



Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos

Wanessa de Cássia Martins Antunes de Melo¹; Janice Rodrigues Perussi^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, Brasil.

²Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, Brasil.

RESUMO

O aparecimento de uma grande variedade de micro-organismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos tem resultado tanto no aumento do índice de doenças quanto no aumento do índice de mortalidade, ambos provocados por infecções facilmente tratadas no passado. Assim, tornou-se urgente a necessidade de desenvolver procedimentos de intervenção a fim de promover a inviabilização do crescimento microbiano. A Inativação Fotodinâmica de micro-organismos é uma alternativa promissora no combate de infecções localizadas de micro-organismos. Basicamente esse mecanismo envolve a combinação sinérgica de um fotossensibilizador, oxigênio molecular e luz visível de comprimento de onda adequado para produzir espécies reativas de oxigênio, que causam oxidação dos componentes da célula levando-a à morte. A principal vantagem dessa técnica é o fato de não haver desenvolvimento de resistência ao tratamento pelos micro-organismos, devido ao grande número de alvos possíveis por parte dos radicais de oxigênio. Este trabalho faz uma comparação entre inativação fotodinâmica de micro-organismos e a ação dos antimicrobianos.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. Resistência Microbiana a Medicamentos. Infecções Fúngicas e Bacterianas.

INTRODUÇÃO

Os antibióticos têm sido usados no tratamento de doenças infecciosas desde 1940, quando um grupo de cientistas na Universidade de Oxford obteve sucesso com o primeiro teste clínico da penicilina. Entretanto, nas últimas décadas, devido ao seu uso abusivo e inapropriado, a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos é considerada como um dos maiores problemas da atualidade (Almeida et al., 2006; Benvindo et al., 2008; Dunbar

et al., 2008). Isso porque tal fato tem provocado sérios problemas de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde as infecções microbianas são a causa de morte de cerca de 45% de toda a população. (Wannmacher, 2004; Azevedo, 2005; Lerma et al., 2010). Segundo Jori et al. (2006), a resistência microbiana pode ser atribuída ainda a vários fatores como: prescrição inapropriada ou excessiva de antimicrobianos, adição generalizada de antibióticos às rações administradas aos animais, alta taxa de transmissão de micro-organismos pelo aumento das viagens globalizadas, crescimento da pobreza nos países do terceiro mundo e ampla variedade de mecanismos de adaptação das células microbianas.

Diante disso, estudos demonstraram que a diminuição da eficácia dos antimicrobianos em certos micro-organismos, não somente prejudica o paciente em tratamento, mas todo o ambiente em que ele está inserido, repercutindo em infecções hospitalares, por exemplo. (Levy, 2005; Livermore, 2005; Martínez, 2009). Portanto, tornou-se imprescindível desenvolver novas modalidades terapêuticas para o tratamento de pacientes infectados, antes que este problema fique completamente fora de controle.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade relativamente nova para o tratamento de câncer e vem se destacando em relação às terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), pois diferentemente dessas terapias não apresenta graves efeitos colaterais e nem possui eficiência limitada (Simplicio et al., 2002). A TFD visa a destruição localizada do tecido vivo, com crescimento anormal, mediante sua necrose ou inviabilização (Machado, 2000). Portanto, outras moléstias tais como infecções bacterianas, fúngicas e virais, que têm como característica comum multiplicação desordenada de células, podem ser tratadas pela TFD, chamada nesse caso de inativação fotodinâmica de micro-organismos (Smetana et al., 1994; Washburn et al., 2001; Teichert et al., 2002; Hamblin & Hasan, 2004; Zupán et al., 2008; Prates et al., 2009; Dai et al., 2009).

A fotoinativação microbiana pode ser uma alternativa para reduzir o uso abusivo de antimicrobianos e, como consequência, diminuiria o desenvolvimento da resistência microbiana. Essa técnica se baseia no emprego de um fotossensibilizador não tóxico combinado com irradiação em baixas doses de luz visível de comprimento de onda adequado. Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador ativado pode reagir

Autor correspondente: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi - Departamento de Química e Física Molecular - Instituto de Química de São Carlos - USP Av. Trabalhador São-carlense, 400 - CEP. 13560-970 - São Carlos - SP telefone: (16)3373-9971 - fax: (16)3373-9985 - e-mail: janice@iqsc.usp.br

com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), induzindo a produção do oxigênio singlete (Perussi, 2007). Ambos os caminhos podem causar a oxidação de diversos componentes celulares tendo como consequência a morte celular (Garcez et al., 2008). A principal vantagem dessa técnica é que devido à existência de múltiplos alvos, é improvável o desenvolvimento de resistência ao tratamento. A proposta desse artigo é destacar as características da inativação fotodinâmica e compará-las à ação dos antimicrobianos.

ANTIMICROBIANOS

Desde a descoberta das sulfonamidas e da penicilina, entre os anos 1920 e 1930, houve um aumento no desenvolvimento e no uso de novos antimicrobianos em todo o mundo. Embora os antimicrobianos tenham salvado milhões de vidas, a sua utilização generalizada e, muitas vezes indiscriminada, resultou na geração de seu próprio conjunto de problemas como: 1) aumento da morbidade e mortalidade, ou seja, ocorreu um elevado índice de mortalidade da população mundial relacionada às infecções causadas por micro-organismos multirresistentes; 2) elevada toxicidade da droga, pois para que um antimicrobiano seja efetivo é necessário que possua toxicidade seletiva, ou seja, a droga deve exibir inativação dos micro-organismos, sem afetar as células do hospedeiro; 3) longos períodos de internação de pacientes com infecções e o aumento nos custos hospitalares e da saúde pública (Herrmann & Gaudet, 2009; Hoiby et al., 2010). Muitos autores relacionam esses problemas ao surgimento e disseminação da resistência dos fungos e das bactérias aos antimicrobianos (Cunha, 1998; Levy, 2005; Alanis, 2005; Dohmen, 2008; Takesue et al., 2010).

A resistência microbiana refere-se aos micro-organismos resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos. Sob a perspectiva laboratorial, entende-se como o crescimento de um micro-organismo *in vitro* na presença de concentrações séricas de antimicrobianos ou quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas, que interfeririam em suas funções de crescimento e às quais seriam habitualmente sensíveis (Guillemot, 1999; Martins et al., 2001; Azevedo, 2005).

