

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E
INFORMÁTICA INDUSTRIAL

KARINA COLASSO VARGAS

**ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA C E TFD EM
CÉLULAS DE *Saccharomyces boulardii* E *Candida albicans***

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2011

KARINA COLASSO VARGAS

**ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA C E TFD EM
CÉLULAS DE *Saccharomyces boulardii* E *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências” – Área de Concentração: Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Sergei Anatolyevich Paschuk

Co-orientadora: Profa. Dra. Marlene Soares

CURITIBA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V297 Vargas, Karina Colasso
Estudo dos efeitos da radiação ultravioleta C e TFD em células de *Saccharomyces boulardii* e *Candida albicans* / Karina Colasso Vargas — 2011.
77 p. : il. ; 30 cm

Orientador: Sergei Anatolyevich Paschuk.
Coorientador : Marlene Soares.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. Curitiba, 2011.
Bibliografia: p. 73-77.

1. Radiação ultravioleta. 2. Fotoquimioterapia. 3. Microorganismos. 4. *Saccharomyces boulardii*. 5. *Candida albicans*. 6. Engenharia elétrica – Dissertações. I. Paschuk, Sergei Anatolyevich, orient. II. Soares, Marlene, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD (22. ed.) 621.3

Título da Dissertação Nº 559:

**“Estudo dos Efeitos da Radiação Ultravioleta C e
TFD em Células de *Saccharomyces boulardii* e
Candida albicans”**

por

Karina Colasso Vargas

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: Engenharia Biomédica, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Campus Curitiba, às 15h do dia 26 de abril de 2011. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores:

Prof. Sergei Anatolyevich Paschuck, Dr.
(Presidente – UTFPR)

Profª. Patrícia Dalzoto, Dr.
(UFPR)

Profª. Adriane Martins de Freitas, Dr.
(UTFPR)

Prof. Hugo Reuters Schelin, Dr.
(UTFPR)

Prof. Fábio Kurt Schneider, Dr.
(Coordenador do CPGEI)

Visto da coordenação:

À família.

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Sergei Paschuk e Marlene Soares, pela orientação e conhecimentos compartilhados;

À prof Edilsa Rosa Silva, pela base dos conhecimentos em microbiologia, oportunidades e pela cessão do micro-organismo *S.boulardii*;

Ao César M. Vargas, pela paciência, companheirismo, compreensão e grande ajuda;

À Jaqueline Kappke, pelos conselhos e ajuda;

Às colegas Joice Mickus e Cristal Daniele, pela ajuda na parte final do trabalho e cessão do micro-organismo *C. albicans*;

À Viviane Oliveira, pelos conselhos e favores;

Ao DAQBI, pela cessão do laboratório;

Ao pessoal do laboratório de microbiologia, pelas trocas de favores;

Ao CAPES, pela bolsa;

Ao CPGEI, pela oportunidade de fazer o mestrado;

Aos professores da banca examinadora, pela atenção e contribuição dedicadas a este trabalho.

E à todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

"A Vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso cante, ria, dance, chore e viva intensamente cada momento de sua vida antes que a cortina se feche e a peça termine sem Aplausos".

Charles Chaplin

RESUMO

Vargas, Karina C. ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA C E TFD EM CÉLULAS DE *Saccharomyces boulardii* E *Candida albicans*. 77 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

O estudo de alguns dos efeitos das radiações ultravioleta C (UV-C) e terapia fotodinâmica (TFD) em células das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Candida albicans* foi realizado expondo-se células destes micro-organismos a diferentes intensidades destas radiações, calculadas com base no tempo de exposição e potência das fontes utilizadas. A exposição à UV-C foi realizada após inoculação dos micro-organismos em ágar YEPD que em seguida foram expostos a uma distância de 35cm da fonte em tempos que variaram entre 5s e 40s para *S. boulardii* e 10s e 60s para *C. albicans*. Os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo uma para verificação da sensibilidade da célula à radiação e uma para verificação da fotorreativação após a irradiação com UV-C. As células consideradas mutantes, isoladas em um segundo experimento, foram submetidas a provas bioquímicas, para avaliação de alterações em seu metabolismo, e posteriormente a microscopia, para avaliação de alterações morfológicas. Os experimentos com TFD foram realizados expondo-se os microrganismos aos agentes fotossensibilizantes e posteriormente a lâmpada de LEDs em tempos entre 3 min e 12min. Os resultados mostram que a radiação UV-C é eficiente na redução populacional dos micro-organismos estudados, além de terem sido observados, nos testes bioquímicos, alterações no metabolismo da *S. boulardii*, como perda da capacidade de assimilar açúcares e fontes de nitrogênio. As alterações morfológicas foram o alongamento celular e diminuição no tamanho da colônia. A TFD, por sua vez, não demonstrou ação antimicrobiana com a metodologia utilizada, apenas observou-se uma aparente recuperação das células que foram expostas às substâncias tóxicas utilizadas para sua fotossensibilização. Conclui-se que a levedura patogênica *C. albicans* é mais resistente à radiação UV-C comparando-se com a *S. boulardii*, pois necessita 60s de exposição à UV-C contra 40s para redução decimal de *S. boulardii*. A metodologia para TFD utilizada neste trabalho não provocou redução populacional as células estudadas.

Palavras-chave: Ultravioleta C, Terapia fotodinâmica, *Saccharomyces boulardii*, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Vargas, Karina C. STUDY OF THE EFFECTS OF ULTRAVIOLET C RADIATION AND PDT IN *Saccharomyces boulardii* AND *Candida albicans* CELLS. 77 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

The study of some effects of ultraviolet C (UVC) and photodynamic therapy (PDT) in *S. boulardii* and *C. albicans* cells was performed by exposing the cells to different radiation intensities, and was computed based on the exposure time and power sources used. The exposure to UV-C was performed after the inoculation of microorganisms in YEPD agar and immediately exposed to UV-C rays at a distance of 35cm from the source for lengths of time ranging from 40s to 5s for *S. boulardii* and from 10s to 60s for *C. albicans*. The experiments were performed in triplicate, once for checking the cell's sensitivity by radiation and once to test the occurrence of photoreactivation after irradiation with UV-C. The cells considered mutants, isolated in another experiment, were submitted to biochemical tests to assess changes in their metabolism, and, later, microscopy to assess morphological changes. The experiments with PDT were done by exposing the microorganisms to the photosensitizing agents and later to the LED bulb for lengths of time ranging from 3 min to 12 min. The results show that UV-C is effective in reducing the population of microorganisms. The biochemical tests also showed changes in the metabolism of the *S. boulardii* such as a loss in the ability to assimilate sugars and nitrogen sources. The morphological changes were cell elongation and reduction of the colony size. PDT, in turn, showed no antimicrobial action with this methodology. There was only an apparent recuperation of cells that were exposed to toxic substances used in its photosensitization. Our conclusion is that the pathogenic yeast *C. albicans* is more resistant to UV-C rays compared with the *S. boulardii* because it needs 60 seconds of exposure to UV-C against 40 seconds for a decimal reduction of *S. boulardii*. The methodology used for PDT in this study did not cause population reduction in the studied cells.

