

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica
Universidade Regional Comunitária de Chapecó
Mestrado Interinstitucional em Engenharia Biomédica**

ADRIANA GASPARETTO

***Alternanthera maritima*: PREPARO DE EXTRATOS E FORMULAÇÕES TÓPICAS
E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR EM TERAPIA
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

São José dos Campos, SP

2008

ADRIANA GASPARETTO

***Alternanthera maritima*: PREPARO DE EXTRATOS E FORMULAÇÕES TÓPICAS
E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR EM TERAPIA
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, dentro do Programa de Mestrado Interinstitucional Univap / Unochapecó.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador
Orientador: Prof^a. Dr^a. Stella Regina Zamuner

São José dos Campos, SP

2008

G192f

Gasparetto, Adriana

Fotossensibilizadores naturais em terapia fotodinâmica antimicrobiana: desenvolvimento de creme e gel creme contendo extratos de *Alternanthera brasiliana* (AMARANTACEAE). / Adriana Gasparetto; Orientadores: Prof. Dr. Marcos José Salvador, Proa. Dra. Stela Regina Zamuner. São José dos Campos; Chapecó, 2008.

1 Disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, modalidade Minter Univap / Unochapecó. 2008.

1. *Alternanthera maritima* 2. Amaranthaceae 3. Formulações tópicas 4. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PDT) 5. Produtos naturais I. Salvador, Marcos José, orientador. II. Zamuner, Stella Regina, orientador III. Título

CDU:613

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

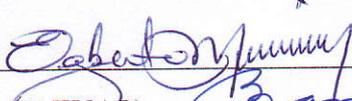
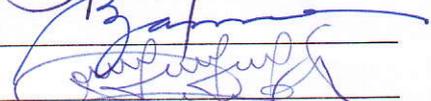
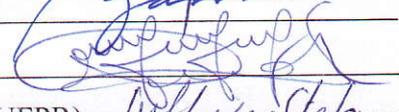
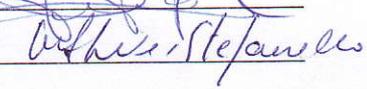
Aluno: *Adriana Gaspardo*

Data: 28 de Agosto de 2008

ADRIANA GASPARETTO

**“ALTERNANTHERA MARITIMA: PREPARO DE EXTRATOS E FORMULAÇÕES TÓPICAS
E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR EM TERAPIA
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **EGBERTO MUNIN** (UNIVAP) 
Prof.^a Dra. **STELLA REGINA ZAMUNER** (UNIVAP) 
Prof. Dr. **MARCOS JOSÉ SALVADOR** (UNICAMP) 
Prof.^a Dra. **MARIA ELIDA ALVES STEFANELLO** (UFPR) 

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D – UniVap
São José dos Campos, 28 de agosto de 2008.

Somos livres
A escravidão acabou
As correntes quebradas
Dos braços livres o abraço
Da boca seca o sorriso
Do coração aflito o sossego
Do corpo cansado o alívio
Do sonho roubado a esperança
Da diferença imposta à igualdade
Do vôo adiado um pista de pouso.

Adriana Gasparetto
15/01/2006

A vida nos coloca à prova
Dia após dia
Assemelha-se uma guerra
Onde devemos ganhar o máximo de batalhas
As vitórias nos fazem acreditar
Que podemos ser os melhores
Mas é com as derrotas que paramos
E refletimos sobre nós mesmos
Buscamos erros, tentamos concertar.
E nos impedimos de cometê-los novamente
Mas novos erros são inevitáveis
E é por eles que buscamos o aperfeiçoamento
Nunca apague ou esqueça o que foi
Pois o que és hoje é devido
Ao que errou e acertou
Ao que ganhou e perdeu
Ao que riu e chorou
Ao que feriu e cicatrizou
O passado tem as peças necessárias
Que molda o ser humano.

Adriana Gasparetto
07/09/2005

Dedico este trabalho aos meus pais, Alcebiades e Ângela, por acompanharem meus primeiros passos com paciência, transmitindo paz e segurança pelos seus gestos; pelo sorriso de seus lábios indicando que ainda há esperança; pelo brilho de seus olhos, que me faz tão grande quanto o amor de vocês por mim; e se pudesse fazê-los eternos, eternos os faria.

Tudo que aprendi foi pisando em seus rastros, tentando fazer o meu caminho pelo reflexo dos teus, porque além de meus pais serão sempre meus mestres maiores de saber imenso com uma experiência que ensina viver, pois não há exemplo maior no mundo, que ainda precisa da vida aprender, pois a lição maior passada por vocês já está guardada, como um tesouro que vocês me deram para a eternidade, de que é o amor que faz no mundo descobrir a coragem de seguir o caminho.

Sua presença, sempre primeira, me traz segurança para seguir cada passo a mais que dou, mesmo quando esse passo é sinônimo do impossível, quando o fardo parece pesado demais, quase impossível suportar e aos poucos a força parece se esgotar, suas preces de encorajamento e estímulo renovam meu espírito e continuo mais forte e confiante rumo a vencer cada desafio.

Ensinarão-me que a queda é importante, pois é com ela que se aprende a levantar; que não é necessário fazer "isso" ou "aquilo" e sim o melhor de acordo com o que já se sabe. Ensinarão que a minha vida sou eu mesma que faço, mas que vocês sempre serão meus faróis para o caminho do bem e da honestidade, sempre desejando grande e verdadeiro sucesso na minha real vocação.

Mostram-me que por mais que a distancia venha nos separar, para a realização de um sonho, nunca haverá a necessidade de gritar para que nos façamos ouvir, pois nossos corações estarão sempre muito próximos basta sussurar.

Agora é mais um daqueles momentos em que da luta se valeu para a conquista de mais um objetivo, e essa vida que pulsa em meu peito foi transmitida por vocês, e meu coração bate ao lado dos seus; e foi com vocês que aprendi a ler e hoje sou capaz de ler em seus olhos o que não conseguem me dizer, então deixem apenas que eu aplauda sua grandeza, que cante sua beleza, que cante a nossa vitória, porque o amor de vocês continuará em mim, do seu amor que desde pequena fui aprendiz e que continuarei a ser.

Obrigada por hoje, e por todos os dias a mim dedicados, obrigada por acreditar em mim, e nunca permitir que eu mesma não acredite; por me apoiarem sempre, me quando as coisas não acontecem exatamente como foi sonhado; por respeitarem momentos meus de silêncio, concentração ou até mesmo de puro mau humor; por estarem ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis; por nunca deixarem faltar nada, especialmente amor; pelo exemplo de família, de homem, de mulher, de casal, de pai, de mãe, de luta, de fé, de coragem, de caráter, de vontade, enfim, muito obrigada por serem meus pais! Amo vocês!

Tenho muito de você em mim
Meu sangue e algumas feições
 Você é meu herói
 Você é meu pai
 e melhor que isso
 Você é meu amigo
Quero poder seguir seus passos
Trilhar meu caminho pelo reflexo do seu
Nasci, cresci e tenho o melhor pai que pude
 desejar
 Não estamos sempre juntos
 Mas você vive no meu coração
 e passeia no meu pensamento
 E é por tudo isso
que mais uma vez eu confesso
 Te amo mais que tudo.

Adriana Gasparetto
29/03/2004

Por algum tempo fomos uma só
E tudo que necessitava era-me dado por você
 Minha memória falha nas recordações
Mas meu coração sente que tudo era perfeito
Pela lei da natureza deixei de viver no meu
 primeiro mundo
Para de mãos dadas viver no seu mundo
E ver pelo brilho de seus olhos todo o amor
 destinado a mim
 Que me fez acreditar
 Que esse é o amor absoluto
 Transmitido de mãe para filho
Alem do amor que por você também sinto
 Meu coração é repleto de gratidão
 Pelo ontem, hoje e sempre.

Adriana Gasparetto
24/09/2004

Agradeço aos meus pais, pelo amor, carinho, compreensão, fé, luta, dedicação e principalmente por acreditar e investir em mim para realização desse projeto.

Agradeço ao Meu Amor, Giancarlo, pelo amor, companheirismo, carinho, pela ajuda na formatação desse sonho, pela paciência em dias incomuns, pelas histórias que temos para contar, e especialmente pelas que ainda escreveremos.

Agradeço aos meus irmãos Marcelo, Alexandra e Maurício, pelo apoio, torcida, amor, carinho, amizade, e especialmente pelo que somos juntos, uma base forte, consolidada no amor.

Aos meus cunhados, Diogo pela força, amizade, bom humor e ajuda com a formatação, Giorgia e Francine pela força, carinho, amizade e apoio.

Agradeço a minha família em geral, em especial Tia Rosa, Tio Osny, Felipe e Rafael, que de alguma forma e de algum lugar torceram e acreditaram nesta conquista.

Agradeço aos meus amigos, Alexandre, Francielle, Andréa, Érika, Rafael e Ricardo pela verdadeira amizade que nem mesmo a distância foi capaz de modificá-la.

Agradeço a Alcimara e Juliana, minhas amigas queridas, pela amizade, companheirismo, viagens, pela divisão de carga, pelos bons momentos que se eternizarão em meu coração.

Agradeço a Deus, pela fé e principalmente por ser a única certeza em dias que a dúvida era constante.

Agradeço ao Marcos José Salvador, meu orientador, pela dedicação, exemplo, empenho, paciência, ensinamentos científicos e de vida, por ser parte importante nesse capítulo da minha vida.

Agradeço a Stella Zamuner, minha orientadora, pelos ensinamentos, exemplo, dedicação, carinho, atenção, e também por ser parte importante nesse capítulo da minha vida.

Agradeço ao Alexandre M. Fuentefria, meu orientador em docência, e hoje grande amigo, por ensinar-me a fazer tudo com amor; por fazer-me acreditar que tudo vai dar certo, basta querer lutar; pelos ensinamentos; pela paciência em transmiti-los; presença em momentos de dúvidas, enfim, pelo exemplo a ser seguido.

Agradeço a Liliane e Emily, pela amizade que nasceu e se fortaleceu durante o estágio em docência.

Agradeço a Luciana Lunelli e Paula C. Primo, pela amizade, apoio, carinho, ajuda, cumplicidade e pelo sorriso sempre presente.

Agradeço ao Egberto Munin, pelo apoio, ensinamentos e esclarecimentos de dúvidas e pela preocupação para que tudo desse certo.

Agradeço ao Leandro Procópio Alves, engenheiro, pelo auxílio técnico na obtenção dos espectros de absorção.

Agradeço a Sonia Khouri, Guilherme Theodoro e Ricardo A. S. Belo, do Laboratório de Microbiologia, pela cooperação e amizade.

Agradeço a Valéria, Rúbia, Dona Neuza e Dona Ivone, pela ajuda, carinho, força e encorajamento.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

***Alternanthera maritima*: PREPARO DE EXTRATOS E FORMULAÇÕES TÓPICAS E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR EM TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**
RESUMO

A família Amaranthaceae possui muitas espécies que são utilizadas na medicina popular devido suas propriedades biológicas, tais como antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana. Neste estudo procedeu-se o preparo de extratos por maceração de *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae) para avaliação do seu efeito como fotossensibilizador em PDT antimicrobiana. Para tanto procedeu-se a adequação de metodologia dos bioensaios e foram empregadas como indicadoras duas cepas de *Candida dubliniensis* ATCC 778157 e ATCC 777. Foram obtidos os extratos em hexano e etanol das partes aéreas de *A. maritima*, que apresentaram bandas de absorção em 650 e 700nm compatível à região de trabalho da PDT. Os resultados mostraram que foi possível observar redução no crescimento microbiano de *C. dubliniensis* ATCC 778157 e ATCC 777 quando tratados com os extratos hexânico ou etanólico (25mg/mL) e irradiados com laser de baixa potencia Fosfeto de Índio-Galio-Aluminio (InGaAlP). Para estes extratos bioativos procedeu-se o desenvolvimento de preparações farmacêuticas tópicas (creme e gel creme), as quais apresentaram efeito antimicrobiano na concentração de 5 mg de creme/mL (equivalente a 0,25mg de extrato/mL) em associação com a radiação laser. As formulações obtidas otimizaram a atividade antimicrobiana dos extratos frente a *C. dubliniensis* ATCC 777 quando associados à formulação farmacêutica tópica, observando-se efeito em PDT antimicrobiana para as formulações em concentração 100 vezes menor do que a observada para o extrato bruto nas mesmas condições experimentais. Os fitocosméticos desenvolvidos (creme e gel creme) apresentaram pH= 5,5 compatível ao pH de preparações farmacêuticas que são veiculadas na pele humana. Em ensaio de estabilidade por centrifugação os extratos hexânico e etanólico apresentaram-se instáveis com separação de fases e as formulações farmacêuticas desenvolvidas minimizaram esta instabilidade uma vez que somente para formulação gel creme contendo o extrato etanólico foi possível visualizar separação de fases. Estes resultados sugerem que os extratos etanólico e hexânico de *A. maritima* e as formulações creme e gel creme desenvolvidas contendo estes extratos bioativos apresentam fotoatividade frente a *C. dubliniensis*.

Palavras chaves: *Alternanthera maritima*, Amaranthaceae, terapia fotodinamica antimicrobiana, formulações farmacêuticas tópicas, fotossensibilizadores naturais.

***Alternanthera maritima*: CRUDE EXTRACTS AND TOPICAL PHARMACEUTICAL FORMULATIONS AND EVALUATION OF THE EFFECT WITH PHOTSENSITIZERS IN ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY**
ABSTRACT

The Amaranthaceae family comprises many species, which are used in traditional folk medicine for the treatment of infections, as analgesic, anti-nociceptive and antimicrobial agents. In this study was proceeded the preparation of crude extracts of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae) for evaluation of its effect as a photosensitizer in antimicrobial photodynamic therapy (PDT). In the susceptibility tests were used standard strains of *Candida dubliniensis* ATCC 778157 and ATCC 777. The hexanic and ethanolic crude extracts of the aerial parts of *A. maritima* presented bands of absorption in 650 and 700nm, which are compatible with region of work of the PDT application. The results indicate that was possible to observe reduction in the microbial growth in *C. dubliniensis* ATCC 778157, how much in *C. dubliniensis* ATCC 777 when these microorganisms had been dealt with hexanic and ethanolic extracts (25 mg/mL) and radiated with laser low harness Fosfeto de Indian-Gallium-Aluminum (InGaAlP). For these bioactive extracts the development of topical pharmaceutical preparations (cream and gel cream) was proceeded and these pharmaceutical preparations presented antimicrobial effect (to 5 mg of cream or gel cream/mL = 0.25mg of extracts/mL) in association with the laser radiation. The antimicrobial PDT effects against *C. dubliniensis* ATCC 777 of the topical pharmaceutical formulations containing the extracts was optimized and was verified activity in concentration 100 smaller times of what the observed one for the extract in the same experimental conditions. The developed phytocosmetics (cream and gel cream) had presented pH= 5.5 compatible to pH of pharmaceutical preparations that are propagated in the skin human being. In assay of stability, only for gel cream containing the bioactive extracts was possible to visualize separation of phases. These results suggest that hexanic and ethanolic extracts of *A. maritima* and the cream and gel cream pharmaceutical formulations containing these bioativos extracts can be used as a photosensitizer against *C. dubliniensis*.

keywords: *Alternanthera maritima*, Amaranthaceae, antimicrobial Photodynamic Therapy, Topical pharmaceutical formulation, natural photosensitizers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Constituintes químicos identificados de <i>Alternanthera maritima</i> (Mart.) St. Hil.- Flavonóides (SALVADOR, 2005).....	34
Figura 2:	Constituintes químicos identificados de <i>Alternanthera maritima</i> (Mart.) St. Hil.- Saponinas Esteroidas (SALVADOR, 2005).....	35
Figura 3:	Constituintes químicos identificados de <i>Alternanthera maritima</i> (Mart.) St. Hil.- Esteróides (SALVADOR, 2005).....	35
Figura 4:	Constituintes químicos identificados de <i>Alternanthera maritima</i> (Mart.) St. Hil.- Triterpenos (SALVADOR, 2005).....	36
Figura 5:	Constituintes químicos identificados de <i>Alternanthera maritima</i> (Mart.) St. Hil.- Ácidos Carboxílicos (SALVADOR, 2005).....	36
Figura 6:	Constituintes químicos identificados de <i>Alternanthera maritima</i> (Mart.) St. Hil.- Grupo Feniletil (SALVADOR, 2005).....	36
Figura 7:	Coerência temporal e espacial, sincronização do movimento da onda devido à emissão estimulada que gera fótons coerentes cujas energias somam-se e propagam-se na mesma direção no tempo e no espaço.....	45
Figura 8:	Monocromaticidade, fótons da mesma cor, mesmo comprimento de onda, mesma freqüência e energia.....	46
Figura 9:	Efeitos do laser de alta potência sobre o tecido em temperaturas crescentes (KNAPPE; FRANK; ROHDE, 2004)	47
Figura 10:	Conversão de energia em processos estimulados por luz.....	49
Figura 11:	Estrutura química da hematoporfirina (A) e protoporfirina (B).....	52
Figura 12:	Representação da estrutura do agente fototerapêutico Photofrin®....	53
Figura 13:	Estrutura química do ácido 5-aminolevulínico (ALA).....	54
Figura 14:	Estrutura química das ftalocianinas.....	55
Figura 15:	Estrutura química das clorinas.....	56
Figura 16:	Estrutura química da hipericina.....	57
Figura 17:	Estrutura química da rosa de bengala (A) e da eosina Y (B).....	58
Figura 18:	Estrutura química do azul de metileno.....	59
Figura 19:	Reação tipo I, o fotossensibilizador sofre degradação por ação direta da luz, o que o leva a uma reação química e conseqüente formação de EROs (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004)	60

Figura 20:	Reação tipo II, o fotossensibilizador, em seu estado tripleto, interage com o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) e forma oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que parece representar o principal agente citotóxico da PDT (FERGUSON, 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002)61
Figura 21:	Preparação dos extratos brutos extraídos em solventes orgânicos....69
Figura 22:	Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar – Técnica de poço em camada dupla.....71
Figura 23:	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços.....72
Figura 24:	Formulações Farmacêuticas.....75
Figura 25:	Extratos hexânico e etanólico de <i>Alternanthera marítima</i> , formulações farmacêuticas contendo os extratos e controles para ensaio de varredura na região do visível.....77
Figura 26:	Equipamentos empregados no ensaio de varredura na região do visível.....77
Figura 27:	Aparelho laser Photon Lase III.....78
Figura 28:	Procedimento de microdiluição em placa de 96 poços, para avaliação do efeito dos extratos e das formulações tópicas contendo <i>Alternanthera marítima</i> como fotossensibilizador em PDT antimicroniana.....79
Figura 29:	Determinação do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), estimando a percentagem de redução de UFC/mL para cada microrganismo, pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços.....80
Figura 30:	Formulações creme base e gel creme base (sem extrato)84
Figura 31:	O teste de centrifugação não apresentou separação de fases no creme (A) e gel creme (B) bases.....86
Figura 32:	O teste de centrifugação das formulações contendo extrato hexânico (AMPAH) (C), não apresentou separação de fases no creme (A) e gel creme (B)86
Figura 33:	O teste de centrifugação das formulações contendo extrato etanólico (AMPAE) (C), não apresentou separação de fases no creme (A), porém apresentou separação de fases no gel creme (B)87
Figura 34:	Espectros de absorção no visível para as diversas soluções utilizadas neste trabalho. As diversas linhas com OD próximas a zero se confundem, e são relativas às seguintes composições: Creme Base (5mg/mL); Gel Creme Base (5mg/mL); Propilenoglicol:Água (5:95); metanol, Creme AMPAH (5mg/mL); Gel Creme AMPAH (5mg/mL);

	Creme AMPAE (5mg/mL); Gel Creme AMPAE (5 mg/mL).....	88
Figura 35:	Espectros de absorção no visível para os Controles Azul de Metileno (0,05mg/mL) e Propilenoglicol:Água (5:95)	88
Figura 36:	Espectros de absorção no visível para as formulações Creme e Gel Creme Base (5mg/mL), sem extratos, em escala expandida.....	89
Figura 37:	Formulações farmacêuticas, creme e gel creme, contendo extrato hexanico (AMPAH, 50mg/g de creme ou gel creme) na concentração de 5mg de creme ou gel creme/mL, em escala expandida.....	90
Figura 38:	Espectro de absorção para o Creme contendo extrato hexanico (AMPAH, 50mg/g de creme ou gel creme) na concentração de 5mg de creme/mL, em escala expandida. A linha suave foi obtida submetendo o espectro ruidoso à filtragem com técnica de FFT (<i>fast Fourier Transform</i>). Foi utilizado filtro bassa-baixa com freqüência de corte de 0,03 Hz.....	90
Figura 39:	Média dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) de <i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157 para os seguintes grupos estudados: Extrato Hexanico Não Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMPAH NI) 25mg/mL (n=6); Extrato Hexanico Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMPAH I) 25mg/mL (n=6); Extrato Etanólico Não Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMPAH NI) 25mg/mL (n=6); Extrato Etanólico Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMPAH I) 25mg/mL (n=6). Estatística: * ? **, Teste de Tukey, P<0,05.....	93
Figura 40:	Média dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) de <i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777 para os seguintes grupos estudados: Extrato Hexanico Não Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMPAH NI) 25mg/mL (n=6); Extrato Hexanico Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMPAH I) 25mg/mL (n=6); Extrato Etanólico Não Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMP AE NI) 25mg/mL (n=6); Extrato Etanólico Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMP AE I) 25mg/mL (n=6). Estatística: * ? **, Teste de Tukey, P<0,05.Irradiado de <i>Alternanthera maritima</i> (AMP AE I) 25mg/mL (n=6)	94
Figura 41:	Média dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) de <i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777 para os seguintes grupos estudados: Creme contendo Extrato Hexanico (0,25 mg de extrato/mL) de <i>Alternanthera marítima</i> , Não Irradiado (AMPAH NI) 5mg/mL (n=6); Creme contendo Extrato Hexanico (0,25 mg de extrato/mL) de <i>Alternanthera maritima</i> , Irradiado (AMPAH I) 5mg/mL (n=6); Creme contendo Extrato Etanólico (0,25 mg de extrato/mL) de <i>Alternanthera marítima</i> , Não Irradiado (AMP AE NI) 5mg/mL (n=6); Creme contendo Extrato Etanólico de <i>Alternanthera maritima</i> (0,25 mg de extrato/mL), Irradiado (AMP AE I) 5mg/mL (n=6); Gel Creme contendo Extrato Hexanico (0,25 mg de extrato/mL) de <i>Alternanthera marítima</i> , Não Irradiado (AMPAH NI) 5mg/mL (n=6); Gel Creme contendo Extrato Hexanico (0,25 mg de extrato/mL) de <i>Alternanthera</i>	

marítima, Irradiado (AMPAH I) 5mg/mL (n=6); Gel Creme contendo Extrato Etanólico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Não Irradiado (AMPAE NI) 5mg/mL (n=6); Gel Creme contendo Extrato Etanólico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Irradiado (AMPAE I) 5mg/mL (n=6). Estatística: * ? **, Teste de Tukey, P<0,05.....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Componentes da formulação creme base.....	74
Tabela 2:	Componentes da formulação gel creme base.....	75
Tabela 3:	Rendimento em massa dos extratos brutos obtidos de <i>Alternanthera marítima</i>	82
Tabela 4:	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Extratos Hexânico (AMPAH) e Etanólico (AMP AE) utilizando o método de microdiluição em placas de 96 poços.....	82
Tabela 5:	Padronização de inóculo dos microrganismos utilizados no experimento, com base na escala de MacFarland, também utilizado para controle de inóculo.....	82
Tabela 6:	Padronização da concentração empregada no ensaio para avaliação do efeito das amostras como fotossensibilizador.....	83
Tabela 7:	Padronização dos controles utilizados para validar o estudo.....	83
Tabela 8:	Formulação controle Creme base (sem extrato).....	83
Tabela 9:	Formulação controle Gel creme base (sem extrato).....	84
Tabela 10:	Formulações contendo diferentes concentrações de extratos hexânico e etanólico incorporados em base Creme ou Gel creme com e sem conservante.....	85
Tabela 11:	Resultado da atividade antimicrobiana extratos de <i>Alternanthera marítima</i> e amostras controles, placa não-irradiada, expresso como média do número de UFC/mL.....	91
Tabela 12:	Resultado da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Alternanthera marítima</i> e amostras controles, placa irradiada, expresso como média do número de UFC/mL.....	91
Tabela 13:	Resultado da atividade antimicrobiana das formulações creme e gel creme contendo extratos de <i>Alternanthera marítima</i> (50 mg de extrato/g de creme ou gel creme) e amostras controles, placa não-irradiada, expresso como média do número de UFC/mL.....	92
Tabela 14:	Resultado da atividade antimicrobiana das formulações creme e gel creme contendo os extratos de <i>Alternanthera marítima</i> (50 mg de extrato/g de creme ou gel creme) e amostras controles, placa irradiada, expresso como média do número de UFC/mL.....	92

Tabela 15: Média (n=6) e Coeficiente de Variação dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) e da percentagem de redução do crescimento microbiano quando tratados com os extratos de *Alternanthera marítima* na presença e ausência de luz.....96

Tabela 16: Média (n=6) e Coeficiente de Variação dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) e da percentagem de redução do crescimento microbiano quando tratados com as formulações contendo os extratos de *Alternanthera marítima* na presença de luz.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius.
cm	Centímetro.
cm²	Centímetro Quadrado.
mm	Milímetro.
nm	Nanômetro.
µm	Micrometro.
mL	Mililitro.
µL	Microlitro.
g	Gramas.
mg	Miligrama.
mg/g	Miligrama por grama.
mg/mL	Miligrama por Mililitro.
µg/mL	Micrograma por Mililitro.
W	Watts.
W/cm²	Watts por centímetro quadrado.
mW	Mili watts.
mW/cm²	Miliwatts por centímetro quadrado.
J	Joule.
J/cm²	Joule por centímetro quadrado.
min	Minutos.
s	Segundos.
Hz	Hertz.
rpm	Rotações por minuto.
m/s⁻¹	Metros por Segundo.
<	Menor que.
=	Menor igual que.
>	Maior que.
=	Maior igual que.
CCD	Cromatografia em Camada Delgada.
CG	Cromatografia Gasosa.
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear.
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico).
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência)

	Adquirida).
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência Humana).
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
UNIVAP	Universidade do Vale do Paraíba.
pH	Potencial Hidrogeniônico.
A. L. Jussieu	Antoine Laurent de Jussieu.
AMPAH	<i>Alternanthera maritime</i> partes aéreas hexano.
AMPAE	<i>Alternanthera maritime</i> partes aéreas etanol.
CB	Creme Base.
GCB	Gel Creme Base.
O/A	Óleo em Água.
A/O	Água em Óleo.
AMP	Amino Metil Propanol.
BHT	Butil Hidroxi Tolueno.
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético).
q.s.p	Quantidade Suficiente Para.
UV	Ultra-Violeta.
IV	Infra-vermelho.
FFT	Fast Fourier Transform.
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação).
PDT	Terapia Fotodinâmica.
APDT	Antimicrobial Photodynamic Therapy (Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana).
PACT	Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana).
PDI	Inativação Fotodinâmica.
HILT	High Intensity Laser Treatment.
LILT	Low Intensity Level Treatment.
LLLT	Low Level Laser Therapy.
InGaAlP	Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio.
He-Ne	Hélio-Neônio.
GaAs	Arsenieto de gálio.
Nd-YAG	Cristal de Ítrio 3 Alumínio 5 Oxigênio 12 dopado com Neodímio.
CO₂	Dióxido de Carbono.

GaAIAs	Arsenieto de Gálio Alumínio.
EROs	Espécies reativas de oxigênio.
FS	Fotossensibilizador.
TBO	Azul de Toluidina.
AM	Azul de Metileno.
e₆	Conjugados de Clorina.
NH₂	Grupo Amino.
RB	Rosa de Bengala.
HpD	Derivados da Hematoporfirina.
DHE	Componente Ativo dos Derivados da Hematoporfirina.
ALA	Ácido Aminolevulínico.
PpIX	Protoporfirina IX.
®	Marca Registrada.
AlSPc	Alumínio Clorofalocianina Sulfonada.
³O₂	Oxigênio Molecular.
¹O₂	Oxigênio Singleto.
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio.
OH⁻	Íons Hidroxila.
O₂⁻	Ânion Superóxido.
Fe⁺³	Íon Férrico.
Fe⁺²	Íon Ferroso.
•OH	Radical Hidroxila.
NO	Óxido Nitroso.
³S₁⁻	Fotossensibilizador no Estado Tripleto.
NI	Ausência de Iluminação.
I	Presença de Iluminação.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute.
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias.
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por Mililitros.
UI/mL	Unidades por Mililitros.
CIM	Concentração Inibitória Mínima.
ASD	Ágar Sabouraud-Dextrose.
ANOVA	Análise de Variância.
CV	Coeficiente de Variação.
CV%	(desvio padrão/media) x 100.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivos Gerais.....	24
2.2	Objetivos Específicos.....	24
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1	Plantas Medicinais.....	25
3.2	Agentes antimicrobianos e antifúngicos.....	27
3.3	Família Amaranthaceae – <i>Alternanthera marítima</i>	32
3.4	Formulações Farmacêuticas Semi-sólidas.....	37
3.5	Laser.....	42
3.5.1	<i>Dosimetria, Densidade de Energia, Fluência</i>	44
3.5.2	<i>Potência</i>	44
3.5.3	<i>Densidade de Potência, Irradiância</i>	44
3.5.4	<i>Características da luz laser</i>	45
3.5.5	<i>Tipos de Laser</i>	46
3.6	Terapia Fotodinâmica (PDT).....	49
3.6.1	<i>Fotossensibilizadores</i>	50
3.6.2	<i>Fotofísica da PDT</i>	59
3.6.3	<i>Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT, Antimicrobial Photodynamic Therapy)</i>	63
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.1	Coleta, classificação e obtenção do material vegetal.....	69
4.2	Preparação dos extratos brutos.....	69
4.3	Ensaio biológico <i>in vitro</i>	70
4.3.1	<i>Determinação da atividade antimicrobiana</i>	70

4.3.2	Determinação da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima (CIM).....	70
4.4	Elaboração de formulações farmacêuticas semi-sólidas para uso tópico.....	73
4.4.1	Preparação das formulações farmacêuticas.....	73
4.4.2	Avaliação da estabilidade e controle de pH das formulações obtidas.....	76
4.5	Varredura na região do visível.....	76
4.6	Laser.....	77
4.7	Avaliação do efeito dos extratos e das formulações tópicas contendo <i>Alternanthera maritima</i> como fotossensibilizador.....	78
4.8	Análise Estatística.....	81
5	RESULTADOS.....	82
5.1	Preparação dos extratos brutos.....	82
5.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	82
5.3	Preparação das formulações farmacêuticas.....	83
5.4	Avaliação da estabilidade e controle de pH das formulações obtidas....	85
5.5	Varredura na região do visível.....	87
5.6	Ensaio biológico <i>in vitro</i> para avaliação dos extratos e de formulações tópicas contendo <i>Alternanthera maritima</i> como fotossensibilizadores naturais.....	91
6	DISCUSSÃO.....	97
7.	CONCLUSÃO.....	105
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	106
	REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais é um assunto relevante e que, de maneira geral, desperta o interesse das pessoas, pois além de seu uso popular com finalidade terapêutica, pode contribuir de forma significativa com informações que conduzam a geração de novas tecnologias pela divulgação e emprego das propriedades terapêuticas dos vegetais (MACIEL et al., 2002; PINTO et al., 2002; CECHINEL; YUNES, 1998). O conhecimento sobre plantas medicinais é tão antigo quanto à espécie humana e, muitas vezes, trata-se do único recurso terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos no tratamento de enfermidades (CARVALHO et al., 2002; MACIEL et al., 2002; PINTO et al., 2002; SALVADOR et al., 2003; YUNES; CALIXTO, 2001).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Plantas encontradas em diferentes ecossistemas são usadas na medicina natural, porém sob o ponto de vista científico, somente cerca de 5%, dentre 250 a 500 mil espécies, têm sido estudadas quimicamente e em menor porcentagem avaliadas sob aspectos biológicos (PEREIRA et al., 2003; CARVALHO et al., 2002; PINTO et al., 2002; CECHINEL ; YUNES, 1998).

A pesquisa de produtos naturais como fonte de matéria prima para obtenção de medicamentos tem carácter multidisciplinar. Estas investigações permitem a integração de conhecimentos. Assim, através de análises de extratos, pode-se estudar quais são os principais componentes químicos responsáveis pela atividade biológica, e pesquisar aplicações para as moléculas isoladas junto às indústrias farmacêutica e cosmética, incorporando-as em formulações farmacêuticas (DI STASI, 1996; MACIEL et al., 2002; PINTO et al., 2002; CECHINEL; YUNES, 1998).