O desenvolvimento de resistência é um fenômeno biológico natural que se seguiu à introdução de agentes antimicrobianos na prática clínica. Uma das primeiras descrições do aparecimento da resistência microbiana ocorreu logo após o uso difundido da penicilina, antibiótico descoberto em 1929 por Alexander Fleming, que observou a inibição de estafilococos em uma placa de ágar contaminado pelo fungo *Penicillium*. Em meados dos anos de 1950, encontraram-se os primeiros registros de surtos por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina em ambiente hospitalar, fato consolidado quando na década de 1960 surgiu o primeiro caso de resistência às recém descobertas penicilinas beta-lactâmicas, como a meticilina, reconhecendo-se, então, no final da década de 1970, as cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA do inglês, methicillin-resistant *S. aureus*) como uma pandemia (Alanis, 2005; Socha et al., 2009). Hoje, mais

de 95% dos isolados de *S. aureus* de todo o mundo são resistentes a diversos antibióticos tais como a penicilina, ampicilina, meticilina e até mesmo a vancomicina (VRSA, do inglês, vancomycin-resistant *S. aureus*), antibiótico de última geração, descoberto em 1956, utilizado em infecções causadas por bactérias Gram-positivas (Dohmen, 2008; Shien Lo & Borchardt, 2009; Thurman et al., 2010; Giacobbe et al., 2011).

Com o passar do tempo, o uso intensivo dos antimicrobianos provocou o aparecimento de outros micro-organismos resistentes, pois os micro-organismos, em especial as bactérias, têm a capacidade de transmitir genes entre populações de uma mesma espécie ou até de espécies diferentes (Chang et al., 2003; Dohmen, 2008; Aslani et al., 2011). A resistência hereditária às drogas é frequentemente carregada pelos plasmídeos (moléculas circulares duplas de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico), ou por pequenos segmentos de DNA denominados transposons, que podem se transpor de uma região do DNA para outra. Portanto, alguns plasmídeos, incluindo aqueles denominados fatores de resistência (R), podem ser transferidos entre células microbianas em uma população e entre populações microbianas diferentes, mas estreitamente relacionadas. Os fatores R frequentemente contêm genes para resistência a muitos antimicrobianos (Tortora et al., 2010; Aslani et al., 2011). Este fato passou a ser preocupante, não somente para os profissionais relacionados à área de saúde, mas também para os órgãos públicos e para a sociedade.

Diante dessa situação, muitos estudos estão em desenvolvimento no sentido de se conhecer os diversos micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, bem como entender os seus mecanismos de resistência. Alguns dos exemplos de micro-organismos resistentes mais comumente encontrados são: 1) bactérias Gram-positivas, como os enterococos, resistentes à vancomicina (VRE, do inglês, vancomycin-resistant enterococos) e estirpes multirresistentes de pneumococos; 2) bactérias Gram-negativas, como as produtoras de enzimas, que promovem a transferência de grupamentos químicos conhecidos como beta-lactamases, os quais clivam anéis beta-lactâmicos de penicilinas e cefalosporinas além de multirresistentes como o meningococo com susceptibilidade diminuída à penicilina; 3) *Candida albicans*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, alguns destes associados ao uso de antimicrobianos empregados na criação de animais para consumo humano nos anos 1980 e 1990 (Takesue et al., 2010; Patel & Saiman, 2010).

Vários são os mecanismos propostos com relação à resistência microbiana, podendo-se destacar entre eles: a inativação do antimicrobiano pela destruição ou modificação do mesmo; a alteração do local de ação do antimicrobiano; a diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano por impermeabilização da membrana celular ou devido às bombas de efluxo presentes nos micro-organismos (Figura 1) (Levy, 2005; Dohmen, 2008; Calvo & Martínez, 2009; Kohanski et al., 2010).

Embora a comunidade científica conheça bastante a respeito dos micro-organismos resistentes, a descoberta de novos antimicrobianos tem atingido sucesso limitado, pois desde 1970 não há o desenvolvimento de nenhuma

nova classe de antimicrobianos que combata as doenças infecciosas. Atualmente o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano tem sido acompanhado pelo aparecimento da resistência de uma ou mais espécies microbianas (Tao et al., 2010; Candelas et al., 2011).

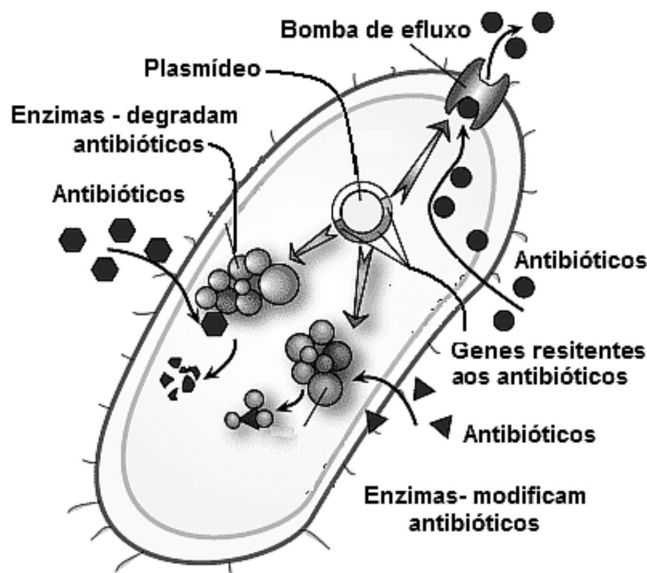


Figura 1: Mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos (Todar, 2011).

Estudos recentes apontam que a descoberta de novas drogas levará mais de uma década para alcançar a possibilidade de uso clínico (Hulscher et al., 2010; Kohanski et al., 2010; Candelas et al., 2011). Como resultado, hoje existe um grande número de pacientes com infecções para as quais não existem tratamentos eficazes e quando existem restringem-se a um determinado número de pessoas devido ao alto custo da droga (Hulscher et al., 2010; Herrmann, 2010). O desenvolvimento de novos antibióticos deve ser continuado, entretanto, a experiência das décadas passadas tem mostrado que novos antibióticos podem ser efetivos somente por um período de tempo restrito. Resistência será desenvolvida cedo ou tarde para cada nova droga. Isso torna difícil tanto o controle quanto o tratamento das infecções, desse modo, eleva-se a necessidade de estratégias eficazes para o seu controle e prevenção.