Keywords: Ultraviolet C, photodynamic therapy, *Saccharomyces boulardii*, *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– CÉLULAS DE <i>C. albicans</i> COM FORMAÇÃO DE PSEUDO-HIFAS EM CÂMARA DE NEUBAUER	19
FIGURA 2	– TÉCNICA DE INOCULAÇÃO POR ESGOTAMENTO.	29
FIGURA 3	– CÂMARA DE NEUBAUER	30
FIGURA 4	– MATRIZ DA CÂMARA DE NEUBAUER	30
FIGURA 5	– CÉLULAS DE LEVEDURA EM CÂMARA DE NEUBAUER	31
FIGURA 6	– ESQUEMA DA IRRADIAÇÃO COM UV-C	35
FIGURA 7	– ESQUEMA DE APRESENTAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO (MODELO DO FATOR DE VISÃO DE RADIAÇÃO PARA A LÂMPADA UV-C)	37
FIGURA 8	– LOG DO NÚMERO DE UFC/ml EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CRESCIMENTO	47
FIGURA 9	– LOG DA ABSORBÂNCIA DO CULTIVO DE <i>S. boulardii</i> PELO TEMPO DE CRESCIMENTO.	47
FIGURA 10	– CORRELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE UFC E A ABSORBÂNCIA DO MEIO OBTIDAS DURANTE A CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. boulardii</i>	48
FIGURA 11	– PERCENTUAL DA POPULAÇÃO DE <i>S. boulardii</i> EXPOSTAS À RADIAÇÃO UV-C EM DOSES CRESCENTES	49
FIGURA 12	– PERCENTUAL DE REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>S. boulardii</i> APÓS SEGUNDA IRRADIAÇÃO COM UV-C	51
FIGURA 13	– COMPARAÇÃO ENTRE OS PERCENTUAIS DE REDUÇÃO COM E SEM EXPOSIÇÃO À LUZ PÓS IRRADIAÇÃO.	51
FIGURA 14	– PERCENTUAL DE CÉLULAS DE <i>S. boulardii</i> SOBREVIVENTES A RADIAÇÃO UV-C SEM EXPOSIÇÃO À LUZ APÓS A IRRADIAÇÃO	52
FIGURA 15	– COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS COM AS LÂMPADAS COM 10000 HORAS E ZERO HORAS DE USO	54
FIGURA 16	– VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE RADIAÇÃO DE LÂMPADAS UV EM FUNÇÃO DO TEMPO	54
FIGURA 17	– COLÔNIAS DE <i>S. boulardii</i> . (A) COLÔNIAS SEM EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO. (B) COLÔNIAS APÓS IRRADIAÇÃO	56
FIGURA 18	– MICROSCOPIA DE CÉLULAS DE <i>S. boulardii</i>	58
FIGURA 19	– RESULTADOS DOS TESTES DE POTENCIAL PROBIÓTICO DA <i>S. boulardii</i>	60
FIGURA 20	– PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE <i>C. albicans</i> EXPOSTAS À RADIAÇÃO UV-C	61
FIGURA 21	– PERCENTUAL DE CÉLULAS DE <i>C. albicans</i> SOBREVIVENTES APÓS EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UV-C	62
FIGURA 22	– COMPARAÇÃO DA REDUÇÃO POPULACIONAL DE <i>C. albicans</i> COM E SEM FOTORREATIVAÇÃO	63
FIGURA 23	– PERCENTAL DE REDUÇÃO POPULACIONAL DE <i>C. albicans</i> APÓS EXPOSIÇÃO À LÂMPADA DE LEDS SEM FS	64

FIGURA 24 – IRRADIAÇÃO DE <i>C. albicans</i> APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM AZUL DE METILENO 1:1	66
FIGURA 25 – IRRADIAÇÃO DE <i>C. albicans</i> APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM AZUL DE METILENO 1:0,5	67
FIGURA 26 – IRRADIAÇÃO DE <i>C. albicans</i> APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM VERDE MALAQUITA 1:0,25	67
FIGURA 27 – IRRADIAÇÃO DE <i>S. boulardii</i> APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM AZUL DE METILENO 1:0,5	68
FIGURA 28 – IRRADIAÇÃO DE <i>S. boulardii</i> APÓS SENSIBILIZAÇÃO COM VERDE MALAQUITA 1:0,25	68
FIGURA 29 – COLÔNIAS DE <i>C. albicans</i> FOTOSSENSIBILIZADAS COM E SEM EXPOSIÇÃO À LÂMPADA DE LEDS.	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– COMPARAÇÃO ENTRE AS REDUÇÕES DECIMAIS (RD) DE <i>S. boulardii</i> COM E SEM FOTORREATIVAÇÃO	52
TABELA 2	– COMPARAÇÃO ENTRE AS RD DE <i>S. boulardii</i> COM E SEM FOTORREATIVAÇÃO (SEGUNDA IRRADIAÇÃO)	53
TABELA 3	– RESULTADOS DAS PROVAS BIOQUÍMICAS EM MUTANTES DE <i>S. boulardii</i>	55
TABELA 4	– REDUÇÕES DECIMAIS DE <i>C. albicans</i> DOS EXPERIMENTOS COM E SEM FOTORREATIVAÇÃO E DESVIOS PADRÃO	63
TABELA 5	– CÉLULAS DE <i>C. albicans</i> SOBREVIVENTES AO FS AZUL DE METILENO	65
TABELA 6	– CÉLULAS DE <i>C. albicans</i> SOBREVIVENTES À EXPOSIÇÃO AO FS VERDE MALAQUITA	65

LISTA DE SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain-heart infusion</i>
DE	Densidade de energia
D.O.	Densidade óptica
FS	Fotossensibilizador
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
MC	Meio completo
MM	Meio mínimo
RD	Redução Decimal
TFD	Terapia Fotodinâmica
UFC	Unidades formadoras de colônias
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 MOTIVAÇÃO	15
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivos específicos	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 LEVEDURAS	19
2.2 A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	21
2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA	23
2.4 TRABALHOS CORRELATOS	23
3 METODOLOGIA	28
3.1 ISOLAMENTO, ATIVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	28
3.1.1 Cultivo das células para realização da curva de crescimento de <i>S. boulardii</i>	29
3.1.2 Contagem em câmara de Neubauer	29
3.1.3 Realização da curva de crescimento	32
3.2 METODOLOGIA PARA IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS	33
3.2.1 Preparo das amostras	33
3.2.2 Irradiação com raios ultravioleta	34
3.2.3 Fotorreativação	35
3.2.4 Cálculo da intensidade de radiação da lâmpada UV-C	36
3.3 CÁLCULO DE REDUÇÃO DECIMAL	38
3.4 ISOLAMENTO DOS MUTANTES	38
3.5 PROVAS BIOQUÍMICAS	39
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS CÉLULAS MUTANTES DE <i>S. boulardii</i>	42
3.7 UTILIZAÇÃO DA TFD COMO AGENTE ANTIMICROBIANO	43
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. boulardii</i>	46
4.2 IRRADIAÇÃO DAS CÉLULAS DE <i>S. boulardii</i>	48
4.2.1 Verificação da ocorrência de fotorreativação em células de <i>S. boulardii</i>	50
4.2.2 Comparação da eficiência entre as lâmpadas UV-C utilizadas	53
4.3 PROVAS BIOQUÍMICAS EM MUTANTES DE <i>S. boulardii</i>	55
4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS MUTANTES	56
4.4.1 Análise macroscópica	56
4.4.2 Análise microscópica	57
4.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL PROBIÓTICO DAS CÉLULAS DE <i>S.</i> <i>boulardii</i>	59
4.6 IRRADIAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>Candida albicans</i> COM UV-C	61
4.6.1 Verificação da fotorreativação das células de <i>C. albicans</i>	62
4.7 UTILIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COMO AGENTE ANTIMICROBI- ANO	64

4.7.1	Avaliação da ação da lâmpada de LEDs sobre as células de <i>C. albicans</i>	64
4.7.2	Teste de toxicidade dos corantes azul de metileno e verde malaquita sobre <i>C. albicans</i>	65
4.7.3	TFD como agente antimicrobiano	66
5	CONCLUSÃO	70
5.1	TRABALHOS FUTUROS	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

A ciência da microbiologia iniciou-se há mais de cem anos, mas registros mostram que os microrganismos já convivem entre nós a muito mais tempo. Antes da época de Pasteur as doenças eram relacionadas com castigos divinos. A descoberta de que as leveduras possuem um papel fundamental na fermentação alertou os cientistas para a possibilidade de que os microrganismos devem possuir uma relação semelhante com plantas e animais, especificamente, que os microrganismos podem causar doenças. Em 1876, Robert Koch intitularia esta ideia como a teoria do germe da doença (TORTORA et al., 2005).

A história das radiações ionizantes começa com Wilhelm Conrad Rontgen, que em novembro de 1895, na Alemanha, descobriu uma nova forma de radiação: os raios X. Após esta descoberta, novos estudos foram feitos em relação às radiações e assim foram desenvolvidas as técnicas de utilização que conhecemos hoje (EINSENBURG, 1992). Perspectivas futuras apontam para o desenvolvimento de práticas e procedimentos que permitam a desinfecção e/ou esterilização de materiais (ANDRADE et al., 2000).

A radiação ultravioleta (UV) é comumente utilizada como agente antimicrobiano, principalmente na desinfecção de água, ar e superfícies. A inativação de microrganismos como resultado da irradiação UV é usualmente atribuída às reações fotobioquímicas que são induzidas no interior das células (PIGATTO, 2008).

Além da avaliação da eficiência da fonte de raios UV para esterilização, é importante estudar e conhecer os efeitos que esta radiação ionizante causa no interior de células eucariotas como as leveduras. As leveduras possuem uma grande similaridade com células de mamíferos, no que diz respeito a organelas e macromoléculas. LEADON e COOPER (1993) afirmam que a reparação dos danos causados pela radiação ultravioleta em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é parecida à reparação dos danos em células de mamíferos. Além disto, a funcionalidade de certas proteínas humanas é extremamente semelhante à funcionalidade de proteínas homólogas em leveduras, tornando o estudo neste tipo de célula ainda mais valioso em se tratando da correlação com

células humanas (FERREIRA, 2006).

