L. A. X.; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.2595-2601, 1998.

STAR, R. Nitric oxide, **The American Journal of the Medical Sciences**, v.306, p.348-358, 1993.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v.5, p.667-675, 2003.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.15245-15250, 2001.

STRAKHOVSKAYA, M. G.; ZHUKHOVITSKII, V. G.; MIRONOV, A. F.; SEREGIN, A. M.; STRANADKO, E. F.; RUBIN, A. B. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. **Doklady. Biochemistry and Biophysics**, v.384, p.155-158, 2002.

TEGOS, G. P.; DEMIDOVA, T. N.; ARCILA-LOPEZ, D.; LEE, H.; WHARTON, T.; GALI, H.; HAMBLIN, M. R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. **Chemistry & Biology**, v.12, p.1127-1135, 2005.

TIAN, S.; RIVERA, J. G.; YAN, B.; CASADEVALL, A.; STARK, R. E. Unlocking the molecular structure of fungal melanin using ¹³C biosynthetic labeling and solid-state NMR. **Biochemistry**, v.42, p.8105-8109, 2003.

USACHEVA, M. N., TEICHERT, M. C., BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.29, p.165-173, 2001.

van DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.3394-3400, 2002.

VALDERRAMA, B.; OLIVER, P.; MEDRANO-SOTO, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.289-299, 2003.

VENEZIO, R. F.; VINCENZO, C. D.; SHERMAN, R.; REICHMAN, M.; ORIGITANO, T. C.; THOMPSON, K.; REICHMAN, O. H. Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **The Journal of Infectious Diseases**, v.151, p.166-169, 1985.

WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v.25, p.351-359, 1996.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, p.13-28, 1998.

WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p.381-394, 2000.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Photosensitizing agents-circumventing resistance and breaking down films: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.53, p.119-126, 2004.

WAKAMATSU, K.; ITO, S. Advanced chemical methods in melanin determination. **Pigment Cell Research**, v.15, p. 174-83, 2002.

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v.57, p.1381-1396, 2005.

WANG Y.; CASADEVALL A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3004-3007, 1994.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.3864-3866, 1994.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. **Infection and Immunity**, v.63, p.3131-3136, 1995.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. Melanin, melanin "ghosts" and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.64, p.2420-2424, 1996.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, p.541-545, 1996.

WATERMAN, S. R.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SHIN, S.; WILLIAMSON, P. R. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. **Infection and Immunity**, v.75, p.714-722, 2007.

WEYENBERG, W.; FILEV, P.; DEN PLAS, D. V.; VANDERVOORT, J.; DE SMET, K.; SOLLIE, P.; LUDWIG, A. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application, **International Journal of Pharmaceutics**, v.337, p.291-298, 2007.

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.656-664, 1994.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Bioscience**, v.2, p.99-107, 1997.

WILLIAMSON, P. R.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1570-1572, 1998.

WILSON, M.; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *Journal of Oral Pathology & Medicine*: v.22, p.354-357, 1993.

WILSON, M.; MIA, N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans in vitro*. **Lasers in Medical Science**, v.9, p.105-109, 1994.

WINK, D.; VODOVOTZ, Y.; COOK, J.; KRISHNA, M.; KIM, S.; COFFIN, D.; DEGRAFF, W.; DELUCA, A.; LIEBMANN, J.; MITCHELL, J. The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment. **Biochemistry (Moscow)**, v.63, p.802-809, 1998.

ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W. M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v.144, p.274-278, 2001.

ZHANG, S.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SOOWAN, S.; ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. The Hsp70 member, Ssa1, acts as a DNA-binding transcriptional co-activator of laccase in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v.62, p.1090-1101, 2006.

ZHU, X.; GIBBONS, J.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A.; WILLIAMSON, P. R. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infection and Immunity**, v.69, p.5589-5596, 2001.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v.5, p.1-10, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Avaliação quantitativa da fotossensibilização após 24 horas de desenvolvimento de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*. As células foram crescidas em meio líquido por 4, 6 e 8 dias, pré-incubadas por 10 min e, a seguir, expostas à luz.