As plantas possuem suas próprias defesas que as protegem de outras plantas, insetos, fitófagos e herbívoros predadores de uma maneira geral. Estas defesas podem ser de natureza biológica que envolve o desenvolvimento de cascas mais rígidas, espinhos entre outros e/ou de natureza química biossintetizando substâncias do metabolismo secundário, fenômeno conhecido como alelopatia, que é a ciência que estuda processos relacionados, principalmente, a metabólitos secundários produzidos por algas, plantas, bactérias e fungos que influenciam os processos biológicos com efeitos positivos e negativos e que estão na gênese de micromoléculas potencialmente bioativas (PINTO et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004).

Dentre as famílias de plantas pertencentes à flora brasileira tem-se a família Amaranthaceae que possui muitas espécies que apresentam atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, tripanocida, leishmanicida, antiinflamatória, imunomodulatória entre outras) e algumas são utilizadas na medicina popular e como alimento (SIQUEIRA, 1987^{a,b}), sendo, portanto material promissor para a busca de novos fármacos ou medicamentos.

A espécie *A. maritima* pertence ao gênero *Alternanthera* que tem se mostrado rico em espécies com atividade biológica como antineoplásica (*A. brasiliana*), antiviral (*A. philoxeroides*), antimicrobiana (*A. maritima* e *A. tenella*) e antioxidante (*A. tenella*). Algumas são usadas na medicina popular como: *A. brasiliana* (infusão das flores) empregada no combate à tosse e a infecções; *A. pugens* (planta total) empregada no tratamento de sífilis e moléstias cutâneas; *A. tenella* (infusão das folhas) usada como diurético e *A. bettzichiana* (planta total) empregada como analgésico e anti-pirético (SIQUEIRA ; GUIMARÃES, 1984; SIQUEIRA, 1987).

Desta forma, pesquisas para a busca de princípios ativos de fonte natural com atividade antimicrobiana se fazem necessário, de maneira a se encontrar novos agentes antimicrobianos que minimizem problemas comuns aos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, tais como: resistência microbiana, baixa solubilidade e alta toxicidade (SALVADOR et al., 2004). Assim pesquisas com produtos naturais e a busca de novas alternativas terapêuticas para terapias antimicrobianas devem ser encorajadas.

Dentre as novas tecnologias disponíveis com potencial terapêutico, tem-se o processo denominado terapia fotodinâmica antimicrobiana ou APDT (*Antimicrobial Photodynamic Therapy*). Esta tecnologia consiste na associação de um agente fotossensibilizador, geralmente exógeno, administrado por via tópica ou sistêmica, a uma fonte de luz visível, com o objetivo de provocar inativação microbiana (SALVA, 2002; GARCEZ et al., 2003).

Visto que a terapia fotodinâmica tem grande eficiência em induzir morte celular em procedimentos experimentais, pesquisadores vêm aplicando esta tecnologia para a inativação de microrganismos patogênicos, constituindo-se em uma nova alternativa terapêutica (GARCEZ et al., 2003), para tanto se faz necessário o emprego de agentes fotossensibilizadores que operacionalizem o processo.

Fotossensibilizadores são agentes, geralmente exógenos, que, sob iluminação em determinado comprimento de onda e na presença de oxigênio encontrado nas células, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que são citotóxicas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; RIBEIRO; GROTH, 2005; PERUSSI, 2007). O fotossensibilizador ideal caracteriza-se por baixa toxicidade após a administração, não induzindo reação alérgica, nem hipotensão e deve absorver a luz no espectro vermelho ou vermelho-distante (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Ou seja, deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficaz, seletivo e minimamente tóxico aos tecidos normais (GARCEZ et al., 2003).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT) em sua maioria emprega fotossensibilizadores derivados de corantes vitais que se caracterizam por não serem tóxicos às células humanas em concentrações superiores às requeridas para a inativação microbiana efetiva (WAINWRIGHT, 1998). Desta forma, os fotossensibilizadores que têm sido estudados para a erradicação de microrganismos pertencem a diferentes grupos de compostos, tais como os xantenos halogenados (Rosa de Bengala – RB), fenotiazídicos (Azul de toluidina O – TBO, Azul de Metileno – AM), acridinas e conjugados de clorina (e_6) (PERUSSI, 2007). Logo, pesquisas para a busca de novos fotossensibilizadores têm sido intensificadas, sendo a maioria de origem sintética. Relatos de pesquisas para a busca de fotossensibilizadores naturais a partir de extratos vegetais não foram encontradas, o que dá um caráter inovador ao presente trabalho de pesquisa.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a eficácia antifúngica da PDT com extratos vegetais de *A. maritima* e laser diodo de fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) em culturas de duas cepas de *Candida dubliniensis*. Para tanto, procedeu-se o preparo de extratos de *A. maritima* (Amaranthaceae) e de formulações tópicas (creme e gel creme) contendo extratos bioativos deste vegetal e avaliou-se seu efeito como fotossensibilizador em PDT antimicrobiana de maneira a propiciar o emprego desta tecnologia na busca de extratos bioativos e fotossensibilizadores naturais em espécies vegetais da flora brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Estudar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e formulações tópicas contendo o vegetal *A. maritima* e avaliar seu efeito como fotossensibilizador natural em PDT antimicrobiana.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar extratos e formulações tópicas contendo o vegetal *A. maritima* e avaliar a atividade antimicrobiana das preparações obtidas;
- Adequar metodologia para os bioensaios;
- Estudar o efeito antimicrobiano *in vitro* dos extratos vegetais e das formulações tópicas desenvolvidas em associação com raio Laser de baixa potência, avaliando o efeito destas preparações farmacêuticas como fotossensibilizadores naturais em PDT antimicrobiana.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais

As plantas brasileiras começaram a ser estudadas cientificamente a partir de 1847 quando Theodoro Peckolt, farmacêutico alemão, veio para o Brasil estudar a flora brasileira e atualmente constitui uma forma de medicina que vem crescendo ao longo dos anos com a evolução dos estudos científicos, em particular, estudos químicos e farmacológicos, que comprovam a eficácia das plantas medicinais utilizadas na medicina popular (PINTO et al., 2002; CECHINEL ; YUNES, 1998).

Os homens primitivos alimentavam-se de determinadas plantas, pelo instinto de sobrevivência, seguido de uma avaliação, rústica, dos sinais e sintomas que apareciam após o consumo, sendo possível avaliar se determinada espécie era útil ou não. Neste processo os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies, de gêneros vegetais, do reconhecimento do habitat, da época da colheita, bem como das partes dos vegetais que se adequavam ao uso medicinal (DI STASI, 1996; MACIEL et al., 2002; CECHINEL ; YUNES, 1998; TAVARES, 2000; CARVALHO et al., 2002).

O conhecimento sobre de plantas medicinais constitui muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos e a utilização de plantas como medicamentos é uma pratica muito antiga e constitui uma alternativa terapêutica econômica em relação aos medicamentos sintéticos, assim inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas comprovando cientificamente a eficácia de algumas plantas. (CARVALHO et al., 2002; MACIEL et al., 2002; PINTO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2000; SALVADOR et al., 2003).

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começa a acontecer no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, caracteriza-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides empregando-se a separação ácido-base. Com o avanço científico e tecnológico, particularmente com o inicio do emprego de técnicas cromatográficas, o final dos anos vinte e toda a década de trinta pode ser caracterizado pelo grande numero de trabalhos sobre o isolamento e a identificação de substâncias de natureza esteroideal (PINTO et al., 2002). Na ultima década, uma diversidade de novas substâncias com

atividade biológica potencial (DI STASI, 1996; PINTO et al., 2002; SIMÕES et al., 2003; MIMICA-DUKIN et al., 2004).

Há uma grande quantidade de plantas existentes no planeta e a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico. Somente 20% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor sob os aspectos biológicos (CECHINEL; YUNES, 1998; PINTO et al., 2002; SUFFREDINI et al., 2004; SUFFREDINI et al., 2006; YUNES et al., 2001).

Uma porcentagem significativa de trabalhos sobre atividade biológica relata estudos de toxicologia e farmacologia de plantas medicinais com resultados preliminares, pois são realizados com extratos vegetais brutos ou frações. Trabalhos envolvendo atividade farmacológica e toxicológica de princípios ativos puros são ainda pouco representativos (PINTO et al., 2002). Assim, estudos sistemáticos com plantas medicinais se fazem necessários face ao valor agregado dos produtos naturais e devido às suas potenciais aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Muitas dessas substâncias constituem-se em moléculas protótipo que podem servir como modelos para o desenvolvimento de fármacos sintéticos (PINTO et al., 2002).

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. As principais classes de constituintes de plantas que podem ser detectadas são: ácidos graxos; terpenóides; esteróides; fenóis; alcalóides; cumarinas, flavonóides taninos etc (MACIEL et al., 2002; CECHINEL; YUNES, 1998).

Para a separação e purificação dos constituintes químicos de extratos vegetais, geralmente, empregam-se diferentes técnicas cromatográficas (CCD, CG, CLAE) e a identificação e determinação estrutural é realizada com o auxílio de métodos espectroscópios de análise (CECHINEL; YUNES, 1998, PINTO et al., 2002). As técnicas espectrais, como UV e IV usadas em conjunto e aliado a técnicas de RMN (ressonância magnética nuclear) uni e bidimensionais e espectroscopia de massa podem ajudar a propor com maior segurança a estrutura molecular de substâncias naturais (CECHINEL; YUNES, 1998).

3.2 Agentes antimicrobianos e antifúngicos

Segundo Fuchs e Wannmacher (2004) um dos grandes avanços da humanidade foi a descoberta dos antimicrobianos, cuja eficácia corresponde à capacidade de eliminar bactérias (efeito bactericida) ou inibir sua multiplicação (efeito bacteriostático). Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo (CUNICO et al., 2004).

Os antimicrobianos atuam interferindo nos processos metabólicos ou nas estruturas dos microrganismos. Os principais pontos de ação incluem a parede celular bacteriana, a membrana citoplasmática e a síntese de ácido nucléico e proteínas (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Os antibióticos que atuam na parede celular se caracterizam por inibirem a síntese dos componentes do peptidoglicano, interferindo na função de várias enzimas que participam da síntese final desse composto, levando a lise da célula bacteriana (TRABULSI ; ALTERTHUM, 2004).

O mecanismo de ação dos antimicrobianos na membrana citoplasmática se caracteriza devido à presença de grupamentos básicos (NH_2) e de uma cadeia lateral de ácido graxo, provocando uma desorganização da membrana, resultando na morte celular (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Alguns antimicrobianos atuam ao nível dos ribossomos inibindo a síntese protéica, enquanto outros impedem a síntese do DNA, interferindo na replicação cromossômica (TRABULSI ; ALTERTHUM, 2004).

Fleming abriu para a humanidade possibilidades de tratar e curar doenças infecciosas com o uso de antimicrobianos, modificando assim, o prognóstico e reduzindo as internações por esta causa. Mas o homem com o uso irracional dos antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos tem contribuído para o surgimento de bactérias e fungos resistentes e multirresistentes (TAVARES, 2000).

O gênero *Candida* pertence à família *Cryptococcaceae*, tratando-se de organismos eucariotos que podem ser unicelulares ou multicelulares. São geralmente caracterizados pela forma leveduriforme, podendo apresentar formas arredondadas ou ovais que medem aproximadamente de 2,0 a 4,0 μm (GUARRO, 1998) e reproduzem-se por brotamento ou gemulação.

Algumas espécies, como *C. albicans*, apresentam a capacidade de dimorfismo, ou seja, pode ser encontrada sob formas leveduriformes (blastocónídios) no estado saprofítico, estando associado à colonização assintomática, ou como formas filamentosas (pseudohifas e hifas verdadeiras), forma necessária para invadir tecidos mais profundos em processos patogênicos (MOLERO et al., 1998), além disso, neste fungo pode ocorrer a formação de clamidósporos, que são esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular, permitindo a adaptação em diferentes sítios biológicos (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; CHAFFIN et al., 1998).

O grande interesse biológico do dimorfismo é a capacidade do microrganismo mudar de forma e isso estar associado diretamente a sua patogenicidade, cujo critério mais importante é a indução para a forma micelial por macrófagos e componentes do soro. A transição da forma leveduriforme para a forma filamentosa pode ser realizada *in vitro*, com variações do ambiente como pH e temperatura, ou por substâncias como N-acetilglucosamina ou prolina (MOLERO et al., 1998).

Espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota de cavidades (retal, bucal, vaginal, uretral, nasal, aural) e da pele humanas. Estas espécies envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas (SEGAL e BAUM, 1994). São consideradas patógenos responsáveis por uma variedade de quadros clínicos, desde desordens mucocutâneas, não comprometedoras ao indivíduo, a exemplo de mulheres que desenvolvem candidíase vaginal, até infecções sistêmicas, principalmente quando fatores de risco estão presentes nos hospedeiros humanos, incluindo o uso prolongado e indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, uso de esteróides ou outras substâncias imunossupressoras, *diabetes mellitus*, AIDS e funções fagocitárias alteradas, podendo comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica da levedura pelo organismo, complicações infecciosas estas geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas (SEGAL; BAUM, 1994; DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSIE, 2003; WEIG; GROB; MUHLSCHLEGEL, 1998).

Cerca de 200 espécies de *Candida* foram descritas, e aproximadamente 10% destas causam infecção (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). As principais espécies de interesse clínico são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae* (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003). A espécie considerada predominante

na infecção fúngica da cavidade bucal em indivíduos imunocomprometidos é a *C. albicans*, seguida ainda por outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. parapsilosis* (SAMARANAYAKE, 1992; REPENTIGNY, LEWANDOWSKI ; JOLICOEUR, 2004).

Embora *C. albicans* seja a mais freqüentemente isolada de amostras clínicas, as espécies não-*albicans* estão significativamente emergindo, entre elas como *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (HAZEN, 1995; HAYNES, 2001).

Em consequência, número progressivo de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas a espécies emergentes de *Candida* têm sido relatados, envolvendo isolados de *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Cândida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Cândida norvegensis*, *Candida inconspicua* entre outras (COLEMAN et al., 1998).

O aumento de casos de candidíase causada por espécies não-*albicans* ainda não é conhecida, porém pressupõe-se que essas espécies emergentes apresentam menor sensibilidade aos agentes antifúngicos de uso clínico (COLLIN; CLANCY; NGUYEN, 1999).

Em 1995, uma nova espécie de *Candida*, com características morfológicas e bioquímicas semelhantes às da *C. albicans*, foi descrita e denominada de *C. dubliniensis*, sendo menos patogênica, mas com maior facilidade de desenvolver resistência aos antifúngicos triazólicos (SULLIVAN et al., 1995) sendo necessária a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las.

Os relatos de quadros clínicos sistêmicos relacionados a esta nova espécie ainda são raros, sendo a maior parte dos casos associados a infecções de mucosa oral (KRCMERY; BARNES, 2002; BROWN et al., 2000).

Os determinantes da patogenicidade das espécies de *Candida* spp dependem dos fatores de virulência, que aumentam sua capacidade de colonizar mucosas, superfícies sintéticas e de invadir tecidos, tais como adesão às células e tecidos dos hospedeiros, produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases, lípases, hialuronidase e condroitina sulfatase), dimorfismo (formação de tubo germinativo com conseqüente desenvolvimento da forma filamentosa), alteração fenotípica da morfologia celular e da colônia (*switching* fenotípico), variabilidade genotípica, variabilidade antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro

e hidrofobicidade da superfície celular (CALDERONE; FONZI, 2001; GHANNOUM ; ABU-ELTEEN, 1990; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003).

A parede celular de *Candida* spp. é uma estrutura de grande importância, pois mantém a morfologia característica de cada forma, levedura e hifa, e é o primeiro local onde ocorre a interação entre o organismo e o ambiente. Por isso, estudos relacionados à identificação e a distribuição dos componentes da parede celular podem contribuir para o conhecimento do seu papel na patogênese fúngica (ex.: expressão de adesinas e receptores para proteínas do hospedeiro; atividade proteolítica extracelular; hidrofobicidade) (BORG ; RUCHEL, 1988; CALDERONE; SCHELD, 1987; DOUGLAS, 1987; HAZEN, 1989; BOUCHARA et al., 1990; LOPEZ-RIBOT et al., 1991).

As proteases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, sendo importante fator na patogênese de inúmeras doenças microbianas, possuindo função relevante na adesão, penetração, nutrição, sobrevivência intracelular, multiplicação e diferenciação celular (HUBE, 2000). Muitas espécies fúngicas, patogênicas ao homem, secretam proteases *in vitro* (RODRIGUES et al., 2003).

O número de pacientes predispostos a infecções causadas por microrganismos oportunistas, como espécies de *Candida*, vem crescendo significativamente nesta última década e os pacientes de risco para essa infecção seriam aqueles sob tratamento para o câncer, transplantados, portadores do HIV, com distúrbios endócrinos, gravidez, deficiência de ferro, xerostomia e desordens imunológicas (SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1982; HUBE, 2000).

Verstrepen e Klis (2006) enfatizam, ainda, a notável capacidade de formação de biofilme a partir da propriedade de adesão de alguns fungos como *C. albicans*. Esta característica apresenta grande relevância médica e industrial, já que a presença de um biofilme maduro dificulta a ação de antifúngicos e pode tornar-se um reservatório de células com características de resistência a determinadas drogas.

As candidíases são usualmente tratadas com derivados poliênicos (anfotericina B) e imidazólicos (fluconazol, cetoconazol, itraconazol). Sendo que as espécies de *Candida* apresentam sensibilidade variada aos novos antifúngicos em desenvolvimento (PFALLER et al., 1999), e relatos de isolados resistentes a essas substâncias surgiram rapidamente na literatura (PRICE; LaROCCO; GENTRY, 1994;

MATHEMA et al., 2001; SANT'ANA et al., 2002; CANTÓN et al., 2003; SANCHEZ-VARGAS et al., 2005; HUBE, 2004; HAYNES, 2001).

O tratamento convencional contra as mais comuns infecções por *Candida* tem sido realizado por aplicações tópicas de antifúngicos poliênicos como a nistatina e anfotericina. Porém, nos casos em que há imunossupressão esses antifúngicos podem não ser efetivos, sendo necessária a administração de agentes sistêmicos como o cetaconazol, anfotericina B, itraconazol (LUNEL; MEIS; VOSS, 1999; JOHNSON et al., 1995).

O amplo uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos em pacientes imunossuprimidos, resultou em um aumento alarmante de microrganismos resistentes a esses medicamentos. Essa resistência está associada, principalmente, com imunossupressão severa, reincidência as infecções e tempo de tratamento prolongado (TEICHERT et al., 2002).

O tratamento para as infecções por *Candida* tem enfrentado o desafio da resistência do microrganismo à droga de escolha, identificada como a maior causa de falha terapêutica no tratamento de doenças causadas por fungos (BROSSCHE et al., 1998; DIEKEMA et al., 2002), que por sua vez, tem seu efeito dependente da espécie infectante, uma vez que a mesma droga pode sensibilizar *C. albicans*, espécie mais susceptível à maioria delas e não ter o mesmo efeito sobre *C.tropicallis* que exibe uma resposta fraca à maioria dos antifúngicos (SOBEL ; VASQUEZ, 2003).

Espécies de *Candida* desenvolvem resistência aos antifúngicos por meio de alteração na parede celular e membrana, dificultando a penetração do antifúngico; bomba de efluxo, removendo o antifúngico da célula; mutação dos alvos dos antifúngicos, diminuindo sua capacidade de ligação; ativação de vias alternativas que aumentam o metabolismo dos antifúngicos; seqüestro dos antifúngicos em organelas semelhantes a vacúolos; e alteração cromossômica (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003).

O perfil de sensibilidade aos agentes antifúngicos de diversas espécies de *Candida*, principalmente os isolados clínicos, tem sido extensivamente investigado, sugerindo à necessidade do desenvolvimento de metodologia para testes de suscetibilidade aos antifúngicos, a qual foi aprovada pelo, atualmente chamado, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Com a introdução dos antifúngicos triazólicos, uma alternativa menos tóxica ficou disponível para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, porém observou-se a resistência adquirida de *Candida albicans* em pacientes que fazem uso prolongado ou freqüente desses medicamentos (SANGLARD; ODDS, 2002; LUNEL; MEIS; VOSS, 1999; COLOMBO, 2000), e resistência intrínseca primária ao fluconazol de *Candidas glabrata* e *krusei* (PFALLER et al., 1998; PFALLER et al., 1999).

Atualmente, medicamentos antimicrobianos e antifúngicos apresentam um limite de uso devido à baixa potência, pouca solubilidade, efeitos tóxicos e resistência de cepas bacterianas e fúngicas aos medicamentos disponíveis (SALVADOR et al., 2003).

A resistência a agentes antimicrobianos é grave e preocupante e requer não somente a pesquisa de novas substâncias com propriedade antimicrobiana, mas também o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento eficaz contra infecções bacterianas e fungicas, uma vez que, entre as causas apontadas para o fenômeno está o uso abusivo e indiscriminado de fármacos antimicrobianos (CUNICO et al., 2004; BERQUÓ et al., 2004; SALVADOR et al., 2003). Assim, é cada vez mais importante a busca de novos fármacos com poder biocida ou biostático e o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções (FALCÃO et al., 2002; PEREIRA et al., 2004; CUNICO et al., 2004; BERQUÓ et al., 2004; GALES et al., 1997).

3.3 Família Amaranthaceae – *Alternanthera marítima*

Amaranthaceae é uma família de plantas angiospérmicas, estabelecida em 1789 por A. L. Jussieu (SIQUEIRA, 1994), pertence à classe Magnoliopsida ou dicotiledôneas, pertencente à divisão Magnoliophyta, ou plantas com flor, cujo embrião (semente) contém dois ou mais cotilédones. Outras características incluem raiz axial e folhas com nervação reticulada. As partes florais podem ser pentâmeras (mais frequentemente), às vezes tetrâmeras e, raramente, trímeras ou monômeras. Esta família de plantas está dentro da ordem Caryophyllales que apresenta cerca de 65 gêneros e aproximadamente 1000 espécies de membros, constituída principalmente por herbáceas e arbustos. Está dividida em quatro tribos: Celosieae, Amarantheae, Braylineae e Gomphreneae (SIQUEIRA, 1994).

A família Amaranthaceae, possui ocorrência predominante em zonas tropicais e subtropicais e no Brasil ocorre principalmente na mata atlântica (SIQUEIRA, 1990), nos cerrados e campos rupestres (SIQUEIRA, 1994/1989). Contêm espécies com importância etnobotânica, empregadas como ornamentais, alimentícias e principalmente medicinais. De acordo com Borsch, Clemants e Mosyakin (2001), membros da família Amaranthaceae são dominantes em ecossistemas áridos e semi-áridos e apresentam uma série de características e estratégias que permitem que sobrevivam em diferentes habitats e nas condições ambientais mais desfavoráveis.

Muitas espécies de Gomphreneae têm apresentado, por exemplo, relatos de atividade antimicrobiana, como *A. brasiliiana* (PEREIRA et al., 2007), *A. marítima* (SALVADOR et al., 2003/2004), *Blutaparon portulacoides* (SALVADOR et al., 2002), *Gomphrena martiana*, *G. boliviana* (SIQUEIRA, 1992). Pomilio et al (1992) estudou a atividade antimicrobiana de *G. martiana* e *G. boliviana* e, mais recentemente, Moura et al (2004) descreve propriedades antimicrobiana a *Gomphrena celosioides*.

O gênero *Alternanthera*, pertencente à família Amaranthaceae, tribo Gomphreneae, apresenta diversas espécies que são utilizadas na medicina popular. Este gênero contém 180 espécies, sendo que destas, 30 ocorrem no Brasil (SIQUEIRA ; GUIMARÃES, 1984). O gênero *Alternanthera* tem se mostrado rico em espécies promissoras quanto à atividade biológica como antineoplásica (*A. brasiliiana*), antiviral (*A. philoxeroides*), antimicrobiana (*A. marítima* e *A. tenella*) e antioxidante (*A. tenella*). (SALVADOR et al., 2006; SIQUEIRA ; GUIMARÃES, 1984; SIQUEIRA, 1987).

A espécie *A. marítima* é uma herbácea comumente encontrada nas restingas brasileiras, porém não é utilizada na medicina popular (SALVADOR et al., 2004). Apesar disto, seus extratos tem apresentado diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana (SALVADOR et al., 2004), antioxidante (DE SOUZA et al., 2006) e imunomodulatória (MORAES et al., 1994). Estudos químicos prévios têm demonstrado a ocorrência de flavonóides, saponinas e esteróides como ativos majoritários nos extratos deste vegetal, dentre outros compostos (Figuras 1 a 6) (SALVADOR ; DIAS, 2004; SALVADOR, 2005; SOUZA et al., 2006). Além disso, análise previa dos extratos deste vegetal mostrou que os mesmos apresentam absorção na região espectral do visível compatível com aplicação em PDT, o que encorajou o presente estudo para avaliação do efeito dos extratos deste vegetal

como fotossensibilizador natural com possível aplicação em PDT antimicrobiana em concentração subinibitória mínima.

Flavonóides

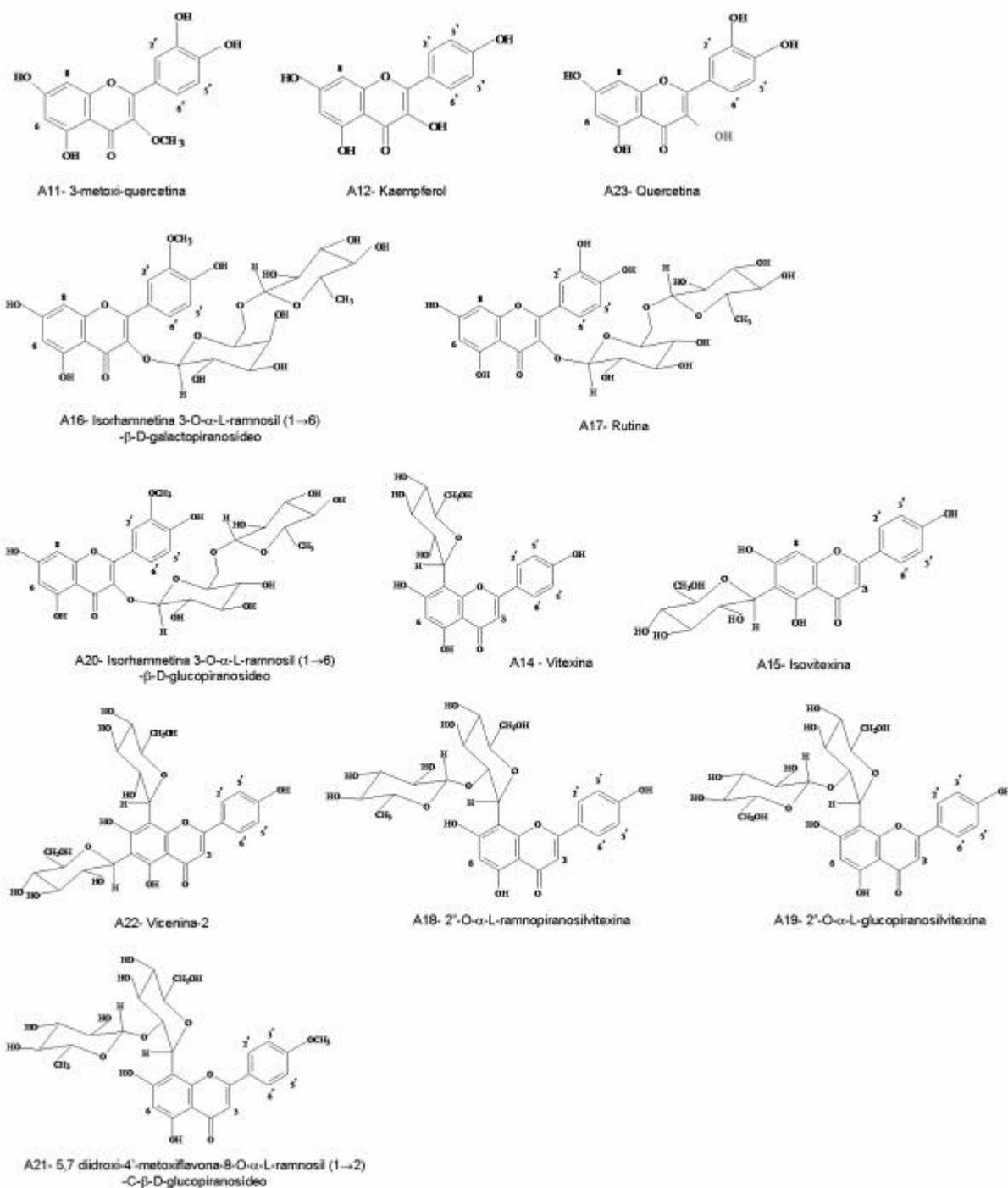


Figura 1: Constituintes químicos identificados de *Alternanthera maritima* - Flavonóides (SALVADOR, 2005).

Saponinas esteroidais

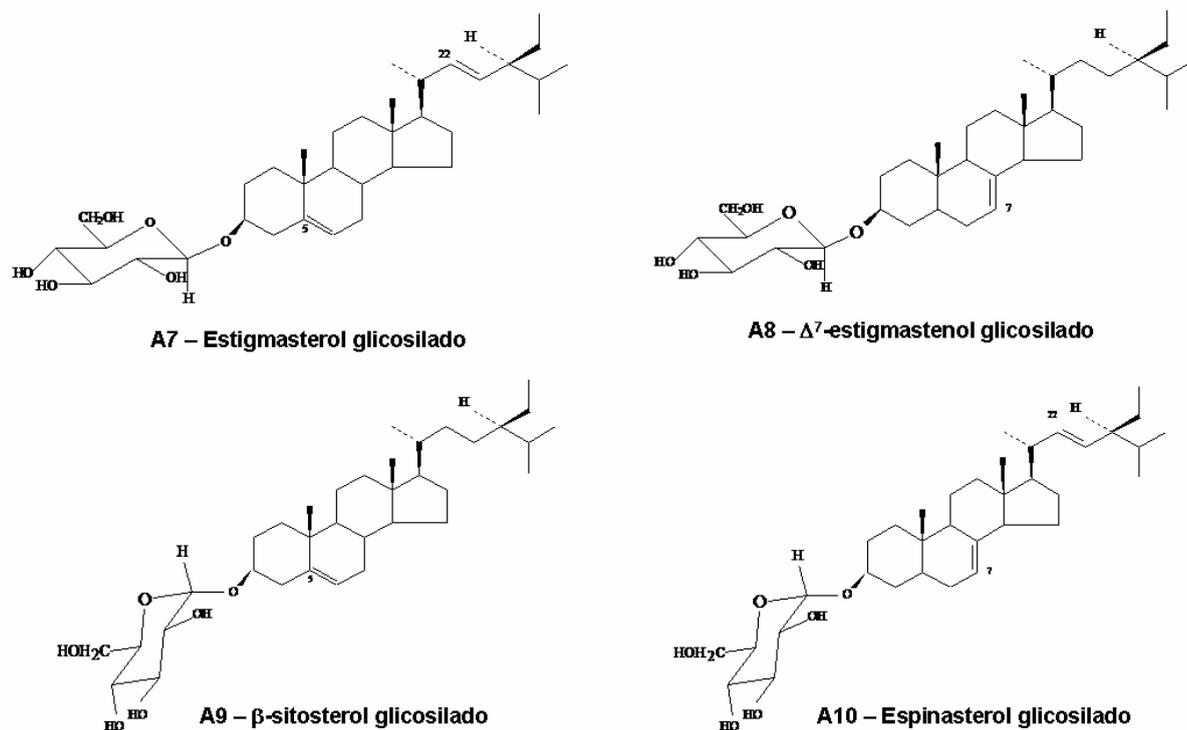


Figura 2 Constituintes químicos identificados de *Alternanthera maritima* - Saponinas Esteroidas (SALVADOR, 2005).

Esteróides

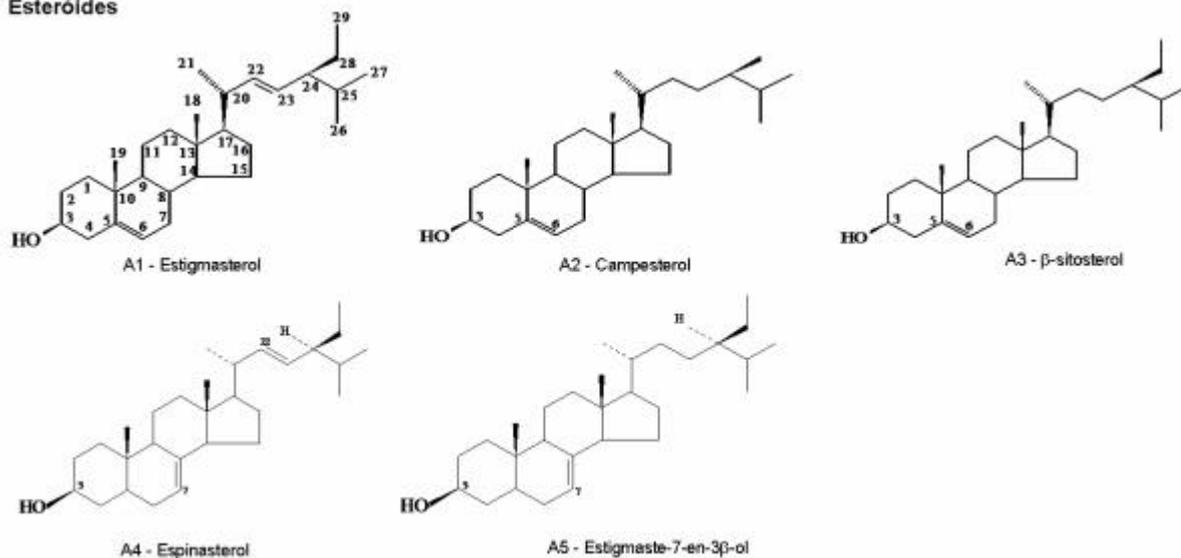


Figura 3 Constituintes químicos identificados de *Alternanthera maritima* - Esteróides (SALVADOR, 2005).