Uma das formas de se avaliar o efeito destas radiações nas células é através do cálculo da taxa de sobrevivência após a exposição à radiação. Para isto, as leveduras e outros organismos unicelulares desempenham um papel importante, pois, comparado a outros, estes organismos possuem estrutura simples, apresentam um tempo de reprodução reduzido e seu cultivo e manipulação são relativamente fáceis (BLACK, 2002).

A utilização de células relativamente menos sensíveis aos raios UV torna-se uma opção viável para se avaliar a eficiência deste método de desinfecção. De acordo com Lobo et al. (2009), células de levedura necessitam de uma dose de radiação UV 100% maior do que células procariotas para terem 99% de inativação da sua população.

Diversas técnicas de desinfecção e esterilização vêm sendo otimizadas, envolvendo custos e eficiência. A irradiação é uma destas técnicas; entretanto, este processo possui suas limitações e somente é indicado para a indústria (ANDRADE et al., 2000).

Além da desinfecção e esterilização, que é consequência da inviabilização ou morte celular, as radiações ionizantes podem causar outros tipos de alterações nas células, como por exemplo modificações permanentes no material genético (mutações). A complexidade destes efeitos está relacionada à espécie da célula irradiada. A sensibilidade à irradiação é inversamente proporcional ao tamanho do organismo (DOMARCO et al., 1996).

As leveduras, são células eucariotas, o que significa que seu material genético está envolto por uma membrana denominada "membrana nuclear". Além de possuírem o DNA protegido, este tipo de célula é relativamente grande quando comparada a uma célula procariota, com seu tamanho variando de 4 a 8 micrômetros de largura por 7 a 12 micrômetros de comprimento, e possui uma parede celular espessa e muito resistente, composta de oligossacarídeos. Com estas características, as células de levedura são menos sensíveis à radiação ionizante em comparação com células bacterianas (LOBO et al., 2009; TORTORA et al., 2005).

A levedura *Saccharomyces boulardii* é um microrganismo não patogênico que possui propriedades probióticas. Esta levedura tem sido amplamente utilizada tanto como agente terapêutico quanto preventivo no tratamento de diversos tipos de diarreias. Este probiótico não faz parte da microbiota natural intestinal, mas possui eficácia comprovada no combate de diversas enfermidades que acometem o intestino humano, causadas por outros microrganismos (ABOSEREH et al., 2006; MARTINS et al., 2005).

A atividade antimicrobiana da *S. boulardii* pode ser alterada após a exposição deste microrganismo à radiação ionizante, podendo tanto ser inativada, quanto ser potencializada (ABO-

SEREH et al., 2006).

Candida albicans, por ser um patógeno oportunista, pode colonizar desde mucosas até penetrar nos tecidos de pessoas com o sistema imunológico comprometido. A candidose oral é a doença mais comum causada por este microrganismo. Esta infecção normalmente não oferece risco à vida do paciente, porém há casos extremos em que a infecção bucal pode ocasionar uma severa infecção sanguínea que pode ser fatal (CAMPANHA, 2005).

A terapia fotodinâmica é um tratamento utilizado, entre outras aplicações, para combater infecções de pele causadas por *C. albicans*. Seu princípio baseia-se na sensibilização das células com uma substância denominada fotossensibilizador (FS) e logo após ocorre a exposição destas células a um comprimento de onda (luz visível) compatível com a substância FS, ou seja, ressonante à absorção deste FS (SUZUKI, 2009).

1.2 OBJETIVOS

O principal objetivo do presente trabalho é avaliar a ação dos raios ultra violeta C (253,7nm) sobre células de *Saccharomyces boulardii* foi obtida a partir de uma amostra do medicamento Repoflor pediátrico[®] do laboratório Legrand na forma liofilizada e de *Candida albicans* (ATCC 10231) adquirida do laboratório New Prov também na forma liofilizada com relação à sobrevivência e alterações morfológicas ou metabólicas destas células após a exposição à radiação. Um segundo objetivo é avaliar a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica e de seus fotossensibilizadores isoladamente sobre estas células.

1.2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Realizar estudo da multiplicação celular da *S. boulardii* em função do tempo (curva de crescimento);
- Expor as células de *S. boulardii* e *C. albicans* à radiação ionizante UVC;
- Estimar o número de células sobreviventes para cada tempo de exposição (cálculo da fração de sobrevivência);
- Comparar os resultados das irradiações com UV-C em *S. boulardii* e *C. albicans*;
- Comparar a eficiência germicida de uma lâmpada UV-C com 10000 horas de uso e uma lâmpada UV-C com zero horas de uso;

- Isolar mutantes auxotróficos de *S. boulardii*;
- Avaliar as características morfológicas dos mutantes auxotróficos por meio de observação e microscopia;
- Avaliar as características fisiológicas dos mutantes auxotróficos por meio de provas bioquímicas;
- Avaliar o potencial probiótico de *S. boulardii* e dos mutantes auxotróficos;
- Verificar a ocorrência de fotorreativação das células após a exposição à radiação;
- Avaliar a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica e de seus fotossensibilizadores isoladamente;
- Avaliar o número de células sobreviventes à terapia fotodinâmica e posterior avaliação morfológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEVEDURAS

Leveduras são microrganismos unicelulares que fazem parte do Reino *Fungi*; contudo, diferentemente dos demais fungos, estes microrganismos normalmente não possuem filamentos (hifas), apesar de alguns gêneros serem capazes de formá-los. As estruturas das leveduras possuem formatos esféricos ou ovais (STANGARLIN et al., 2010).

Estes fungos se reproduzem tanto por fissão como por brotamento, sendo a primeira forma capaz de produzir duas células iguais enquanto que, no caso do gênero *Saccharomyces*, a segunda forma produz duas células desiguais. A divisão por brotamento ainda pode formar as chamadas **pseudo-hifas**, que acontecem quando a célula produzida por brotamento não se separa totalmente da célula mãe formando assim cadeias de células, como é o caso da levedura *Candida albicans* (TORTORA et al., 2005). A Figura 1 apresenta um exemplo de pseudo-hifa do microrganismo *C. albicans*.

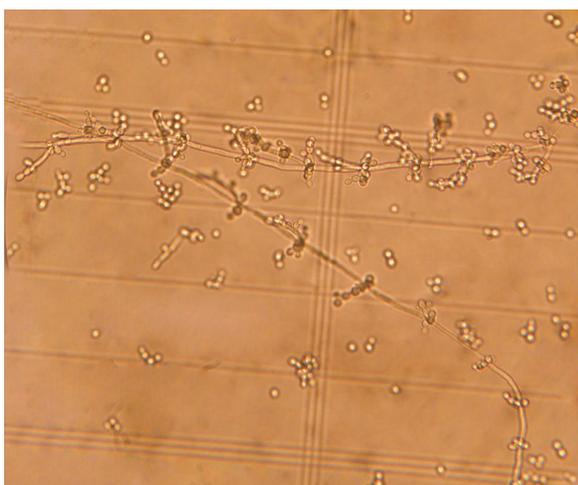


Figura 1: Células de *C. albicans* com formação de pseudo-hifas em câmara de Neubauer, sem coloração com aumento de 400x em microscópio óptico.

Fonte: autoria própria

A levedura *Saccharomyces boulardii* é um microrganismo não patogênico que possui propriedades probióticas. A definição de probióticos aceita pela Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) diz que "são microrganismos vivos que, administrados em quantidade adequada, beneficiam a saúde do hospedeiro". Esse é o caso de *Saccharomyces boulardii*, que apresenta algumas características que a tornam um agente probiótico potencial. Dentre estas características estão a capacidade de sobrevivência ao trânsito intestinal e o fato de apresentar bom desenvolvimento em temperatura corpórea (MIGOWSKI; PUGLIESE, 2009; BANDEIRA et al., 2008)

Além disto, este microrganismo também produz substâncias, como ácidos orgânicos, que podem inibir ou retardar o desenvolvimentos de alguns microrganismos patogênicos. A vantagem de um tratamento com estes microrganismos está no fato de não trazer efeitos secundários indesejáveis ao organismo, dentre eles, a seleção de bactérias resistentes (MARTINS et al., 2005).