Linagem	Período de Crescimento	Melanização	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
ATCC 28957	4 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	86,13	20,39	71,71	86,13	100,54
			Luz + Fs	84,96	10,95	77,22	84,96	92,70
			Apenas Luz	91,34	10,09	83,41	87,91	102,70
		Melanizada	Apenas Fs	106,29	10,44	98,90	106,29	113,67
			Luz + Fs	80,23	1,80	78,95	80,23	81,50
			Apenas Luz	86,70	8,74	80,29	83,16	96,66
	6 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	92,49	9,68	83,05	92,02	102,40
			Luz + Fs	70,87	18,28	53,73	68,77	90,11
			Apenas Luz	86,58	24,34	59,98	92,02	107,74
		Melanizada	Apenas Fs	102,45	7,71	94,20	103,68	109,48
			Luz + Fs	90,74	3,83	86,40	92,13	93,68
			Apenas Luz	104,18	8,65	94,52	106,83	111,20
	8 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	85,78	9,42	75,53	87,78	94,04
			Luz + Fs	77,87	15,11	62,16	79,16	92,30
			Apenas Luz	98,54	7,92	92,12	96,12	107,39
		Melanizada	Apenas Fs	102,96	11,14	93,78	99,75	115,36
			Luz + Fs	71,58	11,15	59,35	74,21	81,17
			Apenas Luz	103,45	7,61	97,85	100,39	112,12
ATCC 90112	4 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	79,63	7,06	74,64	79,63	84,62
			Luz + Fs	10,56	3,55	8,05	10,56	13,07
			Apenas Luz	88,37	6,64	84,41	84,67	96,04
		Melanizada	Apenas Fs	94,81	10,25	87,56	94,81	102,06
			Luz + Fs	22,21	4,58	18,97	22,21	25,45
			Apenas Luz	108,70	8,44	102,73	108,70	114,66
	6 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	87,60	2,88	85,56	87,60	89,64
			Luz + Fs	6,76	6,39	2,24	6,76	11,28
			Apenas Luz	85,74	12,11	74,97	83,41	98,85
		Melanizada	Apenas Fs	79,14	14,87	62,03	86,52	88,88
			Luz + Fs	25,42	12,09	11,94	29,02	35,30
			Apenas Luz	81,96	13,13	69,45	80,79	95,63
	8 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	78,60	11,09	69,59	75,21	90,99
			Luz + Fs	0,93	0,92	0,33	0,47	1,99
			Apenas Luz	97,85	14,39	87,67	97,85	108,02
		Melanizada	Apenas Fs	62,09	12,85	47,40	67,68	71,20
			Luz + Fs	6,38	7,05	1,88	2,75	14,50
			Apenas Luz	90,90	12,91	79,53	88,22	104,94

APÊNDICE B. Comparações entre as médias da culturabilidade relativa das linhagens em cada situação (tratamentos apenas com o fotossensibilizador, apenas com luz e com luz + fotossensibilizador, com 4, 6 e 8 dias de crescimento, células melanizadas e não melanizadas). Avaliação após 24 horas.