Triterpenos

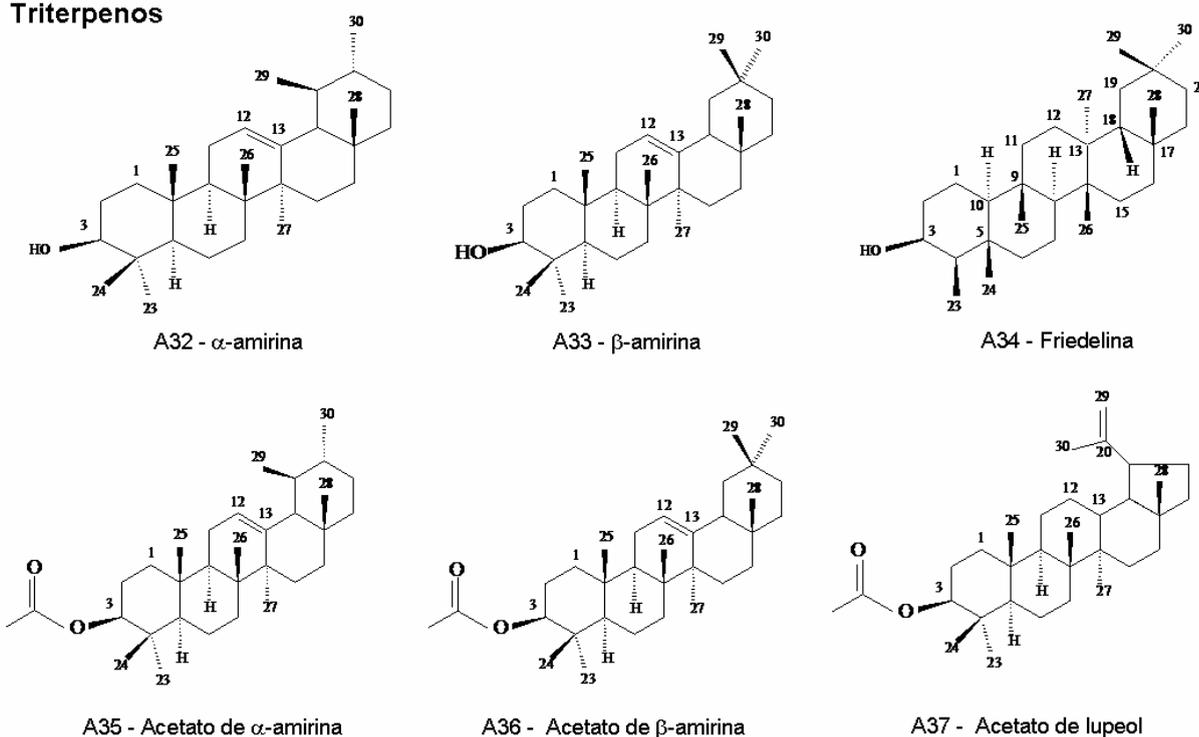


Figura 4: Constituintes químicos identificados de *Alternanthera maritima* - Triterpenos (SALVADOR, 2005).

Ácidos carboxílicos

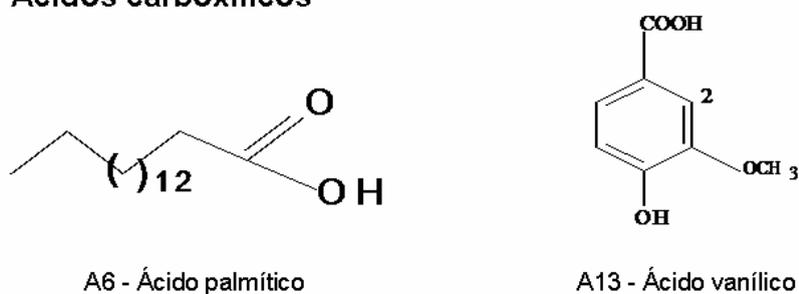


Figura 5: Constituintes químicos identificados de *Alternanthera maritima* - Ácidos Carboxílicos (SALVADOR, 2005).

Substâncias constituídas pelo grupo feniletil

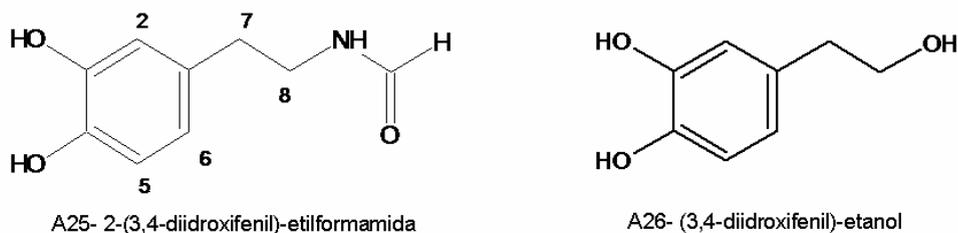


Figura 6: Constituintes químicos identificados de *Alternanthera maritima* - Grupo Feniletil (SALVADOR, 2005).

3.4 Formulações Farmacêuticas Semi-sólidas

Formulações farmacêuticas semi-sólidas, de maneira geral são constituídas principalmente por sistemas dispersos, estando dentro deste tipo de preparações, por exemplo, os cremes, géis cremes e pomadas.

Emulsões, de modo geral, são formas farmacêuticas que possibilitam preparar misturas relativamente estáveis de dois líquidos imiscíveis (oleoso e aquoso), sendo a emulsificação o processo de preparação das emulsões (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA ; ALVES, 1967). Em uma emulsão uma fase está dispersa em uma segunda fase formando gotículas, cujo diâmetro varia de 0,1 a 10 μm , mas não ultrapassa de 100 μm de diâmetro. Assim, uma emulsão consiste de uma fase dispersa (fase interna ou descontínua) em um meio dispersante (fase externa ou contínua) e um agente emulsificante (ANTUNES, 2002; DA FONSECA ; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

Pós insolúveis e soluções aquosas podem ser incorporadas por espatulação ou utilizando um almofariz ou um pistilo. É prudente utilizar um agente levigante, como a glicerina ou o propilenoglicol, para auxiliar a mistura do pó insolúvel à emulsão. Materiais na forma cristalina deveriam ser dissolvidos em uma pequena quantidade de água, antes de sua adição a emulsão. Materiais hidrossolúveis podem ser adicionados pela dissolução do pó em uma pequena quantidade uniforme do óleo no veículo. Geralmente é mais fácil adicionar componentes hidrossolúveis. Quando se emprega aquecimento para incorporar à um veículo O/A é importante trabalhar rapidamente, visto que a água pode evaporar rapidamente. Quando isso ocorre, o produto terá seu volume alterado e, no caso de um semi-sólido, pode ficar muito consistente e com aspecto seroso (ALLEN, 2004).

Os óleos e os pós lipossolúveis podem ser diretamente incorporados na fase externa ou dissolvidos em pequena quantidade de óleo e então incorporados à emulsão por espatulação ou utilizando um almofariz e um pistilo. As substâncias insolúveis na fase aquosa e oleosa devem ser levigadas com um agente levigante lipossolúvel e adicionadas à emulsão. As substâncias hidrossolúveis podem ser dissolvidas em pequena quantidade de água e incorporadas à emulsão. Na maioria das emulsões A/O, existe agente emulsificante suficiente para emulsificar quantidades razoáveis de soluções aquosas de um fármaco, que podem ser

incorporadas por espatulação com o almofariz e o pistilo ou com aquecimento suave em banho-maria (ALLEN, 2004).

Uma emulsão óleo em água (O/A) ocorre quando a fase dispersa é apolar (óleo) e o meio dispersante é polar (água). São miscíveis com água, laváveis com água, podem absorver água, não são oclusivas e não são untuosas (ANTUNES, 2002; DA FONSECA ; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA ; ALVES, 1967).

Emulsão água em óleo (A/O), a fase dispersa é a água e o meio dispersante é o óleo. São insolúveis em água, não são laváveis com água, podem absorver água, são oclusivas e podem ser untuosas (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

O propósito do uso de um agente emulsificante é de manter a estabilidade da emulsão, reduzindo a tensão interfacial (tensoativo), diminuindo a tendência que as gotículas têm para coalescer ou agrupar-se em micelas maiores, com eventual separação das duas fases, ou por aumentarem a viscosidade da fase externa da emulsão. Logo, a estabilidade de uma emulsão depende das propriedades do emulsificante (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

Entre os tensoativos empregam-se substâncias hidrossolúveis, indispensáveis nos cremes de O/A, enquanto que para os cremes tipo A/O utilizam-se compostos oleossolúveis. Os produtos que atuam aumentando a viscosidade da fase externa são hidrossolúveis e, são aplicáveis aos cremes de óleos em água, enquanto que os lipossolúveis podem auxiliar a estabilização de cremes de água em óleo (DA FONSECA ; PRISTA, 2000).

As emulsões podem ser divididas em três tipos em função da carga elétrica do emulsionante utilizado. As emulsões aniônicas proporcionam liberação mais rápida dos princípios ativos, quando comparadas com as não iônicas. Porém, devido à sua carga negativa, são incompatíveis com ingredientes catiônicos com substâncias que reduzem o pH a valores inferiores a 4 (ANTUNES, 2002; DA FONSECA ;PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA ; ALVES, 1967).

As emulsões catiônicas são aplicadas para condicionamento dos cabelos. Os emulsionantes catiônicos possuem alto potencial de irritabilidade na pele e mucosas,

em comparação aos outros tipos de emulsionantes (ANTUNES, 2002; DA FONSECA ; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

Os emulsionantes não iônicos não apresentam carga elétrica predominante e são os emulsionantes que permitem maior flexibilidade de uso na preparação de emulsões por serem compatíveis com a maioria dos princípios ativos e atuam na faixa de pH de 2,0 a 12,0 (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

Os cremes são sólidos macios ou líquidos viscosos, opacos e destinados às aplicações externas. Eles podem conter medicamentos dissolvidos ou suspensos em emolientes ou evanescentes. Portanto, podem ser tanto do tipo A/O quanto O/A (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA ; ALVES, 1967).

O termo “creme” é mais frequentemente aplicado às preparações cosmeticamente aceitáveis, do tipo O/A. São usados geralmente em lesões úmidas ou exudativas, por possuírem um efeito “secativo”, uma vez que os fluidos serão miscíveis com a fase externa aquosa do creme (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

Os cremes A/O têm indicação para as dermatites subagudas com pele fina e ressecada e com risco de rachadura ou já rachada e também tem indicação em dermatites crônicas recentes com escassa descamação ou discreta ceratose, porém, elevando a porcentagem de óleo (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA ; ALVES, 1967).

Os géis são formados por macromoléculas orgânicas ou inorgânicas, com propriedades de reter moléculas de água em sua estrutura, originando dispersões viscosas. Existem os géis inorgânicos, derivados de sílica que apesar de serem bem tolerados são muito ressecantes para a pele (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

Os géis possibilitam um excelente sistema para liberação de fármacos por diferentes vias de administração e são compatíveis com diversas substâncias. Géis contendo promotores de penetração são especialmente populares para administração de medicamentos antiinflamatório e antieméticos. Eles são

relativamente fáceis de preparar e muito eficazes (ANTUNES, 2002; DA FONSECA; PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

A pele humana é essencialmente constituída de três camadas de tecidos: a epiderme celular, estratificada e avascular, é limitada ao exterior por uma camada córnea e no interior por uma camada basal germinativa; a derme é formada de tecido conjuntivo, que é uma camada fibrosa na qual circulam vasos capilares e linfáticos e a hipoderme que separa a derme dos tecidos subjacentes. Sua constituição varia muito segundo a região do corpo, e contem algumas panículas subcutâneas (ANTUNES, 2002; AULTON, 2001).

A pele é coberta de pêlos que são inclusos numa depressão cutânea, que constitui o folículo piloso e as glândulas sebáceas; a pele lisa das solas dos pés e palmas das mãos produz uma epiderme espessa com estrato córneo compactos, mas não contem folículos pilosos e nem glândulas sebáceas. As glândulas sudoríparas são constituídas por um longo tubo que entra na hipoderme, enrolando-se (ANTUNES, 2002; AULTON, 2001).

A pele desempenha funções variadas: como função mecânica que confere elasticidade à pele; função protetora através de barreira microbiológica, que auxilia na proteção com a perda de corneócitos (escamas) juntamente com a microbiota normal da pele; barreira química barrando a entrada de moléculas indesejadas do meio externo; barreira a irradiações através de produção de melanina pelos melanócitos; barreira térmica e regulação de temperatura para conservar o calor e para a perda de calor, mantendo a temperatura corpórea a 37°C; e barreira elétrica uma vez que a pele seca confere maior resistência e impedância comparado a outros tecidos biológicos (ANTUNES, 2002; AULTON, 2001).

A pele constitui uma barreira muito eficaz, mas pode ser atravessada por pequenas quantidades de substâncias lipofílicas capazes de penetrar nas camadas córneas. Se estas substâncias possuem também uma determinada hidrofília, pode ocorrer uma difusão mais profunda e as vezes uma absorção sistêmica (ANTUNES, 2002; AULTON, 2001).

Os fármacos aplicados na pele podem tanto agir no local da aplicação, como produzir efeitos sistêmicos, que é a capacidade do fármaco, após penetrar a derme, de atravessar a parede dos capilares sanguíneos, que situam-se bem abaixo das

células da epiderme, encontrando acesso imediato à circulação geral (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

O mecanismo de penetração dos princípios ativos é muito complexo, e depende de muitos fatores como a natureza do princípio ativo, propriedades físicas e mecânicas, solubilidade, a presença ou não de tensoativos, e a quantidade de excipiente que o carrega, bem como a região de aplicação, levando em consideração a quantidade de folículos pilosos e a camada de queratina; grau de hidratação da pele e pH da emulsão (ANTUNES, 2002; PRISTA; ALVES, 1967).

Pomadas, cremes e pastas são preparações semi-sólidas nas quais o fármaco é contido em base adequada de caráter hidrófilo ou hidrófobo. Essas bases têm papel importante na formulação dessas preparações e não existe uma que seja universalmente adequada como carreadora de todos os princípios ativos ou para todas as indicações terapêuticas. A base adequada é determinada individualmente para proporcionar a velocidade de liberação, as qualidades de permanência depois da aplicação e a textura desejada (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

As pomadas e cremes geralmente são indicadas quando se é necessário ação terapêutica, já as pastas são indicadas para quando se necessita ação protetora, pois estas contêm mais materiais sólidos, tornando-as mais duras e menos penetrantes, ótima para lesões cutâneas pela capacidade protetora e de absorção de corrimentos serosos das lesões (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

As pomadas são misturas simples de fármacos em uma base, enquanto que os cremes são emulsões semi-sólidas do tipo óleo em água ou água em óleo e em geral são menos viscosos e mais suaves (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Os cremes evanescentes geralmente são emulsão de óleo em água que contém grande porcentagem de água e de ácido esteárico. Após a aplicação a água evapora deixando um fino filme residual de ácido esteárico (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

A indústria farmacêutica geralmente comercializa suas preparações tópicas em forma de pomada e de creme, sendo indicado de acordo com a preferência do paciente e do médico (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Muitos pacientes e médicos preferem cremes às pomadas devido ao seu caráter não gorduroso, tornando-os mais fáceis de aplicar, e a sua capacidade de “evanescer” ao serem esfregados na pele, tornando-os mais fáceis de remover (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

As pomadas ou cremes de consistência elevada são destinados à aplicação sobre a pele. As matérias-primas vegetais incorporadas abrangem desde as sólidas, como extratos secos e pós, até as líquidas, como soluções extrativas nos mais diversos sistemas de solventes (TOLEDO et al., 2003).

Gel é uma das formas farmacêuticas e cosmética mais aceitas recentemente. Os géis devido a sua aparência cristalina (efeito visual), por transmitirem sensação de bem estar por serem muitas vezes laváveis com água, hidrossolúveis, higroscópicos, não gordurosos e também por atuarem como bases de absorção, fazem com que o consumidor e os profissionais de saúde apreciem a idéia de pureza e refrescância (ANTUNES, 2002; DA FONSECA;PRISTA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002; PRISTA; ALVES, 1967). Géis são sistemas semi-sólidos nos quais o movimento do meio dispersante é restrito por uma rede tridimensional de partículas interlaçadas ou macromoléculas solvatadas presentes na fase dispersa. Pode estar envolvido um alto grau de interações físicas ou químicas. O aumento da viscosidade causado pelo entrelaçamento e conseqüente atrito interno é responsável pelo estado semi-sólido (ALLEN, 2004).

As resinas de carbopol são os agentes gelificantes mais comumente utilizados. Existem vários tipos de resinas de Carbopol que atribuem características distintas ao gel produzido. Quando dispersa em água, a resina de Carbopol umecta e forma uma dispersão aquosa (resina/água) com valor de pH na faixa de 2,8 a 3,2. Neste estado pré-dissolvido a molécula de Carbopol está extremamente enrolada e sua capacidade espessante é limitada. Para obter o espessamento é necessário a neutralização com bases inorgânicas, como o hidróxido de sódio ou aminas de baixo peso molecular (trietanolamina, por exemplo). Ao acrescentar trietanolamina ou hidróxido de sódio, o polímero (Carbopol) “estica”, devido a neutralização dos grupos carboxilas presentes no polímero (ALLEN, 2004).

3.5 Laser

Albert Einstein, em 1917, formulou a Teoria da Emissão Estimulada, onde o átomo, em condições especiais, pode ser excitado para um nível quântico energético mais alto, a partir do processo de bombardeamento de um meio ativo. Após excitação do átomo para níveis superiores de energia, observa-se a emissão espontânea de energia, onde o excesso de energia acumulado pelo átomo é

liberado na forma de um par de fótons coerentes que apresentam a mesma frequência, comprimento e direção, originando o feixe de laser que possui mais potência do que outras radiações ópticas, assim o átomo retorna do seu estado excitado para um nível inferior de energia (PINHEIRO, 1998).

A palavra LASER é a abreviatura de "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*", ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Laser é um aparelho que gera ou amplifica radiação óptica coerente na região do infravermelho, visível e ultravioleta do espectro eletromagnético. Os feixes de radiação emitidos pelos lasers possuem importantes características de monocromaticidade, coerência espectral ou espacial (única direção) e coerência temporal (coerência dos fótons, amplificando a intensidade do laser) (BRUGNERA ; PINHEIRO, 1998).

Na década de 60 o cientista Theodore Maiman, desenvolveu o primeiro emissor de laser de rubi, usando uma barra de rubi sintético. Também na década de 60 houve o desenvolvimento dos lasers de hélio-neônio (He-Ne), neodímio-ítrio-alumíniogranada (Nd-YAG) e dióxido de carbono (CO₂) (BRUGNERA, 2003). O laser terapêutico, sem efeito de corte, mas com ação biomoduladora, foi criado em 1965, por Sinclair e Knoll (BRUGNERA, 2003).

Mester, em 1968, foi o primeiro a empregá-lo na clínica médica e defendia a idéia de que os lasers de rubi e argônio, em baixa intensidade, aceleravam a cura de úlceras crônicas (REDDY, 2004).

No final da década de 70, surgiram os lasers terapêuticos arsenieto de gálio (GaAs) e arsenieto de gálio alumínio (GaAlAs), na faixa infravermelha, com emissão de luz visível, variando de 660 a 904 nm (ORTIZ et al., 2001).

Desta forma o laser começou a ser utilizado na área da saúde como coadjuvante no tratamento de doenças de pele e pequenos tumores. Atualmente o uso da radiação laser pode ser observado em quase todas as áreas de tratamento de saúde com elevado índice de sucesso (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998; MIDDA; RENTON-HARPER, 1991).

3.5.1 Dosimetria, Densidade de Energia, Fluência

Dosimetria, densidade de energia e/ou fluência expressa a dose de tratamento, é a energia total transmitida por um feixe laser por unidade de área, medida em Joule por centímetro quadrado (J/cm^2) (GENOVESE, 2000), ou seja, é a relação entre a energia administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio de luz laser (BRUGNERA, 2003). O termo refere-se à unidade de superfície irradiada e não à totalidade de energia emitida (ALMEIDA-LOPES; MASSINI, 2002), sendo o critério de verificação da eficácia e referência da reprodutibilidade da terapia. Logo a dosimetria está diretamente relacionada com o sucesso ou insucesso do tratamento e/ou diagnóstico (BRUGNERA; VILLA; GENOVESE, 1991; BRUGNERA, 2003).

$$\text{Densidade de Energia } (\text{J}/\text{cm}^2) = \frac{\text{Energia (J)}}{\text{Área } (\text{cm}^2)}$$

3.5.2 Potência

Potência é a capacidade do aparelho fornecer energia e provocar maior ou menor reação fotobiológica, ou seja, a potência relaciona o trabalho realizado por uma força, com o tempo gasto para realizar esse trabalho (GENOVESE, 2000) e é representada pela fórmula:

$$\text{Potência (W)} = \frac{\text{Energia (J)}}{\text{Tempo (segundos)}}$$

3.5.3 Densidade de Potência, Irradiância

A densidade de potência, ou irradiância, é a potência da saída da luz por área irradiada, medida em Watts por centímetro quadrado (W/cm^2). Ressaltando, que variações na densidade de potência, do tempo de irradiação ou de ambos podem resultar em uma mesma dose de luz (WAINWRIGHT, 1998).

$$\text{Densidade de Potência (W/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência (W)}}{\text{Área (cm}^2\text{)}}$$

3.5.4 Características da luz laser

Os lasers aparecem em uma grande variedade de formas e são caracterizados pelo comprimento de onda, pelo tipo de material ativo utilizado e técnicas de bombeamento ou ativação. Os feixes de radiação emitidos pelo laser possuem importantes características de monocromaticidade (pureza espectral), que indica que o meio que gera o feixe laser corresponde a um único comprimento de onda, garantindo a seletividade; a colimação ou coerência espacial (direcionalidade), que se refere ao grau de paralelismo do feixe laser, com divergência angular muito pequena, permitindo que, por meio de um sistema de lentes, se consiga concentrar toda a energia do laser de uma forma precisa em um ponto focal; e coerência temporal (intensidade), que é a sincronicidade das ondas de luz, ou seja, quando os fótons estão ajustados em um plano espacial, paralelos entre si, amplificando a intensidade do laser (Figuras 7 e 8) (ORTIZ et al., 2001; MIDDA; RENTON-HARPER, 1991; GENOVESE, 2000; KNAPPE; FRANK; ROHDE, 2004).

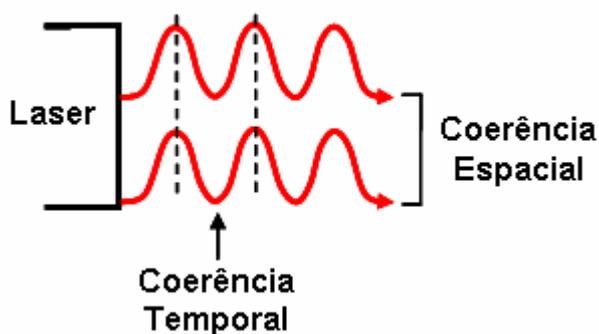


Figura 7: Coerência temporal e espacial, sincronização do movimento da onda devido à emissão estimulada que gera fótons coerentes cujas energias somam-se e propagam-se na mesma direção no tempo e no espaço.

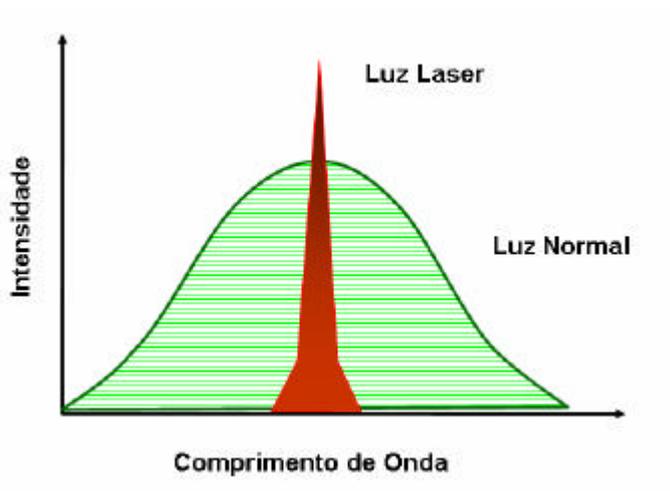


Figura 8: Monocromaticidade, fótons da mesma cor, mesmo comprimento de onda, mesma frequência e energia.

3.5.5 Tipos de Laser

Os lasers são classificados em laser cirúrgico ou de alta potência e laser não cirúrgico ou de baixa potência (ORTIZ et al., 2001).

a) Laser Cirúrgico

O laser cirúrgico é conhecido como laser de alta potência, laser ablativo, hard laser, laser de alta intensidade de energia (HILT-High Intensity Laser Treatment). Causa fotodestruição celular por elevação da temperatura do tecido com ação fototérmica que desnatura o conteúdo protéico da célula, o que determina propriedades de corte, coagulação, vaporização do conteúdo hídrico da célula e carbonização do tecido (Figura 9) (GENOVESE, 2000; BRUGNERA, 2003). Os três componentes mais comuns desse grupo são os lasers de argônio, de CO₂ e Nd-YAG (PINHEIRO ; FRAME, 1992).

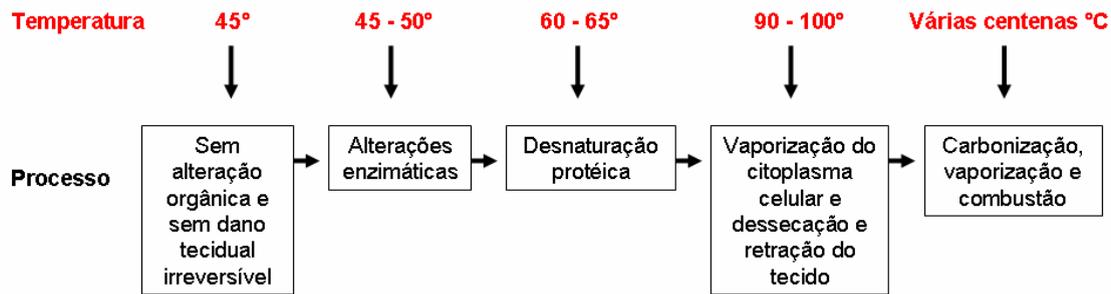


Figura 9: Efeitos do laser de alta potência sobre o tecido em temperaturas crescentes (KNAPPE; FRANK; ROHDE, 2004).

b) Laser Terapêutico

O laser terapêutico possui baixa potência e é também denominado laser clínico ou não-cirúrgico, laser não-ablativo, laser frio, soft laser, LILT (Low Intensity Level Treatment) ou LLLT (Low Level Laser Therapy). Os lasers terapêuticos mais comumente empregados são:

- Hélio-Neônio (He-Ne), que apresenta comprimento de onda na faixa do visível (632,8 nm) de cor vermelha;
- Diodo ou semicondutores, arsenieto de gálio (GaAs), que atua no infravermelho e varia de 830 nm a 920 nm;
- Arsenieto de gálio alumínio (GaAlAs), que apresenta comprimento de onda desde o vermelho ao infravermelho, variando entre 620 e 830 nm, com características semelhantes ao He-Ne (PINHEIRO, 1998; GENOVESE, 2000).

Na maioria dos semicondutores, a energia é liberada na forma de calor, porém, em materiais como o gálio, o alumínio e o arsênio, é liberada na forma de fótons (PINHEIRO, 1998).

Com os avanços tecnológicos em microeletrônica têm possibilitado a construção e comercialização de um tipo alternativo de diodos geradores de laser, construído com uma mistura dos elementos Gálio, Alumínio, Índio e Fósforo (InGaAlP), a fim de substituir ampolas de HeNe, diminuindo os custos de produção e de aquisição. Esse equipamento laser diodo de fosfeto de índio gálio alumínio (InGaAlP), gera laser com comprimento de onda dentro do espectro vermelho visível, 600 a 680 nm com potência entre 10 e 50 mW (WALSH, 1994), sendo

compatível com aqueles comprimentos de onda derivados do HeNe, porém, ainda são poucas as publicações referentes aos efeitos benéficos relacionados a esse tipo de laser.

c) Ação de Laser Terapêutico

A terapia laser de baixa potência tem sido amplamente empregada na medicina com várias finalidades, como na bioestimulação tecidual, promovendo a hemostasia e estimulação da cicatrização (PINHEIRO e FRAME, 1992); no alívio da dor (ação analgésica); no controle no processo inflamatório com reabsorção do edema e inativação de catabólitos intermediários (GENOVESE, 2000); em patologias cutâneas possui a capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos, além de diminuir o edema local, favorecendo a neovascularização (BELKIN; SCHWARTZ, 1989); e na regeneração óssea (SAITO; SHIMIZU, 1997).

Pela ação de mediadores químicos, o efeito do laser terapêutico pode alcançar sítios anatômicos distantes. Desta forma, os efeitos do laser terapêutico não se limitam ao local de aplicação (Figura 10). Além disso, o laser terapêutico tem efeito no tecido saudável e nas feridas em indivíduos saudáveis (TÚNER ;HODE, 1998).

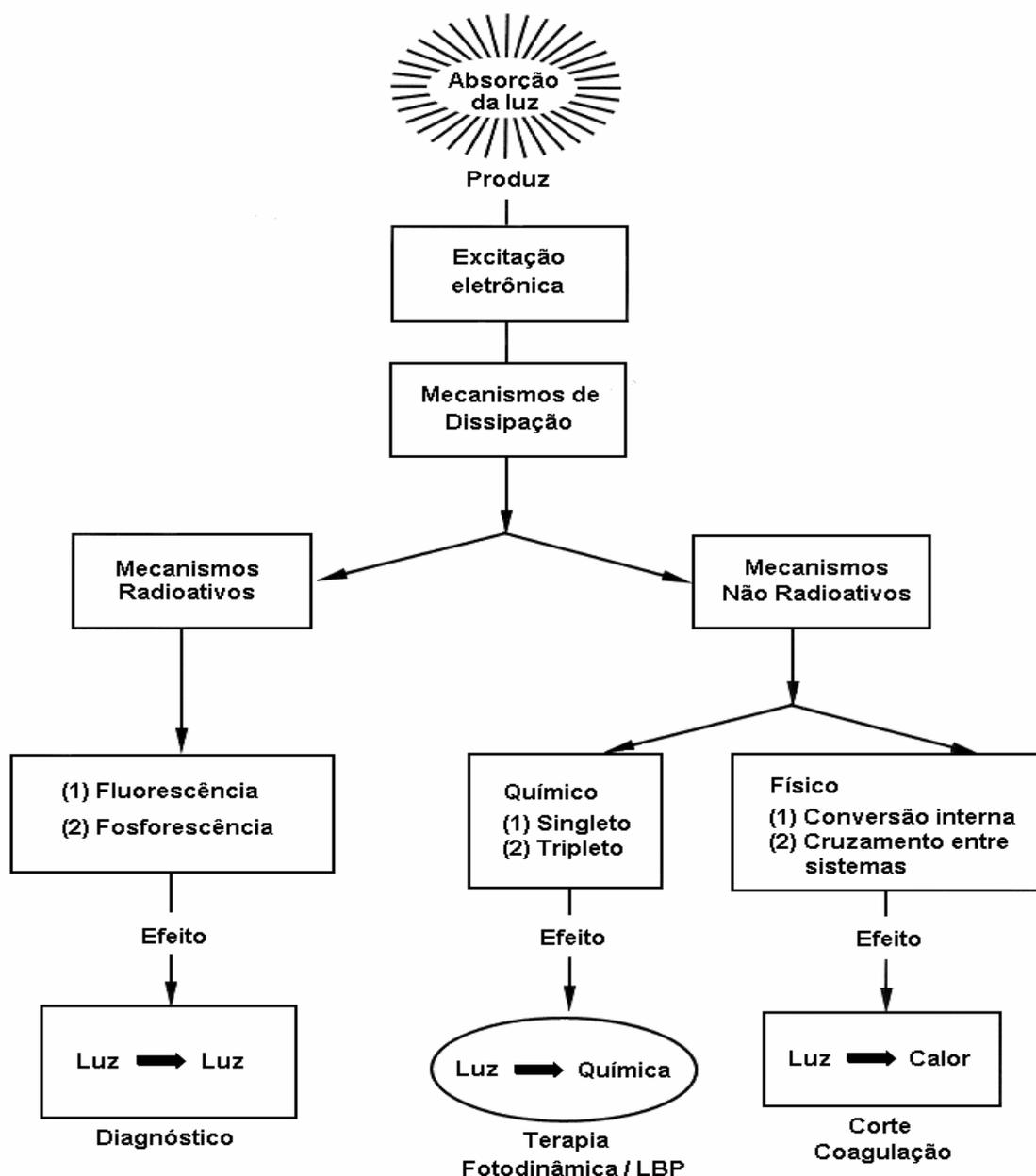


Figura 10: Conversão de energia em processos estimulados por luz.