Há muitas décadas, este microrganismo vinha sido utilizado como probiótico em vários países e atualmente é mundialmente reconhecido como tal. Deste a década de 50, na França, este microrganismo é utilizado no tratamento de diarréias e, a partir da década de 60, a levedura começou a ser utilizada na forma liofilizada e associada a outros medicamentos como antibióticos. Por possuir um ótimo crescimento a 37°C e uma parede celular espessa, é capaz de sobreviver no intestino humano o que nos permite usufruir de suas propriedades benéficas (MIGOWSKI; PUGLIESE, 2009; MARTINS et al., 2005).

Um microbiologista francês, Henri Boulard, na década de 20, foi informado que a população local preparava um chá com a casca de uma fruta chamada "lichia" para combater diarréias. Estudando este fruto o pesquisador descobriu que sua casca era recoberta por uma levedura e que a ação contra as disfunções intestinais da população se devia a este microrganismo, que posteriormente seria chamado de *Saccharomyces boulardii*, por ter sido isolada por este pesquisador (MARTINS et al., 2009).

Após este descobrimento esta levedura tem sido amplamente utilizada tanto como agente terapêutico quanto preventivo no tratamento de diversos tipos de disfunções gastrointestinais (ABO-SEREH et al., 2006; MARTINS et al., 2005).

A levedura *Cândida albicans*, por sua vez, tem grande importância pela alta frequência com que coloniza e infecta o hospedeiro humano. É um microrganismo que está presente naturalmente na maioria das pessoas saudáveis podendo ser isolado do trato gastrointestinal, mucosa oral, vagina e pele. Entretanto, apesar de não ocasionar processos patológicos nestes indivíduos, este microrganismo é um patógeno oportunista, podendo colonizar cavidades e mucosas, penetrando assim nos tecidos e causando infecções em pacientes imunodeficientes. Esta levedura causa

uma enfermidade denominada candidíase, que não apresenta sérios riscos à vida do paciente mas que pode evoluir para uma infecção sistêmica se não tratada adequadamente (CAMPANHA, 2005; SUZUKI, 2009).

Espécies do gênero *Candida* têm sido frequentemente encontradas nas infecções fúngicas hospitalares e são a quarta maior causa de infecção da corrente sanguínea, a chamada candidemia. Este tipo de infecção pode conduzir ao óbito em cerca de 25% a 38% dos casos (SUZUKI, 2009).

O grau de patogenicidade da *C. albicans* está ligado a diversos fatores, dentre estes, a formação de hifas, a estrutura da sua superfície celular (que se adapta às células do hospedeiro ao entrar em contato, penetrando assim no tecido), alterações fenotípicas (que é uma transição entre a forma de levedura, branca e circular, e uma forma opaca, em forma de pequenos bastões) e produção de enzimas extracelulares hidrolíticas que foram muito estudadas ao longo dos últimos anos (SUZUKI, 2009).

Ambas as leveduras descritas pertencem à família *Saccharomycetaceae* e são intimamente ligadas geneticamente (CONSORTIUM et al., 2009).

2.2 A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Em 1801, o cientista alemão Johan Ritter descobriu a existência de uma forma de luz invisível que era capaz de oxidar haletos de prata. Este espectro de luz invisível passou a ser chamado de luz ultravioleta no final do século XIX, pois seu comprimento de onda fica em uma faixa logo após ao comprimento de onda correspondente à cor violeta. Segundo GUEDES et al. (2009), após este descobrimento apenas, no ano de 1878 foi detectado o efeito germicida desta radiação.

A radiação UV corresponde à porção do espectro eletromagnético que se encontra entre os raios X e a luz visível, ou seja, com comprimentos de onda entre 100nm e 400nm. Dentro desta faixa, os raios ultravioleta são ainda subdivididos em três bandas sendo estas: UV-A - que possui entre 315nm e 400nm, UV-B - entre 280nm e 315nm e UV-C - entre 100nm e 280nm. Existem autores que consideram uma banda a mais de radiação ultravioleta, uma banda denominada UV-vácuo ou UV-vazio, cujos limites de emissão se encontram entre os comprimentos de onda de 100 a 200 nm. A região do espectro compreendida entre 200nm e 300nm (UV-C e UV-B) corresponde aos comprimentos de onda que possuem a maior ação germicida (AGUIAR, 2000).

Esta faixa de comprimento de onda possui energia suficiente para causar danos nas ligações moleculares do DNA das células. Entre estes danos está a produção de ligações extras entre as bases primídicas (em geral as timinas). Estes dímeros de timina provocam uma grande distor-

ção na hélice de DNA, ocasionando assim uma parada em sua replicação. Esta parada se deve à impossibilidade da inserção de bases na formação de pontes de hidrogênio estáveis, alterando o metabolismo e a reprodução da célula, o que normalmente acarreta sua morte (GUEDES et al., 2009; TORTORA et al., 2005; LENZI, 2005).

Quando as alterações no DNA não causam a morte celular e não são corretamente reparadas, tornam-se alterações permanentes na informação genética codificada. Estas alterações podem ser repassadas a gerações futuras, sendo então chamadas de mutação (PIGATTO, 2008).

A fotorreativação é um mecanismo de reparo das moléculas de DNA danificadas pela radiação UV. Este mecanismo acontece quando as enzimas fotolases, produzidas pelas células, reparam os danos causados pela radiação UV no DNA. Estas enzimas possuem dois cromóforos, que são estruturas que captam fótons de luz e utilizam esta energia para reverter os dímeros de timina, ou seja, quebrar as ligações covalentes entre as pirimidinas resultantes da exposição à radiação ultravioleta, resultando novamente na estrutura original do DNA. Uma vez que os dímeros são desligados, a célula pode replicar corretamente seu material genético e voltar a se reproduzir normalmente. Esta fotorreparação está ausente em animais placentários (TORTORA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2003).

Quando não há presença da luz as enzimas realizam outro mecanismo de reparo chamado reparo por excisão de nucleotídeos, processo que não está restrito a reparar danos causados apenas pela radiação UV. Este reparo consiste em retirar parte da fita do DNA danificada e substituir por uma nova fita sem danos. Ocasionalmente este processo de reparo gera um erro na sequência das bases e isto resulta em uma mutação (TORTORA et al., 2005).

A radiação ultravioleta C é amplamente utilizada na desinfecção de superfícies, água e ar, além de preparos alimentícios. As reações fotobioquímicas que ocorrem como resultado da exposição do DNA à radiação ultravioleta são quase que totalmente atribuídas como causas da inativação dos microrganismos (PIGATTO, 2008).

A penetração da radiação UVC na superfície líquida possui, com a exceção de águas límpidas, uma profundidade considerada curta. Esta penetração em sucos, por exemplo, é de aproximadamente 1mm, ou seja, cerca de 90% da radiação é absorvida. O efeito da penetração da irradiação UVC depende do tipo de material em que é utilizado e da absorção de UVC dos sólidos solúveis e das substâncias suspensas em líquidos (PIGATTO, 2008).

As fontes de radiação ultravioleta podem ser naturais (sol) ou artificiais (lâmpadas de UV). A radiação proveniente de fontes naturais como o sol é quase que totalmente absorvida pela atmosfera terrestre. Esta radiação sofre espalhamento, quando atravessa, a atmosfera e é absorvida principalmente pelo ozônio, e apenas as faixas mais energéticas do espectro ultravioleta chegam

até a superfície terrestre (NOGUEIRA, 2003).

Em seres humanos, a radiação ultravioleta é um dos principais agentes causadores de câncer de pele. Esta doença é causada principalmente pela porção do espectro que corresponde à radiação UVB, que é a faixa responsável pelas chamadas queimaduras solares. Estas queimaduras são um importante fator de risco para o desenvolvimento dos melanomas. Além destes, outros efeitos são causados pela radiação UV como a melanogênese, que significa a produção de melanina e o escurecimento da pele, e em alguns casos pode ocorrer a imunossupressão do organismo exposto. A produção de pró-vitamina D pela pele ao se expor a esta radiação é a única exceção de efeito benéfico para o corpo humano (BAKOS, 2005).

2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) é um procedimento realizado para tratamentos de pele e também vem sendo utilizada para estudo de sensibilização de microrganismos patógenos que colonizam infecções de pele e mucosas humanas. Schwingel (2007) estudou a TFD antimicrobiana no tratamento da candidose em pacientes portadores do vírus HIV. Esta terapia consiste na utilização de substâncias fotossensibilizadoras (FS) em conjunto com uma fonte luminosa para causar efeito sobre as células. As células com as quais se deseja trabalhar são coradas pela substância fotossensibilizadora e irradiadas com um comprimento de onda de luz visível. Esta irradiação gera formas reativas de oxigênio e estes radicais livres são responsáveis pela sensibilização da célula. Dentre os radicais formados pelo FS na presença da luz estão os peróxidos, radicais hidroxilas, íons superóxidos e oxigênio singlete, sendo este último considerado o maior causador de danos celulares neste processo (SUZUKI, 2009).