Comparações	Diferença média estimada	P
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Não Melan. 4 dias	-5,22	0,62
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Melan.4 dias	19,58	0,06
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Não Melan. 6 dias	5,91	0,53
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Melan. 6 dias	-1,73	0,85
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Não Melan. 8 dias	-12,76	0,17
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Melan. 8 dias	-0,49	0,96
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Não Melan. 4 dias	-8,74	0,40
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Melan. 4 dias	-13,89	0,23
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Não Melan. 6 dias	1,86	0,86
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Melan. 6 dias	-2,81	0,76
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Não Melan. 8 dias	-19,25	0,07
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Melan. 8 dias	-28,80	0,00
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 4 dias	-6,38	0,54
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 4 dias	-6,48	0,53
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 6 dias	-15,71	0,09
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 6 dias	-13,45	0,15
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 8 dias	-20,67	0,03
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 8 dias	-31,88	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 4 dias	-77,81	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 4 dias	-86,49	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 6 dias	-78,98	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 6 dias	-56,54	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 8 dias	-96,92	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 8 dias	-84,52	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 4 dias	1,17	0,92
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 4 dias	26,06	0,02
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 6 dias	21,62	0,02
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 6 dias	11,72	0,21
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 8 dias	7,91	0,40
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 8 dias	31,39	0,00
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 4 dias	69,07	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 4 dias	72,60	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 6 dias	80,84	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 6 dias	53,72	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 8 dias	77,67	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 8 dias	55,72	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Não Melan. Luz	-2,97	0,75
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Não Melan. Luz	-0,84	0,93
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Não Melan. Luz	-0,70	0,95
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Melan. Luz	21,99	0,04
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Melan. Luz	-22,23	0,02

continua

(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Melan. Luz	-12,56	0,18
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Não Melan. Fs	-6,50	0,57
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Não Melan. Fs	-4,89	0,64
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Não Melan. Fs	-7,19	0,44
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Melan. Fs	-11,48	0,32
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Melan. Fs	-23,31	0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Melan. Fs	-40,87	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Não Melan. Fs + Luz	-74,40	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Não Melan. Fs + Luz	-64,11	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Não Melan. Fs + Luz	-76,94	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Melan. Fs + Luz	-58,02	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Melan. Fs + Luz	-65,32	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Melan. Fs + Luz	-65,20	<0,01
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Não Melan. Luz	4,76	0,61
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Luz	-7,20	0,44
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Luz	-11,96	0,20
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Melan. Luz	-17,48	0,06
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Luz	-16,75	0,08
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Luz	0,73	0,94
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs	-6,37	0,54
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs	0,34	0,97
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs	6,71	0,47
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Melan. Fs	3,83	0,71
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Fs	3,32	0,75
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Fs	-0,51	0,96
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs + Luz	14,09	0,18
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs + Luz	7,09	0,50
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs + Luz	-7,00	0,45
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Melan. Fs + Luz	-10,51	0,31
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Fs + Luz	8,65	0,41
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Fs + Luz	19,16	0,04
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Não Melan. Luz	2,63	0,78
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Luz	-9,47	0,36
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Luz	-12,10	0,25
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Melan. Luz	26,74	0,01
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Luz	17,80	0,09
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Luz	-8,94	0,34
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs	-7,97	0,48
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs	1,03	0,92
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs	9,00	0,39
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Melan. Fs	15,67	0,14
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Fs	32,72	0,00
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Fs	17,05	0,07
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs + Luz	3,80	0,74
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs + Luz	9,63	0,36
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs + Luz	5,83	0,58
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Melan. Fs + Luz	-3,21	0,76
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Fs + Luz	15,83	0,13
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Fs + Luz	19,04	0,04

continua

conclusão

(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 4 dias Luz	4,64	0,62
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 6 dias Luz	-17,60	0,06
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 8 dias Luz	-4,91	0,60
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 4 dias Fs	-20,16	0,08
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 6 dias Fs	-9,96	0,29
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 8 dias Fs	-17,18	0,07
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 4 dias Fs + Luz	4,74	0,68
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 6 dias Fs + Luz	-19,87	0,04
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 8 dias Fs + Luz	6,30	0,50
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 4 dias Luz	-20,32	0,05
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 6 dias Luz	3,79	0,68
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 8 dias Luz	6,95	0,50
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 4 dias Fs	-15,18	0,19
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 6 dias Fs	8,46	0,42
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 8 dias Fs	16,50	0,08
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 4 dias Fs + Luz	-11,65	0,31
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 6 dias Fs + Luz	-18,66	0,08
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 8 dias Fs + Luz	-5,45	0,56

APÊNDICE C. Avaliação quantitativa da fotossensibilização após 96 horas de desenvolvimento de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*. As células foram crescidas em meio líquido por 4, 6 e 8 dias, pré-incubadas por 10 min e, a seguir, expostas à luz.