3.6 Terapia Fotodinâmica (PDT)

A terapia fotodinâmica representa um sistema terapêutico que envolve a administração de um agente fotossensibilizador seguida pela ativação do mesmo pela luz, resultando em uma seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que geram produtos fototóxicos danosos à célula-alvo (DOUGHERTY et al., 1998; BLISS et al., 2004). Sendo assim, a terapia fotodinâmica baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico sensível à luz, seguida de irradiação

em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado (FUCHS; THIELE, 1998; PERUSSI, 2007).

Em 1900, data a primeira demonstração de fotossensibilização letal de células, o aluno de medicina Oscar Raab, juntamente com seu professor Herman Von Tappeiner, verificou que a acridina vermelha, em baixas concentrações, quando exposta à luz normal do dia apresentava efeito de inativação do *Paramecium*, protozoário causador da malária, o que não era observado no escuro (KESSEL, 2004). No mesmo ano, o neurologista francês Prime, observou que ao utilizar eosina oral no tratamento de epilepsia, esta induziu dermatites nas áreas da pele expostas ao sol. A partir desta descoberta, Von Tappeiner e o dermatologista Jesionek iniciaram a utilização da associação de eosina tópica e luz branca para o tratamento de tumores cutâneos. Partindo deste princípio, Von Tappeiner e Jodlbauer em 1907, demonstraram a necessidade da presença de oxigênio nas reações de fotossensibilização e nomearam o termo “ação fotodinâmica” para descrever o fenômeno.

3.6.1 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são agentes, geralmente exógenos, que, sob iluminação em determinado comprimento de onda e na presença de oxigênio encontrado nas células, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que são citotóxicas (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; RIBEIRO; GROTH, 2005; PERUSSI, 2007). Os fotossensibilizadores podem ser administrados por via tópica, intralesional e sistêmica antes da subsequente exposição à luz (ORTH et al., 2000).

Os fotossensibilizadores podem ser hidrofílicos, lipofílicos ou anfifílicos. Essa característica afeta os parâmetros fotofísicos e a eficácia do fotossensibilizador, assim como determina a via de administração *in vivo* do mesmo: oral, endovenosa, intraperitoneal ou tópica. Fotossensibilizadores hidrofóbicos têm alta tendência à agregação em meio aquoso e necessitam de conjugação com outras moléculas como, por exemplo, lipossomos (NYMAN; HYNNINEN, 2004). Os fotossensibilizadores hidrofílicos podem acumular-se rapidamente na lesão e rapidamente serem excretados. Essa propriedade pode ser vantajosa para prevenir fotossensibilidade cutânea ao corante (SEGUCHI et al., 2002).

Grande parte das moléculas fotossensíveis tem em sua estrutura um anel heterocíclico similar àquele presente na clorofila e hemoglobina. Quando moléculas fotossensíveis são expostas à luz, a energia luminosa é capturada e posteriormente é transferida para outras moléculas, resultando na liberação de espécies reativas de oxigênio, que interagem com os sistemas biológicos e produzem dano tecidual (ACKROYD et al., 2001).

A habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Outros requisitos importantes são que ele não apresente características tóxicas para as células do hospedeiro, além de permanecer em estado excitado por tempo suficiente para permitir a sua interação com as moléculas vizinhas e produzir espécies citotóxicas capazes de causar a morte celular (bacteriana) (ACKROYD et al., 2001; MACROBERT; BOWN; PHILLIPS, 1989).

O fotossensibilizador ideal caracteriza-se por baixa toxicidade após a administração, não induzindo reação alérgica nem hipotensão e deve absorver a luz no espectro vermelho ou vermelho-distante. Deve, também, ser facilmente sintetizado, ser um composto puro, hidrossolúvel e ser eliminado rapidamente pelo paciente (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Ainda, deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficaz, seletivo e minimamente tóxico aos tecidos normais (GARCEZ et al., 2003).

A maioria dos fotossensibilizadores que estão sendo empregados ou investigados para o tratamento do câncer e outras doenças é baseada em núcleos tetrapirrólicos incluindo porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas, devido a sua baixa toxicidade na ausência de luz em células de mamíferos e por suas propriedades de localização de tumor (DETTY; GIBSON; WAGNER, 2004, PERUSSI, 2007).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT) em sua maioria, emprega fotossensibilizadores derivados de corantes vitais que se caracterizam por não serem tóxicos às células humanas em concentrações superiores às requeridas para a inativação microbiana efetiva (WAINWRIGHT, 1998). Desta forma, os fotossensibilizadores que têm sido estudados para a erradicação de microorganismos pertencem a diferentes grupos de compostos, tais como os xantenos halogenados (Rosa de Bengala – RB), fenotiazídicos (Azul de toluidina O –

TBO, Azul de Metileno – AM), acridinas e conjugados de clorina (e_6) (PERUSSI, 2007).

a) Hematoporfirinas

Os fotossensibilizadores podem ser classificados por sua estrutura química ou por sua família. A primeira família descoberta foram os derivados da hematoporfirina (HpD), tais como protoporfirina (Figura 11) e hidroxietilvinildeuteroporfirina, cuja natureza exata deste composto ainda é controversa, o componente ativo da HpD tem recebido o nome DHE e está disponível no comércio como Photofrin®, fármaco de primeira geração, que é uma preparação semipurificada do HpD que constituem o principal grupo de medicamentos com aplicação clínica em PDT e foi o primeiro fotossensibilizador a obter aprovação regular para tratamento de câncer em vários países (ACKROYD et al., 2001; KANTONIS; TRIKERIOTIS; GHANOTAKIS, 2007).

O Photofrin® é relativamente seguro e atóxico, porém os pacientes devem evitar a luz solar por cerca de oito semanas após o uso, além disso, a falta de absorção em um comprimento de onda maior que 650 nm resulta em uma ação antineoplásica pouco eficaz (Figura 12) (SALVA, 2002; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

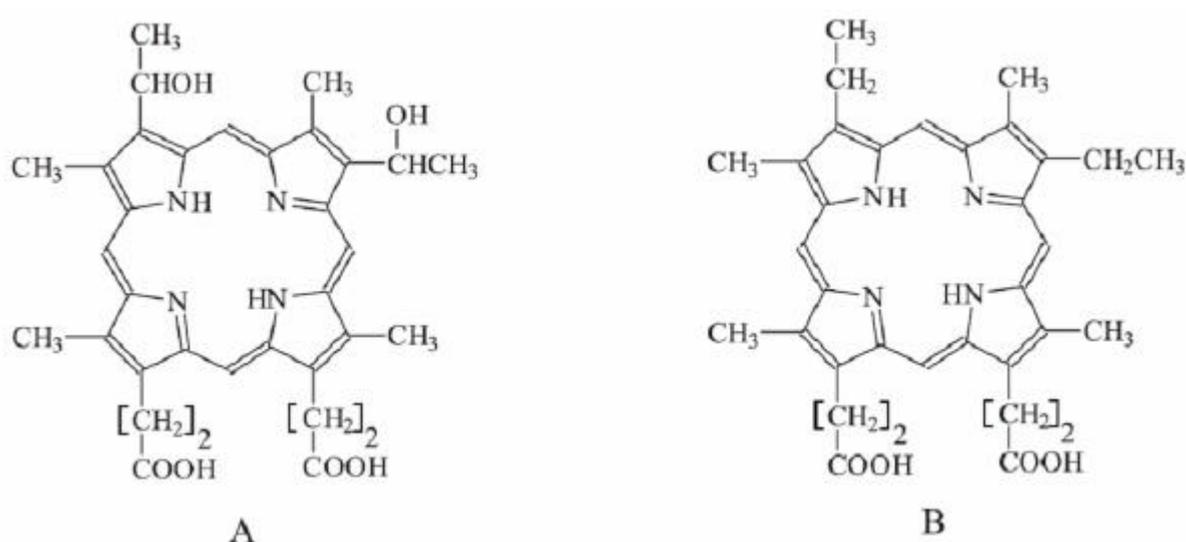


Figura 11: Estrutura química da hematoporfirina (A) e protoporfirina (B).

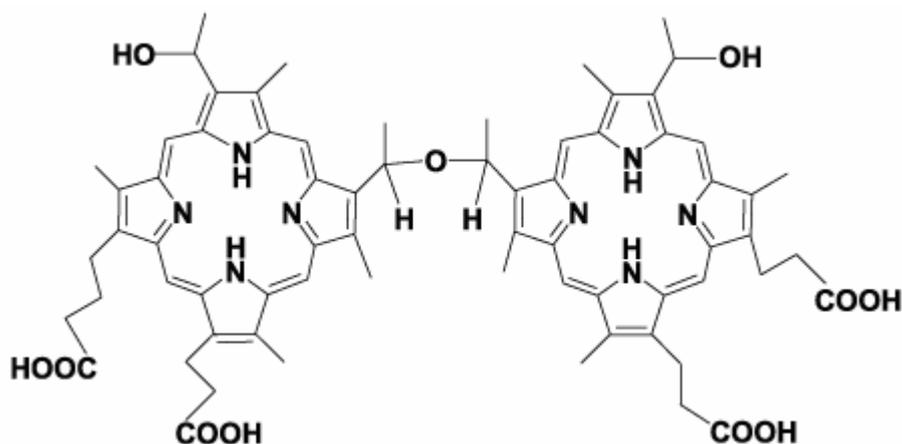


Figura 12: Representação da estrutura do agente fototerapêutico Photofrin®.

b) Ácido Aminolevulínico (ALA)

O ácido aminolevulínico (ALA) (Figura 13), precursor da hematoporfirina, não apresenta fotossensibilidade sistêmica quando aplicado topicamente e se caracteriza por ser uma substância pouco reativa que necessita de alta energia ou tratamentos mais longos com o inconveniente de ser acompanhado de sintomatologia dolorosa durante a aplicação (SALVA, 2002).

Sua utilização em PDT é com base na formação e acumulação endógena de protoporfirina IX (PpIX) após a administração tópica de ácido aminolevulínico. A protoporfirina IX (PpIX) é um precursor do heme, que se forma e acumula preferencialmente em tecidos com rápida renovação, e pertence à segunda geração de fotossensibilizadores, (KENNEDY; POTTIER; PROSS, 1990; ACKROYD et al., 2001; PERUSSI, 2007; UEHLINGER et al., 2000).

Embora a formação altamente regulada de protoporfirina IX exista em quase todas as células nucleadas (que contenham mitocôndrias), o acúmulo se dá principalmente em tecidos com alta atividade celular. O fenômeno de acumulação do fotossensibilizador em tecidos doentes não é específico para doenças neoplásicas ou pré-neoplásicas. A síntese do ácido aminolevulínico é normalmente controlada com rigor pela enzima ALA sintetase, provavelmente através do nível intracelular de heme. Quando o ácido aminolevulínico é fornecido à célula, subverte esse controle e resulta na acumulação da protoporfirina IX, que é convertida para heme pela ferroquelatase pela adição de ferro ao núcleo da protoporfirina IX. Uma vez que esse processo é lento, altos níveis de protoporfirina IX são encontrados no tecido, embora

para produzir um efeito fotodinâmico necessita de exposição à luz (PERUSSI, 2007).

O diagnóstico fotodinâmico empregando o ácido aminolevulínico (ALA) tem sido largamente realizado durante os últimos anos em muitos institutos do Japão e Alemanha, objetivando detectar tumores cerebrais tipo gliomas. O procedimento não é complexo e o cuidado pós-operatório do paciente é mais fácil em relação ao uso de outros agentes fotossensibilizadores (YAMAGUCHI; TAKAHASHI; TERAMOTO, 2007).

Há várias vantagens na fotossensibilização por protoporfirina IX induzida pelo ácido aminolevulínico, uma delas é que o organismo elimina protoporfirina IX rapidamente, o que limita o risco da fotossensibilidade a 1-2 dias (PERUSSI, 2007).

Estudos clínicos têm envolvido a aplicação tópica do ácido aminolevulínico para o tratamento de lesões de pele, devido a localização superficial. Além disso, o efeito a longo prazo do ácido aminolevulínico no tratamento de queratoses solares têm sido demonstrado benéfico em estudo *in vivo* eliminando a doença em 71% dos ratos testados. Em estudos aplicando-se ALA-PDT em verrugas de mão e pés os resultados foram significativamente melhores do que aqueles obtidos pelo tratamento padrão (crioterapia) (ACKROYD et al., 2001).

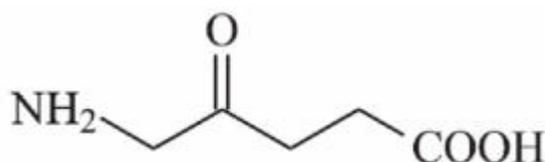


Figura 13: Estrutura química do ácido 5-aminolevulínico (ALA).

c) Ftalocianinas

Estes compostos têm a estrutura similar à hematoporfirina. O alumínio cloroftalocianina sulfonada (ALSPc), derivado das ftalocianinas, quando comparado aos derivados de hematoporfirinas (HpD), apresenta menor sensibilidade e toxicidade à pele quando exposta à luz ambiente, produz maior fotossensibilização levando a uma toxicidade maior quando exposta à luz vermelha. Fato que pode ser explicado devido ao seu caráter aromático grandemente aumentado, absorvendo mais intensamente na região do infravermelho próximo, quando comparado ao núcleo de porfirinas originais (ACKROYD et al., 2001).

Ftalocianinas têm por vantagem o rendimento alto de produção de formas reativas de oxigênio, maior que de um fotossensibilizador padrão como o azul de metileno (Figura 14). Além disso, têm demonstrado grande potencial na área de desinfecção dos produtos do sangue (PERUSSI, 2007).

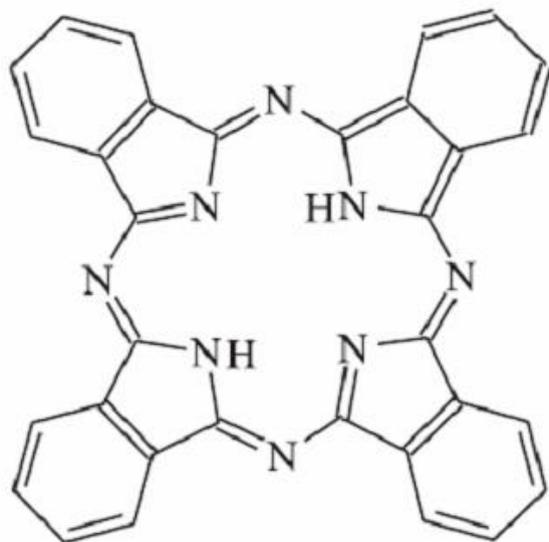


Figura 14: Estrutura química das ftalocianinas.

d) Clorinas

As clorinas são porfinas reduzidas e nesta família cita-se o Foscan®, de administração endovenosa que contém a substância ativa temoporfina (Figura 15). O tratamento com Foscan® é realizado em duas etapas: primeiramente o medicamento é administrado via endovenosa e a irradiação é feita somente quatro dias após a injeção. Quando Foscan® é administrado a temoporfina é distribuída pelo organismo, incluindo o interior do tumor. A aplicação de luz laser em um comprimento de onda específico ativa a temoporfina que reage com o oxigênio presente, formando um tipo de oxigênio altamente reativo e tóxico, que reage com as proteínas e DNA celulares, causando a morte celular (PERUSSI, 2007).

O Foscan® é um fotossensibilizador eficaz que necessita de apenas 20 J/cm² para ser ativado, sendo empregado na PDT de tumores de cabeça e pescoço. Porém também apresenta o inconveniente da dor durante a terapia e fotossensibilidade, enquanto a droga estiver ativa, mesmo na ausência de luz solar. Como o mesmo é injetado quatro dias antes da aplicação da luz, deve-se orientar o

paciente para evitar exposição direta à luz solar nesse período e uma semana após o tratamento. A sensibilidade é elevada mesmo à luz ambiente e persiste, no mínimo, por uma semana (ALLISON et al., 2004).

Além do Foscan®, outro representante importante das clorinas é o Photodithazine® que contém a substância ativa clorina e_6 , derivada da clorofila. É um fármaco de 2ª geração, que se encontra em fase de testes clínicos e apresenta resultados promissores como fotossensibilizador. O Photodithazine® apresenta duas importantes características; maior rendimento quântico de formação de oxigênios altamente reativos e intensa banda de absorção em comprimentos de onda maiores (650-660 nm) (PERUSSI, 2007).

Alguns estudos vêm sendo realizados aplicando clorinas e_6 como fotossensibilizador em PDT e resultados encorajadores estão sendo alcançados. Essa clorina e_6 demonstrou-se efetiva e segura e não apresentou efeitos colaterais além da fotossensibilidade transitória da pele. Essa clorina permanece no plasma por período maior que seis semanas (ACKROYD et al., 2001).

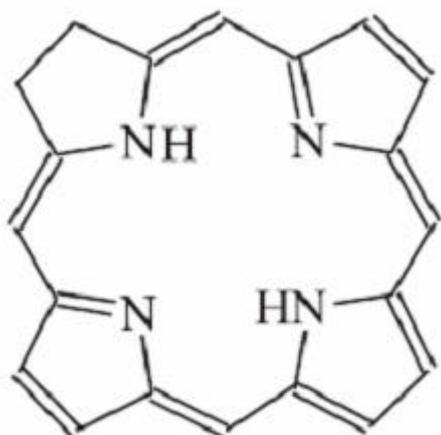


Figura 15: Estrutura química das clorinas.

e) *Hipericina*

A hipericina é um pigmento fotoativo natural produzido por plantas do gênero *Hypericum* da família *Guttiferae* com indicação terapêutica para quadros de distúrbios psicovegetativos, medo, agitação emocional, estados depressivos leves e moderados (Figura 16). Além disso, possui propriedades antiinflamatórias,

anti-infecciosas, entre outras, exibindo uma potente atividade fototóxica antitumoral *in vitro* e *in vivo*. A hipericina é provavelmente o mais potente fotossensibilizador encontrado na natureza. A produção sintética deste fotossensibilizador para aplicação em PDT tem se demonstrado promissora e alguns resultados indicam que esse fotossensibilizador pode induzir tanto apoptose quanto necrose de células tumorais (PERUSSI, 2007).

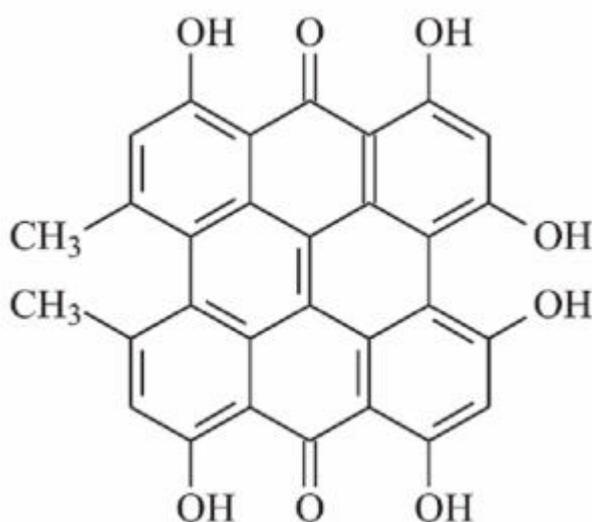


Figura 16: Estrutura química da hipericina.

f) Xantenos

São compostos aromáticos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear com um átomo de oxigênio no anel central, que absorvem luz na região do visível. Esses corantes não se ligam à membrana celular e localizam-se no citoplasma. São representantes desta classe os seguintes compostos: rosa de bengala, eosina Y, fluoresceína e eritrosina B (PERUSSI, 2007).

Rosa de bengala é um haleto derivado da fluoresceína que tem sido usado em oftalmologia como um corante para diagnóstico de várias patologias (Figura 17). Quando aplicado em inativação fotodinâmica (PDI), pode matar microorganismos tais como vírus, bactérias, protozoários e em PDT produz efeitos *in vitro* sobre células epiteliais, cardiomiócitos entre outros. Quando exposto à radiação no comprimento de onda de 532 nm promove basicamente reação do tipo II, gerando 80% de oxigênio singlete e 20% de ânion superóxido (PERUSSI, 2007).

Eosina Y é derivado de tetrabromo da fluoresceína e pode ser usado para corar o citoplasma, o colágeno e as fibras musculares para exame ao microscópio (Figura 17) (PERUSSI, 2007).

Eritrosina B apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias da cavidade oral. Este corante foi aprovado para uso bucal, o que representa uma vantagem sobre os demais fotossensibilizadores (PERUSSI, 2007).

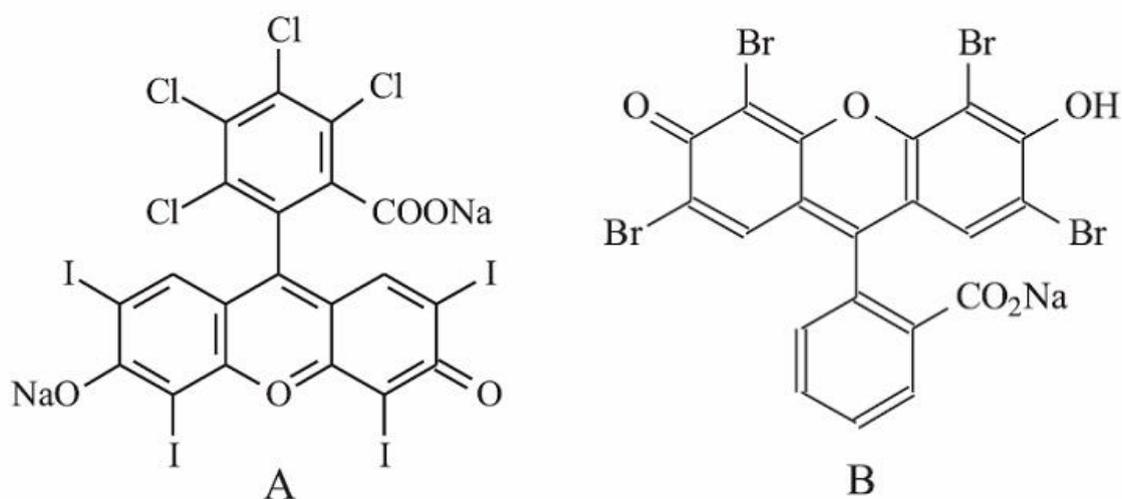


Figura 17: Estrutura química da rosa de bengala (A) e da eosina Y (B).

g) Fenotiazínicos

As propriedades do azul de metileno foram descritas no final do século XIX, pelo cientista alemão Ehrlich, sendo caracterizado como um composto tricíclico que anos mais tarde passou a ser o núcleo de um grupo de compostos derivados, denominados fenotiazinas (AMARAL; VIVEIROS; KRISTIANSEN, 2001).

Os corantes fenotiazínicos exibem intensa absorção entre 600-700 nm, região do espectro útil em PDT, por estar na “janela terapêutica” requerida para a eficiente penetração da luz nos tecidos. Além disso, esses corantes apresentam grande propensão à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete, que são os mediadores de ação dos fotossensibilizadores contra espécies microbianas, tanto aeróbias quanto anaeróbias, sem, no entanto, ser seletivo a elas (WAINWRIGHT e CROSSLEY, 2004; PERUSSI, 2007).

A banda de absorção do azul de metileno (Figura 18) varia entre 620 e 700 nm, com ótima penetração nos tecidos e absorção máxima em 665 nm em solução

aquosa, uma vez que são considerados hidrofílicos (FERNANDEZ; BILGIN; GROSSWEINER, 1997).

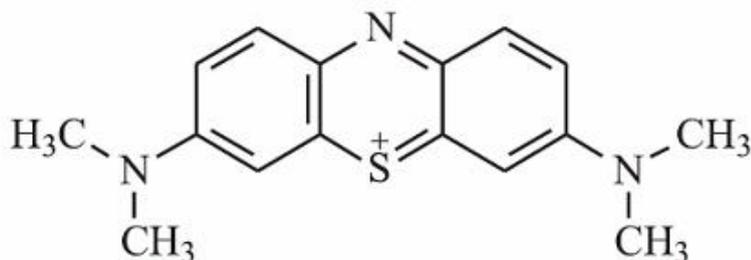


Figura 18: Estrutura química do do azul de metileno.

Para o azul de toluidina, também considerado hidrofílico (GARCEZ et al., 2003), a banda máxima de absorção é de 636 nm (TUIE e KELLY, 1993). O uso desses corantes pode ser tópico ou sistêmico e não apresenta toxicidade (MÜLLER et al., 1998). Devido à baixa toxicidade, aceitação no campo médico e potencial antimicrobiano fotoativo, o azul de metileno é o fotossensibilizador ideal para terapêutica antimicrobiana e antifúngica (TEICHERT et al., 2002).

3.6.2 *Fotofísica da PDT*

A PDT requer uma fonte de luz para fornecer a energia necessária à produção local de oxigênio singleto e para promover reações redox (WAINWRIGHT e CROSSLEY, 2004). A eficácia da técnica depende da dose de luz aplicada, da concentração do fotossensibilizador e da disponibilidade de oxigênio. Para causar morte celular, o efeito deve exceder certo limiar (NYMAN e HYNINEN, 2004).

Os lasers mais empregados na PDT são os que têm emissão na região vermelha do espectro eletromagnético, sendo que os do tipo diodo AsGaAl são de baixo custo, se comparados aos lasers He-Ne (GARCEZ et al., 2003).

Na presença de oxigênio molecular ($^1\text{O}_2$), o fotossensibilizador é ativado e dois tipos iniciais de processos competidores podem ocorrer (PERUSSI, 2007). A reação tipo I é iniciada pela interação do fotossensibilizador com biomoléculas e resulta na formação de radicais livres provenientes da transferência de íons hidrogênio ou de elétrons que podem degradá-las (Figura 19) (LIM et al., 2002). A reação tipo II ocorre quando o fotossensibilizador, em seu estado tripleto, interage

com o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) e forma oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que parece representar o principal agente citotóxico da PDT (Figura 20) (FERGUSON, 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002).

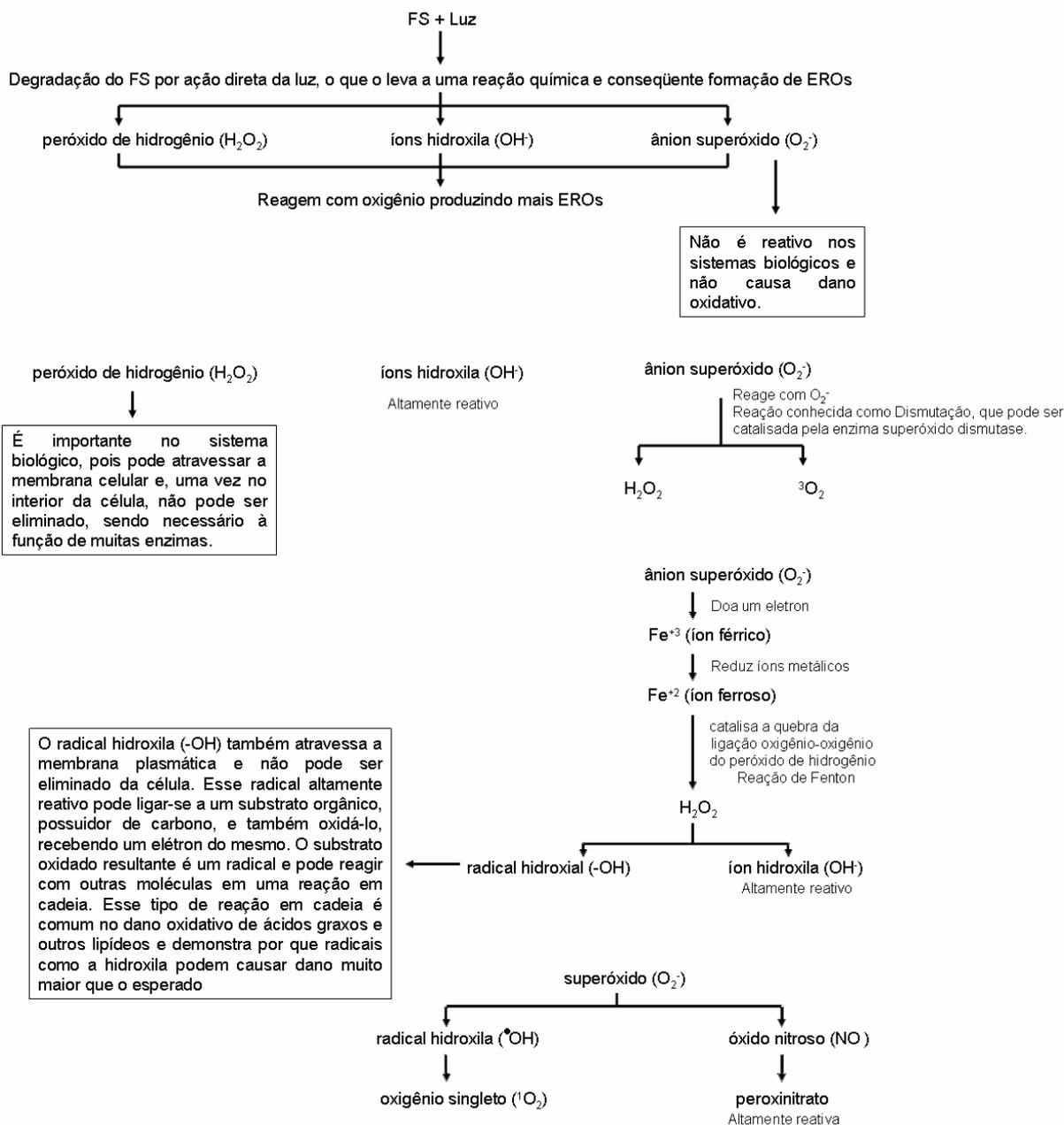


Figura 19: Reação tipo I, o fotossensibilizador sofre degradação por ação direta da luz, o que o leva a uma reação química e conseqüente formação de EROs (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Uma vez que a reatividade das EROs com moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para PDT. Assim, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células

desenvolverem resistência celular, sendo essa uma das vantagens da fotossensibilização, além da morte celular (PERUSSI, 2007).

A extensão do dano causado pela luz e a citotoxicidade parece ser multifatorial, envolvendo fatores que incluem a distribuição intracelular e a concentração do fotossensibilizador empregado na PDT, a intensidade de luz e a disponibilidade de oxigênio. A membrana plasmática, mitocôndria, núcleo e lisossomos são os principais alvos para PDT (PENG; MOAN; NESLAND, 1996).

O dano fotodinâmico microbiano está, em alguns casos, bem estabelecido. A ocorrência de uma reação tipo I, com água no meio de cultura microbiano, pode ocasionar aumento do radical hidroxila (-OH), o qual pode reagir com biomoléculas ou se combinar para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) *in situ* com resultados citotóxicos subsequentes (WAINWRIGHT, 1998).

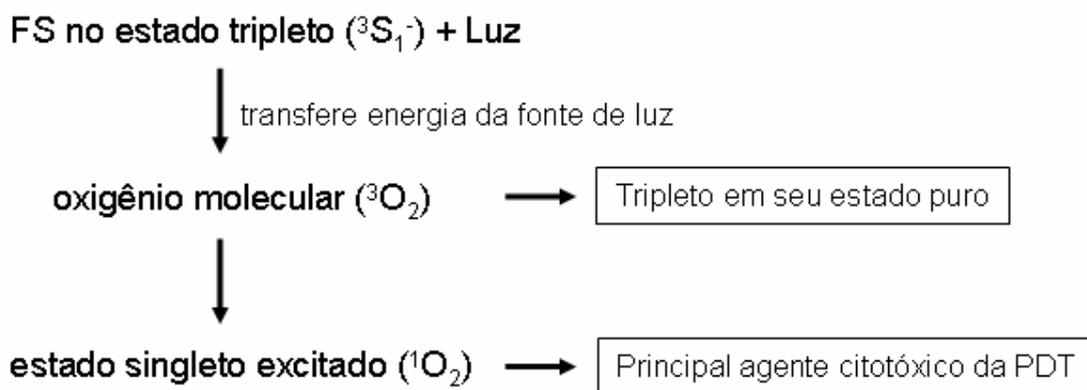


Figura 20: Reação tipo II, o fotossensibilizador, em seu estado tripleto, interage com o oxigênio molecular (3O_2) e forma oxigênio singleto (1O_2), que parece representar o principal agente citotóxico da PDT (FERGUSON, 2002; KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002).