Esta terapia tem se mostrado bastante eficiente contra microrganismos, inclusive aos microrganismos que se tornaram resistentes aos antifúngicos (no caso das leveduras). Ainda não foram relatados efeitos colaterais consequentes desta técnica, uma vez em que todos os parâmetros estabelecidos para cada caso são atendidos (SCHWINGEL, 2007).

2.4 TRABALHOS CORRELATOS

A irradiação de materiais é uma técnica que vem sendo estudada e desenvolvida para a esterilização e descontaminação de diversos tipos de produtos. Muitos autores já utilizaram diversos tipos de radiação para verificação dos efeitos e eficiência dos mesmos. KAPPKE et al. (2005) avaliaram os efeitos da radiação ultravioleta em células de *Escherichia coli* e em 2007 a mesma autora submeteu estas células à radiação gama, obtendo também a taxa de morte das bactérias em relação

a dose de radiação (KAPPKE, 2007);(KAPPKE et al., 2005). ALCARDE e WALDER (1997) estudaram os efeitos da radiação gama na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em mosto de mel de cana de açúcar com o objetivo de melhorar a eficiência da fermentação alcoólica. NEPPELENBROEK et al. (2006) por sua vez, analisaram a inativação de microrganismos e a desinfecção de materiais através da irradiação com microondas.

DOMARCO et al. (1996) realizaram estudos sobre a sobrevivência das células de *S. cerevisiae* em suco de laranja com baixa temperatura. Os autores avaliaram o crescimento destas células após irradiação gama e armazenagem do material irradiado sob refrigeração, utilizando vários tempos de exposição e tempos de armazenagem diferentes, provando ser efetiva a radiação com 1kGy na conservação dos sucos em até 90 dias. Também estudando este mesmo microrganismo Friedl et al. (1997), irradiaram estas leveduras com o intuito de induzir e estudar aberrações cromossômicas nas mesmas. Na metodologia deste estudo, os microrganismos foram resfriados e irradiados com uma fonte emissora de raios gama de ^{60}Co . Os autores concluíram que as aberrações são mais frequentes na presença de um determinado gene denominado HDF-1.

A avaliação da eficiência de uma fonte de radiação ultravioleta foi feita por Alexandre et al. (2008). Os autores avaliaram a esterilização de superfícies plásticas contaminadas por vários microrganismos utilizando uma lâmpada ultravioleta C. O estudo foi realizado levando em consideração a distância da amostra até a fonte e também variando o nível de contaminação do plástico. Foi constatado que as reduções decimais obtidas não foram muito altas, variando entre 0,21 a 2,47 e o uso da lâmpada UV foi altamente eficiente com um tempo de exposição superior a 30 segundos.

Lobo et al. (2009), utilizando-se de uma lâmpada ultravioleta de 30W, realizaram ensaios para a inativação de células de *S. cerevisiae* e *E. coli* em água. Variando o tempo de exposição e a concentração de células, os autores estudaram a melhor condição para a maior inativação de tais microrganismos, obtida com uma concentração de células de 0,01g/l quando irradiadas por 60 segundos. Isto causou 99,99% de inativação celular.

SOMMER et al. (1996) avaliaram a ação da radiação ultravioleta C em células procariotas e eucariotas. Os autores avaliaram as intensidades 0,02 W/m², 0,2 W/m² e 2 W/m² em diferentes tipos de microrganismos observando a sobrevivência destes nas diferentes intensidades. Esta ação também foi antes verificada por LEADON e COOPER (1993) sobre células humanas de pacientes com um tipo de doença hereditária chamada "síndrome de cocaína". Os autores compararam a ação da radiação gama e ultravioleta para avaliação da habilidade das células em reparar os danos provocados pelas radiações. Concluiu-se que não há diferença na reparação entre as células estudadas.

O isolamento de mutantes auxotróficos de *S. cerevisiae* também já foi feito por FOURY

e GOFFEAU (1979). Após a irradiação destas células em placa de Petri com raios gama, também provenientes de uma fonte de ^{60}Co , os autores isolaram mutantes de DNA mitocondrial destas leveduras e também avaliaram a curva de sobrevivência do microrganismo em relação à dose de radiação. Os autores observaram uma série de alterações que resultam em resistência a certos antibióticos. Um exemplar mutante deste microrganismo também foi estudado por Lenzi (2005). Este autor fez um estudo de complementação fenotípica do mutante *pso2-1* de *Saccharomyces cerevisiae* pelos genes *uvr* de *Escherichia coli*, incluindo em seus estudos a irradiação destes mutantes com raios UVC entre outras radiações. Os dados do autor mostram que não houve restauração dos fenótipos de resistência e mutagenese para um determinado gene denominado ICLs.

A sensibilidade da citada levedura a agentes como radiação ultravioleta A, radiação ultravioleta C, peróxido de hidrogênio e radiação gama foi testada simultaneamente por Kozmin et al. (2005), que estudaram também a frequência de mutações induzidas por estes agentes, bem como, a observação de outros fatores relacionados. Os autores utilizaram como fonte de raios gama um isótopo radioativo do ^{137}Cs . A irradiação com raios ultravioleta A foi a uma taxa de $80\text{mW}/\text{cm}^2$ e para ultravioleta C $0,12\text{mW}/\text{cm}^2$. Os resultados mostram que a enzima DNA glicosilase OGG1 previne eficientemente mutagenese induzida por UVA, e ainda concluem que a capacidade das células da pele em reparar resíduos de guanina oxidada, proveniente da mutagenese por UVA, pode ser um parâmetro chave para o efeito mutagênico e carcinogênico da radiação UVA nos seres humanos.

A radiação ultravioleta B e ultravioleta C também foi utilizada por Birrell et al. (2001) para irradiar células de *S. boulardii*. Foram realizados os procedimentos de irradiação visando obter a intensidade de radiação UV-C que mataria 50% da população de células. As densidades de energia foram respectivamente de $200\text{ J}/\text{m}^2$ para radiação ultravioleta B e de $6,400\text{ J}/\text{m}^2$ para radiação ultravioleta C. Em seus resultados é possível concluir que existe uma redução decimal maior que 1 com uma intensidade próxima de $300\text{ J}/\text{m}^2$.

Cordeiro et al. (2004) fizeram uma investigação da inativação dos microrganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* por oxidação fotocatalítica. Este estudo consistiu em utilizar o composto TiO_2 em associação com a exposição aos raios ultravioleta causando a reação de fotocatalise. Diferentes tempos de exposição e concentração foram testados até se obter inativação de 99,9% das células iniciais. As autoras concluíram que a taxa de sobrevivência das espécies bacterianas estudadas diminuiu quando a concentração celular inicial foi reduzida e quando a intensidade luminosa foi aumentada e o tempo de exposição ao UV ou a dosagem de TiO_2 até a concentração de 1 mg mL^{-1} . Além de ter sido detectada maior resistência para *Escherichia coli* em relação à *Pseudomonas sp.* para os dois processos.

Com relação aos trabalhos realizados com terapia fotodinâmica, Suzuki (2009) verificou a sensibilidade do biofilme de *C. albicans* frente à terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando como FS o azul de metileno e a hipoclerina B: La⁺³. O autor ainda analisou este biofilme por tomografia de coerência óptica TCO, que é um exame semelhante ao ultrassom, mas com o uso de um feixe luminoso ao invés do sonoro para formação de imagens, após as células terem sido submetidas à terapia fotodinâmica. O autor obteve reduções de 100% na população de *C. albicans* quando testadas com ambos FS, porém com tempos diferentes de irradiação para cada um, sendo 30 segundos para a HBLa⁺³ e 6 minutos para o azul de metileno. Foi constatado através da TCO que o biofilme apresenta uma mudança óptica ao ser submetido à TFD com o azul de metileno.

Rossoni et al. (2008) fizeram a comparação da eficácia dos FS azul de toluidina, azul de metileno e verde malaquita na terapia fotodinâmica contra a *C. albicans*. Os autores testaram diversas concentrações das FS frente a várias intensidades luminosas a fim de verificar as concentrações e intensidades mais eficientes. Os autores observaram que o uso isolado do laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) provoca uma pequena redução na população microbiana o que não acontece para os FS testados isoladamente. Os resultados com a TFD revelaram que ao se aumentar a intensidade luminosa, a redução na taxa de sobrevivência do microrganismo também aumenta.