Linhagem	Período de Crescimento	Melanização	Tratamento	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
ATCC 28957	4 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	85,84	20,82	71,11	85,84	100,56
			Fs + Luz	85,59	11,19	77,68	85,59	93,50
			Apenas Luz	91,10	9,78	83,38	87,81	102,10
		Melanizada	Apenas Fs	106,62	10,44	99,23	106,62	114,00
			Fs + Luz	84,90	8,05	79,20	84,90	90,59
			Apenas Luz	86,72	8,38	80,81	83,04	96,31
	6 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	92,62	9,55	83,18	92,41	102,27
			Fs + Luz	82,05	9,93	72,14	82,01	91,99
			Apenas Luz	86,21	23,48	60,19	92,62	105,81
		Melanizada	Apenas Fs	102,08	7,30	94,41	102,87	108,95
			Fs + Luz	96,24	4,13	91,97	96,54	100,21
			Apenas Luz	103,97	8,01	95,00	106,51	110,41
	8 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	86,14	7,69	78,28	86,49	93,65
			Fs + Luz	91,13	6,45	86,49	88,41	98,49
			Apenas Luz	98,05	7,02	91,80	96,70	105,65
		Melanizada	Apenas Fs	103,88	11,89	94,20	100,29	117,16
			Fs + Luz	93,29	15,64	80,08	89,23	110,56
			Apenas Luz	103,38	9,45	96,44	99,56	114,15
ATCC 90112	4 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	81,38	7,48	76,09	81,38	86,67
			Fs + Luz	43,78	12,23	35,13	43,78	52,42
			Apenas Luz	88,52	6,28	84,21	85,63	95,73
		Melanizada	Apenas Fs	94,81	10,54	87,35	94,81	102,26
			Fs + Luz	58,16	4,55	54,94	58,16	61,38
			Apenas Luz	107,38	7,38	102,16	107,38	112,60
	6 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	91,85	0,06	91,81	91,85	91,89
			Fs + Luz	42,44	14,02	32,52	42,44	52,35
			Apenas Luz	86,48	11,73	76,56	83,46	99,42
		Melanizada	Apenas Fs	88,63	5,02	84,06	87,83	94,00
			Fs + Luz	66,77	7,96	61,60	62,77	75,93
			Apenas Luz	86,78	13,08	71,75	92,98	95,61
	8 dias	Não Melanizada	Apenas Fs	88,33	13,86	79,60	81,08	104,32
			Fs + Luz	47,21	8,09	39,51	46,48	55,65
			Apenas Luz	97,85	9,69	90,99	97,85	104,70
		Melanizada	Apenas Fs	81,17	2,84	79,28	79,79	84,44
			Fs + Luz	54,00	16,61	34,82	63,38	63,80
			Apenas Luz	93,94	14,01	78,81	96,55	106,47

APÊNDICE D. Comparações entre as médias da culturabilidade relativa das linhagens em cada situação (tratamentos apenas com o fotossensibilizador, apenas com luz e com luz + fotossensibilizador, 4, 6 e 8 dias de crescimento, células melanizadas e não melanizadas). Avaliação após 96 horas.