As duas reações (tipos I e II) podem ocorrer simultaneamente, e a proporção entre esses processos depende do fotossensibilizador usado, da concentração do substrato e da presença de oxigênio (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Um dos principais mecanismos de ação da PDT que emprega corantes como fotossensibilizadores é a reação tipo II. A geração de oxigênio singleto (1O_2) pelo fotossensibilizador torna-se um critério importante para a eficácia da PDT. Quanto maior a geração de oxigênio singleto, menos fotossensibilizador é necessário (WU et al., 2000). Como o oxigênio singleto (1O_2) tem vida muito curta, o fotossensibilizador não ligado à célula não é fototóxico (NYMAN ; HYNNINEN, 2004).

Devido a esse possível mecanismo de ação, a terapia fotodinâmica é uma modalidade alternativa para o tratamento contra vários tipos de câncer (HENDERSON ; DOUGHERTY, 1992).

Além disso, apresenta vantagens como dispensar a especificidade dos agentes quimioterapêuticos e a radiação ionizante. Comparada com outras terapias citotóxicas, terapia fotodinâmica tem a vantagem de dupla seletividade, não apenas o fotossensibilizador pode ser direcionado para as células ou tecido doente, mas também a luz pode ser precisamente focalizada no local da lesão. O procedimento pode ser repetido várias vezes, se necessário, visto que não há efeitos tóxicos cumulativos e é usualmente não invasivo (PERUSSI, 2007).

Terapia fotodinâmica já foi aprovada para tratamento de vários tipos de câncer como de bexiga, pulmão, esôfago, gástrico e cervical, além de degeneração macular relacionada à idade. Outras aplicações não oncológicas de terapia fotodinâmica em estágio menos desenvolvido incluem tratamento de lesões pré-malignas, psoríase, artrite, aterosclerose e reestenose tanto em veias como em artérias (HAMBLIN ; HASAN et al, 2004).

A pele é o principal órgão alvo para a terapia fotodinâmica devido ao aumento da incidência de câncer de pele e ao acesso fácil das drogas fotossensibilizadoras e luz. A tensão de oxigênio na pele varia durante e após a PDT e parece ser um importante parâmetro para o tratamento. A literatura indica que é possível realizar medidas transcutâneas do oxigênio para adotar o dado como uma medida avaliável da efetividade clínica da terapia fotodinâmica e como predição bcal da energia requerida para gerar uma resposta biológica. Consequentemente, a efetividade da terapia fotodinâmica pode ser manipulada pela modulação da tensão de oxigênio na pele (FUCHS ; THIELE, 1998).

A terapia fotodinâmica tem sido reportada por promover algum efeito sobre o sistema imune. Nesse sentido, ela poderia tanto ativar como suprimir a resposta imunológica. Com relação ao processo inflamatório, há liberação de mediadores inflamatórios de amplo alcance com recrutamento de leucócitos e incremento da atividade destes após a terapia fotodinâmica, com a indução de uma resposta inflamatória aguda e a geração de imunidade tumor-específica (KORBELIK, 1996).

A terapia fotodinâmica parece não promover dor e apresenta uma técnica mais rigorosa do que outras técnicas ablativas, entretanto, pode apresentar custo

elevado, devido à combinação necessária de tecnologia laser e drogas fotossensibilizadoras de alto custo (O'DONNELL et al., 2007).

3.6.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT, Antimicrobial Photodynamic Therapy)

De modo semelhante às células tumorais, microorganismos tais como bactérias, fungos, leveduras, vírus, também podem ser mortos aplicando luz visível depois do tratamento com um fotossensibilizador apropriado e luz, em um processo denominado terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT), também conhecida por quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT, photodynamic antimicrobial chemotherapy) (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2004; GAD et al., 2004), que consiste na associação de um fotossensibilizador a uma fonte de luz visível, com o objetivo de provocar inativação microbiana (GARCEZ et al., 2003; PERUSSI, 2007).

Dobson e Wilson (1992) realizaram um estudo *in vitro* utilizando laser He-Ne, no comprimento de onda de 632,8 nm, em biofilmes bacterianos de *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* utilizando tanto o azul de metileno nas concentrações de 0,01% e 0,1%, quanto o azul de toluidina a 0,01%. Verificaram que, o azul de toluidina foi eficaz em erradicar as bactérias no tempo de dez segundos de irradiação (5,5 J/cm²).

Wilson (1993) descreve as vantagens dessa técnica em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo, como ocorre com o uso de antibióticos. Outro aspecto relevante é que o uso de fotossensibilizador ou da radiação laser sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias.

Wilson e Mia (1993) realizaram estudo objetivando a destruição através da terapia fotodinâmica, de *Candida albicans* e outras *Candida* spp. responsáveis pela candidose associada ao HIV. Os laser utilizados foram He-Ne de 632,8 nm e potência de 7,3 mW, com fotossensibilizadores cristal de violeta, azul de toluidina, éster dihematoporfirina e tionina, e GaAs de 660 nm e potência de 11 mW, associado com azul de metileno e ftalocianina dissulfonada de alumínio. A partir dos

resultados observou-se que a associação do laser He-Ne com azul de toluidina foi mais eficaz na redução de colônias viáveis.

Wilson e Pratten (1994) realizaram estudo objetivando determinar se o fotossensibilizador azul de toluidina poderia destruir o *Staphylococcus aureus* empregando a luz de um laser de baixa potência He-Ne. Para isso, suspensões do microorganismo foram irradiadas na presença e ausência do azul de toluidina. Observaram que com a mesma radiação de luz laser houve uma redução de 95% na contagem de células viáveis quando o fotossensibilizador estava presente, e na sua ausência, as reduções da viabilidade celular foram insignificantes. Com doses maiores de luz laser, na ausência do azul de toluidina, foi observado mortes estatisticamente significantes, fato atribuído a presença de fotossensibilizador endógeno nos microrganismos.

Soukos et al (1996) realizaram um experimento em células epiteliais orais e fibroblastos com o objetivo de encontrar uma janela terapêutica na qual bactérias pudessem ser destruídas sem danos ao tecido adjacente. *S. sanguis* foi utilizado como microorganismo teste, o laser utilizado foi de He-Ne e o fotossensibilizado escolhido foi o azul de toluidina. Observaram que o azul de toluidina foi citotóxico em baixas concentrações (5,0 µg/mL). A sensibilização de queratinócitos e fibroblastos com as concentrações de 2,0 e 5,0 µg/mL do corante, respectivamente, por 5 minutos e exposição à luz de um laser He-Ne, com potência de 7,3 mW durante um tempo maior que 2 minutos, não reduziu a viabilidade celular. Entretanto, a morte de *S. sanguis* foi alcançada seguindo a exposição à luz de He-Ne por 75 segundos na presença de azul de toluidina na concentração de 2,5 µg/mL.

Wainwright (1998) avaliaram, *in vitro*, a atividade bactericida dos corantes azul de metileno, azul de toluidina, novo azul de metileno, dimetil azul de metileno e azure B contra amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina e compararam-na com a dos antibacterianos flucloxacilina e vancomicina. As amostras foram expostas à luz incoerente no comprimento de onda entre 350 e 800 nm e dosimetria de 6,3 J/cm² por uma hora. Observaram que os fotossensibilizadores, dimetil azul de metileno e novo azul de metileno, reduziram significativamente cepas de *S. aureus*. Destacaram que, por ser lipofílico, o novo azul de metileno apresentou maior produção de oxigênio singlete, o que levou à maior fotossensibilização das bactérias. A aplicação de luz de forma isolada não afetou o crescimento bacteriano.

Concluíram que a aplicação de luz aumentou em quatro vezes a atividade dos fenotiazínicos, exceto do azure B.

Wood et al (1999) realizaram estudo *in vitro* sobre o uso da terapia fotodinâmica para o tratamento de biofilmes naturais de placa oral formada *in vivo*. Utilizaram ftalocianina catiônica e luz branca de uma lâmpada de filamento de tungstênio, cujos parâmetros eram de 22,5 mW/cm² de taxa de fluência, potência de 400 W e comprimento de onda entre 600 e 700 nm. Os autores concluíram que as bactérias dos biofilmes naturais da cavidade oral humana podem ser danificadas pela PDT empregando-se uma ftalocianina catiônica. Assim, o desenvolvimento da PDT pode ser aliado para a instituição de um tratamento alternativo para placa dentária em situações em que outras terapias não são apropriadas, tal como em casos de resistência a antibióticos ou quando a remoção mecânica da placa não é tolerada.

Karrer et al (1999), realizaram estudos sobre as diferentes reações em espécies distintas de *Staphylococcus* com a aplicação dos fotossensibilizadores ácido aminolevulínico (ALA) e Photofrin® (derivados da hematoporfirina), isoladamente ou associada ao laser pulsado de argônio. A terapia fotodinâmica com ácido aminolevulínico (ALA), não teve efeito sobre o *Staphylococcus epidermidis* apesar de apresentar efeito dose-dependente, e não apresentou redução significativa da viabilidade celular do *S. aureus*. A terapia fotodinâmica com Photofrin® foi mais eficaz contra *S. aureus* do que o foi contra o *S. epidermidis*, porém quando aplicado isoladamente, apresentou toxicidade dose-dependente *S. aureus* e alta toxicidade para *S. epidermidis*.

König et al (2000) realizaram estudo que avaliou a inativação bacteriana, baseado na excitação óptica de porfirinas endógenas fotossensibilizadores. Foi investigada a porfirina produzida por cepas patogênicas gram-positivas *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces odontolyticus* e *Porphyromonas gingivalis*. Espectroscopia sensível de autofluorescência revelou que estas bactérias sintetizam naturalmente o fotossensibilizador fluorescente protoporfirina IX. Colônias destas bactérias foram expostas à luz vermelha de um laser de He-Ne de 632,8 nm, densidade de potência 100 mW/cm², densidade de energia de 360 J/cm². Houve destruição significativa nas três espécies testadas mesmo após fototratamento único. Esses resultados sugeriram que o tratamento com luz vermelha pode ser empregado como método terapêutico para inativação de cepas bacterianas

patogênicas produtoras de porfirinas sem necessidade de emprego de agentes fotossensibilizadores externos.

Usacheva, Teichert e Biel (2001) realizaram estudo avaliando a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina contra diferentes microrganismos sob condições de claro (presença de luz), e escuro (ausência de luz), para determinar o corante bactericida mais efetivo. Os microrganismos testados foram *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As fontes de luz vermelha utilizadas foram laser de Argônio de 630 nm e laser diodo de 664 nm. Os inóculos foram tratados no escuro e em condições de iluminação com laser vermelho na presença de cada corante empregando. Foram comparados o efeito da concentração do corante, o tempo de incubação no escuro, a fluência e a intensidade da luz laser, na destruição das diferentes bactérias. O azul de toluidina exibiu uma atividade bactericida melhor do que a apresentada pelo azul de metileno tanto na presença quanto na ausência de luz, e apresentou completa fotodestruição de microrganismos em concentrações menores que as do azul de metileno.

Zeina et al (2001) desenvolveram estudo avaliando a aplicação da PDT em espécies de microrganismos cutâneos utilizando azul de metileno como fotossensibilizador e luz visível. A amostragem foi representada por *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *C. albicans*, espécies representativas daquelas encontradas na pele saudável e doente. As condições de luz foram padronizadas empregando-se um projetor de slides a 25 cm de distância do alvo e densidade de potência luminosa de 42 mW/cm², e o corante aplicado em concentração de 100µg/mL. Os resultados observados demonstram que todas as espécies testadas foram susceptíveis à terapia fotodinâmica, sendo que *C. albicans* foi menos sensível à morte devido a presença de membrana nuclear, que possivelmente atua como uma barreira adicional para o azul de metileno ou para os produtos de alta energia provenientes da reação do fotossensibilizado com a luz. Além disso, consideraram as diferenças entre espécies eucarióticas e procarióticas. Concluíram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana foi mais efetiva contra células procarióticas, o que pode ser sugestivo para o uso de terapia fotodinâmica como um procedimento seguro e efetivo para o tratamento ou controle de uma variedade de microrganismos associados a doenças cutâneas possibilitando a redução do desenvolvimento de

resistência a drogas pela flora da pele.

Kömerik e Wilson (2002) realizaram estudo objetivando avaliar os efeitos dos fatores fisiológicos e ambientais na suscetibilidade de algumas bactérias associadas a infecções orais em pacientes imunocomprometidos, à PDT empregando azul de toluidina como fotossensibilizador. Foram avaliadas após exposição à luz de um laser He-Ne suspensões de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* feitas em saliva humana, soro de cavalo ou salina. Foi observado que as três espécies demonstraram-se suscetíveis à fotossensibilização letal sob as condições do teste. O efeito bactericida foi reduzido em pHs ácidos, mas não foi afetado pela fase de crescimento dos microrganismos. Pôde-se perceber que a composição e o pH do fluido em que as bactérias foram suspensas influenciam a efetividade da fotossensibilização letal mediada pelo azul de toluidina.

A eficácia dos fotossensibilizadores é avaliada a partir das propriedades fotofísicas e fotoquímicas de seus monômeros e do meio em que se encontram. De acordo com Usacheva, Teichert e Biel (2003), a concentração do azul de metileno e do azul de toluidina para erradicar bactérias depende de sua capacidade de formar dímeros, o que acontece na presença de sais inorgânicos ou com o aumento da concentração dos mesmos. Tal habilidade é conhecida como comportamento metacromático, que é atribuído à agregação das moléculas do corante. Com isso, ocorre a mudança da absorção máxima do corante a um comprimento de onda menor.

De acordo com Teichert et al. (2002), o mecanismo de destruição de fungos pela PDT envolve aumento de permeabilidade da parede e membrana celulares pela presença de espécies reativas de oxigênio, o que permite a penetração do fotossensibilizador na célula. Ao infectarem mucosa oral de camundongos com *Candida sp.* e aplicarem a PDT, verificaram que o efeito desta dependeu da concentração do fotossensibilizador. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica é uma alternativa em potencial para o tratamento da candidíase e apontaram como vantagens da técnica o fato de ser uma terapia realizada topicamente, de simples execução e inespecífica, ou seja, que atinge um grande número de microrganismos. Além disso, esta terapia pode ser repetida sem o risco da seleção de cepas resistentes.

Zanin et al (2003) através de uma revisão bibliográfica demonstrou que a ação antimicrobiana dos lasers de baixa potência só começou a ser efetivamente

estudada na última década, quando a terapia fotodinâmica inicialmente idealizada para o tratamento do câncer foi aplicada na odontologia. Enquanto no tratamento do câncer o alvo da terapia fotodinâmica é promover a morte seletiva das células tumorais, no caso da odontologia surgiu uma nova perspectiva para a utilização da terapia fotodinâmica tendo como alvo as células bacterianas envolvidas no desenvolvimento das lesões de cárie e da doença periodontal. Descreveram como vantagens da terapia fotodinâmica antimicrobiana a morte microbiana mais rápida, não sendo necessária a manutenção do fotossensibilizador em altas concentrações na área infectada por tempo prolongado, contrariamente ao que ocorre com as drogas antimicrobianas; a prevenção à novas formas resistentes à antifúngicos e antimicrobianos; a inexistência de interações medicamentosas indesejáveis e baixo custo do azul de metileno disponível comercialmente; a terapia ser confinada à área da lesão por meio de fibra óptica e o custo reduzido comparado a terapia laser de alta potência. Em contra partida, destacaram que essa terapia ainda apresenta limitações devido a ausência de parâmetros definidos para que a terapia seja efetiva na eliminação dos microrganismos, apontando a necessidade de estudos laboratoriais mais precisos antes que essa terapia possa ser utilizada em humanos.

De Souza et al (2006) avaliaram os efeitos da radiação com laser diodo de 685 nm e dosimetria de 28 J/cm^2 , associado com azul de metileno na concentração de 0,1 mg/mL como fotossensibilizador, na viabilidade de diferentes espécies do gênero *Candida*. Assim, suspensões padronizadas de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, foram irradiadas na presença e ausência do corante. A radiação laser sem a presença do fotossensibilizador apresentou redução no número de UFC/mL apenas para *C. tropicalis*, enquanto que com a presença de azul de metileno reduziu o número de UFC/mL em 88,6% *C. albicans*, 84,4% *C. dubliniensis*, 91,6% *C. krusei* e 82,3% *Candida tropicalis*. Concluíram que o azul de metileno é fotoativado pela radiação laser de 685 nm apresentando efeito fungicida em todas as espécies de *Candidas* estudadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta, classificação e obtenção do material vegetal

Alternanthera marítima (Mart.) St. Hil (Amaranthaceae), partes aéreas, foi coletada no seu habitat natural, Restinga de Marica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, em dezembro de 1998 sendo identificada pelo Professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira (“Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil”). Uma amostra da espécie foi depositada no Herbário do “Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brasil”. (sob número de registro SPFR 02968).

4.2 Preparação dos extratos brutos

O material coletado (partes aéreas) foi submetido à secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C, em seguida foi pulverizado em moinho de faca.

O pó obtido foi submetido ao processo de maceração com solventes orgânicos (Figura 21) em ordem crescente de polaridade (hexano para baixa polaridade e etanol para alta polaridade), na proporção massa de pó/solvente 1:20 (massa/volume).

Das soluções obtidas, foram removidos os solventes em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se assim, os extratos brutos em hexano (AMPAH) e em etanol (AMP AE).

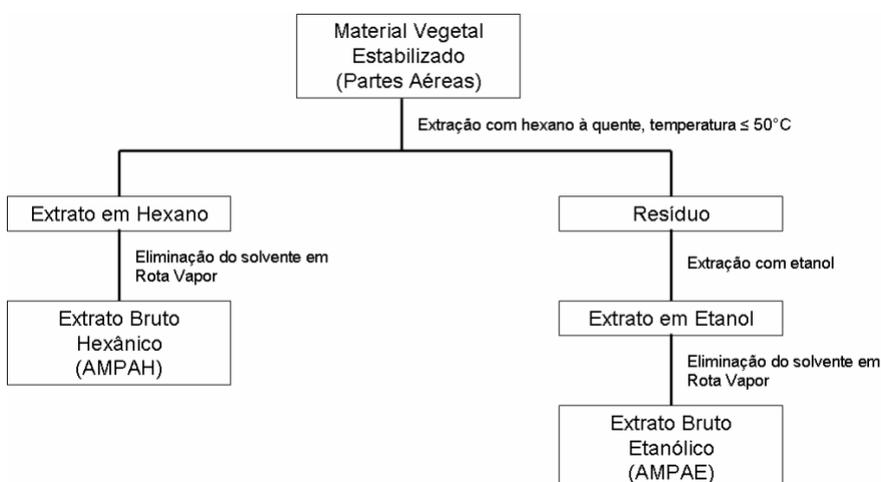


Figura 21: Preparação dos extratos brutos extraídos em solventes orgânicos.

4.3 Ensaio biológico *in vitro*

Ensaio biológico *in vitro* frente a fungos leveduriformes foram realizados no laboratório de Produtos Naturais e Bioensaios e de Microbiologia da UNIVAP.

4.3.1 *Determinação da atividade antimicrobiana*

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar pela técnica de poço em camada dupla e pelo método de microdiluição (OKEKE et al., 2001; NCCLS, 1998; ESPINEL-INGROFF et al., 1995; NCCLS, 1993; GROVE e RANDALL, 1955) seguindo a adequação de metodologia como descrita por SALVADOR et al., 2003/2004).

Para a execução dos ensaios foram utilizadas cepas padrão de leveduras de *Candida dubliniensis* ATCC 778157 e *Candida dubliniensis* ATCC 777, cultivadas em Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD) por 24 horas a 37°C.

4.3.2 *Determinação da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima (CIM)*

Nesta etapa de triagem empregou-se o método de difusão em ágar, utilizando a técnica do poço determinando quais os extratos apresentavam ou não efeito antimicrobiano (Figura 22).

Para tanto, procedeu-se o plaqueamento das leveduras, onde foram utilizados 20,0 mL de Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD), a cerca de 50°C, inoculados (5×10^6 ufc/mL), independentemente, com as cepas de leveduras em placas de 20 x 150 mm. A seguir foram confeccionados poços com 5,0 mm de diâmetro.

Em cada poço foram aplicados 20 µL das soluções controle (positivo e negativo) e drogas-teste, soluções estas, preparadas em propilenoglicol/água esteril (5:95) nas concentrações de 100 mg/mL para os extratos brutos no *screening*.

Como controle positivo foi utilizado cetoconazol (200,0 µg/mL) e como controle negativo propilenoglicol/água esteril (5:95).

As placas-testes foram mantidas à temperatura ambiente por cerca de 2 horas e depois incubadas a 37°C por cerca de 24/48 horas para as leveduras.

Decorrido o período de incubação as zonas de inibição do desenvolvimento microbiano foram mensuradas, em milímetros, em termos de diâmetro (halo) e aro da borda do poço a início do desenvolvimento. Os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata, para cada cepa indicadora utilizada.

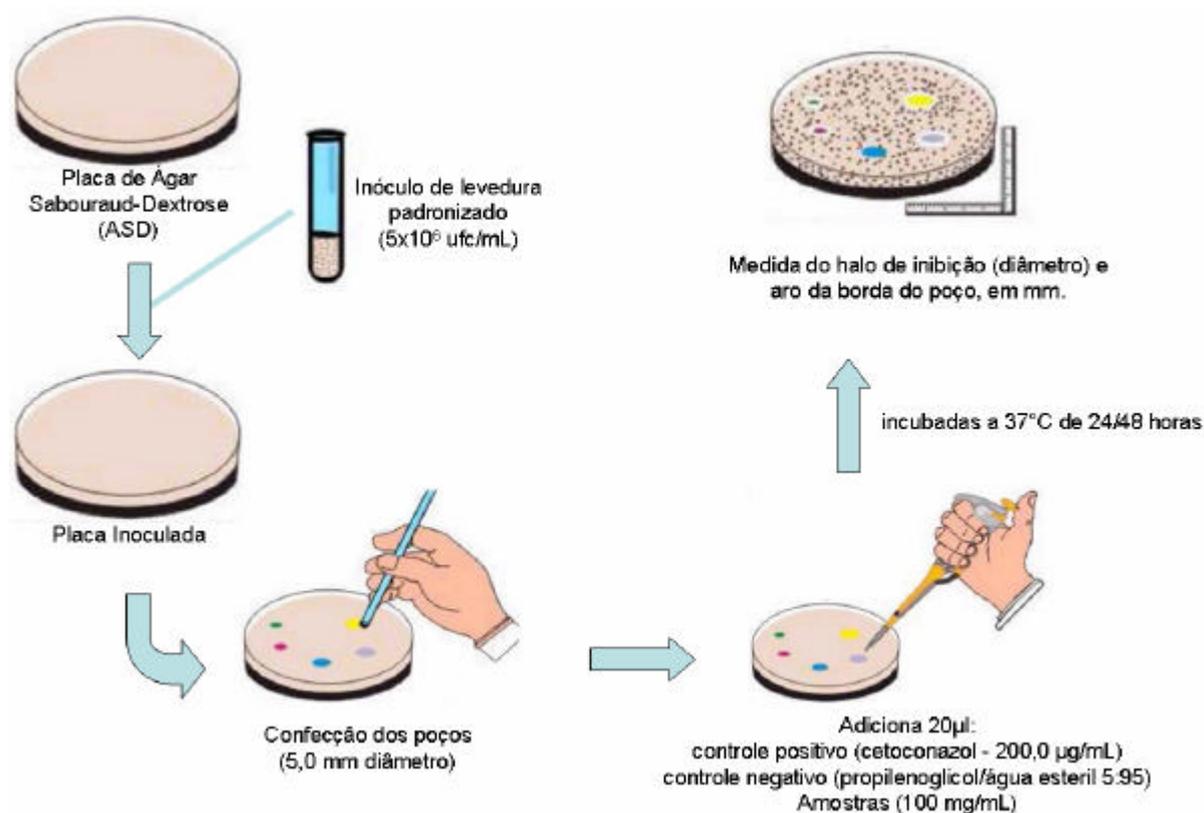


Figura 22: Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar – Técnica de poço em camada dupla.

Para os extratos que se mostraram ativos na concentração de 100 mg/mL, procedeu-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços (Figura 23).

Em uma placa de microdiluição estéril de 96 poços, em poços individuais foi aliquotado 50 µL dos caldos Sabouraud-Dextrose (ASD), 50 µL das drogas teste em diferentes concentrações (100 a 0,050 mg/mL), controles e 5µL da suspensão de microrganismos com turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland, o que corresponde aproximadamente a 10^7 UFC/mL (foi realizada a contagem do inóculo para cada cepa estudada).

Como controles positivos foram utilizados cetoconazol (200 μ g/mL). Como controles negativos foram utilizados o diluente propilenoglicol/água 5:95, além do controle do inóculo e do controle do meio de cultura.

Ao término do período de incubação a 37 $^{\circ}$ C por cerca de 24/48 horas, procedeu a leitura visual da turvação nos poços e quando em dúvida quanto à presença de inibição total, o material foi inoculado (estrias) em placas contendo meio Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD) e incubadas a 37 $^{\circ}$ C por cerca de 24/48 horas para a verificação se o efeito era biocida ou não, ou seja, verificou-se o crescimento ou não do microrganismo. Foi considerada como CIM com valores expressos em mg/mL, a menor concentração onde se observou a presença de inibição do desenvolvimento microbiano (SALVADOR et al., 2002; OKEKE et al., 2001). Os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata, para cada cepa indicadora utilizada.

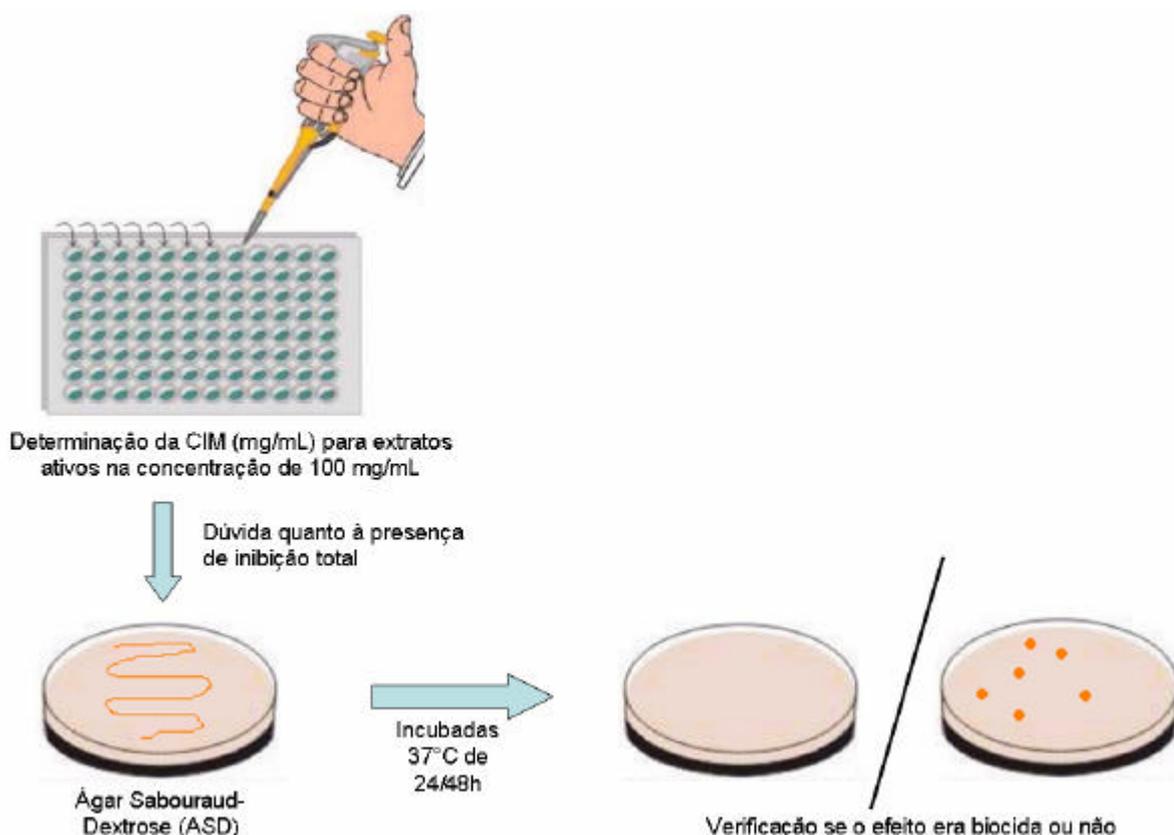


Figura 23: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços.

4.4 Elaboração de formulações farmacêuticas semi-sólidas para uso tópico

Os experimentos para a elaboração de formulações farmacêuticas semi-sólidas contendo os extratos vegetais bioativos foram realizados na Farmácia Escola da UNOCHAPECÓ/SC.

Para tanto se elaboraram procedimentos para o preparo de creme e gel creme onde os extratos vegetais bioativos foram incorporados (GEORGETTI et al., 2006; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; PRISTA e ALVES, 1967). Os extratos bioativos foram incorporados na formulação na concentração inibitória mínima (CIM) ou em concentração sub-inibitória mínima. Foram empregadas três diferentes concentrações de extrato nas formulações creme e gel creme 5, 50 e 100 mg de extrato/g de creme ou gel creme.

4.4.1 Preparação das formulações farmacêuticas

Primeiramente, seguindo as exigências das boas práticas em farmácia magistral, realizou-se antissepsia das mãos e paramentação (retirada de adornos, uso de equipamentos de proteção individual tais como jaleco de mangas longas, touca, máscara, pro-pés, luvas para procedimentos) adequadas.

Antes de iniciar o preparo das formulações farmacêuticas, foi realizada assepsia das embalagens plásticas não transparentes, onde posteriormente foram armazenadas as formulações prontas (empregou-se sabão neutro e álcool a 70%), a assepsia das bancadas foi realizada utilizando álcool a 70%.

Foram selecionadas as matérias primas necessárias (armazenadas em almoxarifado sob condições controladas de temperatura e umidade) sendo possível iniciar o desenvolvimento das formulações semi-sólidas para uso tópico.

Para o preparo do creme base, inicialmente realizou-se cálculos a fim de descobrir a quantidade de cada substância a ser pesada, realizando-se posteriormente o procedimento de pesagem (Tabela 1).

Os componentes de ambas as fases (oleosa e aquosa), com exceção do ciclometicone, conservante e óleo de macadâmia, foram aquecidos, separadamente, até 80°C e posteriormente verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa, sob agitação constante, empregando um agitador, objetivando incentivar a formação da emulsão, até que a mistura esfriasse a uma temperatura adequada (35°C – 40°C),

quando começou adquirir consistência. Feito isso, adicionou-se o ciclometicone e o conservante e o óleo de macadâmia.

Tabela 1: Componentes da formulação creme base.

Emulsão	Componentes	Formulação Creme Base
Fase oleosa	Polawax	10%
	Vaselina líquida	3%
	BHT	0,02%
	Álcool cetosteárilico	5%
	Óleo de macadâmia	2%
	Ciclometicone volátil	2%
Fase aquosa	Phenonip	0,1%
	EDTA	0,14%
	Propilenoglicol	6%
	Água destilada	q.s.p. 30g

Para preparar a base gel creme, foi necessário preparar uma loção não-iônica utilizando os mesmos componentes empregados na formulação creme base, no entanto, a concentração de polawax foi reduzida em 40% (Tabela 2).

Uma solução gel foi preparada, utilizando carbopol, EDTA, água, propilenoglicol e conservantes. Para que esta solução adquirisse forma de gel, foi empregada uma substância basificante – AMP.

Os componentes de ambas as fases (oleosa e aquosa), com exceção do ciclometicone, conservante e óleo de macadâmia, foram aquecidos, separadamente, até 80°C e posteriormente verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa, sob agitação constante, empregando um agitador, objetivando incentivar a formação da emulsão, até que a mistura esfriasse a uma temperatura adequada (35°C – 40°C), quando começou adquirir consistência, formando uma loção de menor consistência em relação ao creme. Feito isso, adicionou-se o ciclometicone e o conservante e o óleo de macadâmia, e então o gel foi vertido sobre a loção, até que a base gel creme ficasse homogênea.

Tabela 2: Componentes da formulação gel creme base.

Emulsão	Componentes	Formulação Gel Creme Base
Fase oleosa	Polawax	6%
	Vaselina líquida	10%
	BHT	0,05%
	Álcool cetosteárilico	3%
	Óleo de macadâmia	2%
	Ciclometicone volátil	2%
Fase aquosa	EDTA	0,19%
	Phenonip	0,04%
	Propilenoglicol	2,4%
	Água destilada	q.s.p. 30g
Gel	Carbopol	1%
	Propilenoglicol	3,6%
	Phenonip	0.06%
	Água destilada	q.s.p. 30 g

Os extratos etanólico e hexânico após pesados, separadamente em um gral, em proporções adequadas para alcançar as concentrações desejadas, foram levigados com propilenoglicol, e incorporados, vagarosamente, as formulações farmacêuticas, creme base (CB) e gel creme base (GCB) (q.s.p. 30 g para cada uma das formulações).

Após o término do preparo as formulações farmacêuticas foram enfrascadas e rotuladas devidamente (Figura 24).