O estudo da terapia fotodinâmica em pacientes portadores do vírus HIV também contra infecções causadas pela *C. albicans* foi realizado por Schwingel (2007). A autora acompanhou o tratamento de pacientes com candidíase oral por terapia fotodinâmica e pelo tratamento convencional com antifúngicos, comparando posteriormente a eficiência das duas técnicas. Em seus resultados, a autora não observou redução da carga microbiana com a utilização do laser isoladamente. Já a terapia fotodinâmica antimicrobiana erradicou 100% das colônias do fungo do gênero *Candida sp* e não mostrou recidiva da doença em até 30 dias após a irradiação.

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

Prates et al. (2010) investigaram a influência de cada parâmetro da terapia fotodinâmica em leveduras. Os autores submeteram três espécies de leveduras, dentre elas *Candida albicans*, *C. Krusei* e *Cryptococcus neoformans*, a testes com o fotossensibilizador azul de metileno. Primeiramente os microrganismos foram expostos somente ao corante, depois, somente ao laser e por fim à combinação laser e corante nos tempo de 0, 3, 6 e 9 minutos de exposição ao laser. O

estudo conclui que a diminuição da concentração de leveduras é maior quando se combina a ação do corante com a exposição ao laser, pois isolados, os parâmetros também não causam inibição significativa do número de células.

Mais quatro espécies de leveduras do gênero *Candida* foram submetidas a estudos com laser de baixa potência e o corante azul de metileno por Souza et al. (2003), que também compararam os resultados entre os experimentos isolados com e sem a presença do corante ao expô-las as células ao laser. Com 5 minutos de exposição, os autores obtiveram até 91,6% de redução nos experimentos feitos com associação de corante e laser.

Martins et al. (2007) realizaram estudos com diodos emissores de luz (LEDs) de 640 nm irradiando células de HEp-2 fotossensibilizadas por Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada AlPcS₄. As células foram irradiadas em placas com 2cm de diâmetro durante 128 segundos. Como resultado foi observada desorganização dos filamentos de actina que compõem o citoesqueleto destas células.

3 METODOLOGIA

3.1 ISOLAMENTO, ATIVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A linhagem de *Saccharomyces boulardii* foi obtida a partir de uma amostra do medicamento Repoflor pediátrico[®] do laboratório Legrand, na forma liofilizada. A linhagem de *Candida albicans*, ATCC 10231, foi adquirida do laboratório New Prov . As duas amostras foram primeiramente ativadas em caldo YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) por 24h em estufa à 30 °C.

Após a ativação dos microrganismos foi necessária a realização de uma purificação. Para a obtenção de culturas puras recorre-se a técnicas de inoculação específicas, que visam a separação das células no cultivo em placa de Petri, com o intuito de obter colônias isoladas. Para tal, foi utilizada a técnica de inoculação por esgotamento em estrias superficiais, descrita por TORTORA et al. (2005) e Neder (1992), que consiste em retirar, com o auxílio de uma alça de inoculação, uma única colônia (aparentemente pura) e depositá-la em uma placa de Petri contendo meio de cultivo apropriado para o microrganismo a ser trabalhado na forma sólida (ágar) esterilizado. Nesta técnica realizam-se movimentos contínuos de um lado ao outro da placa ou movimentos em linha reta, como estrias simples, dividindo a placa em 3 setores ou mais, como mostrado na Figura 2.

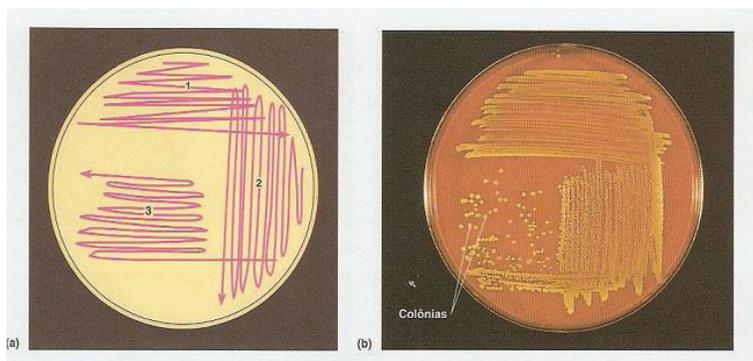


Figura 2: Técnica de inoculação por esgotamento.(a) indicação do movimento a ser feito para inoculação. (b) resultado previsto com colônias isoladas.

Fonte: (TORTORA et al., 2005)

No momento em que se obtém as culturas puras é necessário mantê-las ativas para os

posteriores estudos. A estocagem refrigerada dos microrganismos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por PELCZAR (1996) e TRABULSI (2005). Esta técnica, conserva os microrganismos por um período relativamente longo de tempo (dias ou meses dependendo da resistência do microrganismo). Os cultivos foram feitos em ágar YEPD inclinado, considerando 24h de incubação à 30°C. Foram armazenadas em refrigerador com temperatura entre 4 e 10°C. Estas culturas refrigeradas foram reativadas a cada duas semanas utilizando o mesmo procedimento.

3.1.1 Cultivo das células para realização da curva de crescimento de *S. boulardii*

Para a curva de crescimento, que foi feita apenas para a levedura *Saccharomyces boulardii*, realizou-se a ativação dos microrganismos em meio YEPD (Glicose 2%, Peptona 2%, Extrato de levedura 1%), que é um meio com os nutrientes essenciais. Foram preparados frascos contendo 50mL de meio de cultivo líquido e, após estes frascos serem devidamente fechados com tampões, confeccionados em algodão e gaze, e esterilizados em autoclave por 15 min à 1,1 atm (121°C) e naturalmente resfriados à temperatura ambiente, as células de *Saccharomyces boulardii* foram transferidas em pequenas porções para estes frascos com o auxílio de uma alça de platina. Esta cultura foi incubada em estufa *shaker* a 130rpm e 30°C durante 24 horas (VIEIRA, 2006; FERREIRA, 2006; EPIPHANIO et al., 2001).

3.1.2 Contagem em câmara de Neubauer

Após a ativação dos microrganismos por 24 horas, uma alíquota de 10mL desta solução foi transferida, com o auxílio de uma pipeta graduada, para um frasco tipo *erlenmeyer* contendo 200ml de caldo YEPD esterilizado para, então, ser realizada uma contagem prévia de células contidas por ml de solução. Esta contagem estima o número inicial de células que são cultivadas para a obtenção da curva de crescimento (MARTINS et al., 1998).

Para tal contagem foi utilizada uma câmara de Neubauer, que consiste em uma lâmina de microscopia confeccionada em vidro que possui uma espessura maior que as lâminas comuns. Na parte central da lâmina existem pequenos compartimentos precisamente divididos em quadrados com dimensões conhecidas. Cada câmara (compartimento) possui 9 quadrados de contagem, cada um com 1mm² de área, que em conjunto com uma lamínula com peso calibrado e recobrindo o sistema, obtém-se um volume conhecido de 0,1mm³ (ANTONINI, 2004; MARTINS et al., 1998; LUCARINI et al., 2004). As Figuras 3 e 4 mostram uma câmara de Neubauer e os compartimentos nela existentes respectivamente.

As células foram submetidas à coloração com azul de metileno (azul de metileno 0,01g, citrato de sódio 2g e água destilada 100mL). Esta coloração permite determinar as células viáveis,



Figura 3: Câmara de Neubauer.

Fonte: autoria própria

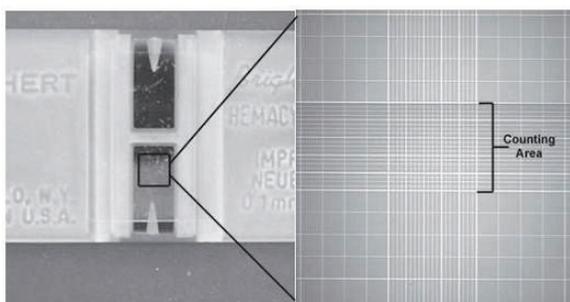


Figura 4: Matriz da câmara de Neubauer. À esquerda, a ilustração da área de contagem vista em microscópio óptico.

Fonte: (LUCARINI et al., 2004)

ou seja, células que possuem capacidade de se reproduzir. Em um tubo de vidro foram misturados 0,1mL da suspensão de células que se desejava contar com 0,1mL da solução de azul de metileno. Após 2 minutos, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, uma pequena quantidade foi despejada entre a lâmina e a lamínula de forma que a mistura atingisse os compartimentos da câmara (ANTONINI, 2004). O corante é retido pelas células sem capacidade de reprodução deixando-as com uma coloração azul intensa, enquanto que as células com alta atividade metabólica e capacidade de reprodução permanecem incolores. A figura 5 mostra a micrografia de uma contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.