TERAPIA FOTODINÂMICA

Breve histórico

Há cerca de 4.000 anos os egípcios já associavam a luz solar e plantas que continham psoralenos (furo[3,2-g]-coumarina ou ácido 6-hidroxi-5-benzofurano-lactona) no tratamento de doenças como o vitiligo (Simplicio et al., 2002). Entretanto, Raab (1900) observou que a exposição ao corante acridina e à luz podia ser letal ao *Paramecium caudatum*, protozoário causador da malária. Ele postulou que este efeito era causado pela transferência de energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas pela absorção da luz pela clorofila. A utilização da luz ou corante isoladamente não apresentava qualquer

efeito aparente sobre os paramécios, mas juntos eram altamente citotóxicos (Imparato, 2005; Brovko, 2010).

Após essa descoberta, Tappenier e Jesionek realizaram estudos visando à aplicação do efeito fotodinâmico no tratamento de tumores humanos utilizando a eosina como fotossensibilizador (Machado, 2000; Simplicio et al., 2002; Ferro et al., 2007). Embora os resultados tenham sido positivos, esse trabalho não teve continuidade.

Posteriormente, na década de 60, após estudos obtidos a respeito do acúmulo preferencial de corantes em tumores implantados em ratos terem apresentado resultados promissores, Lipson e Schwartz realizaram o tratamento em uma mulher portadora de câncer de mama, utilizando um derivado de hematoporfirina e irradiação seletiva do tumor. Tal fato marcou o início da terapia fotodinâmica para o tratamento clínico do câncer (Machado, 2000; Simplicio et al., 2002; Prates, 2005). A partir de então, os estudos progrediram e a metodologia empregada foi aprovada para tratamento de alguns tipos de câncer inicialmente pelo FDA dos Estados Unidos, seguido por diversos países em todos os continentes (Prates, 2005; Ferro et al., 2007; Ryskova et al., 2010; Mang et al., 2010).

Apesar destas descobertas, o potencial da fotoinativação contra doenças de origem microbiana não foi explorado por várias décadas devido principalmente a descoberta dos antibióticos, que fez com que os cientistas acreditassem que as doenças de origem bacteriana pudessem ser gradualmente reduzidas (Jori et al., 2006). Em contrapartida, houve o rápido aumento da resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos, divergindo das expectativas da comunidade científica.

Atualmente, acredita-se no uso da inativação fotodinâmica como uma opção no tratamento de infecções microbianas locais. Tal fato possibilita a diminuição do uso de antimicrobianos para esses tipos de infecções e, além disso, resguarda a utilização desses para infecções generalizadas (ou septicemia), atenuando o aparecimento de novos micro-organismos resistentes (Jori et al., 2006; Ferro et al., 2007; Dai et al., 2009; Ryskova et al., 2010; Mang et al., 2010).

ASPECTOS GERAIS

A aplicação da terapia fotodinâmica na inativação de micro-organismos pode ser considerada uma nova abordagem para a eliminação de patógenos em infecções localizadas (Hamblin & Hasan, 2004; Dai et al., 2009). Essa técnica, assim como a TFD aplicada em células tumorais, utiliza fotossensibilizadores e luz para promover uma resposta fototóxica, normalmente oxidativa, capaz de danificar biomoléculas e estruturas celulares, provocando a morte dos micro-organismos. Assim sendo, a inativação fotodinâmica de micro-organismos baseia-se no princípio de que, se um micro-organismo demonstra seletividade por um fotossensibilizador, é possível destruí-lo expondo-o à luz após aplicação do mesmo (Dai et al., 2009; Ryskova et al., 2010).

Os fotossensibilizadores são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz na região do visível (Jori et al., 2006). Quando o fotossensibilizador é exposto à radiação com

comprimentos de onda apropriados, sua molécula é excitada levando a uma série de transferências moleculares de energia que geram espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, o ânion superóxido e o ânion radical hidroxila, todos extremamente reativos e citotóxicos (Ragas, 2010). Várias são as características ideais para potencializar a ação dessas substâncias, entre elas: (1) ausência de toxicidade no escuro; (2) estabilidade cinética e termodinâmica; (3) especificidade pela célula-alvo; (4) rápida eliminação pelas células não-alvo; (5) curto intervalo de tempo entre a sua administração e a máxima absorção pelas células-alvo; (6) síntese rápida e barata com alto rendimento; (7) alta capacidade de produção de oxigênio singlete e (8) ausência de mutagenicidade (Calzavara et al., 2005; Perussi, 2007).

No que diz respeito à fonte de luz, coerente e não-coerente, utilizada nesse processo de fotossensibilização, há uma ampla variedade que pode ser utilizada como, por exemplo: os lasers, os diodos emissores de luz, assim como as lâmpadas incandescentes e fluorescentes (Brancaleon & Moseley, 2002; Perussi & Imasato, 2008). O aspecto prioritário para escolha dessa fonte de luz é a sua habilidade de excitar o fotossensibilizador, provocando um efeito adverso mínimo nas células não-alvos (Wainwright, 2000).

O tratamento fotodinâmico de infecções superficiais e localizadas é considerado simplificado pela acessibilidade da pele para exposição à luz. A facilidade da técnica também decorre do fato de que a intensidade de radiação, as doses de luz e o tempo de irradiação necessários para eliminação do micro-organismo, além de não provocarem efeito térmico significativo, podem ser facilmente obtidos por fonte de luz de baixo custo (luz não-coerente) que requer tecnologia simples e medidas mínimas de proteção para o operador e paciente (Jori et al., 2006).