Comparações	Diferença média estimada	P
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Não Melan. 4 dias	-5,26	0,60
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Melan.4 dias	19,90	0,05
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Não Melan. 6 dias	6,41	0,47
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Melan. 6 dias	-1,90	0,83
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Não Melan. 8 dias	-11,91	0,18
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 28957 Melan. 8 dias	0,50	0,96
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Não Melan. 4 dias	-7,14	0,47
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Melan. 4 dias	-12,58	0,25
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Não Melan. 6 dias	5,37	0,59
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Melan. 6 dias	1,85	0,84
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Não Melan. 8 dias	-9,51	0,34
(Tratamento Fs x Luz) ATCC 90112 Melan. 8 dias	-12,77	0,16
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 4 dias	-5,51	0,58
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 4 dias	-1,83	0,85
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 6 dias	-4,16	0,64
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 6 dias	-7,73	0,39
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 8 dias	-6,92	0,44
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 8 dias	-10,09	0,26
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 4 dias	-44,75	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 4 dias	-49,22	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 6 dias	-44,05	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 6 dias	-20,01	0,03
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 8 dias	-50,63	<0,01
(Tratamento Luz x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 8 dias	-39,94	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 4 dias	0,25	0,98
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 4 dias	21,72	0,05
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 6 dias	10,57	0,24
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 6 dias	5,84	0,51
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Não Melan. 8 dias	-4,99	0,58
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 28957 Melan. 8 dias	10,59	0,24
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 4 dias	37,61	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 4 dias	36,65	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 6 dias	49,42	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 6 dias	21,86	0,02
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Não Melan. 8 dias	41,12	<0,01
(Tratamento Fs x Luz + Fs) ATCC 90112 Melan. 8 dias	27,17	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Não Melan. Luz	-2,57	0,77
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Não Melan. Luz	0,27	0,98
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Não Melan. Luz	-0,21	0,98
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Melan. Luz	20,66	0,04
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Melan. Luz	-17,19	0,06

continua

(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Melan. Luz	-9,44	0,29
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Não Melan. Fs	-4,46	0,68
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Não Melan. Fs	-0,77	0,94
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Não Melan. Fs	2,19	0,81
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Melan. Fs	-11,81	0,28
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Melan. Fs	-13,45	0,14
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Melan. Fs	-22,71	0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Não Melan. Fs + Luz	-41,82	0,00
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Não Melan. Fs + Luz	-39,61	0,00
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Não Melan. Fs + Luz	-43,92	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias Melan. Fs + Luz	-26,74	0,02
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias Melan. Fs + Luz	-29,47	0,00
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias Melan. Fs + Luz	-39,29	<0,01
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Não Melan. Luz	4,89	0,58
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Luz	-6,95	0,44
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Luz	-11,84	0,19
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Melan. Luz	-17,25	0,06
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Luz	-16,66	0,07
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Luz	0,59	0,95
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs	-6,79	0,50
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs	-0,31	0,98
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs	6,48	0,47
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Melan. Fs	4,54	0,65
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Fs	2,73	0,78
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Fs	-1,81	0,84
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs + Luz	3,54	0,72
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs + Luz	-5,54	0,58
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Não Melan. Fs + Luz	-9,08	0,31
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 Melan. Fs + Luz	-11,35	0,26
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Fs + Luz	-8,40	0,40
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 Melan. Fs + Luz	2,95	0,74
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Não Melan. Luz	2,04	0,82
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Luz	-9,32	0,35
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Luz	-11,37	0,26
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Melan. Luz	20,60	0,04
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Luz	13,44	0,18
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Luz	-7,16	0,42
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs	-10,47	0,34
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs	-6,95	0,49
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs	3,52	0,72
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Melan. Fs	6,18	0,54
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Fs	13,64	0,17
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Fs	7,46	0,40
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs + Luz	1,34	0,90
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs + Luz	-3,44	0,73
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Não Melan. Fs + Luz	-4,78	0,63
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 Melan. Fs + Luz	-8,61	0,39
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Fs + Luz	4,16	0,68
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 Melan. Fs + Luz	12,77	0,16