**Figura 24:** Formulações Farmacêuticas.

4.4.2 Avaliação da estabilidade e controle de pH das formulações obtidas

Os cremes e géis creme contendo os extratos foram analisados quanto às propriedades organolépticas através da visualização e do olfato, observando qualquer alteração da coloração, odor ou separação de fases.

Após o preparo das formulações creme e gel creme contendo os extratos vegetais, determinou-se o pH das formulações prontas, com fita de pH.

Para o teste de centrifugação utilizou-se centrífuga, com velocidade de 2800 rpm durante cinco (5) minutos seguindo metodologia descrita por Georgetti et al (2006) e Anvisa (2004). Para tanto, pesou-se 50 mg/mL dos extratos e formulações, incluindo as formulações bases e procedeu-se o teste de centrifugação observando a separação ou não de fases a olho desarmado.

4.5 Varredura na região do visível

Os extratos etanólico e hexânico de *A. marítima* e as formulações farmacêuticas contendo estes extratos foram analisados quanto à sua capacidade de absorção de luz (Figura 25), para isso foi feita uma análise preliminar (varredura na região visível) entre os comprimentos de onda de 400 a 700 nm (Figura 26).

Os extratos e formulações foram avaliados nas concentrações de 25,0 e 5,0 mg/mL, respectivamente. Como branco utilizou-se o diluente (propilenoglicol:água (5:95) ou metanol) e como controle positivo azul de metileno na concentração de 0,05mg/mL.

A luz coletada foi acoplada a um espectrômetro de $\frac{1}{4}$ m (Oriel Instruments, modelo MS257), com grade de difração de 300 linhas /mm.

Um detector tipo CCD (*Charge Coupled Device*) intensificado com 256 x 1024 pixels foi conectado à saída de detecção do monocromador.

Cada medida foi realizada com a acumulação de 100 aquisições, e foram realizadas 10 medidas para cada amostra.

Os espectros de absorção (400 a 700nm) foram obtidos no Laboratório de Lasers de Alta Potência do IP&D/UNIVAP, determinando-se a região de absorção dos extratos hexânico e etanólico e das formulações de creme e gel creme contendo os extratos.

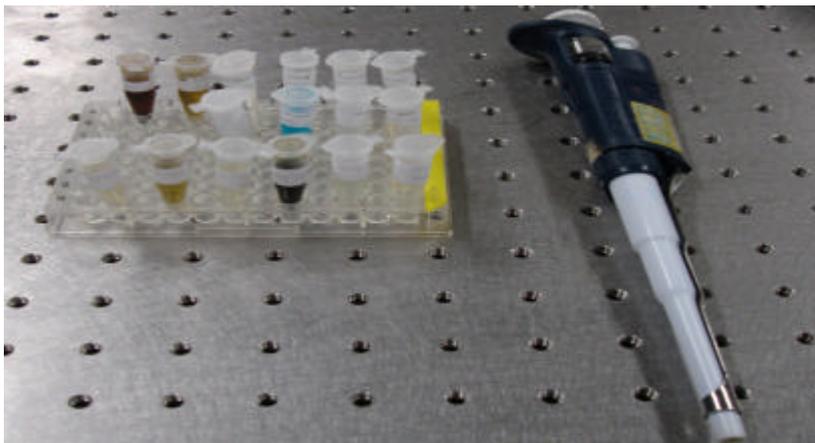


Figura 25: Extratos hexânico e etanólico de *Alternanthera marítima*, formulações farmacêuticas contendo os extratos e controles para ensaio de varredura na região do visível.



Figura 26: Equipamentos empregados no ensaio de varredura na região do visível.

4.6 Laser

Quanto ao laser foram estudadas as condições de operação (tipo de laser, comprimentos de onda, dentre outros parâmetros) e procedeu a avaliação do efeito

antifúngico da associação laser/extratos e/ou laser/formulações tópicas contendo os extratos. Inicialmente foi seguido o protocolo experimental descrito por De Souza et al (2006) com modificações.

Foi utilizado o equipamento laser de InGaAlP (Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio) (modelo PHOTON LASE nod. III, DMN Equipamentos Ltda), com potência de 35mW e comprimento de onda de 685nm (laser vermelho), conforme informações fornecidas pelo fabricante (Figura 27).



Figura 27: Aparelho laser Photon Lase III.

A fonte laser iluminou uma área de $0,38\text{cm}^2$ com tempo de irradiação de 5 min, resultando numa densidade de energia (fluência) de 28 J/cm^2 para cada amostra.

Como controle foi seguido o mesmo protocolo para uma placa contendo as mesmas drogas testes e controles na ausência de luz, até mesmo da luz ambiente.

Todos os experimentos descritos foram realizados em capela de fluxo laminar.

4.7 Avaliação do efeito dos extratos e das formulações tópicas contendo *Alternanthera maritima* como fotossensibilizador

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Produtos Naturais e Bioensaios da UNIVAP.

Em uma placa de microdiluição estéril de 96 poços, em poços individuais foi aliquoteado $50\ \mu\text{L}$ dos caldos Sabouraud-Dextrose (ASD), $50\ \mu\text{L}$ das drogas teste (extratos vegetais ativos avaliados na concentração final sub-inibitória mínima de 25

mg/mL; e formulações farmacêuticas contendo os extratos a 5%, com concentração final de 5mg/mL ou 0,25 mg do extrato ativo/mL), controles e 5µL da suspensão de microrganismos com turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland, o que corresponde aproximadamente a 10^7 UFC/mL (foi realizada a contagem do inoculo para cada cepa estudada).

Como controles positivos foram utilizados o fotossensibilizador corante azul de metileno (50 µg/mL) diluído em salina estéril e cetoconazol (200µg/mL). Como controles negativos foram utilizados o diluente propilenoglicol/água 5:95, além do controle do inóculo, do controle do meio de cultura e do controle das formulações (creme e gel creme base) sem os extratos ativos (Figura 28).

50 µL dos caldos Sabouraud-Dextrose (ASD);
 # 50 µL das drogas teste:
 extratos vegetais ativos (25 mg/mL);
 formulações farmacêuticas (extratos a 5%);
 # controles positivos azul de metileno (50 µg/mL)
 diluído em salina estéril e cetoconazol (200 µg/mL),
 # controle negativo propilenoglicol/água 5:95,
 # controle do inóculo;
 # controle do meio de cultura;
 # controle das formulações (creme e gel creme base)
 sem os extratos ativos;
 # 5 µL da suspensão de microrganismos padronizado
 (0,5 da escala de Mac Farland).

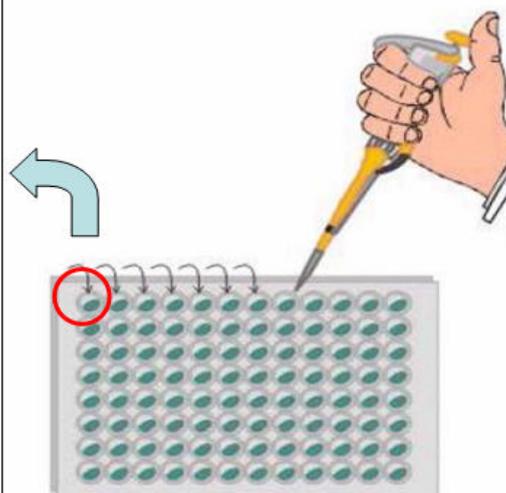


Figura 28: Procedimento de microdiluição em placa de 96 poços, para avaliação do efeito dos extratos e das formulações tópicas contendo *Alternanthera maritima* como fotossensibilizador em PDT antimicrônica.

Os experimentos foram realizados em duplicata para cada droga teste (intra-ensaio), sendo realizados três experimentos em três dias diferentes (n=6 por amostra no total dos resultados inter-ensaios).

Em cada ensaio uma das placas foi submetida à radiação e a outra não (placa controle, a qual não ficou exposta sequer à luz ambiente).

O período de incubação do fotossensibilizador em contato com as células, previamente à aplicação do laser, foi de 1 minuto.

Feito isto, procedeu a irradiação das placas do grupo irradiado. A irradiação das amostras foi realizada em condições assépticas em fluxo laminar com laser operando com densidade de energia de 28 J/cm^2 por 5 minutos e área irradiada de $0,38 \text{ cm}^2$ por amostra.

Depois da irradiação, as placas foram incubadas a 37°C por cerca de 24/48 horas.

Ao término do período de incubação procedeu a diluição seriada, em placa de 96 poços, de 10^{-2} e 10^{-3} para cada uma das amostras em solução fisiológica e alíquotas de $10 \mu\text{L}$ foram plaqueadas em duplicata no meio Sabouraud-Dextrose (ASD) e incubadas a 37°C por cerca de 24/48 horas.

Decorrido o período de incubação determinou-se o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), estimando-se a percentagem de redução de UFC/mL para cada microrganismo (Figura 29).

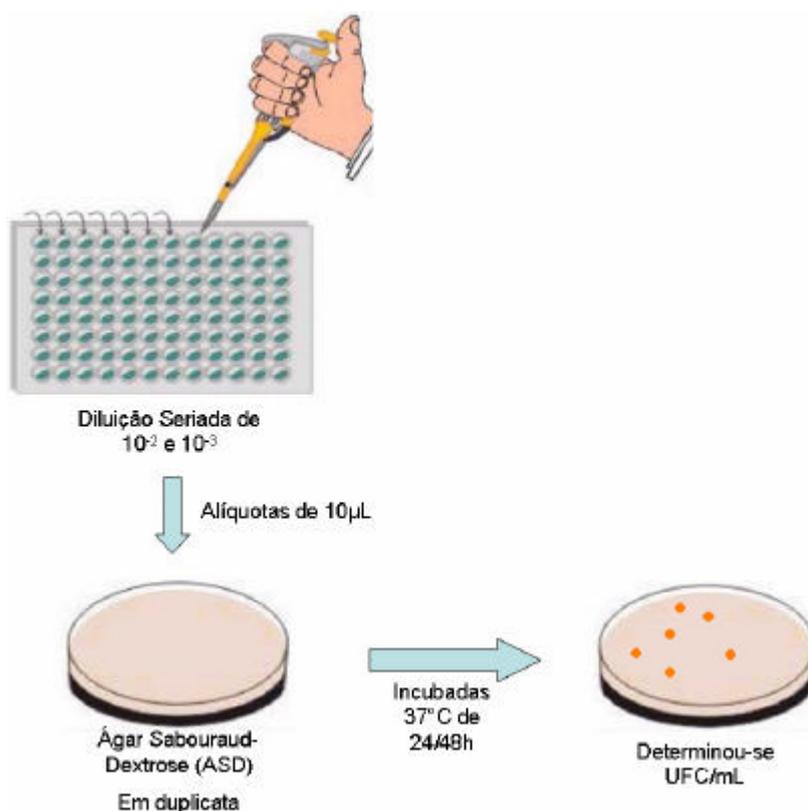


Figura 29: Determinação do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), estimando a percentagem de redução de UFC/mL para cada microrganismo, pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada empregando ANOVA, teste de Tukey com significância para $p < 0,05$, considerado-se os valores de ufc/mL antes e após o tratamento para as amostras bioativas. Os resultados foram apresentados como média (coeficiente de variação, %CV).

5 RESULTADOS

5.1 Preparação dos extratos brutos

Inicialmente foram obtidos os extratos brutos de *Alternanthera maritima* planta *in natura*, para os quais foram calculados os rendimentos em massa (Tabela 3).

Tabela 3: Rendimento em massa dos extratos brutos obtidos de *Alternanthera maritima*.

Parte da planta	Extratos	Código	Massa (g)
Partes aéreas - Material vegetal estabilizado e seco (2300g)	Hexânico	AMPAH	10,60 g
	Etanólico	AMPAE	86,77 g

Esses extratos foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana e determinou-se a CIM para os extratos ativos.

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços. Com isso pode-se determinar a CIM dos extratos frente aos microorganismos estudados (Tabela 4).

A partir da CIM estabeleceu-se um protocolo de estudo utilizando concentrações iguais a CIM ou inferiores (subinibitórias) (Tabelas 5 a 7).

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Extratos Hexanico (AMPAH) e Etanólico (AMPAE) utilizando o método de microdiluição em placas de 96 poços.

Microrganismos	AMPAH (mg/mL)	AMAPE (mg/mL)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	50	50
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	50	50

Tabela 5: Padronização de inóculo dos microrganismos utilizados no experimento, com base na escala de MacFarland, também utilizado para controle de inóculo.

Microrganismos	Inóculo (UFC/mL)*
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	$1,14 \cdot 10^7$ (0,30)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	$1,7 \cdot 10^6$ (0,10)

*: dados expressos como média n=6, (Coeficiente de Variação, CV%), onde CV (%) = (desvio padrão/média) x 100.

Tabela 6: Padronização da concentração empregada no ensaio para avaliação do efeito das amostras como fotossensibilizador.

Extratos e Formulações	Concentração de extrato ou creme ou gel creme (mg/mL)	Concentração de extratos ativos (mg/mL)
Extrato Hexânico (AMPAH)	25	25
Extrato Etanólico (AMP AE)	25	25
Creme AMPAH	5	0,25
Gel Creme AMPAH	5	0,25
Creme AMPAE	5	0,25
Gel Creme AMPAE	5	0,25

Tabela 7: Padronização dos controles utilizados para validar o estudo.

Controles	Concentração
Controle - Creme Base	5 mg/mL
Controle - Gel Creme Base	5 mg/mL
Controle Negativo (Propilenoglicol:água)	na proporção de 5:95
Controle Positivo PDT (azul de metileno)	0,05 mg/mL
Controle Positivo para Leveduras (Cetoconazol)	200µg/mL

5.3 Preparação das formulações farmacêuticas

Para a incorporação dos extratos vegetais (hexânico e etanólico) de *A. marítima*, foram desenvolvidos creme base (Tabela 8, Figura 30) e gel creme base (Tabela 9, Figura 30).

Tabela 8: Formulação controle Creme base (sem extrato).

Emulsão	Componentes	Função Farmacotécnica	Formulação Creme Base
Fase oleosa	Polawax	Base auto-emulsificante	10%
	Vaselina líquida	Agente emoliente	3%
	BHT	Antioxidante	0,02%
	Álcool cetosteárico	Doador de consistência	5%
	Óleo de macadâmia	Emoliente	2%
	Ciclometicone volátil	Doador de Brilho	2%
Fase aquosa	Phenonip	Conservante (Parabenos)	0,1%
	EDTA	Sequestrante	0,14%
	Propilenoglicol	Adjuvante técnico/umectante	6%
	Água destilada	Veículo	q.s.p. 30g

Tabela 9: Formulação controle Gel creme base (sem extrato).

Emulsão	Componentes	Função Farmacotécnica	Formulação Gel Creme Base
Fase oleosa	Polawax	Base auto-emulsificante	6%
	Vaselina líquida	Agente emoliente	10%
	BHT	Antioxidante	0,05%
	Álcool cetosteárfílico	Doador de consistência	3%
	Óleo de macadâmia	Emoliente	2%
	Ciclometicone volátil	Doador de Brilho	2%
Fase aquosa	EDTA	Sequestrante	0,19%
	Phenonip	Conservante (Parabenos)	0,04%
	Propilenoglicol	Adjuvante técnico/umectante	2,4%
	Água destilada	Veículo	q.s.p. 30g
Gel	Carbopol	Espessante	1%
	Propilenoglicol	Adjuvante técnico/umectante	3,6%
	Phenonip	Conservante (Parabenos)	0,06%
	Água destilada	Veículo	q.s.p. 30 g

**Figura 30:** Formulações creme base e gel creme base (sem extrato).

Os extratos foram primeiramente solubilizados em propilenoglicol e depois incorporados nas formulações farmacêuticas, de acordo com a concentração desejada, em temperatura ambiente.

Foram preparadas formulações contendo extratos hexânico e etanólico individualmente nas concentrações de 5, 50 e 100 mg/g de creme ou gel creme com e sem conservante (Tabela 10).

Tabela 10: Formulações contendo diferentes concentrações de extratos hexânico e etanólico incorporados em base Creme ou Gel creme com e sem conservante.

Formulações com o conservante*	Concentração (mg/g de creme ou gel creme)	Formulações sem o conservante*	Concentração (mg/g de creme ou gel creme)
CB + Ampah + phenonip	5	CB + Ampah – phenonip	5
CB + Ampah + phenonip	50	CB + Ampah – phenonip	50
CB + Ampah + phenonip	100	CB + Ampah – phenonip	100
GCB + Ampah + phenonip	5	GCB + Ampah – phenonip	5
GCB + Ampah + phenonip	50	GCB + Ampah – phenonip	50
GCB + Ampah + phenonip	100	GCB + Ampah – phenonip	100
CB + Ampae + phenonip	5	CB + Ampae – phenonip	5
CB + Ampae + phenonip	50	CB + Ampae – phenonip	50
CB + Ampae + phenonip	100	CB + Ampae – phenonip	100
GCB + Ampae + phenonip	5	GCB + Ampae – phenonip	5
GCB + Ampae + phenonip	50	GCB + Ampae – phenonip	50
GCB + Ampae + phenonip	100	GCB + Ampae – phenonip	100

*CB: creme base; GCB: gel creme base.

5.4 Avaliação da estabilidade e controle de pH das formulações obtidas

As formulações farmacêuticas semi-sólidas foram preparadas empregando creme base (CB) e gel creme base (GCB), incorporando-se os extratos etanólico (AMPAE) e hexânico (AMPAH) de *A. maritima* (partes aéreas) em diferentes concentrações, mantendo suas características organolépticas, após as formulações prontas.

Após o preparo das formulações creme e gel creme contendo os extratos vegetais, determinou-se o pH das formulações prontas (com fita de pH) e os valores encontrados ficaram entre 5,0 e 5,5.

Em relação à centrifugação, não houve separação de fases visível ao olho nu na maioria dos cremes e géis creme (Figuras 31 e 32). Porém, apresentou separação de fases no gel creme com extrato etanólico (Figura 33).

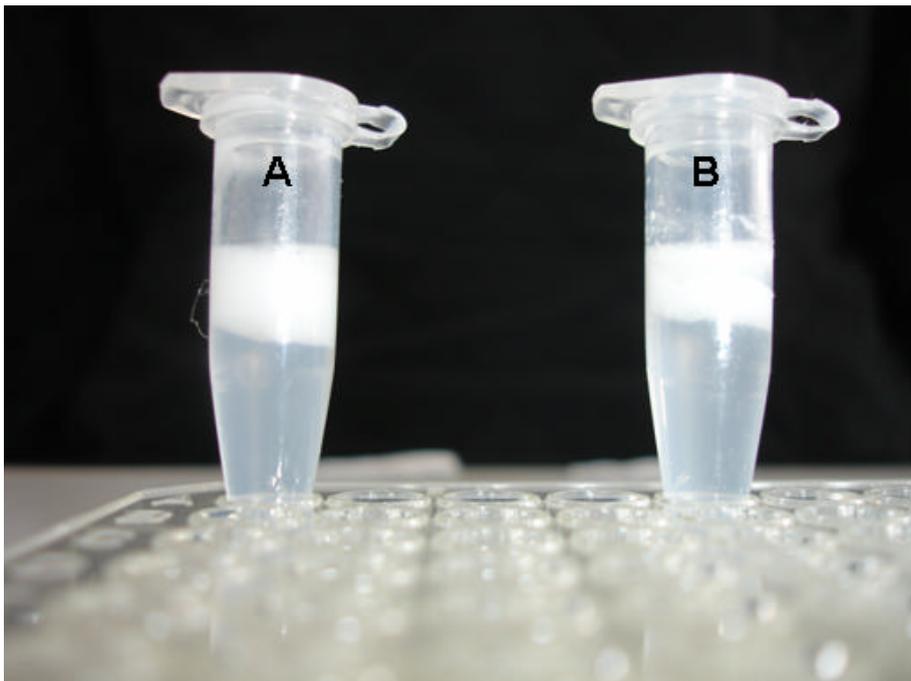


Figura 31: O teste de centrifugação não apresentou separação de fases no creme (A) e gel creme (B) bases.

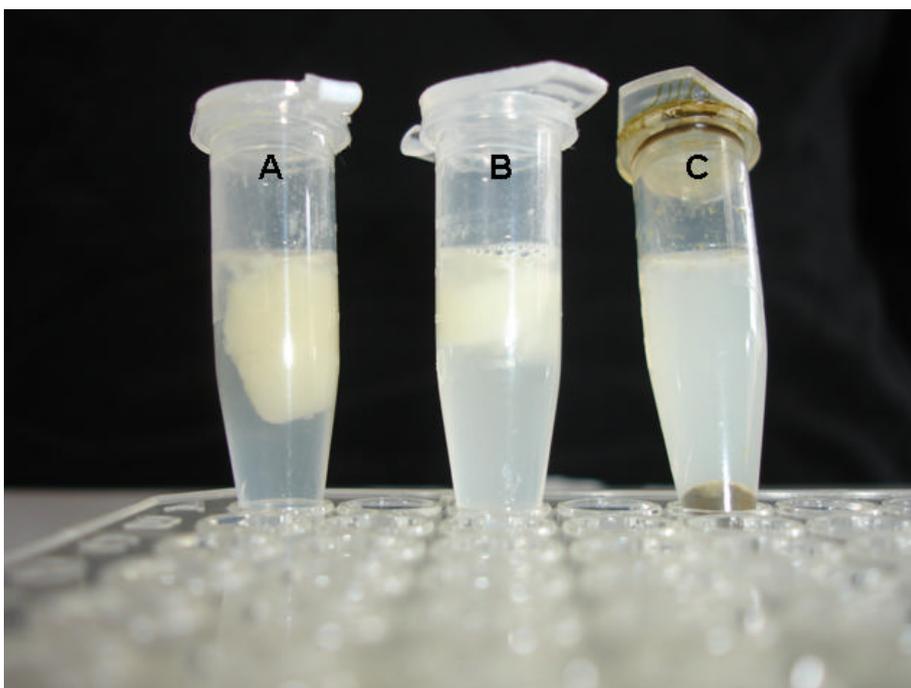


Figura 32: O teste de centrifugação das formulações contendo extrato hexânico (AMPAH) (C), não apresentou separação de fases no creme (A) e gel creme (B).

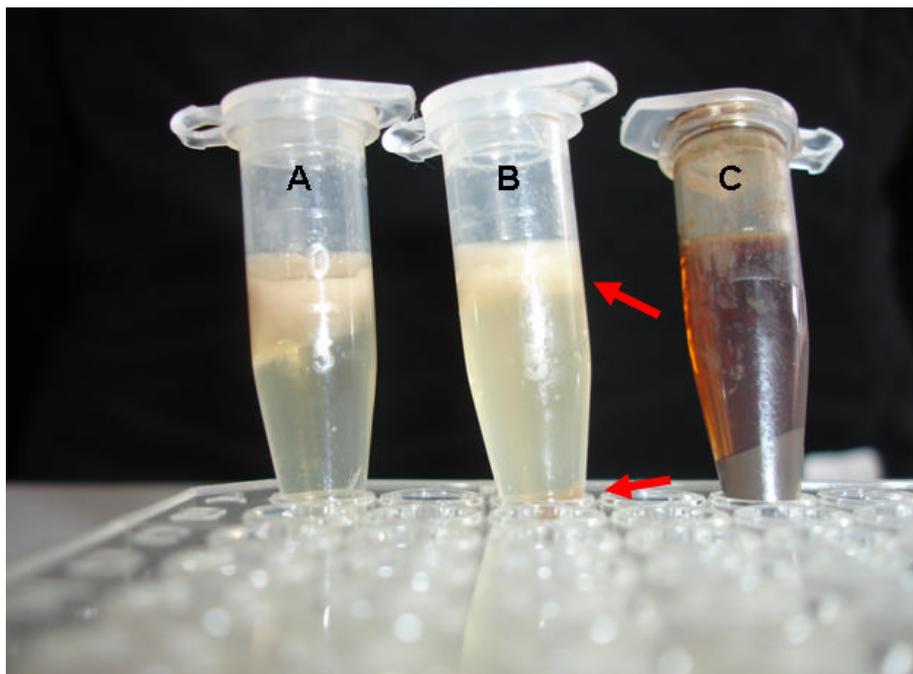


Figura 33: O teste de centrifugação das formulações contendo extrato etanólico (AMP AE) (C), não apresentou separação de fases no creme (A), porém apresentou separação de fases no gel creme (B).

5.5 Varredura na região do visível

A análise preliminar de varredura na região do visível mostrou que os extratos hexânico e etanólico de *A. marítima*, diluídos em metanol, apresentam uma tendência em absorver luz entre os comprimentos de onda de 600 e 700nm (Figura 34).

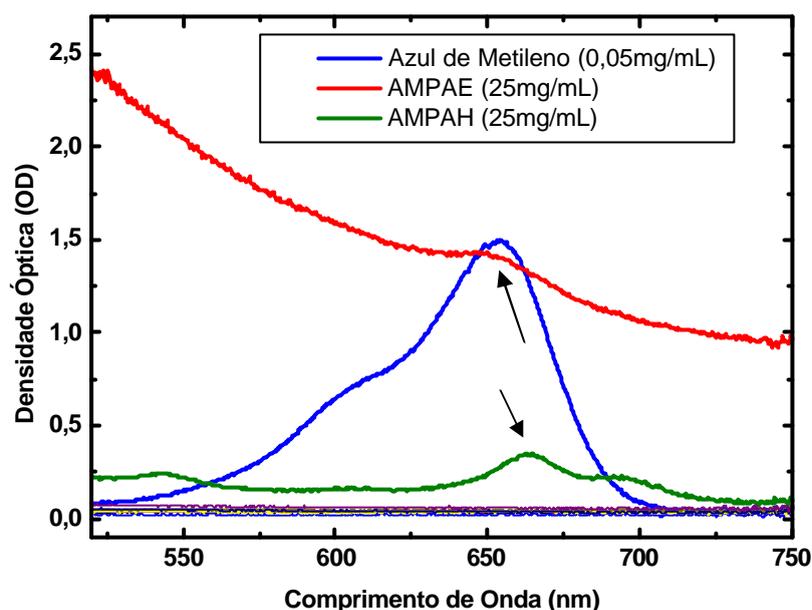


Figura 34: Espectros de absorção no visível para as diversas soluções utilizadas neste trabalho. As diversas linhas com OD próximas a zero se confundem, e são relativas às seguintes composições: Creme Base (5mg/mL); Gel Creme Base (5mg/mL); Propilenoglicol:Água (5:95); metanol, Creme AMPAH (5mg/mL); Gel Creme AMPAH (5mg/mL); Creme AMPAE (5mg/mL); Gel Creme AMPAE (5 mg/mL).

Como branco utilizou-se o diluente (propilenoglicol:água (5:95) ou metanol) e como controle positivo azul de metileno (0,05 mg/mL), e esse último apresentou absorção (Figura 35).

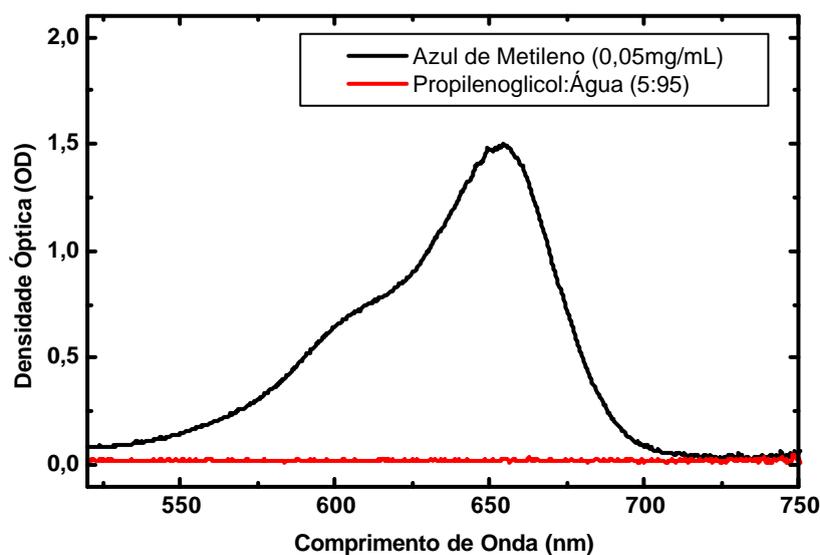


Figura 35: Espectros de absorção no visível para os Controles Azul de Metileno (0,05mg/mL) e Propilenoglicol:Água (5:95).

Dentro das condições de medida não foi possível observar nenhuma estrutura espectral sobressaindo do nível de ruído para as amostras formulações sem extratos, creme base e gel creme base (Figura 36).

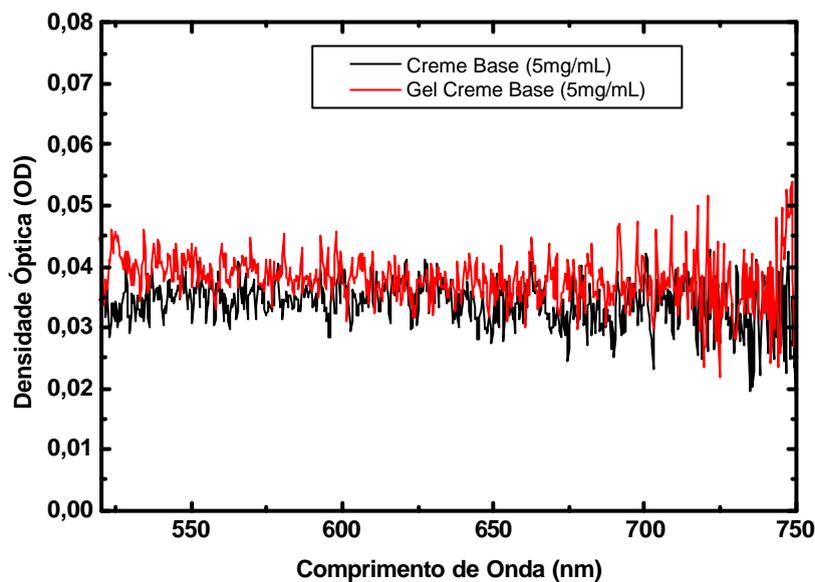


Figura 36: Espectros de absorção no visível para as formulações Creme e Gel Creme Base (5mg/mL), sem extratos, em escala expandida.

As formulações em creme contendo o extrato hexânico de *A. maritima* (50mg/g de creme) demonstraram uma tendência a absorver luz entre os comprimentos de onda de 600 e 700 nm (Figuras 37 e 38).

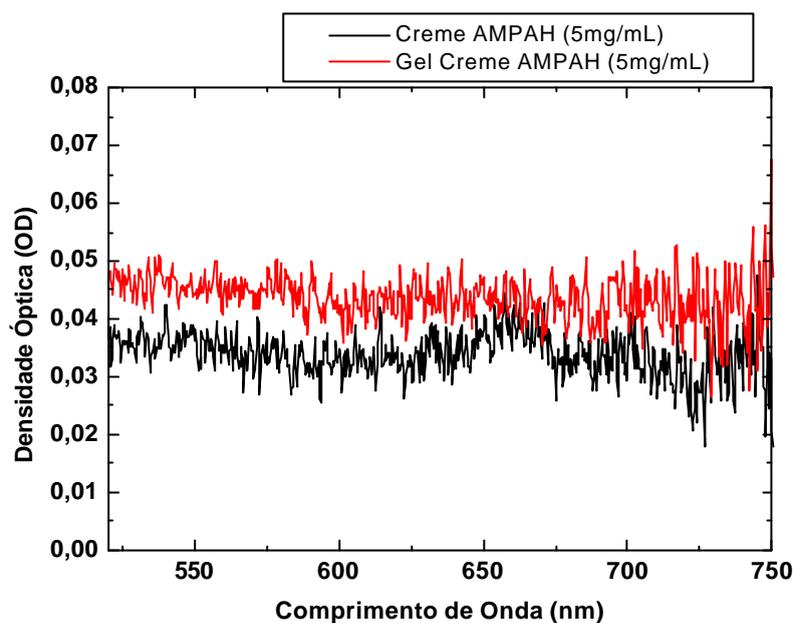


Figura 37: Formulações farmacêuticas, creme e gel creme, contendo extrato hexânico (AMPAH, 50mg/g de creme ou gel creme) na concentração de 5mg de creme ou gel creme/mL, em escala expandida.

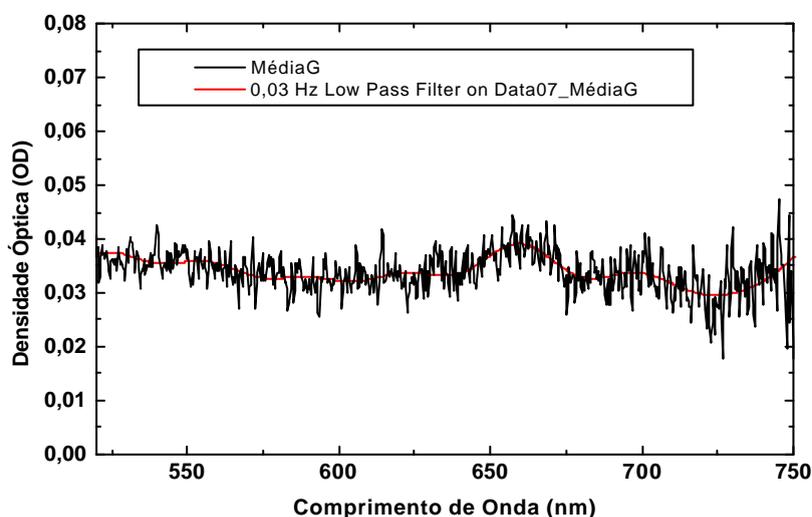


Figura 38: Espectro de absorção para o Creme contendo extrato hexânico (AMPAH, 50mg/g de creme ou gel creme) na concentração de 5mg de creme/mL, em escala expandida. A linha suave foi obtida submetendo o espectro ruidoso à filtragem com técnica de FFT (*fast Fourier Transform*). Foi utilizado filtro passa-baixa com frequência de corte de 0,03 Hz.