Estudos demonstram que os danos fotodinâmicos nos micro-organismos, de uma maneira geral, não diferem muito dos danos observados nas células de eucariotos superiores. Como já mencionado, há dois tipos de fotoprocessos conhecidos como Tipo I e Tipo II. As reações do Tipo I geram radicais hidroxila que reagem com biomoléculas ou combinam-se, originando peróxido de hidrogênio in situ com efeitos citotóxicos. Tipicamente, as reações do Tipo I incluem remoção de hidrogênio de moléculas insaturadas, como os fosfolípidios presentes na membrana. A peroxidação de lípidios afeta a estrutura e o funcionamento da membrana celular, diminuindo a sua fluidez e aumentando sua permeabilidade aos íons. Tal fato pode também proporcionar a inativação de receptores celulares e de enzimas localizadas na membrana citoplasmática (Wainwright, 2000; Cassidy et al., 2009). O fotoproceto do Tipo II é geralmente aceito como o principal mecanismo responsável pelo dano foto-oxidativo da célula microbiana. Nesse mecanismo, o efeito citotóxico do oxigênio singlete é decorrente de sua reação rápida e indiscriminada com todos os tipos de biomoléculas, provocando oxidação de proteínas, ácidos nucléicos e lípidios (Demidova & Hamblin, 2005).

A multiplicidade de sítios-alvo afetados durante a inativação fotodinâmica faz com que a seleção de linhagens e/ou espécies tolerantes seja extremamente improvável, fato este que constitui uma das principais vantagens da técnica em relação à quimioterapia antimicrobiana convencional (Komerick & Wilson, 2002).

Outras vantagens

A terapia fotodinâmica apresenta vantagens em relação aos antimicrobianos, podendo-se destacar: largo espectro de ação, visto que o fotossensibilizador pode agir sobre bactérias, fungos, vírus e protozoários; eficácia, independente das cepas microbianas serem resistentes a antibióticos; possibilidade do desenvolvimento de protocolos que conduzam a uma extensa redução dos micro-organismos com dano muito limitado ao tecido hospedeiro; falta de seleção de cepas fotoresistentes após múltiplos tratamentos; baixa probabilidade de promover mutagenicidade; disponibilidade de formulações que permitam uma pronta e específica liberação do fotossensibilizador na área infectada e uso de uma fonte de luz de baixo custo para a ativação do agente fotossensibilizador (Hamblin & Hasan, 2004; Jori et al., 2006).

Essas vantagens podem ser observadas em resultados obtidos por alguns autores quando realizaram fotoinativação de micro-organismos in vitro e in vivo. Usacheva et al. (2001) avaliaram a eficácia do azul de metileno e azul de toluidina como fotossensibilizadores sobre vários micro-organismos patogênicos (*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*). Os autores utilizaram o laser de argônio no comprimento de onda de 630 nm e o laser de diodo no comprimento de onda de 664 nm com doses de 10 a 60 J cm⁻² e as concentrações dos corantes de 1 a 200 µmol L⁻¹. Os resultados indicaram que todos os micro-organismos foram sensíveis ao laser na presença dos corantes, podendo destacar que a completa fotodestruição das bactérias Gram-negativas foi atingida com concentrações mais altas dos fotossensibilizadores do que as utilizadas para as Gram-positivas.

Teichert et al. (2002) realizaram estudo com cepas de *C. albicans* resistentes aos antifúngicos coletadas de pacientes HIV-positivos. Estas cepas foram inoculadas na cavidade bucal de ratos que posteriormente foram submetidos à aplicação tópica de 1 mL de azul de metileno nas concentrações de 250-500 µg mL⁻¹. Dez minutos após a aplicação do corante, foi feita a irradiação com laser de diodo em 664 nm e densidade de energia de 275 J cm⁻². Os resultados mostraram que todos os grupos, sem distinção da concentração de azul de metileno utilizada, exibiram redução na população de *C. albicans* após receberem ativação da luz. A completa eliminação dos micro-organismos foi obtida com as concentrações de 450 e 500 µg mL⁻¹ do corante.

A fotoinativação de espécies de *Candida* (*C. albicans* e *Candida glabrata*) resistentes ao fluconazol também foi estudada por Dovigo et al. (2011) em suspensões celulares empregando o fotossensibilizador Photogem® e irradiação com LED em 630nm. As células planctônicas dessas cepas foram tratadas com diferentes concentrações de Photogem® (2,5 - 50 mg mL⁻¹) e doses de luz (10,5; 18,0; 25,5 e 37,5 J cm⁻²), enquanto que os biofilmes foram tratados com 25 mg mL⁻¹ do fotossensibilizador e irradiado com 37,5 J cm⁻². Os resultados mostraram que esses fungos na forma organizada em biofilmes são menos suscetíveis à fotoinativação (máximo 0,34 log de redução) quando comparados à forma planctônica (6 log de redução).