continua

conclusão

(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 4 dias Luz	4,38	0,62
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 6 dias Luz	-17,77	0,05
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 8 dias Luz	-5,33	0,55
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 4 dias Fs	-20,78	0,06
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 6 dias Fs	-9,46	0,29
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 8 dias Fs	-17,74	0,05
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 4 dias Fs + Luz	0,70	0,95
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 6 dias Fs + Luz	-14,19	0,12
(Não Melan. X Melan.) ATCC 28957 8 dias Fs + Luz	-2,16	0,81
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 4 dias Luz	-18,86	0,06
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 6 dias Luz	-0,30	0,97
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 8 dias Luz	3,90	0,70
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 4 dias Fs	-13,43	0,22
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 6 dias Fs	3,22	0,75
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 8 dias Fs	7,16	0,42
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 4 dias Fs + Luz	-14,39	0,19
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 6 dias Fs + Luz	-24,33	0,02
(Não Melan. x Melan.) ATCC 90112 8 dias Fs + Luz	-6,79	0,45

APÊNDICE E. Avaliação quantitativa da fotossensibilização após 24 e 96 horas de desenvolvimento de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*. As células foram crescidas em meio líquido por 4, 6 e 8 dias, pré-incubadas por 10 min e, a seguir, expostas à luz.

Linagem	Período de crescimento	Tempo de avaliação	Melanização	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
ATCC 90112	4 dias	24 horas	Não Melanizada	13,12	3,29	10,79	13,12	15,44
			Melanizada	23,82	7,40	18,59	23,82	29,05
		96 horas	Não Melanizada	53,34	10,10	46,20	53,34	60,48
			Melanizada	62,00	11,69	53,73	62,00	70,26
	6 dias	24 horas	Não Melanizada	7,60	7,05	2,61	7,60	12,58
			Melanizada	30,82	10,48	19,25	33,55	39,67
		96 horas	Não Melanizada	46,20	15,24	35,42	46,20	56,97
			Melanizada	75,18	4,93	71,47	73,30	80,78
	8 dias	24 horas	Não Melanizada	1,10	0,95	0,44	0,67	2,18
			Melanizada	10,95	11,76	2,64	5,81	24,41
		96 horas	Não Melanizada	53,44	3,85	49,64	53,34	57,33
			Melanizada	66,31	19,55	43,92	75,06	79,96
ATCC 28957	4 dias	24 horas	Não Melanizada	99,94	10,96	92,19	99,94	107,69
			Melanizada	75,92	9,15	69,45	75,92	82,39
		96 horas	Não Melanizada	101,11	11,50	92,98	101,11	109,24
			Melanizada	80,38	15,44	69,46	80,38	91,30
	6 dias	24 horas	Não Melanizada	77,73	23,15	52,46	82,81	97,92
			Melanizada	88,74	4,02	84,16	90,36	91,70
		96 horas	Não Melanizada	89,56	16,48	70,54	98,60	99,54
			Melanizada	94,41	2,77	91,97	93,84	97,42
	8 dias	24 horas	Não Melanizada	90,55	12,68	82,30	84,20	105,15
			Melanizada	70,13	14,43	59,50	64,33	86,55
		96 horas	Não Melanizada	106,39	12,17	92,35	112,94	113,88
			Melanizada	89,65	8,49	79,84	94,37	94,73

APÊNDICE F. Comparações entre as médias da culturabilidade relativa das linhagens em cada situação (avaliação após 24 e 96 horas, células melanizadas e não melanizadas com 4, 6 e 8 dias de crescimento).