5.6 Ensaio biológico *in vitro* para avaliação dos extratos e de formulações tópicas contendo *Alternanthera maritima* como fotossensibilizadores naturais

Após estabelecido o protocolo do experimento, os ensaios foram realizados sendo os resultados apresentados nas tabelas 11 e 12 para os extratos hexânico e etanólico e tabelas 13 e 14 para as formulações creme e gel creme contendo os extratos. Os melhores resultados obtidos foram para as formulações contendo 50mg de extrato/g de creme ou gel creme.

Tabela 11: Resultado da atividade antimicrobiana extratos de *Alternanthera marítima* e amostras controles, placa não-irradiada, expresso como média do número de UFC/mL.

Microrganismos	Média do número de microrganismos expresso em UFC/mL* em ensaio na ausência de iluminação (NI)						
	AMPAH 25mg/mL	AMPAE 25mg/mL	Controle Inoculo	Controle negativo	Controle positivo PDT	Controle positivo	Inoculo Inicial
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	0 ^a	1,14.10 ⁷ (0,30) ^b
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	0 ^a	1,70.10 ⁶ (0,10) ^b

*: dados expressos como média n=6, (Coeficiente de Variação, CV%), onde CV (%)= (desvio padrão/média)x100; Controle positivo: cetozonazol (200ug/mL); Controle positivo PDT: Azul de metileno (0,05mg/mL); Controle negativo: diluente – propilenoglicol/água esterilizada (5:95); Inoculo inicial: número de ufc/mL do inoculo. Estatística: a ? b, Teste de Tukey, P<0,05.

Tabela 12: Resultado da atividade antimicrobiana dos extratos de *Alternanthera marítima* e amostras controles, placa irradiada, expresso como média do número de UFC/mL.

Microrganismos	Média do número de microrganismos expresso em UFC/mL* em ensaio na presença de iluminação (I)						
	AMPAH 25mg/mL	AMPAE 25mg/mL	Controle Inoculo	Controle negativo	Controle positivo PDT	Controle positivo	Inoculo Inicial
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	2,2.10 ⁴ (1,29) ^a	2,1.10 ⁵ (1,50) ^a	> 10 ⁷	> 10 ⁷	0 ^c	0 ^c	1,14.10 ⁷ (0,30) ^b
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	1,86.10 ⁴ (2,10) ^a	2,0.10 ⁴ (2,05) ^a	> 10 ⁶	> 10 ⁶	0 ^c	0 ^c	1,70.10 ⁶ (0,10) ^b

*: dados expressos como média n=6, (Coeficiente de Variação, CV%), onde CV (%)= (desvio padrão/média)x100; Controle positivo: cetozonazol (200ug/mL); Controle positivo PDT: Azul de metileno (0,05mg/mL); Controle negativo: diluente – propilenoglicol/água esterilizada (5:95); Inoculo inicial: número de ufc/mL do inoculo. Estatística: a ? b ? c, Teste de Tukey, P<0,05.

Tabela 13: Resultado da atividade antimicrobiana das formulações creme e gel creme contendo extratos de *Alternanthera maritima* (50 mg de extrato/g de creme ou gel creme) e amostras controles, placa não-irradiada, expresso como media do numero de UFC/mL.

Microrganismos	Media do numero de microrganismos expresso em UFC/mL* em ensaio na ausência de iluminação (NI)						
	Creme AMPAH 5mg/mL	Gel creme AMPAH 5mg/mL	Creme AMPAE 5mg/mL	Gel creme AMPAE 5mg/mL	Creme Base com conservante 5mg/mL	Gel Creme Base com conservante 5mg/mL	Inoculo Inicial
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	1,14.10 ⁷ (0,30)
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶	1,70.10 ⁶ (0,10)

*: dados expressos como media n=6, (Coeficiente de Variação, CV%), onde CV (%)= (desvio padrão/media)x100; Controle positivo: cetoconazol (200ug/mL); Controle positivo PDT: Azul de metileno (0,05mg/mL); Controle negativo: diluente – propilenoglicol/agua esterilizada (5:95); Inoculo inicial: numero de ufc/mL do inoculo. Os controles do inoculo, controle negativo, controle positivo e controle positivo PDT apresentaram os mesmos resultados como apresentados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 14: Resultado da atividade antimicrobiana das formulações creme e gel creme contendo os extratos de *Alternanthera maritima* (50 mg de extrato/g de creme ou gel creme) e amostras controles, placa irradiada, expresso como media do numero de UFC/mL.

Microrganismos	Media do numero de microrganismos expresso em UFC/mL* em ensaio na presença de iluminação (I)						
	Creme AMPAH 5mg/mL	Gel creme AMPAH 5mg/mL	Creme AMPAE 5mg/mL	Gel creme AMPAE 5mg/mL	Creme Base com conservante 5mg/mL	Creme base com conservante 5mg/mL	Inoculo Inicial
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	> 10 ⁷	1,14.10 ⁷ (0,30) ^b
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	2,57.10 ⁴ (1,70) ^a	2,25.10 ⁴ (2,40) ^a	2,83.10 ⁴ (2,40) ^a	2,43.10 ⁴ (2,80) ^a	> 10 ⁶	> 10 ⁶	1,7.10 ⁶ (0,10) ^b

*: dados expressos como media n=6, (Coeficiente de Variação, CV%), onde CV (%)= (desvio padrão/media)x100; Controle positivo: cetoconazol (200ug/mL); Controle positivo PDT: Azul de metileno (0,05mg/mL); Controle negativo: diluente – propilenoglicol/agua esterilizada (5:95); Inoculo inicial: numero de ufc/mL do inoculo. Estatística: a ? b, Teste de Tukey, P<0,05. Os controles do inoculo, controle negativo, controle positivo e controle positivo PDT apresentaram os mesmos resultados como apresentados nas tabelas 11 e 12.

Com a análise dos resultados foi possível observar redução significativa de crescimento microbiano de *C. dubliniensis* ATCC 778157 dos extratos hexânico e etanólico irradiados, o que não foi observado na ausência de irradiação (Figura 39 e Tabela 13). Entretanto para esse mesmo microrganismo não foi observado efeito antimicrobiano das formulações creme e gel creme (5 mg de creme/mL) contendo os

extratos ativos tanto na presença ou ausência de luz (Tabela 14). Estes resultados, portanto referem-se a 0,25mg de extrato ativo/mL no caso das formulações.

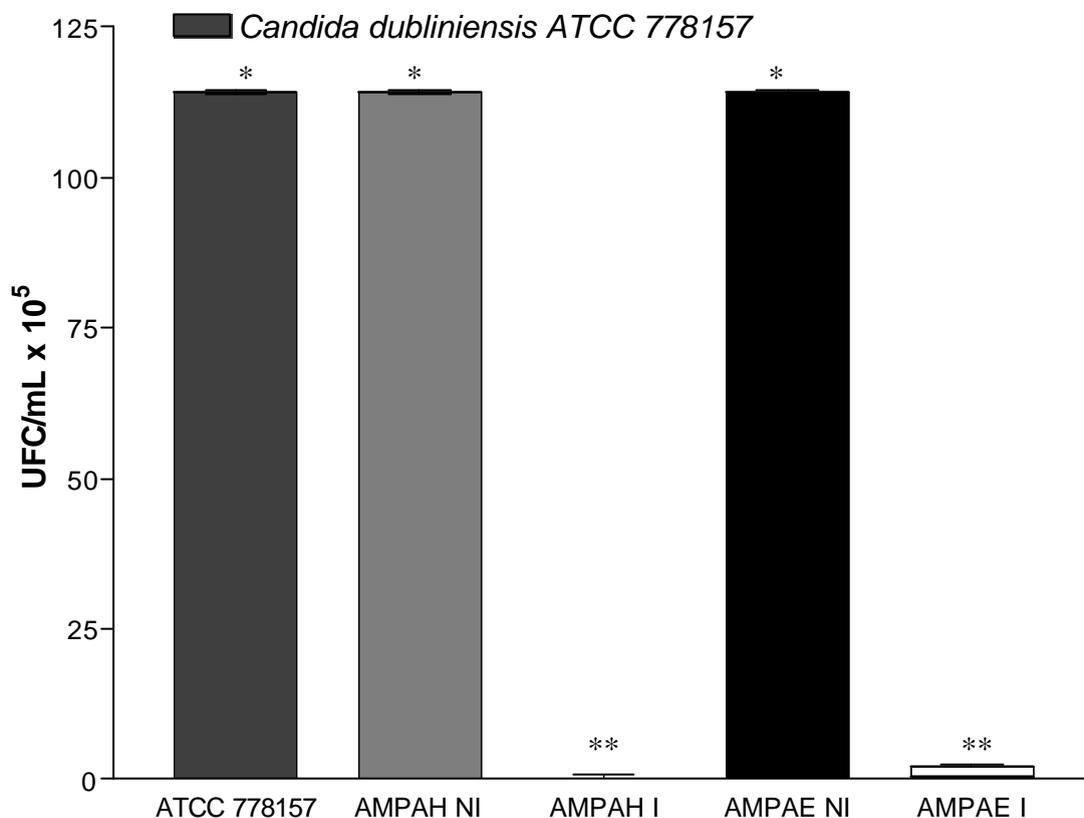


Figura 39: Média dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) de *Candida dubliniensis* ATCC 778157 para os seguintes grupos estudados: Extrato Hexânico Não Irradiado de *Alternanthera maritima* (AMPAH NI) 25mg/mL (n=6); Extrato Hexânico Irradiado de *Alternanthera maritima* (AMPAH I) 25mg/mL (n=6); Extrato Etanólico Não Irradiado de *Alternanthera maritima* (AMPAH NI) 25mg/mL (n=6); Extrato Etanólico Irradiado de *Alternanthera maritima* (AMPAH I) 25mg/mL (n=6). Estatística: * ? **, Teste de Tukey, P<0,05.

Para *C. dubliniensis* ATCC 777, observou-se redução significativa de crescimento microbiano com extratos hexânico e etanólico irradiados (Figura 40 e Tabela 15), bem como redução significativa do crescimento microbiano de todas as formulações (5mg de creme ou gel creme/mL) contendo os extratos (50 mg de extrato/g de creme ou gel creme) na presença de luz (Figura 41 e Tabela 16).

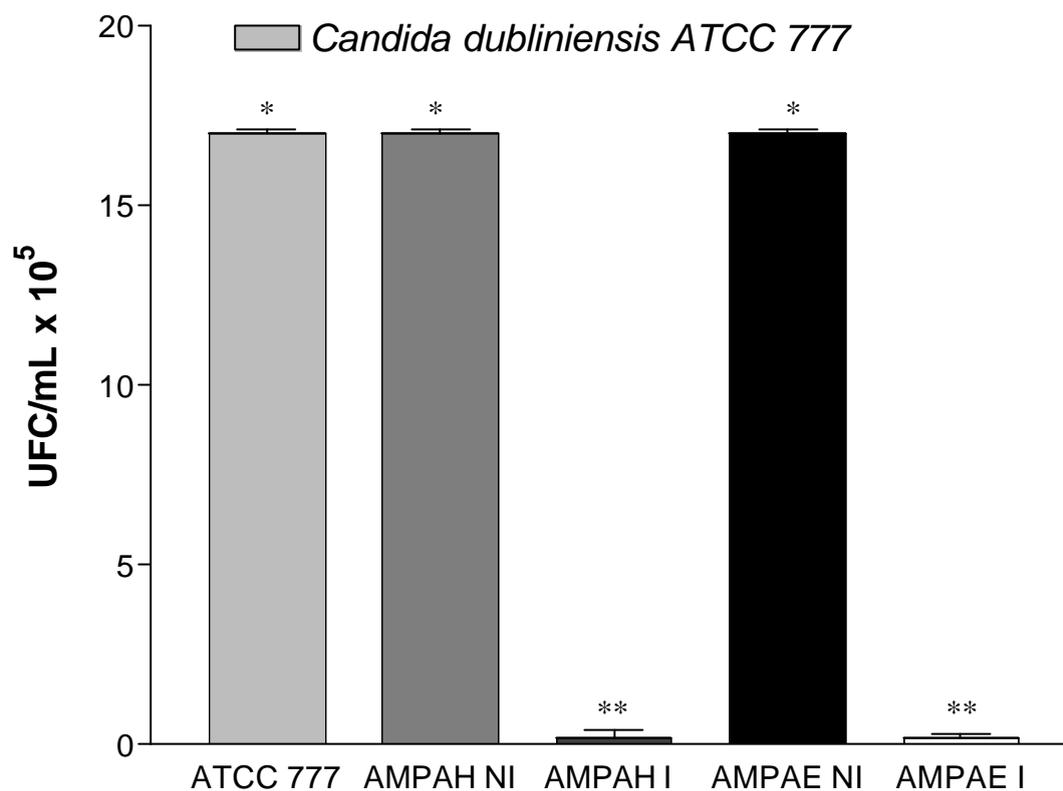


Figura 40: Média dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) de *Candida dubliniensis* ATCC 777 para os seguintes grupos estudados: Extrato Hexânico Não Irradiado de *Alternanthera maritima* (AMPAH NI) 25mg/mL (n=6); Extrato Hexânico Irradiado de *Alternanthera maritima* (AMPAH I) 25mg/mL (n=6); Extrato Etanólico Não Irradiado de *Alternanthera maritima* (AMPAE NI) 25mg/mL (n=6); Extrato Etanólico Irradiado de *Alternanthera maritima* (AMPAE I) 25mg/mL (n=6). Estatística: * ? **, Teste de Tukey, P<0,05.

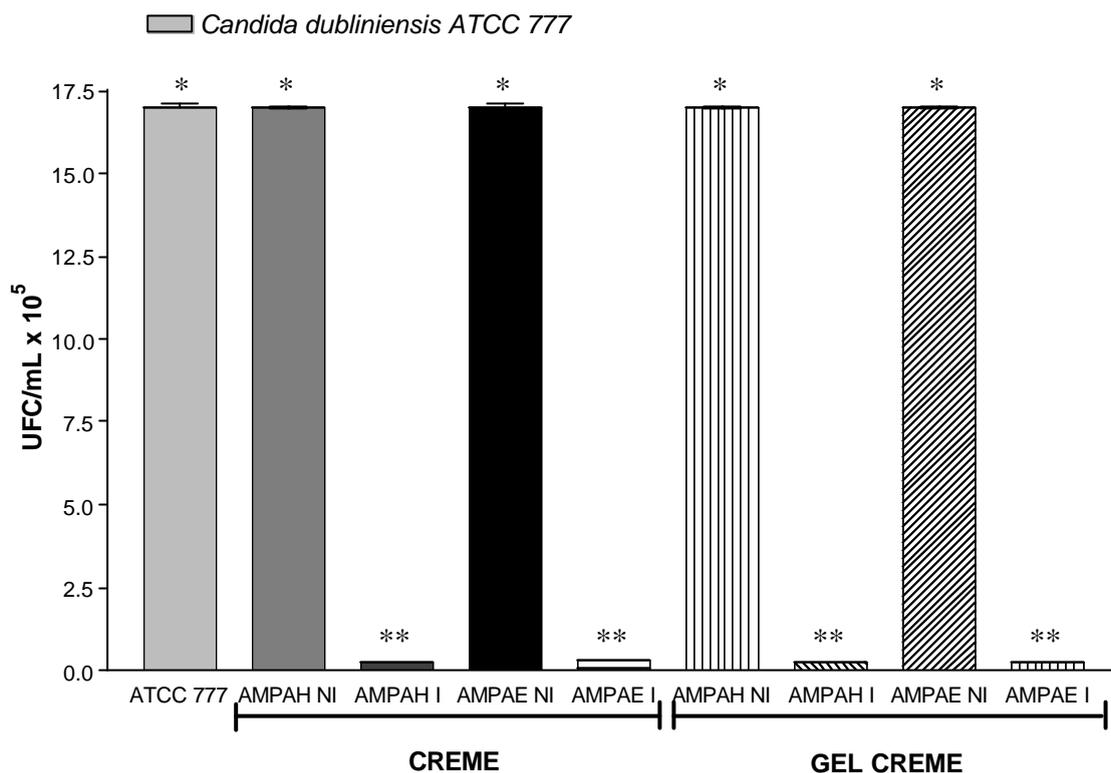


Figura 41: Média dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) de *Candida dubliniensis* ATCC 777 para os seguintes grupos estudados: Creme contendo Extrato Hexânico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Não Irradiado (AMPAH NI) 5mg/mL (n=6); Creme contendo Extrato Hexânico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Irradiado (AMPAH I) 5mg/mL (n=6); Creme contendo Extrato Etanólico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Não Irradiado (AMPAE NI) 5mg/mL (n=6); Creme contendo Extrato Etanólico de *Alternanthera marítima* (0,25 mg de extrato/mL), Irradiado (AMPAE I) 5mg/mL (n=6); Gel Creme contendo Extrato Hexânico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Não Irradiado (AMPAH NI) 5mg/mL (n=6); Gel Creme contendo Extrato Hexânico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Irradiado (AMPAH I) 5mg/mL (n=6); Gel Creme contendo Extrato Etanólico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Não Irradiado (AMPAE NI) 5mg/mL (n=6); Gel Creme contendo Extrato Etanólico (0,25 mg de extrato/mL) de *Alternanthera marítima*, Irradiado (AMPAE I) 5mg/mL (n=6). Estatística: * ? **, Teste de Tukey, P<0,05.

Tabela 15: Média (n=6) e Coeficiente de Variação dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) e da percentagem de redução do crescimento microbiano quando tratados com os extratos de *Alternanthera marítima* na presença e ausência de luz.

Microrganismos	Média do numero de microrganismos expresso em UFC/mL *								
	AMPAH 25 mg/mL Não Irradiado	Redução (%)	AMPAH 25mg/mL Irradiado	Redução (%)	AMP AE 25 mg/mL Não Irradiado	Redução (%)	AMP AE 25mg/mL Irradiado	Redução (%)	Inoculo Inicial
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	$> 10^7$	0	$2,2 \cdot 10^4$ (1,29) ^a	99,81	$> 10^7$	0	$2,1 \cdot 10^5$ (1,50) ^a	98,16	$1,14 \cdot 10^7$ (0,30) ^t
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	$> 10^6$	0	$1,86 \cdot 10^4$ (2,10) ^a	98,9	$> 10^6$	0	$2,0 \cdot 10^4$ (2,05) ^a	99,80	$1,70 \cdot 10^6$ (0,10) ^t

*: dados expressos como media, n=6, (Coeficiente de Variação, CV%), onde CV (%)= (desvio padrão/media)x100; Inoculo inicial: numero de ufc/mL do inoculo. Estatística: a ? b, Teste de Tukey, P<0,05.

Tabela 16: Média (n=6) e Coeficiente de Variação dos valores de unidade formadora de colônias por mililitros (UFC/mL) e da percentagem de redução do crescimento microbiano quando tratados com as formulações contendo os extratos de *Alternanthera marítima* na presença de luz.

Microrganismos	Média do numero de microrganismos expresso em UFC/mL *								
	Creme AMPAH 5mg/mL Irradiado	Redução (%)	Gel creme AMPAH 5mg/mL Irradiado	Redução (%)	Creme AMP AE 5mg/mL Irradiado	Redução (%)	Gel Creme AMP AE 5mg/mL Irradiado	Redução (%)	Inoculo Inicial
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 778157	$> 10^7$	0	$> 10^7$	0	$> 10^7$	0	$> 10^7$	0	$1,14 \cdot 10^7$ (0,30) ^b
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC 777	$2,57 \cdot 10^4$ (1,70) ^a	99,20	$2,25 \cdot 10^4$ (2,40) ^a	99,30	$2,83 \cdot 10^4$ (2,40) ^a	99,12	$2,43 \cdot 10^4$ (2,80) ^a	99,24	$1,70 \cdot 10^6$ (0,10) ^b

*: dados expressos como media, n=6, (Coeficiente de Variação, CV%), onde CV (%)= (desvio padrão/media)x100; Inoculo inicial: numero de ufc/mL do inoculo. Estatística: a ? b, Teste de Tukey, P<0,05.

6 DISCUSSÃO

O material vegetal utilizado neste estudo foi coletado no seu habitat natural (item 4.1, página 69), tendo em vista que a primeira etapa da investigação farmacognósica é a coleta do material vegetal, registrando o local, a hora, a data da coleta, já que o meio ambiente, a hora do dia e a época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos metabólitos secundários (PEREIRA et al., 2004; CECHINEL; YUNES, 1998; MACIEL et al., 2002; TOLEDO et al., 2003).

Após a coleta, a espécie vegetal aqui estudada teve sua identificação botânica confirmada e uma amostra do material vegetal foi depositada em um herbário. Para isso, foi preparada uma exsicata, essencial para a identificação botânica, servindo de material testemunho (item 4.1, página 69).

O método de extração utilizado foi maceração tendo sido obtido um bom rendimento em massa. Este método de extração é realizado sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (figura 21, página 69). Por sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula.

No presente estudo procedeu-se o desenvolvimento de preparações farmacêuticas semi-sólidas (creme e gel creme), empregando uma fase oleosa e uma fase aquosa (tabelas 8 e 9). A fase oleosa é constituída por componentes que elevam a viscosidade da forma farmacêutica/cosmética e por vezes também são emulsionantes não iônicos (Polawax), que por não apresentarem carga elétrica predominante, permitem maior flexibilidade de uso na preparação de emulsões por serem compatíveis com a maioria dos princípios ativos, atuam na faixa de pH de 2,0 à 12,0.

O crescimento bacteriano ocorre geralmente na fase aquosa da emulsão, portanto os conservantes devem estar nessa mesma fase, pois se houver a migração do conservante para a fase oleosa pode ocorrer a perda de efetividade do mesmo, além disso, o conservante não deve estar ligado a nenhum dos componentes da formulação, não deve ser adsorvido e deve estar no estado não-ionizado que é mais efetivo contra as bactérias (ALLEN, 2004).

A diferença entre as duas formulações (creme base e gel creme base) está propriamente na concentração dos componentes, uma vez que para a preparação

do gel creme base, foi utilizado Carbopol (tabelas 1, 2, 8 e 9), gel aniônico, ou seja, gel de carga negativa, como espessante da emulsão, evitando assim concentrações elevadas de compostos lipofílicos, originando o gel-creme (ANTUNES, 2002; PRISTA et al, 1967; DA FONSECA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al, 2002).

Após o preparo das formulações creme e gel creme contendo os extratos vegetais, avaliaram-se suas características organolépticas, que se mativeram dentro do padrão aceitável em termos visual, cor, textura e odor, resultando em um bom creme e gel creme, onde estes mantiveram sua viscosidade e homogeneidade durante a estocagem, sem sofrer contração de volume durante o armazenamento (ANTUNES, 2002; PRISTA et al, 1967; DA FONSECA, 2000; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al, 2002).

Determinou-se o pH das formulações e os valores encontrados ficaram entre 5,0 e 5,5 (item 5.4, página 85), o que é compatível com o pH de formulações tópicas veiculadas na pele humana (ANTUNES, 2002; THOMPSON, 2006; ALLEN, 2004; DIAZ et al., 2002).

Dentre os ensaios de estabilidade preconizados pela Anvisa (2004), tem-se o ensaio de centrifugação, no qual a separação de fase indica perda de estabilidade das formulações, acelerando as reações de degradação (MONTAGNER; CORRÊA, 2004).

Em relação ao ensaio de centrifugação, para os extratos observou-se separação de fase tanto para o extrato hexânico, quanto o etanólico. Para as formulações desenvolvidas não se verificou separação de fases visível ao olho nu na maioria dos cremes e géis cremes (base e com o extrato incorporado). Porém, somente apresentou separação de fases o gel creme com extrato etanólico de *A. marítima* (AMP AE, 50 mg de extrato/g de creme) (figuras 31, 32 e 33). Assim, de maneira geral as formulações desenvolvidas favoreceram a estabilidade dos extratos quanto a separação de fases.

A análise preliminar de varredura na região do visível mostrou que os extratos hexânico e etanólico de *A. marítima*, diluídos em metanol, apresentaram uma tendência em absorver luz entre os comprimentos de onda de 600 e 700nm (figura 34) o que sugere a possibilidade de emprego como agente fotossensibilizador. Nas condições de medida não foi possível observar nenhuma estrutura espectral sobressaindo do nível de ruído, para as formulações sem extratos, creme base e gel

creme base (figura 36), indicando que as formulações farmacêuticas utilizadas não interferem na absorção de luz durante a terapia laser.

A formulação em creme contendo extrato hexânico de *A. maritima* demonstrou uma tendência a absorver luz entre os comprimentos de onda de 600 e 700 nm (figuras 37 e 38), que é a região de trabalho de fotossensibilizadores em terapia antimicrobiana associada à terapia laser de baixa potência (DE SOUZA et al., 2006).

Atendendo a finalidade que este estudo se propôs, de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos naturais, foi necessário o estabelecimento de uma concentração necessária mínima, bem como de uma concentração sub-inibitória (tabela 4), uma vez que além do estudo da atividade antimicrobiana do extrato vegetal, também se propôs estudar o seu efeito como fotossensibilizador natural.

Como ponto de partida para o ensaio biológico *in vitro*, foi realizada uma triagem prévia, pelo método de difusão em agar técnica do poço (figura 22), determinando quais os extratos apresentavam ou não efeito antimicrobiano nas condições ambiente. Para os extratos que se mostraram ativos na concentração de 100mg/mL, procedeu-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (figura 23).

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços (figura 23), depois de realizada a leitura das placas para determinação da concentração inibitória mínima, considerou-se como CIM, a menor concentração que inibiu completamente o crescimento das cepas testadas (tabela 4).

Procedeu-se, então a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em uma concentração subinibitória mínima em associação com a radiação laser (figura 28) e observou-se que os extratos que nesta concentração subinibitória eram inativos passaram a ser ativos, indicando a presença de substâncias fotoativas no extrato (tabelas 11 e 12). Para estes extratos ativos procedeu-se o desenvolvimento de formulações creme e gel creme com concentração 100 vezes menor e procedeu-se a avaliação da atividade PDT antimicrobiana (tabelas 13 e 14).

Ao avaliar-se o efeito antimicrobiano da associação laser/extratos e/ou laser/formulações tópicas contendo os extratos sobre as culturas de *C. dubliniensis* (ATCC 778157) e *C. dubliniensis* (ATCC 777), foi verificada diferença estatisticamente significativa de UFCs viáveis, bem como para o grupo controle positivo para PDT (azul de metileno) na dosimetria laser empregada. Isto é, a

dosimetria de 28 J/cm² determinou a inativação significativa de todas as espécies estudadas ($p < 0,05$) (tabelas 11 e 12).

A partir dos resultados de, De Souza et al (2006) que observaram que a PDT com energia de 10,5 J (dosimetria de 28 J/cm²) aplicada durante cinco minutos com o laser diodo e tendo azul de metileno como fotossensibilizador, inativou 91,6% das UFCs de *Candida krusei*, 88,6% das UFCs de *Candida albicans*, 84,8% das UFCs de *C. dubliniensis* e 82,3% das UFCs de *Candida tropicalis*, estabeleceu-se um protocolo experimental para PDT de produtos naturais e os resultados mostraram que frente a cepas distintas de *C. dubliniensis*, em PDT com energia aplicada de 10,64 J (fornecida pela dosimetria de 28 J/cm²) aplicada durante cinco minutos com laser de InGaAlP, os extratos hexânico e etanólico, de *A. marítima* atuaram como fotossensibilizadores inativando os microrganismos empregados como indicadores da atividade (figuras 39, 40 e 41).

As dosimetrias recomendadas para uso do laser InGaAlP chegam até 130J/cm². De acordo com os autores, dosimetrias mais altas são reservadas para áreas de inflamação crônica (ALMEIDA-LOPES ; MASSINI, 2002).

Frente a *C. dubliniensis* (ATCC 778157) observou-se que o emprego da luz laser associada ao extrato hexânico (AMPAH) inativou 99,81% das UFCs, e associada ao extrato etanólico (AMPAE) inativou 98,16% das UFCs (tabela 15).

Para a outra indicadora, o extrato hexânico e o extrato etanólico na presença de luz inativaram, respectivamente, 98,9 e 99,8% das UFCs de *C. dubliniensis* (ATCC 777) (tabela 15), sendo que essa mesma levedura, apresentou-se significativamente mais sensível à PDT associada com as formulações farmacêuticas (creme e gel creme) contendo os extratos hexânico e etanólico de *A. marítima* na concentração de 5 mg de creme ou gel creme/mL, o que corresponde a 0,25 mg de extrato ativo/mL (tabelas 13 e 14; figura 41). As taxas de inativação foram, respectivamente, de 99,2% (creme AMPAH), 99,3% (gel creme AMPAH), 99,12% (creme AMPAE) e 99,24% (gel creme AMPAE) (tabela 16).

Vale dizer que a concentração do extrato bioativo efetiva na formulação foi de 5%, o que equivale a 0,25mg de extrato/mL, concentração esta 100 vezes menor do que a do extrato bruto que foi fotoativo a 25 mg/mL. Estes resultados demonstram como a formulação farmacêutica favorece a biodisponibilidade dos ativos otimizando a ação no sistema biológico.

Considerando o critério de taxa de inativação ótima da fotossensibilização de 50% (KRESPI et al., 2005) observa-se que a PDT empregando a luz laser na dosimetria de 28 J/cm² mostrou-se viável nos grupos testes acima mencionados (figuras 39, 40 e 41).

A potência útil do laser que associada ao tempo de irradiação determina o total de energia aplicado no local, no presente estudo foi de 10,64 J com a dosimetria de 28 J/cm² (item 4.6, página 77). Trata-se de um valor de energia menor que 12,2 J, a qual foi utilizada na inativação eficaz de *S. sanguinis in vitro* em biofilmes bacterianos por Wilson, Burns e Pratten (1996).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana dos extratos de *A. marítima*, vale dizer que são necessários estudos quanto a composição química destes extratos bioativos na tentativa de se identificar substâncias fotoativas, podendo esta atividade não ser atributo de uma única substância, e sim por mais de uma substância, dado o fato do extrato tratar-se de uma mistura complexa de substâncias (efeito de sinergismo). Além disso, muitas vezes pode-se tratar de substâncias minoritárias, quimicamente instáveis quando isoladas, o que poderia dificultar sua caracterização química. Por outro lado, um extrato bruto vegetal que possui efeito bactericida satisfatório, poderia não necessitar de processos de isolamento de substâncias ativas, reduzindo etapas químicas e conseqüentemente custos financeiros, podendo ser utilizado como droga vegetal ou como um fitocomplexo ou medicamento fitoterápico. Para tanto, deveriam ser garantidos a segurança, a eficácia e a qualidade do produto (PINTO et al., 2002). Salvador (2005) em estudo fitoquímico biomonitorado pelas atividades antimicrobiana e antiprotozoário, relata a presença de flavonóides aglicona e O- e C-glicosilados como constituintes majoritários do extrato etanólico das partes aéreas de *A. marítima*, além da presença de saponinas, esteróides e alcalóides. No extrato hexânico foram identificados ácidos graxos, esteróides e triterpenóides. Entretanto, estudos precisam ser realizados na tentativa de se verificar se substâncias pertencentes a estas classes de metabólitos secundários são capazes de se tornarem fotoativos e estariam contribuindo para o efeito fotossensibilizador em PDT verificado para os extratos de *A. marítima*.

No presente trabalho, a PDT foi aplicada em *C. dubliniensis* (forma de levedura) uma vez que foram empregados cultivos em Sabouraud dextrose-ASD (figura 28). De acordo com Jackson et al (1999), tanto a forma de levedura como a

forma filamentosa de *Candida sp.* são sensíveis à terapia, embora a hifa seja mais susceptível. Jackson et al (1999) empregaram energia de 21 J, isto é, 1,97 vezes superior à fornecida pelos 28 J/cm² do presente estudo (item 4.6, página 77) e verificaram que a sensibilidade das hifas ao PDT antimicrobiano foi 175 vezes superior à das leveduras. A maior susceptibilidade pode estar associada a diferenças entre hifas e leveduras na expressão dos sítios que constituem o alvo da ação de substâncias ativas. Baseado neste comparativo, se 58,33% das leveduras de *C.dubliniensis*, de ambas as cepas, tendo os extratos de *A. marítima* como fotossensibilizador foram sensíveis à PDT na dosimetria de 28 J/cm² (tabelas 15 e 16), é sugestivo que as hifas, que constituem a forma patogênica da candidose, apresentem maior sensibilidade a PDT nesta mesma dosimetria. Tal probabilidade deve ser analisada, induzindo a formação de hifas, por meio de testes *in vitro*, uma vez que a assimilação do fotossensibilizador pela célula é maior em meio de cultura com condições mais restritivas ou na presença de alterações na composição da parede celular tanto de hifas como de leveduras em diferentes condições fisiológicas, o que permite transporte passivo mais eficiente do fotossensibilizador para o interior da célula (BLISS et al., 2004).