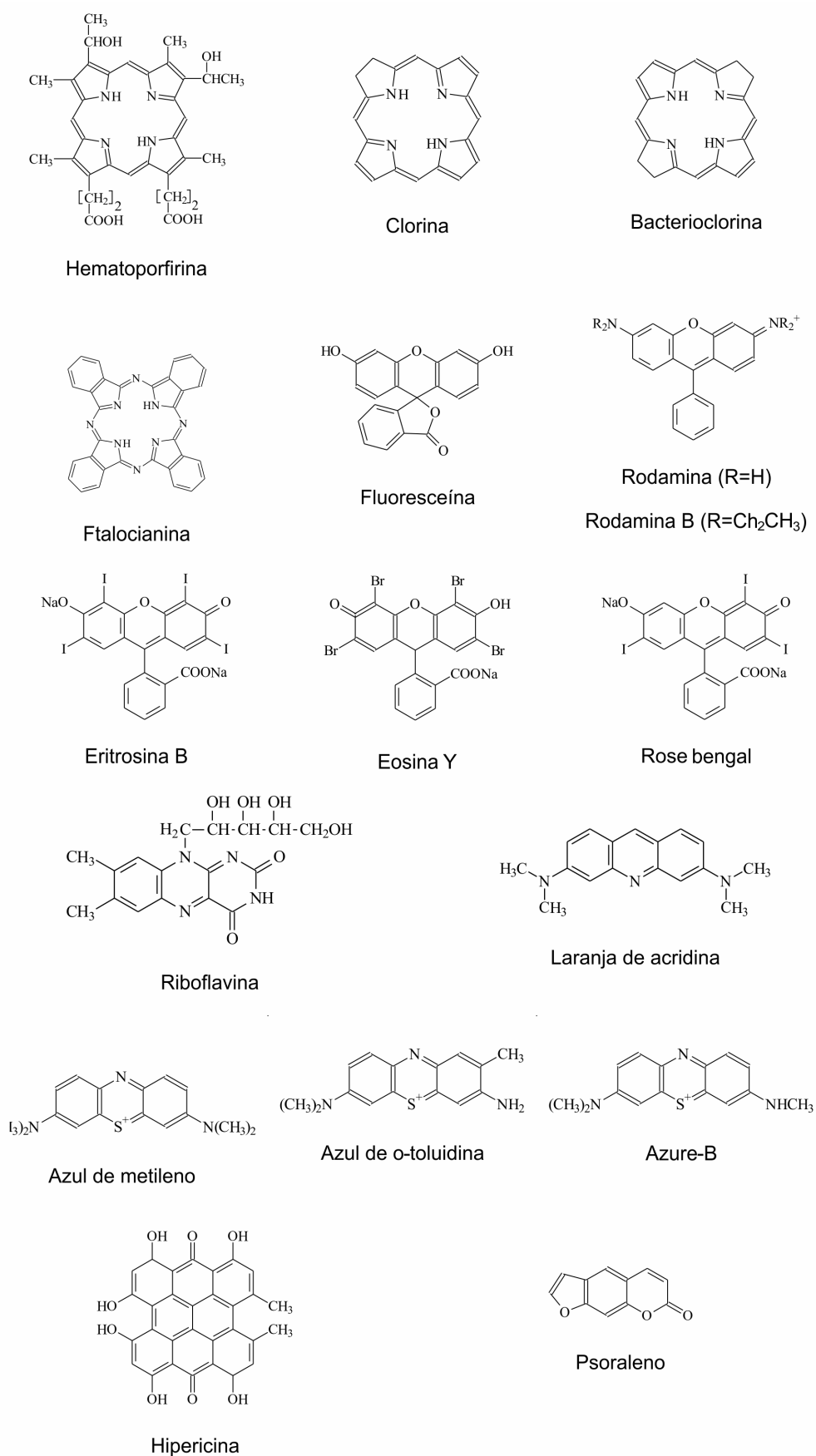


Figura 2: Estrutura de fotossensibilizadores com aplicação em inativação de micro-organismos (Perussi & Imasato, 2008).

Maisch et al. (2005) investigaram diferentes concentrações (0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e tempos de incubação (5 min, 1h e 4h) de fotossensibilizadores à base de porfirina, (CTP1, XF 70, XF 73) utilizando duas cepas de *S. aureus* resistentes a metilina, uma cepa de *S. aureus* sensível a metilina, uma cepa de *Staphylococcus epidermidis* resistente a metilina, *E. coli*, queratinócitos humanos e fibroblastos. A incubação por 5 minutos com 0,005 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de XF 70 ou XF 73, seguida de iluminação, promoveu 99,9% de redução no número de células de todas as cepas de *Staphylococcus*, indicando que esses corantes apresentaram alta efetividade contra as bactérias Gram-positivas, independentemente das cepas serem resistentes ou não aos antibióticos, sem danos significativos aos queratinócitos e fibroblastos.

Prates et al. (2009) investigaram a influência dos parâmetros de irradiação na fotoinativação dos fungos *C. albicans*, *Candida krusei* e *Candida neoformans*. Os autores testaram duas taxas de fluência (100 e 300 mW cm^{-2}) durante 3, 6 e 9 minutos empregando um laser de 660 nm e azul de metileno como fotossensibilizador (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados mostraram até 6 log de redução microbiana. Souza et al. (2010), compararam a eficiência da inativação fotodinâmica em *C. albicans* utilizando os fotossensibilizadores azul de metileno, verde de malaquita e azul de toluidina na concentração 0,1 mg mL^{-1} utilizando laser no comprimento de onda 660 nm e doses entre 15 e 40 J cm^{-2} . Os autores não encontraram diferenças significativas entre os fotossensibilizadores, mas puderam concluir que a fotoinativação realizada com os três fotossensibilizadores irradiados com laser de baixa potência tem efeito fungicida.

Estudos de fotoinativação in vivo também têm sido realizados (Mima et al., 2010) avaliando a eficácia do Photogem (400-1000 mg L^{-1}) após irradiação com LED (305 J cm^{-2}) em 455 ou 630 nm quatro dias depois da inoculação com 1×10^7 células de *C. albicans* no dorso da língua de camundongos. Os autores relataram inibição significativa de *C. albicans* independente do comprimento de onda e da ausência de efeitos adversos na mucosa constatado pelas análises histológicas da língua. Dai et al. (2010) avaliaram o tratamento de infecção por *S. aureus* resistente a metilina em feridas de queimadura na pele de ratos. Após aplicar o fotossensibilizador clorina(e6) ligado covalentemente ao polímero poli-etileno-imina (PEI) sobre as feridas e irradiar o local com luz vermelha não-coerente (360 J cm^{-2}) foi observado uma redução bacteriana de 2,7 log, bem como aceleração em cerca de oito dias na cicatrização da ferida na pele dos ratos.

Atualmente, vários são os fotossensibilizadores empregados em estudos de inativação fotodinâmica de micro-organismos como as bactérias e fungos (Figura 2).

Problemas enfrentados

Apesar da eficiente redução microbiana por efeito fotodinâmico em diversas espécies microbianas, essa terapia enfrenta desafios diferentes quando utilizada contra bactérias Gram-negativas e fungos. De maneira geral, a literatura mostra que as bactérias Gram-positivas podem ser eliminadas por vários fotossensibilizadores e por doses mais baixas de irradiação do que bactérias Gram-negativas

e fungos. Isso se deve a diferenças estruturais nas membranas celulares destes micro-organismos, e no caso dos fungos, devido ao seu maior volume.