Comparações	Diferença média estimada	P
(24 h x 96 h) ATCC 28957 Não Melanizada 4 dias	-1,17	0,92
(24 h x 96 h) ATCC 28957 Melan. 4 dias	-4,46	0,71
(24 h x 96 h) ATCC 90112 Não Melan. 4 dias	-40,23	<0,01
(24 h x 96 h) ATCC 90112 Melan. 4 dias	-38,18	<0,01
(24 h x 96 h) ATCC 28957 Não Melanizada 6 dias	-11,83	0,23
(24 h x 96 h) ATCC 28957 Melanizada 6 dias	-5,67	0,56
(24 h x 96 h) ATCC 90112 Não Melan. 6 dias	-38,60	<0,01
(24 h x 96 h) ATCC 90112 Melanizada 6 dias	-44,36	<0,01
(24 h x 96 h) ATCC 28957 Não Melanizada 8 dias	-15,84	0,11
(24 h x 96 h) ATCC 28957 Melanizada 8 dias	-19,52	0,05
(24 h x 96 h) ATCC 90112 Não Melanizada 8 dias	-52,34	<0,01
(24 h x 96 h) ATCC 90112 Melanizada 8 dias	-55,36	<0,01
(Não Melanizada x Melanizada) 4 dias ATCC 28957 24 h	24,02	0,05
(Não Melanizada x Melanizada) 4 dias ATCC 28957 96 h	20,73	0,09
(Não Melanizada x Melanizada) 4 dias ATCC 90112 24 h	-10,71	0,37
(Não Melanizada x Melanizada) 4 dias ATCC 90112 96 h	-8,66	0,47
(Não Melanizada x Melanizada) 6 dias ATCC 28957 24 h	-11,01	0,26
(Não Melanizada x Melanizada) 6 dias ATCC 28957 96 h	-4,85	0,62
(Não Melanizada x Melanizada) 6 dias ATCC 90112 24 h	-23,23	0,04
(Não Melanizada x Melanizada) 6 dias ATCC 90112 96 h	-28,99	0,01
(Não Melanizada x Melanizada) 8 dias ATCC 28957 24 h	20,42	0,04
(Não Melanizada x Melanizada) 8 dias ATCC 28957 96 h	16,74	0,09
(Não Melanizada x Melanizada) 8 dias ATCC 90112 24 h	-9,86	0,32
(Não Melanizada x Melanizada) 8 dias ATCC 90112 96 h	-12,88	0,19
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias 24 h Não Melanizadas	-86,83	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias 96 h Não Melanizada	-47,77	0,00
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias 24 h Melanizada	-52,10	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 4 dias 96 h Melanizada	-18,39	0,13
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias 24 h Não Melanizada	-70,14	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias 96 h Não Melanizada	-43,37	0,00
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias 24 h Melanizada	-57,92	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 6 dias 96 h Melanizada	-19,23	0,05
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias 24 h Não Melanizada	-89,45	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias 96 h Não Melanizada	-52,95	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias 24 h Melanizada	-59,17	<0,01
(ATCC 28957 x ATCC 90112) 8 dias 96 h Melanizada	-23,33	0,02
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 24 h Não Melanizada	22,21	0,05
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 96 h Não Melanizada	11,55	0,29
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 24 h Melanizada	-12,82	0,24
(4 dias x 6 dias) ATCC 28957 96 h Melanizada	-14,03	0,20

continua

conclusão

(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 24 h Não Melanizada	9,39	0,39
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 96 h Não Melanizada	-5,28	0,63
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 24 h Melanizada	5,79	0,60
(4 dias x 8 dias) ATCC 28957 96 h Melanizada	-9,27	0,40
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 24 h Não Melanizada	-12,82	0,19
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 96 h Não Melanizada	-16,83	0,09
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 24 h Melanizada	18,61	0,06
(6 dias x 8 dias) ATCC 28957 96h Melanizada	4,76	0,63
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 24 h Não Melanizada	5,52	0,64
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 96 h Não Melanizada	7,15	0,55
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 24 h Melanizada	-7,00	0,52
(4 dias x 6 dias) ATCC 90112 96 h Melanizada	-13,19	0,23
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 24 h Não Melanizada	12,02	0,27
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 96 h Não Melanizada	-0,10	0,99
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 24 h Melanizada	12,87	0,24
(4 dias x 8 dias) ATCC 90112 96 h Melanizada	-4,32	0,69
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 24 h Não Melanizada	6,50	0,55
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 96 h Não Melanizada	-7,24	0,51
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 24 h Melanizada	19,87	0,05
(6 dias x 8 dias) ATCC 90112 96 h Melanizada	8,87	0,37