No presente estudo, o período de incubação do fotossensibilizador em contato com as células, previamente à aplicação do laser, foi de 1 minuto (item 4.7; página 78). Conforme o preconizado na PDT antimicrobiana, o fotossensibilizador deve permanecer em contato com as células durante um período de tempo que varia de 1 a 10 minutos, previamente à aplicação do laser (RIBEIRO; GROTH, 2005).

Jackson et al (1999) verificaram, *in vitro*, que o período ideal de incubação do fotossensibilizador azul de toluidina foi de cinco minutos para leveduras de *C. albicans* e que o aumento do tempo de incubação não intensifica a inativação das UFCs.

A aplicação isolada do laser não afeta a viabilidade das células microbianas, fato que também é observado com o emprego de luz incoerente (WILSON; MIA, 1993; JACKSON et al., 1999; ROVALDI et al., 2000 ; KRESPI et al., 2005). Jackson et al (1999) aplicaram luz laser em leveduras e hifas de *Candida sp*, resultando em energia de 21 J e não verificaram alteração da viabilidade das mesmas. De Souza et al (2006) verificaram que a aplicação isolada do laser provocou redução das UFCs de *C. tropicalis*, sugerindo susceptibilidade apenas desta espécie à luz laser quando comparado a outras espécies de *Candida*, incluído *C. dubliniensis*. Estudos

realizados demonstram que a PDT é mais eficaz na eliminação de bactérias que as aplicações isoladas de fotossensibilizadores e do laser, resultando na permanência de mais de 50% de microrganismos viáveis (BHATTI et al., 2000; CHAN ; LAI, 2003), o que mostra a importância da associação do laser com fotossensibilizadores para o sucesso da PDT antimicrobiana.

A comparação entre os resultados em estudos experimentais utilizando PDT não é muito fácil e isto ocorre devido, por exemplo: à grande variedade de fotossensibilizadores existentes tanto na sua natureza química, quanto em suas propriedades físico-químicas e fotoativas; à diversidade de possibilidades das condições operacionais da PDT; ao comportamento distinto frente a diferentes microrganismos (KÖMERIK et al., 2002).

A inativação de bactérias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas, é bem sucedida utilizando PDT com diferentes doses (KARRER et al., 1999; ROVALDI et al., 2000; KÖMERIK et al., 2003). Zeina et al (2002), relatam maior sensibilidade das células bacterianas à PDT em relação às leveduras. Isto pode estar relacionado ao fato de que fungos, como espécies de *Candida*, são microrganismos eucariotos, apresentando um número maior de organelas que servem de alvo para interação com o fotossensibilizador. Outro fato a ser considerado é o volume celular, uma vez que espécies de *Candida* são 25 a 50 vezes maiores que bactérias como *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.*

No entanto é importante ressaltar que a PDT não substitui a terapia antimicrobiana convencional, porém mostra-se uma como mais uma alternativa terapêutica tópica, mais seletiva do que a antibioticoterapia sistêmica, evitando a alteração da microbiota normal em sítios não-alvos e minimizando efeitos colaterais da administração sistêmica sendo uma opção de tratamento local rápido, de baixo custo e com risco de *overdose* baixo ou inexistente (WAINWRIGHT, 1998). Além disso, a resistência microbiana pode ser evitada com o emprego da PDT, sendo também improvável o aparecimento de resistência fúngica ao tratamento, já que a inativação do microrganismo é mediada por oxigênio singlete (EMBLETON et al., 2002; KARRER et al., 1999; TEICHERT et al., 2002).

No presente estudo a aplicação da PDT em sessão única sobre as culturas dos microrganismos estudados mostrou resultados satisfatórios. Desta forma, o emprego da PDT tendo como fotossensibilizadores extratos hexânico e etanólico de *A. marítima* pode constituir uma alternativa potencial para o tratamento de infecções

superficiais, particularmente as causadas por *C. dubliniensis*. Porém a estabilidade do agente fotossensibilizador deve ser mantida até sua ativação pela fonte de luz, assim como a penetração através da pele e da mucosa deve ser adequada (RIBEIRO; GROTH, 2005). As formulações farmacêuticas contendo o extrato hexânico e etanólico das partes aéreas de *A. marítima* também foram bioativas. Entretanto estes estudos são preliminares, necessitando de um maior aprofundamento tanto com os extratos, quanto com as formulações tópicas desenvolvidas, além da necessidade de serem avaliados outros microrganismos indicadores em PDT antimicrobiana com estes extratos fotoativos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

- Os extratos obtidos em hexano e etanol das partes aéreas de *A. maritima*, apresentaram bandas de absorção entre 650 e 700nm compatível com a região de trabalho da PDT;
- Os extratos hexânico (AmpaH) e etanólico (AmpaE) de *A. maritima*, em concentração sub-inibitoria (25 mg/mL), reduziram o crescimento microbiano das duas cepas de *C. dubliniensis* (ATCC 778157 e ATCC 777) quando irradiados com o laser de baixa potência (InGaAIP) nas condições experimentais utilizadas;
- As formulações creme obtidas mostraram-se estáveis no teste de centrifugação e com pH = 5,5 compatível com formulações tópicas desenvolvidas para aplicação na pele humana;
- As preparações farmacêuticas semi-sólidas (creme e gel creme) desenvolvidas contendo os extratos hexânico e etanólico (50mg/g de creme ou gel creme) de *A. maritima* apresentaram efeito antimicrobiano (a 5 mg de creme ou gel creme/mL, equivalente a 0,25mg de extrato ativo/mL) quando submetidos à irradiação com laser de baixa potência frente a cepa indicadora *C. dubliniensis* ATCC 777;
- As formulações obtidas otimizaram a atividade dos extratos frente a *C. dubliniensis* ATCC 777 quando associados à formulação farmacêutica tópica, observando-se efeito em PDT antimicrobiana para as formulações contendo os extratos em concentração 100 vezes menor do que a observada para o extrato bruto nas mesmas condições experimentais.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste trabalho encorajam estudos mais detalhados, dentre eles pode-se citar:

- Estudos fitoquímicos para a caracterização química dos extratos fotoativos de maneira a se identificar quais os constituintes presentes nos extratos bioativos estariam atuando como fotossensibilizadores;
- Avaliação de efeitos de sazonalidade e da influencia de fatores edaficos (temperatura, luminosidade, umidade, pH do solo etc) na reprodutividade da atividade biológica dos extratos;
- Estudos futuros tanto *in vitro* como *in vivo*, buscando-se detalhar e pormenorizar os efeitos biológicos dos extratos estudados para um possível emprego em PDT antimicrobiana, estabelecendo-se, dentre outras abordagens, uma curva dose resposta dos extratos bioativos frente ao laser, variando os tipos de laser e outras condições de irradiação, bem como estudando outros microrganismos e procedendo a realização de estudos de toxicidade, bem como estudos *in vivo*.
- Investigações mais detalhadas das formulações aqui empregadas como veículos, visando potencializar o efeito dos extratos de *A. maritima* associados ao laser de baixa potência para uma possível aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana.
- Para que se possa ter uma margem de segurança para aplicação *in vivo*, se fazem necessários novos estudos *in vitro* e em modelos animais para melhor fundamentarem-se os resultados obtidos, bem como estudos desenvolvendo procedimentos analíticos, incluindo estudos de controle de qualidade das preparações farmacêuticas desenvolvidas, identificando possíveis substâncias marcadoras, dentre outras possíveis abordagens.

REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- ALLEN JR., L. V. Manipulando emulsões. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 6, n. 3, p. 169-176, 2004.
- ALLISON, R.; DOWNIE, G.; CUENCA, R.; HU, X.; CHILDS, C.; SIBATA, C. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.
- ALMEIDA-LOPES, L.; MASSINI JÚNIOR, R. **Laseres e Suas Aplicações: Manual do Usuário**. São Carlos: DMC Equipamentos, 2002. 30p.
- AMARAL, L.; VIVEIROS, M.; KRISTIANSEN, J.E. Phenothiazines: potential alternatives for the management of antibiotic resistant infections of tuberculosis and malaria in developing countries. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 12, p. 1016-1022, 2001.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. **Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568p.
- ANTUNES JR., D. **Farmácia de Manipulação – Noções Básicas**. 1. ed. São Paulo: Editorial Tecnopress, 2002. 442p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004. (Séries Qualidade em cosméticos; v. 1).
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), **Manual Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI** (antigo NCCLS).
<<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acesso em: 19/06/2008.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. São Paulo: Artmed, p.2001. 504-545.
- BELKIN, M.; SCHWARTZ, M. New biological phenomena associated with laser radiation. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 687-690, 1989.
- BERQUÓ, L.S.; BARROS, A.J.D.; LIMA, R.C.; BERTOLDI, A.D. Utilização da antimicrobianos em uma população urbana. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n 2, p. 239-246, 2004.
- BHATTI, M.; MACROBERT, A.; HENDERSON, B.; SHEPHERD, P.; CRIDLAND, J.; WILSON, M. Antibody-targeted lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2615-2618, 2000.

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, n. 6, p. 2000-2006, 2004.

BORG, M. ; RÜCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. **Infection Immunity**, v. 56, n.3, p. 626-631, 1988.

BORSCH, T.; CLEMANTS, S. ; MOSYAKIN, S. Symposium: Biology of the Amaranthaceae-Chenopodiaceae alliance. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 128, n. 3, p. 234-235, 2001.

BOUCHARA, J. P.; TRONCHIN, G.; ANNAIX, V.; ROBERT R.; SENET, J. M. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. **Infection Immunity**, v. 58, n. 1, p. 48-54, 1990.

BROSSCHE VH, DROMER F, IMPROVISI I, LOZANO-CHIU M, REX JH, SANGLARDS D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v. 36, n. 1, p. 119-128, 1998.

BROWN, D. M.; JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W. A.; BAQUI, A. A.; MEILLER, T. F. Identification of *Candida dubliniensis* in a study of HIV -seropositive pediatric dental patients. **Pediatric Dental Journal**, v. 22, n.3, p. 234-238, 2000.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLA, R.G.; GENOVESE, W.J. **Laser na Odontologia**. São Paulo: Pancast, 1991. 61 p.

BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. 356 p.

BRUGNERA JÚNIOR, A. **Atlas de Laserterapia Aplicada à Clínica Odontológica**. São Paulo: Santos, 2003. 119 p.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trens in Microbiology**. v. 9, n.7, p. 327-335, 2001.

CALDERONE, R. A. ; SCHELD, W. M. Role of fibronectin in the pathogenesis of *candida* infections. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. S400-403, 1987.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; VIUDES, A.; QUINDÓS, G.; GOBERNADO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.45, n. 3, p. 203-206, 2003.

CARRÉ, V.; GAUD, O.; SYLVAIN, I.; BOURDON, O.; SPIRO, M.; BLAIS, J.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; GUILLOTON, M. Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 48, n. 1, p. 57-62, 1999.

CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-Negativas. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

CECHINEL, V.F.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHAFFIN, W.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, D.G.; MARTINEZ, J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 130-180, 1998.

CHAN, Y.; LAI, C.-H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 1, p. 51-55, 2003.

COLEMAN DC, RINALDI MG, HAYNES KA, REX JH, SUMMERBELL RC, ANAISSIE EJ, LI A, SULLIVAN DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, v.36, n. 1, p. 156-165, 1998.

COLLIN, B.; CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Antifungal resistance in non-albicans *Candida*. **Drug Resistance Updates**, v. 2, n. 1, p. 9-14, 1999.

COLOMBO, A. L. Epidemiology and Treatment of Hematogenous Candidiasis. A Brazilian Perspective. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 113-118, 2000.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of Hematogenous Infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CUNICO, M.M.; CARVALHO, J.L.S.; KERBER, V.A.; HIGASKINO, C.E.K.; CRUZ ALMEIDA, S.C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 97-103, 2004.

DA FONSECA, A., PRISTA, L. N. **Manual de Terapêutica Dermatológica e Cosmetologia**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2000. 438p.

DE SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y.; MUNIN, E.; CARDOSO, J. A. O. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 83, n.1, p. 34-38, 2006.

DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230p.

DÍAZ, C.D.L., SÁNCHEZ, M.A.C., JIMÉNEZ, G.S.C., ALTO, G.J.M. **Elaboración de Preparados Farmacêuticos y Parafarmacêuticos**. Espanha: Editorial Estrella Marinas Mateos, 2002. 197-216p.

DIEKEMA DJ, MESSER SA, BRUEGGEMANN AB, COFFMAN SL, DOERN GV, HERWALD LA, PFALLE MA. Epidemiology of Candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 1298-1302, 2002.

DIGNANI MC, SOLOMKIN JS, ANAISSIE E. Candida. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M.A. (eds). **Medical Mycology**. 1. ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003. p. 195-239.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Archives of Oral Biology**, v. 37, n. 11, p. 883-887, 1992.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KOBERLIC, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889- 905, 1998.

DOUGLAS, L. J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 27-43, 1987.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* Species Infections in Critically ill Non-immunosuppressed Patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.685-702, 2003^a.

_____. Management of *Candida* Species Infections in Critically ill Patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.772-785, 2003^b.

EMBLETON, M.L.; NAIR, S. P.; COOKSON, B. D.; WILSON, M. Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG-tin (IV) chlorin e6 conjugate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 857-864, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A.; DAWSON, K.; PFALLER, M.; ANAISSIE, E.; BRESLIN, B.; DIXON, D.; FOTHERGILL, A.; PAETZNICK, V.; PETER, J.; RINALDI, M.; WALSH, T. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 314-319, 1995.

FALCÃO, E.P.S.; SILVA, N.H.; GUSMÃO, N.B.; RIBEIRO, S.M.; HONDA, N.K.; PEREIRA, E.C. Atividade de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERGUSON, J. Photosensitivity due to drugs. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 18, n. 5, p. 262-269, 2002.

FERNANDEZ, J.M.; BILGIN, M.D.; GROSSWEINER, L.I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 37, n. 1-2, p. 131-140, 1997.

FUCHS, J.; THIELE, J. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 5, p. 835-847, 1998.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapia Racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2004. 1074p.

GAD, F.; ZAHRA, T.; HASAN, T.; HAMBLIN, M. R. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2173-2178, 2004.

GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; JONES, R.N.; BARETTA, M.; SADER, H.S. Avaliação da atividade *in vitro* dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 137-144, 1997.

GARCEZ, A. A. ; RIBEIRO, M. S.; NUNEZ, S. C.; SOUZA, F. R. Terapia fotodinâmica em odontologia laser de baixa potência para redução microbiana. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 57, n. 3, p. 223-226, 2003.

GENOVESE, W.J. **Laser de Baixa Intensidade: Aplicações Terapêuticas em Odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000. 175 p.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; CARVALHO, F. T. M.; VERRI JR, W. A.; FONSECA, M. J. V Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in tropical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 99-106, 2006.

GHANNOUM, M.; ABU-ELTEEN, K. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v. 33, n. 6, p. 265-282, 1990.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. **Assay Methods of Antibiotics: A Laboratory Manual**. New York: Medical Encyclopedia Incorporated, 1955. (Antibiotics monographs, 2).

GUARRO, J. Comments on recent human infections caused by *ascomyces*. **Journal of Medical Mycology**, v. 36, n. 5, p. 349-350, 1998.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, R. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HAMMER, M.L.A. ; JOHNS, E.A. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Islands, Pará (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v.40, n. 1, p. 53-75, 1993.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**. v.9, n. 12, p. 591-596, 2001.

HAZEN, K. C. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 5, p. 1894-1900, 1989.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

HUBE, B. Extracellular Proteases of Human Pathogenic Fungi. **Contributions to Microbiology**, v. 5, p. 126-137, 2000.

HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissuespecific gene expression of *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, n.4, p.336-341, 2004.

JACKSON, Z.; MEGHJI, S.; MACROBERT, A.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. **Lasers in Medical Science**, v. 14, n. 2, p. 150-157, 1999.

JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W.; LUCKER, J.; POSTER, S.R.; SCULLY, C.. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy of oral candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.35, n. 1, p.103-114,1995.

KANTONIS, G.; TRIKERIOTIS, M.; GHANOTAKIS, D. F. Biocompatible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 185, n. 1, p. 62-66, 2007.

KARRER, S.; SZEIMIES, R. M.; ERNST, S.; ABELS, C.; BÄUMLER, W.; LANDTHALER, M. Photodynamic inactivation of Staphylococci with 5-aminolaevulinic acid or Photofrin. **Lasers in Medical Science**, v. 14, n. 1, p. 54-61, 1999.

KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 6, n. 1-2, p. 143-148, 1990.

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

KNAPPE, V.; FRANK, F.; ROHDE, E. Principles of lasers and biophotonic effects. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 5, p. 411-417, 2004.

KÖMERIK, N.; CURNOW, A.; MacROBERT, A. J.; HOPPER, C.; SPEIGHT, P. M.; WILSON, M. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue O on rat buccal mucosa. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 2, p. 86- 92, 2002.

KÖMERIK, N.; NAKANISHI, H.; MacROBERT, A. J.; HENDERSON B.; SPEIGHT, P. M.; WILSON, M. *In vivo* killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 932-940, 2003.

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.

KONAN, Y.N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KÖNIG, K.; TESCHKE, M.; SIGUSCH, B.; GLOCKMANN, E.; EICK, S.; PFISTER, W. Red light kills bacteria via photodynamic action. **Cellular and Molecular Biology**, v. 46, n. 7, p. 1297-1303, 2000.

KORBELIK, M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 14, n. 5, p. 329-334, 1996.

KRCMERY V, BARNES AJ. Non-albicans *Candida* spp. Causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p. 243-260, 2002.

KRESPI, Y.P.; SLATKINE, M.; MARCHENKO, M.; PROTIC, J. Lethal photosensitization of oral pathogens via red-filtered halogen lamp. **Oral Diseases**, v. 11, n. 1, p. 92-95, 2005.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

LIM, D.-S.; KO S.-H.; KIM S.-J.; PARK Y.-J.; PARK J.-H.; LEE W.-Y. Photoinactivation of vesicular stomatitis virus by a photodynamic agent, chlorophyll

derivatives from silkworm excreta. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 67, n. 3, p. 149-156, 2002.

LOPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; MARTINEZ, J. P.; SENTANDREU, R. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 7, p. 2324-2332, 1991.

LUNEL, F. M. V.; MEIS, J. F. G. M.; VOSS, A. Nosocomial Fungal Infections. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v.34, n. 3, p. 213-220, 1999.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNDERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**, v.25, n. 3, p. 429- 438, 2002.

MACROBERT, A.J.; BOWN, S.G.; PHILLIPS, D. What are the idea properties of a photosensitizer? In: **Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use**. Chichester: Wiley, 1989. p.4-16.

MATHEMA, B.; CROSS, E.; DUN, E.; PARK, S.; BEDELL, J.; SLADE, B.; WILLIAMS, M.; RILEY, L.; CHATURVEDI, V.; PERLIN, D. S. Prevalence of vaginal colonization by drug-resistant *Candida* species in college-age women with previous exposure to over-the-counter azole antifungals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. E23-E27, 2001.

MIDDA, M.; RENTON-HARPER, P. Lasers in dentistry. **The British Dental Journal**, v. 170, n. 9, p. 343-346, 1991.

MIMICA-DUKIN, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; SIMIN, N. Antimicrobial and antioxidant of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemeistry**, v. 52, n. 9, p. 2485-2489, 2004.

MOLERO, G.; DÍEZ-OREJAS, R.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MONTEOLIVA, L.; PLA, J.; GIL, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M.; NOMBELA, C. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. **Internatl Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 95-106, 1998.

MONTAGNER D.; CORRÊA, G. M. Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs. **Revista Brasileira Farmacêutica**, v. 85, n. 3, p. 69-72, 2004.

MORAES, V.L.G.; SANTOS, L.F.M.; CASTRO, S.B.; LOUREIRO, L.H.; LIMA, O.A.; SOUZA, M.L.M.; YIEN, L.M.K.; ROSSIBERGMANN, B.; COSTA, S.S. Inhibition of lymphocyte activation by extracts and fractions of *Kalanchoe*, *Alternanthera*, *Paullinia* and *Mikania* species. **Phytomedicine**, v. 1, p. 199-204, 1994.

MOURA, R. M. X., PEREIRA, P. S., JANUÁRIO, ANA HELENA, FRANÇA, SUZELEI DE CASTRO, DIAS, DIONES APARECIDA. Antimicrobial screening and quantitative determination of benzoic acid derivative of *Gomphrena celosioides* by TLC-densitometry. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 11, p. 1342 - 1344, 2004.

MÜLLER, S.; WALT H.; DOBLER-GIRDZIUNAITE D.; FIEDLER D.; HALLER U. Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 42, n. 1, p. 67-70, 1998.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests. Approved standard M2-A5**. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1993.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P**. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1998. 28 p.

NYMAN, E.S.; HYNINEN, P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 73, n. 1-2, p. 1-28, 2004.

O'DONNELL, C. A.; GRAY, J.; HODGSON, H.; MACPHERSON, M.; ZAMMIT, M.; FULLARTON, M. D. A cost comparison of photodynamic therapy and metallic stents in the palliation of oesophageal cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 4, p. 65-70, 2007.

OKEKE, M.J.; IROEGBU, C.U.; EZE, E.N.; OKOLI, A.S.; ESIMONE, C.O. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 119-127, 2001.

ORTH, K.; BECK, G.; GENZE, F.; RÜCK, A. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**, v. 57, n. 2-3, p. 186-192, 2000.

ORTIZ M, C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S.; GONÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidade – Parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-240, 2001^a.

_____. Laser de baixa intensidade: efeito sobre os tecidos biológicos – Parte 2. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 6, p. 337-352, 2001^b.

PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S e KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2.ed., v.2. São Paulo: Editorial MAKRON Books, 1996. 211p.

PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J. M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. **Ultrastructural Pathology**, v 20, n.2, p. 109-129, 1996.

PEREIRA, D.F.; dos SANTOS, M.; POZZATTI, P.; ALVES, S.H.; de CAMPOS, M.M.A.; ATHAYDE, M.L. Antimicrobial activity of a crude extract and fractions from

Alternanthera brasiliana (L.) O. Kuntze leaves. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n.6, p. 893-896, 2007.

PEREIRA, R.S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PERIN, F.M. **Avaliação *in vitro* do efeito bactericida promovido por diferentes métodos de desinfecção do canal radicular**. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – UNAERP, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microorganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1-7, 2007.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J.; SADER, H. S.; MESSER, S. A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R. J. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.35, n. 1, p.19-25, 1999.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J.; SADER, H. S.; MESSER, S. A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R. J. National Surveillance of Nosocomial Blood Stream Infection due to *Candida* Other than *Candida albicans*: Frequency of Occurrence and Antifungal Suscetibility In The Scope Program. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v.30, p.121-129, 1998.

_____. For The SENTRY Participant Group (Europe). International Surveillance of Blood Stream Infections due to *Candida* Species in The European Sentry Program: Species Distribution and Antifungal Sucetibility Including Investigatinal Triazole Echinocandin Agents. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v.35, p.19-25, 1999.

PINHEIRO, A. L. B. Bases Físicas dos Lasers. In: Aldo Brugnera Jr; Antonio Luiz Barbosa Pinheiro. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. 27-46p.

PINHEIRO, A. L. B.; FRAME, J. W. Laser em Odontologia. Seu uso atual e perspectivas futuras. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 40, n. 5, p. 327-332, 1992.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

POMILIO, A.B.; BUSCHI, C.A.; TOMES, C.N.; VIALE, A.A. Antimicrobial constituents of *Gomphrena martiana* and *Gomphrena boliviana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 155-161, 1992.

PRICE, M. F.; LaROCCO, M. T.; GENTRY, L. O. Fluconazole susceptibilities of *Candida* species and distribution of species recovered from blood over a 5-year period. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1422-1424, 1994.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**, 1. ed. Liboa: Editorial Fundação Calouste Gulbenkian, 1967.

REDDY, G.K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p. 141-150, 2004.

REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 729-759, 2004.

RIBEIRO, M.S.; GROTH, E. B. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. In: **Livro virtual, 23° CIOSP**, São Paulo, 2005, 26p. Disponível em <<http://www.netodonto.com.br/ciosp/index.php>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

ROBBERS, J.E.; SEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372p.

RODRIGUES, M. L.; dos REIS, F. C. G.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; ALVIANO, C. S. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, n. 2, p. 65-71, 2003.

ROVALDI, C. R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N. A.; FRIDEN, P. M. ; ROTHSTEIN, D. M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3364-3367, 2000.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low -power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. v. 111, p. 525-532, 1997.

SALVA, K.A. Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages or indications. **Clinical Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 571-581, 2002.

SALVADOR, M.J. **Estudo fitoquímico, caracterização dos elementos inorgânicos por espectrometria de raios X e atividades biológicas de *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil.** 2002. 228f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas-Área Fármacos e Medicamentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SALVADOR, M.J. **Estudo químico, biológico e biotecnológico de *Alternanthera maritima* e *Alternanthera tenella* (Gomphreneae, Amaranthaceae).** 2005. 410f. Doutorado (Doutorado em Ciências - Área Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics And Ecology**, v. 32, p. 107-110, 2004.

SALVADOR, M. J.; DIAS, DIONES APARECIDA ; NASCIMENTO FILHO, VIRGILIO FRANCO DO ; ZUCCHI, ORGHÊDA LUIZA ARAUJO DOMINGUES . Análise elementar de *Alternanthera maritima* e *Blutaparon portulacoides* (Gomphreneae, Amaranthaceae) por fluorescência de raios X. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 4, n. 3, p. 1136-1140, 2002.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, de OLIVEIRA E.; MERTENSTALCOTT, S. U.; de CASTRO, W. V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D. A. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Antioxidant Flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift Für Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, v. 61c, p. 19-25, 2006.

SALVADOR, M.J.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adults plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 131-136, 2003.

SALVADOR, M.J.; ZUCCHI, O.L.A.D.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 2, p. 138-148, 2004.

SANCHEZ-VARGAS, L. O.; ORTIZ-LOPEZ, N. G.; VILLAR, M.; MORAGUES, M. D.; AGUIRRE, J. M.; CASHATCRUZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; GAITAN-CEPEDA, L. A.; QUINDOS, G. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4159-4162, 2005.

SANGLARD D, ODDS FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANT'ANA, P. L.; MILAN, E. P.; MARTINEZ, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; FERREIRA, M. S.; ALCANTARA, A. P.; CARVALHO, M. T.; COLOMBO, A. L. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 253-257, 2002.

SAMARANAYAKE LP. Oral candidosis: an old disease in new guises. **Dental Update**, v. 17, n. 1, p. 36-38. 1990.

SAMARANAYAKE, L. P. Oral mycoses in HIV infection. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 73, n. 2, p. 171-80, 1992.

SAMARANAYAKE, L. P. ; MacFARLANE, T. W. The effect of dietary carbohydrates on the in-vitro adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 15, n, 4, p. 511-517, 1982.

SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP, POW EH, BEENA VT, YEUNG KW. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus infected southern Chinese cohort. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3296-3302, 2001.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4. p. 275-280, 2004.

SEGAL E, BAUM GL. **Pathogenic Yeasts and Yeast Infections**. Boca Raton (CRC): Ann Arbor; 1994. 297p.

SEGUCHI, K.; KAWAUCHI, S.; MORIMOTO, Y.; ARAI, T.; ASANUMA, H.; HAYAKAWA, M.; KIKUCHI, M. Critical parameters in the cytotoxicity of photodynamic therapy using a pulsed laser. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 4, p. 265-271, 2002.

SIMÕES, C.M. de O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P. MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editoria UFRGS; Editoria UFSC, 2003. 1102p.

SIQUEIRA, J. C. A família Amaranthaceae nas restingas do Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**. v. 9, n. 1, p. 5-22, 1987.

SIQUEIRA, J. C. Importância alimentícia e medicinal das amarantáceas do Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**. v. 9, n. 1, p. 99-110, 1987.

SIQUEIRA, J. C. **Amaranthaceae - Flora do Estado de Goiás**. Goiânia: UfGo, 1989. p. 1-44. (Coleção Rizzo. Flora do Estado de Goiás; v. 12)

SIQUEIRA, J. C. Amaranthaceae de mata atlântica. **Acta Biologica Leopoldensia**. v. 1, n. 12, p. 165-173, 1990.

SIQUEIRA, J. C. O gênero *gomphrena l.* (amaranthaceae) no Brasil. **Pesquisas Botânicas**. v. 1, n. 43, p. 5-197, 1992.

SIQUEIRA, J. C. Fitogeografia das Amaranthaceae Brasileiras. **Pesquisas Botânica**, v. 45, p. 5-21, 1994.

SIQUEIRA, J.C.; GUIMARÃES, E.F. *Amaranthaceae* do Rio de Janeiro – gênero *Alternanthera* Forsskal. **Rodriguésia – Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 36, p. 21-40, 1984.

SOBEL, J.D.; VASQUEZ, J. Candidiasis in the Intensive Care Unit. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 24, n. 1, p. 99-112, 2003.

SOUKOS, N. S.; WILSON, N.; BURNS, T.; SPEIGHT, P. M. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus*

sanguis evaluated *in vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 18, n. 1, p. 253-259, 1996.

SUFFREDINI, I.B.; SADER, H.S.; GONÇALVES, A.G.; REIS, A.O.; GALES, A.C.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the brazilian amazon rain forest and atlantic forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 37, n. 3, p. 379-384, 2004.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; NEPOMUCENO, D.C.; YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D. Antibacterial and cytotoxic activity of brazilian plant extracts – Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 287-290, 2006.

SULLIVAN, D. J.; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K. A.; BENNETT, D. E.; COLEMAN, D. C. *Candida dubliniensis* sp. nov. Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV -infected individuals. **Microbiology**, v. 141, n. 7, p. 1507-1521, 1995.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TEICHERT, M. C.; JONES, J. W.; USACHEVA, M. N.; BIEL, M. A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**. v. 93, n. 1, p. 155-160, 2002.

THOMPSON, J. E. **A Prática Farmacêutica na Manipulação de Medicamentos**. Porto Alegre: Editorial Artmed, 2006. 576p.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fototerápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1-2, p. 7-13, 2003

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Editorial Atheneu, 2004. 718p.

TUITE, E.M.; KELLY, J.M. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**. v. 21, n. 2-3, p. 103-124, 1993.

TÚNER, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v. 16, n. 5, p. 245-248, 1998.

UEHLINGER P.; ZELLWEGER M.; WAGNIERES G.; JUILLERAT-JEANNERET L.; VAN DEN BERGH H.; LANGE N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**. v. 54, n. 1, p. 72-80, Jan. 2000.

- 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, n. 1, p. 165-173, 2001.
- USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**. v. 71, n. 1-3, p. 87-98, 2003.
- VERSTREPEN, K. J. ; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**. v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.
- WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.
- WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K.B. Photosensitising agents-circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 53, n. 2, p. 119-126, 2004.
- WALSH, L.J. Dental Lasers: some basic principles. **Postgrad Dent**. v. 4, p. 26-29, 1994.
- WEIG, M.; GROB, U.; MUHLSCHLEGEL, F. Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. **Trends in Microbiology**. v. 6, n. 12, p. 468-470, 1998.
- WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 75, n. 4, p. 299-306, 1993.
- WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using light-activated antimicrobial agent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 37, n. 2, p. 377-381, 1996.
- WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v. 22, n. 8, p. 354-357, 1993.
- WILSON, M.; PRATTEN, J. Lethal photosensitization of *Staphylococcus aureus*. **Microbios**, v. 78, n. 1, p. 163-168, 1994.
- WOOD, S.; NATTRESS, B.; KIRKHAM, J.; SHORE, R.; BROOKES, S.; GRIFFITHS, J.; ROBINSON, C. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**. v. 50, n. 1, p. 1-7, 1999.
- WU T.; SHEN J.; SONG A.; CHEN S.; ZHANG M.; SHEN T. Photodynamic action of amino substituted hypocrellins: EPR studies on the photogenerations of active oxygen and free radical species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology**. v. 57, n. 1, p. 14-21, 2000.

YAMAGUCHI, F.M.D.; TAKAHASHI, H.; TERAMOTO, A. Photodiagnosis for frameless stereotactic biopsy of brain tumor. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 4, n. 1, p. 71-75, 2007.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. 1 ed. Chapecó: Editorial Argos, 2001. p.17-75.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA JR., A.; ZANIN, F.; GONÇALVES, R. B. Terapia fotodinâmica na odontologia (T.F.D.). **Revista Gaúcha de Odontologia**. v. 51, n.3, p. 179-182, 2003.

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

ZEINA B.; GREENMAN J.; CORRY D.; PURCELL W.M. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vitro*. **British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 4, p. 568-573, 2002.