Em bactérias Gram-positivas, a porção externa da parede celular é relativamente mais porosa, permitindo aos fotossensibilizadores neutros ou aniônicos a vinculação mais eficiente e a difusão para locais sensíveis da célula. Em bactérias Gram-negativas, a estrutura da membrana externa é mais complexa, formando uma barreira física e funcional entre a célula e o ambiente, tornando difícil a penetração do fotossensibilizador (Hamblin & Hasan, 2004; Tang et al., 2007; Maisch, 2009). As leveduras, por outro lado, são mais resistentes à inativação fotodinâmica, pois possuem maior tamanho celular do que as bactérias. As espécies de *Candida*, por exemplo, são 25 a 50 vezes maiores do que as bactérias, contendo um grande número de alvos por célula para inativação fotodinâmica (Figura 3) (Dai et al., 2009). A presença de membrana nuclear representa um outro fator que dificulta a fotoinativação dos fungos, pois atua como uma barreira adicional na interação do micro-organismo com os fotossensibilizadores (Zeina et al., 2001; Dovigo et al., 2008).

A eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana para os diferentes micro-organismos depende tanto do tipo quanto da concentração do fotossensibilizador, além do modo exato de ação do fotossensibilizador que por sua vez, é influenciado pelo sítio de ação. O sítio de ação depende das características físico-químicas da interação célula-fotossensibilizador. Os parâmetros importantes do fotossensibilizador para interação incluem: solubilidade relativa em água e lipídios, constante de ionização e outros fatores mais específicos como as características de absorção de luz e a eficiência da formação do estado excitado tripleto ou da produção de oxigênio singleto (Calzavara et al., 2005; Kussovski et al., 2009, Corona et al., 2009).

A morfologia da célula microbiana apresenta uma ampla variação tanto entre espécies quanto entre linhagens, o que modula a interação dos fotossensibilizadores exógenos com os constituintes celulares, afetando os caminhos do processo de fotoinativação (Hamblin & Hasan, 2004; Jori et al., 2006; Komerik & McRobert, 2006). A interação primária do fotossensibilizador ocorre geralmente com a parede celular, a qual envolve grande parte das células microbianas. A parede celular dos diferentes grupos de micro-organismos apresenta uma grande variabilidade na sua complexidade, arquitetura estrutural, permeabilidade e capacidade de associação com moléculas externas (Kussovski et al., 2009).

A célula fúngica possui uma parede composta por quitina, beta-glucana, glicoproteínas e polissacarídeos solúveis e insolúveis. A disposição de pigmentos modifica as características dessa parede celular, podendo diminuir sua porosidade, que é um dos fatores responsáveis pela sua carga negativa (Jacobson & Ikeda, 2005; Frases et al., 2006). As cargas negativas da parede celular podem facilitar a interação dos fotossensibilizadores catiônicos com as mesmas. Um estudo de Mantareva et al. (2007) comparou duas ftalocianinas, uma catiônica e outra aniônica na inativação de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos. Foi observado que as ftalocianinas aniônicas não apresentaram resultados promissores, em especial, com as bactérias Gram-negativas que não foram inativadas em nenhuma dose de luz testada (12-60 J cm^{-2}). Empregando

a ftalocianina catiônica o resultado foi significativo para a bactéria Gram-positiva que sofreu inativação com 12 J cm^{-2} , o fungo que sofreu inativação somente com 30 J cm^{-2} , entretanto, a bactéria Gram-negativa não foi completamente inativada nem com a dose de luz 60 J cm^{-2} .

Portanto, a hidrofobicidade e a presença de cargas nos fotossensibilizadores levam a diferentes interações com as organelas dos micro-organismos e o uso de conjugados como polimixina B e EDTA (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid) têm aumentado a permeabilidade da membrana celular dos micro-organismos, em especial de bactérias Gram-negativas e fungos (Dai et al., 2009).

Os biofilmes de bactérias e fungos são difíceis de remover mesmo com as práticas rotineiras de desinfecção de superfícies ou administração de medicamentos adequados ao paciente, fazendo com que esses micro-organismos sobrevivam (Coleman et al., 2007; Romanova et al., 2007). Alguns estudos têm demonstrado que a atividade fotodinâmica é capaz de inativar esse tipo de organização microbiana, entretanto com uma efetividade reduzida, se comparado à inativação das células planctônicas (Donnelly et al., 2007; Fontana et al., 2009; Dovigo et al., 2011).

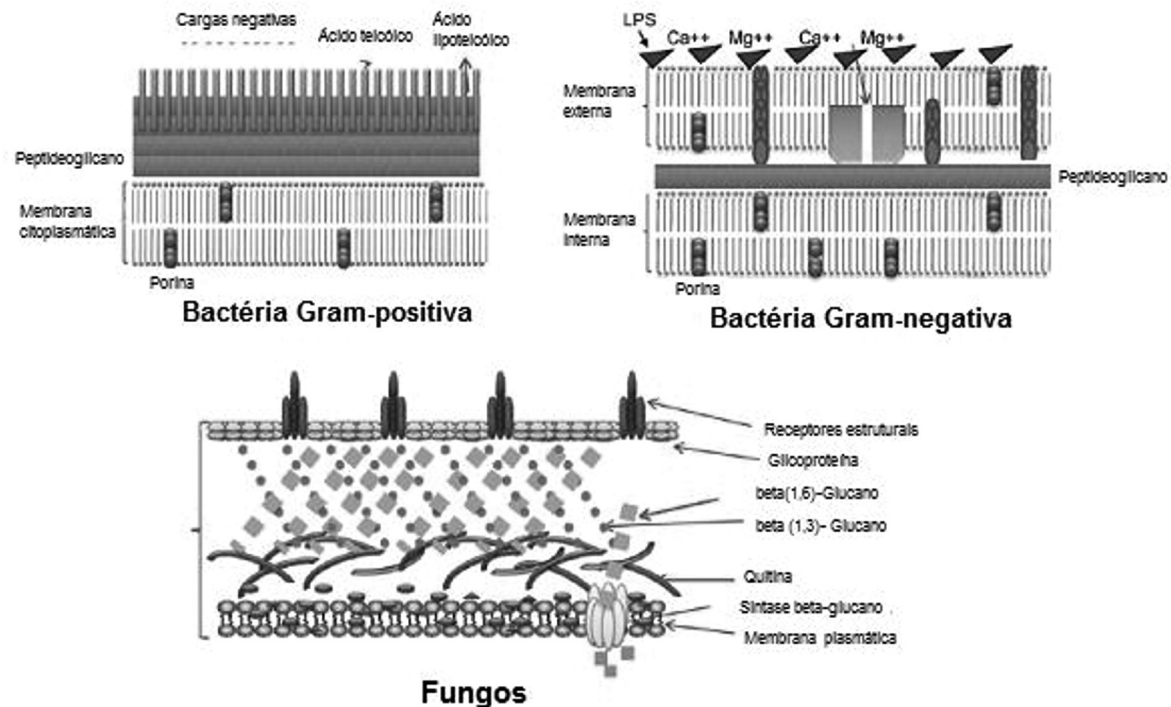


Figura 3: Estrutura da parede celular de três diferentes classes de micro-organismos patogênicos (Dai et al., 2009).