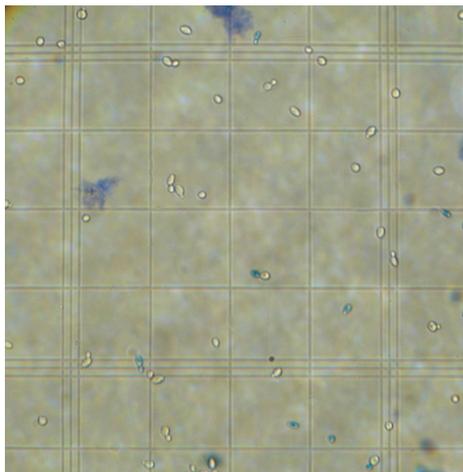


Figura 5: Células de levedura em câmara de Neubauer com um aumento de 400x. As células transparentes são contadas como viáveis e as coradas de azul são desprezadas na contagem.

Fonte: autoria própria

O cálculo para a estimativa de células por ml de solução foi realizado conforme descrito por Lagranha (2008):

Na câmara de Neubauer o número de células é obtido com a contagem de um compartimento com um volume de $0,1\text{mm}^3$, portanto, para se obter o resultado em células/ml, é necessário fazer uma correção, multiplicando o valor obtido por 10000 pois, sabendo que, 1ml equivale a 1000mm^3 e que o volume da câmara é de $0,1\text{mm}^3$, então $10 \times 1000\text{mm}^3 = 10000$.

O número estimado de células por ml é obtido através da equação 1

$$\mathcal{N} = \frac{N_t}{Q} \times D \times 10000, \quad (1)$$

onde:

N - número de células por ml;

N_t - número total de células contadas;

Q - número de quadrantes contados;

D - fator de diluição utilizado.

3.1.3 Realização da curva de crescimento

A realização da curva de crescimento iniciou-se após a determinação inicial de células viáveis por mL de solução. Com o auxílio de uma pipeta, 10mL da cultura ativada previamente foi inoculada em um *erlenmeyer* contendo 200mL de meio YEPD líquido e, após a contagem, foi incubado na estufa *shaker* com 130 rpm 30°C. A partir deste momento foi iniciada a contagem do tempo para o crescimento (MARTINS et al., 1998).

A análise do primeiro tempo (T0) se deu logo após a transferência do microrganismo para o *erlenmeyer*, retirando-se uma alíquota de 5ml para determinação da densidade óptica (D.O.), com a utilização de um espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm, neste primeiro momento. Além da medição da D.O., foi feita a contagem das colônias crescidas em placa de cada triplicada para cada tempo de crescimento (VIEIRA, 2006; FERREIRA, 2006).

O espectrofotômetro é um aparelho que permite medir a quantidade de luz, com um comprimento de onda conhecido e dentro do espectro de luz visível, que é absorvida por uma solução (absorbância ou densidade óptica). O aparelho utilizado neste experimento é da marca *Varian*, modelo *Cary 50 Conc*. Para a medição da absorbância da cultura de células o espectrofotômetro utiliza-se da passagem de um feixe de luz monocromática através de uma cubeta de quartzo com 1cm de espessura onde se adiciona a solução a ser analisada. O aparelho possui uma interface com um computador que, através do *software* Cary Win UV, realiza o cálculo da absorbância relacionando a intensidade luminosa incidente e a intensidade luminosa transmitida através da cubeta. Estas grandezas são relacionadas pelo *software* seguindo a lei de Beer-Lambert mostrada na equação 2.

$$A_{\lambda} = \text{Log}_{10} \frac{I_o}{I_t} \quad (2)$$

onde:

A_{λ} - absorbância da solução;

I_o - intensidade luminosa incidente;

I_t - intensidade luminosa transmitida;

A contagem em placa foi realizada retirando-se 1ml do inóculo e transferindo-o para um tubo contendo 9ml de solução salina à 0,9% diluindo assim o inóculo a 10^{-1} . Para se chegar a uma diluição de 10^{-4} , foi retirada uma nova alíquota de 1ml, deste tubo já diluído de 10^{-1} , e transferida

para um novo tubo contendo 9ml de solução salina à 0,9%. Repetindo esta operação 4 vezes, foi obtida a diluição a 10^{-4} (VIEIRA, 2006; FERREIRA, 2006).

Alcançada a diluição desejada, uma porção de 0,1ml desta diluição foi transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultivo sólido (ágar YEPD: Glicose 2%, Peptona 2%, Extrato de levedura 1% e ágar ágar 1,5%) e então espalhada nesta placa com o auxílio de uma alça de Drigalsky, seguindo a técnica do espalhamento descrita por SILVA et al. (2007).

Após inoculadas, as placas foram mantidas em estufa à 30°C por 48h, para então serem feitas as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC). Esta contagem é feita para estimar o número de células por ml de cultivo. Este valor foi comparado com o valor da D.O. estabelecendo um gráfico correlacionando os valores de D.O., contagem padrão em placas e contagem em câmara de Neubauer (KUHN et al., 2006).

O procedimento realizado para a análise do tempo inicial (T0) foi também realizado para a análise dos demais tempos sendo que, amostras do inóculo foram retiradas exatamente após uma, três, cinco, sete, nove, doze e vinte quatro horas. O fim do procedimento foi considerado quando atingida a fase estacionária do crescimento, sendo determinada através dos resultados da D.O. (RODRIGUES; SANT'ANNA, 2001).

3.2 METODOLOGIA PARA IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Preparo das amostras

O procedimento para a irradiação das amostras foi feito com base na metodologia utilizada por KAPPKE et al. (2005) e adaptado para o cultivo das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Candida albicans*.

Para a preparação das amostras para irradiação, as células foram cultivadas em tubos contendo 10ml de caldo YEPD (FERREIRA, 2006). Após a ativação dos microrganismos, foi realizado a lavagem das células para a retirada do excesso do meio de cultivo em que estas se encontravam. Esta lavagem foi feita primeiramente com a centrifugação dos tubos contendo 3ml do cultivo de cada levedura à 3500 rpm durante 10 min (EPIPHANIO et al., 2001). Esta centrifugação é feita para causar a sedimentação das células no fundo do recipiente. O sedimento foi então ressuspensão em tubos contendo 10ml de solução salina 0,9%. Em seguida foram feitas diluições de acordo com os dados obtidos com a contagem em câmara de Neubauer com o intuito de se obter, em média, entre 30 e 300 UFC por placa (KAPPKE et al., 2005; NEDER, 1992; MARIANO; ASSIS, 2000; LOBO et al., 2009).

A irradiação das amostras foi feita após a inoculação destas células em ágar YEPD através da técnica do espalhamento descrito por SILVA et al. (2007), que consiste na deposição de 0,1ml da solução contendo o microrganismo, no centro da placa, espalhando-se com o auxílio de uma alça de vidro (alça de Drigalsky) até que o material seque por completo.

Após a inoculação, as células foram submetidas à irradiação com radiação ultravioleta C.

3.2.2 Irradiação com raios ultravioleta

O procedimento de irradiação com radiação ultravioleta foi realizado no laboratório de Microbiologia da UTFPR, com a utilização de uma lâmpada ultravioleta da marca Sankyo Denki de 15W emissora de radiação ultravioleta C, com pico de comprimento de onda de 253,7nm (DENKI, Co., Ltda). Esta lâmpada faz parte de uma câmara de fluxo laminar da marca Pachane, modelo PA 300.

Placas inoculadas foram dispostas abertas no interior da câmara de fluxo laminar esterilizada previamente pela mesma lâmpada ultravioleta.

Com o auxílio de apoios, as placas foram inclinadas para permanecerem em uma posição perpendicular em relação à lâmpada UV-C, de modo a obter uma exposição uniforme. Esta inclinação foi necessária pois a lâmpada é fixa em uma das paredes da câmara de fluxo laminar. A Figura 6 mostra uma vista lateral esquemática da disposição das placas em relação à lâmpada UV-C.

Com base nos experimentos feitos por Pigatto (2008), que irradiou células bacterianas com radiação UV, e Lobo et al. (2009), que concluíram que a célula de *S. cerevisiae* precisa de uma maior intensidade de raios UV em comparação com células bacterianas, os tempos de irradiação variaram entre 5 segundos e 40 segundos para *S. boulardii* e de 10 a 60 segundos para a *C. albicans*, avaliando-se assim os efeitos da densidade de energia de UV-C sobre os microrganismos em função do tempo de exposição.