Perspectivas futuras

A inativação fotodinâmica microbiana apresenta grandes perspectivas futuras como: 1) tratamento de infecções localizadas, em especial aquelas que ocorrem devido à presença de biofilmes; 2) tratamento de infecções em pacientes imunodeprimidos, já que eles possuem menor capacidade de combate aos micro-organismos, visto que seus mecanismos de defesa são limitados, tornando-os mais susceptíveis às infecções por micro-organismos presentes em todo lugar, mas que não causam doenças em pessoas saudáveis; 3) desinfecção de fluidos como sangue (Ben-Hur et al., 1995) e plasma (Mohr et al., 1997), materiais cirúrgicos e próteses dentárias (Dovigo, et al., 2008) entre outros.

Entretanto, para que a inativação fotodinâmica possa ser utilizada no tratamento de infecções localizadas, evitando assim o uso dos antimicrobianos e consequente desenvolvimento de resistência, estudos são necessários para otimizar a fotoinativação de micro-organismos, em especial das bactérias Gram-negativas e fungos. Além disso,

essas investigações poderão indicar a escolha adequada do tipo de fotossensibilizador, que deve ser administrado de forma tópica e local, permanecendo por um curto período de tempo em contato com os tecidos do paciente, a fim de não comprometer suas células normais, como as epiteliais, fibroblastos e queratinócitos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro à W.C.M.A.M.

ABSTRACT

Photoinactivation versus antimicrobial agents

The appearance of a large variety of antimicrobial-resistant pathogenic microorganisms has led to increased rates of disease and mortality caused by infections that were easily treated in the past. Hence,

there is an urgent need to develop new procedures to prevent microbial growth. Photodynamic inactivation of microorganisms is a promising alternative way to fight localized microbial infections. This technique, basically, involves the synergistic combination of a photosensitizer, molecular oxygen and visible light of an appropriate wavelength, to produce highly reactive oxygen species that lead to the oxidation of several cell components and to cell inactivation. The main advantage of the technique is that, given the existence of multiple targets, there is no development of resistance. This paper aims to compare the photodynamic inactivation of microorganisms and the action of antibiotics.

Keywords: Photochemotherapy. Microbial Drug Resistance. Bacterial Infections and Mycoses.

REFERÊNCIAS

- Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic Era? Arch Med Res. 2005;36(6):697-705.
- Almeida JM, Garcia VG, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Macarini VC. Terapia fotodinâmica: uma opção na terapia periodontal. Arq Cent Estud Curso Odontol. 2006;42(3):199-210.
- Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. Int J Infect Dis. 2011;15(2):136-9.
- Azevedo FM. Microrganismos multirresistentes. In: Oliveira AC. Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 341-7.
- Ben-Hur E, Geacintov NE, Studamire B, Kenney ME, Horowitz B. The effect of irradiance on virus sterilization and photodynamic damage in red blood cells sensitized by phthalocyanines. Photochem Photobiol. 1995;61(2):190-5.
- Benvindo RG, Braun G, Carvalho AR, Bertolini GRF. Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias *in vitro*. Rev Fisioter Univ São Paulo. 2008;15(1):71-7.
- Brancaleon L, Moseley H. Effects of photoproducts on the binding properties of protoporphyrin IX to proteins. Biophys Chem. 2002;96(1):77-87.
- Brovko L. Photodynamic Treatment: A New Efficient alternative for surface sanitation. Adv Food Nutr Res. 2010;61:119-47.
- Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from bench top to clinical practice. J Photochem Photobiol B Biol. 2009;95(2):71-80.
- Cunha AB. Antibiotic resistance: control strategies. Crit Care Clin. 1998;14(2):309-27.
- Calvo J, Martínez LM. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(1):44-52.
- Calzavara PGP, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. J Photochem Photobiol B. 2005;78(1):1-6.
- Candelas FG, Comas I, Martínez JL, Galán JC, Baquero F. The Evolution of antibiotic resistance. Genet Evolut Infect Dis. 2011:305-37.
- Chang S, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the van A resistance gene. N Engl J Med. 2003;348(14):1342-7.
- Coleman DC, O'Donnell M, Shore A, Swan J, Russell R. The role of manufacturers in reducing biofilms in dental chair waterlines. J Dent. 2007;35(9):701-11.
- Corona MC, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. J Photochem Photobiol B. 2009;95(2):71-80.
- Dai T, Ying-Ying H, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. Photodiagn Photodyn Ther. 2009;6(3-4):170-88.
- Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, Mylonakis E, Hamblin MR. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. Lasers Surg Med. 2010;42(1):38-44.
- Demidova TN, Hamblin MR. Effect of Cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(6):2329-35.
- Dohmen PM. Antibiotic resistance in common pathogens reinforces the need to minimise surgical site infections. J Hosp Infect. 2008;70(Suppl 2):15-20.
- Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, Woolfson DA. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. J Photochem Photobiol B. 2007;86(1):59-69.
- Dovigo LN, Ribeiro DG, Mima EG, Pavarina AC. Terapia fotodinâmica antimicrobiana: perspectivas de aplicação em prótese dentária. J Bras Laser. 2008;1:8-12.
- Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Mycoses. 2011;54(2):123-30.
- Dunbar LM, Tang DM, Manausa RM. A review of telavancin in the treatment of complicated skin and skin structure infections. Ther Clin Risk Manag. 2008;4(1):235-44.

- Ferro S, Ricchelli F, Monti D, Mancini G, Jori G. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(5):1026-34.
- Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, Boussios CI, Kent R, Goodson JM, Tanner AC, Soukos NS. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodont Res.* 2009;44(6):751-9.
- Frases S, Salazar A, Casadevall A. Induction by *Klebsiella aerogenes* of a melanin-like pigment in *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(2):1542-50.
- Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod.* 2008;34(2):138-42.
- Giacobbe AD, Pecetta S, Virga A, Scazzocchio F, Aquilanti L, Iebba V, Passariell C. Diffusion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 strains in central Italy. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(4):1-8.
- Guillemot D. Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(5):494-8.
- Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):436-50.
- Herrmann M, Gaudet G. The economic dynamics of antibiotic efficacy under open access. *J Environ Econ Manage.* 2009;57(3):334-50.
- Herrmann M. Monopoly pricing of an antibiotic subject to bacterial resistance. *J Health Econ.* 2010;29(1):137-50.
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322-32.
- Hulscher MEJL, Grol RPTM, van der Mee JWM. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and behavioural scientific approach. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(3):167-75.
- Imparato JCP. Tratamento restaurador atraumático: técnicas de mínima intervenção para o tratamento da doença cárie dentária. Curitiba: Maio; 2005.
- Jacobson ES, Ikeda R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Med Mycol.* 2005;43(4):327-33.
- Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):468-81.
- Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell.* 2010;37(3):311-20.
- Komerick N, Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol.* 2002;92(4):618-23.
- Komerik N, MacRobert, AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006;25(1-2):487-504.
- Kussovski V, et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;294(2):133-40.
- Lerma FA, Camerino RS, Rocha LA, Colomo OR. Política de antibióticos em pacientes críticos. *Med Intensiva.* 2010;34(9):600-8.
- Levy SB. Antibiotic resistance: the problem intensifies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(10):1446-50.
- Livermore DM. Minimising antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(7):450-9.
- Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova.* 2000;23(2):237-43.
- Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of Novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(4):1542-52.
- Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9(8):947-83.
- Mang, TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2010;7(2):98-105.
- Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Borisova E, Avramov L, Schnurpfeil G, Wöhrle D. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;15(14):4829-35.
- Martínez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Toxicol.* 2009;1579(11):2893-902.
- Martins MA, Azevedo FM, Rocha LCM, Rosário PWS. Drogas antibacterianas: antibióticos. In: Martins MA. Manual de infecção hospitalar: epidemiologia, prevenção e controle. Belo Horizonte: Medsi; 2001. p. 451-72.
- Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):392-440.
- Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A, Lambrecht B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol.* 1997;65(3):441-5.
- Patel SJ, Saiman L. Antibiotic resistance in neonatal intensive care unit pathogens: mechanisms, clinical impact,

- and prevention including antibiotic stewardship. Clin Perinatol. 2010;37(3):547-63.
- Perussi JR, Imasato H. Inativação fotodinâmica de microrganismos. In: Bagnato VS. Novas técnicas ópticas para área da saúde. São Paulo: Livraria da Física; 2008. p. 161-84.
- Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. Quím Nova. 2007;30(4):988-94.
- Prates RA. Verde de malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: ação bacteriana sobre actinomycescomitans um estudo *in vitro*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2005.
- Prates EGS, Yamada AM, Suzuki LC, Claudete RP, Ribeiro MS. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manne. Laser Phys. 2009;19(5):1038-44.
- Raab O. Ueber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. Z Biol. 1900;39:524-46.
- Ragas X, Agut M, Nonell S. Singlet oxygen in *Escherichia coli*: new insights for antimicrobial photodynamic therapy. Free Radic Biol Med. 2010;49(5):770-6.
- Ryskova L, Buchta V, Slezak R. Photodynamic antimicrobial therapy. Cent Eur J Biol. 2010;5(4):400-6.
- Romanova NA, Gawande VP, Brovko LY, Griffiths MW. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. J Microbiol Method. 2007;71(3):231-37.
- Shien Lo T, Borchardt SM. Antibiotic-associated diarrhea due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;63(4):388-89.
- Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços no desenvolvimento de medicamentos. Quim Nova. 2002;25(5):801-7.
- Smetana Z, Mendelson E, Manor J, van Lier JE, Ben-Hur E, Salzberg S, Malik Z. Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanine derivatives. J Photochem Photobiol B. 1994;22(1):37-43.
- Socha AM, LaPlante KL, Russell DJ, Rowley DC. Structure-activity studies of echinomycin antibiotics against drug-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19(5):1504-07.
- Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. Lasers Med Sci. 2010;25(3):385-9.
- Takesue Y, Nakajima K, Ichiki K, Ishihara M, Wada Y, Takahashi Y, Tsuchida T, Ikeuchi H. Impact of a hospital-wide programme of heterogeneous antibiotic use on the development of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. J Hosp Infect. 2010;75(1):28-32.
- Tang HM, Hamblin MR, Yow CM. A comparative *in vitro* photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. J Infect Chemother. 2007;13(2):87-91.
- Tao R, Ying GG, Su HC, Zhou HW, Sidhu JPS. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the Pearl rivers in South China. Environ Pollut. 2010;158(6):2101-9.
- Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;93(2):155-60.
- Thurman AR, Yadira A, White CA, Soper DE. Post-cesarean delivery infectious morbidity: Focus on preoperative antibiotics and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Control. 2010;38(8):612-6.
- Todar, K. Bacterial resistance to antibiotics. Todar's textbook of bacteriology. 2011 [4 screens]. [cited 2011 june 17]. Available from: <<http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>>.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology: an introduction. 10th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2010.
- Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. Laser Surg Med. 2001;29(2):165-73.
- Wainwright M. Methylene blue derivatives - suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? Int J Antimicrob Agents. 2000;16(4):381-94.
- Wannmacher L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? Organização Pan-Americana da Saúde. 2004;1(4):1-6.
- Washburn, KE, Streeter RN, Saliki JT, Lehenbauer TW, Prado ME. Photodynamic inactivation of an RNA enveloped virus in goat colostrum. Small Rumin Res. 2001;42(1):31-7.
- Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. Braz J Dermatol. 2001;144(2):274-8.
- Zupán K, Egyeki M, Tóth K, Fekete A, Herényi L, Módos K, Csík G. Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation. J Photochem Photobiol B. 2008;90(2):105-12.

Recebido em 14 de abril de 2011.

Aceito para publicação em 11 de agosto de 2011.