O procedimento foi realizado em triplicata, ou seja, três placas inoculadas foram expostas em cada tempo. Uma triplicata inoculada foi incubada sem ser irradiada, para verificação do padrão de crescimento em comparação com a curva de crescimento mencionada e com a contagem em câmara de Neubauer. Uma placa esterilizada foi mantida sob as mesmas condições de incubação para controle de esterilidade.

Todo o processo de irradiação foi realizado ao abrigo da luz pois, outras ondas eletromagnéticas produzidas pelas lâmpadas ou até mesmo pela iluminação natural, poderiam afetar os resultados da exposição com raios UV-C, causando a fotorreativação do DNA mutado pela radia-

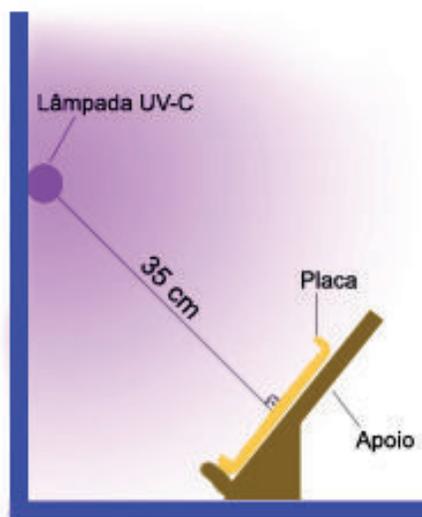


Figura 6: Esquema da irradiação com UV-C

Fonte: autoria própria

ção (KAPPKE et al., 2005; TORTORA et al., 2005).

Após as irradiações, as triplicatas foram embaladas em papel *kraft* para evitar a fotorreativação (KAPPKE et al., 2005). As embalagens foram mantidas em estufa à 30°C por 48 horas para posterior visualização e contagem das UFC (unidades formadoras de colônias) (FRIEDL et al., 1997).

Com os resultados numéricos obtidos, foi construído um gráfico das UFC sobreviventes pelo tempo de exposição.

3.2.3 Fotorreativação

Posteriormente foram realizados testes para confirmar a ocorrência da fotorreativação. A execução destes testes utilizou o mesmo procedimento anterior para irradiação com a diferença de que 6 placas inoculadas foram irradiadas de cada vez. Três destas placas foram embaladas em papel *kraft* para posterior incubação e a demais foram imediatamente expostas à luz das lâmpadas fluorescentes do próprio laboratório após a irradiação. A distância entre as placas e as lâmpadas foi correspondente à altura das bancadas onde os experimentos são frequentemente realizados, e o tempo de exposição foi de uma hora. para então serem incubadas durante 48h.

Dado o tempo de incubação, as colônias visíveis de cada placa foram contadas. Os resul-

tados obtidos, com as placas sem exposição à luz e com exposição à luz após a irradiação, foram comparados.

3.2.4 Cálculo da intensidade de radiação da lâmpada UV-C

O cálculo da intensidade de radiação da lâmpada UV-C que atinge a placa onde estão os microrganismos, foi realizado com base em fatores de radiação térmica descrita por (MODEST, 1993), que define a quantidade de radiação difusa transmitida de uma superfície para outra. (KOWALSKI, 2001; KOWALSKI et al., 2002) citam que, para definir a intensidade de um campo de radiação em 3D, é necessário o uso de um “fator de visão de radiação”. O cálculo deste fator, de um elemento plano posicionado perpendicularmente à um cilindro finito (lâmpada), pode ser realizado através da equação 3.

$$F(x, l, r) = \frac{L}{\pi H} \left[\frac{1}{L} \arctan \left(\frac{L}{\sqrt{H^2 - 1}} \right) - \arctan \left(\sqrt{\frac{H-1}{H+1}} \right) + \frac{X-2H}{\sqrt{X \times Y}} \arctan \left(\sqrt{\frac{X \times (H-1)}{Y \times (H+1)}} \right) \right], \quad (3)$$

onde:

$$H = x/r;$$

$$L = l/r;$$

$$X = (1 + H)^2 + L^2;$$

$$Y = (1 - H)^2 + L^2;$$

x - distância entre a lâmpada e a placa [cm];

l - comprimento do segmento da lâmpada [cm];

r - raio da lâmpada [cm].

Para calcular o fator de visão em qualquer ponto ao longo de uma lâmpada, esta deve ser dividida em dois segmentos de comprimentos l_1 e l_2 ($l_2 = l_{tot} - l_1$) como mostra a figura 7.

Este processo é conhecido como álgebra de fator de visão e pode ser calculado através da equação 4 (KOWALSKI, 2001; KOWALSKI et al., 2002).

$$F_{tot}(x, l_1, l_{tot}, r) = F_1(x, l_1, r) + F_2(x, l_2, r). \quad (4)$$

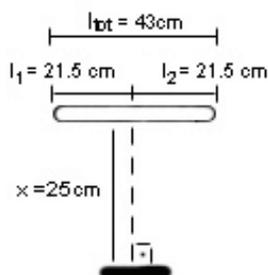


Figura 7: Esquema de apresentação dos parâmetros de irradiação (modelo do fator de visão de radiação para a lâmpada UV-C)

Fonte: autoria própria

A intensidade da radiação UV-C no centro da placa posicionada de acordo com a figura 7 pode ser calculada pela equação 5 (KOWALSKI, 2001; KOWALSKI et al., 2002).

$$I = \frac{E_{uv}F_{tot}}{2\pi rl}, \quad (5)$$

onde:

I - intensidade da radiação UV-C no centro da placa [$\mu W/cm^2$];

E_{uv} - potência da lâmpada UV-C [μW].

A partir das equações 3, 4 e 5, tem-se que a intensidade de radiação no centro da placa foi de $56,4 \text{ mW/cm}^2$. Para se obter esta intensidade em função do tempo basta apenas multiplicar o valor da intensidade pelo tempo em segundos por exemplo, para o tempo de 5 segundos, multiplica-se $56,4 \times 5 = 282 \text{ mW.s/cm}^2$.

A verificação da fotorreativação com *C. albicans* foi testada com uma lâmpada de LEDs para TFD (terapia fotodinâmica) de 1,5 W de potencia, 630nm de comprimento de onda e fluxo luminoso de 36 lm. Da mesma maneira que com a luz visível, as placas foram expostas a esta lâmpada logo após serem irradiadas com radiação ultravioleta. Cada triplicata foi irradiada durante 5 minutos a uma distância de 10 centímetros da fonte. A intensidade luminosa média, medida com um fotômetro da marca *EXTECH Instruments*, modelo 403125, foi de 1901,25 lux.

3.3 CÁLCULO DE REDUÇÃO DECIMAL

O valor da redução decimal determina o número de vezes em que a população inicial de células é reduzida de 90%, ou seja, apenas 10% de células sobreviventes em um determinado tempo de contato com o agente esterilizante (RUTALA; WEBER, 1998; MAZZOLA et al., 2003). A relação utilizada para o cálculo da redução decimal esta descrita por Alexandre et al. (2008) e é mostrada na equação 6.

$$\gamma = \text{Log} \frac{N_o}{N}, \quad (6)$$

onde:

γ - número de reduções decimais;

N_o - número inicial de células (placas sem exposição);

N - número de UFC após irradiação;

3.4 ISOLAMENTO DOS MUTANTES

Muitos microrganismos são capazes de se desenvolver em meios de cultivo que contém apenas sais minerais e uma fonte de carbono ou alguns aminoácidos, este tipo de meio é denominado meio mínimo (MM). Porém, esta capacidade também se aplica a meios de cultivo mais complexos cuja composição é mais rica em nutrientes, tais como a peptona, extrato de levedura, caseína hidrolisada, extrato de carne entre outros, estes meios são ditos meios completos (MC). Quando um microrganismo que é capaz de se desenvolver em ambos os meios sofre alterações e perde esta capacidade de se desenvolver apenas em MM, este microrganismo é chamado de mutante auxotrófico (AZEVEDO, 1998). O procedimento para isolamento de mutantes está descrito em Neder (1992) e Kleiner et al. (1998). A cultura ativada por 24 horas foi centrifugada a 3500 rpm por 15 min. Logo após, as células foram ressuspensas em solução salina, a concentração de células por ml de solução foi contada em câmara de Neubauer e ajustada por diluições até obter-se concentração na ordem de 10^6 células por ml. Em seguida a solução foi vertida em uma placa de Petri vazia e esterilizada para então ser irradiada por 30 segundos com raios UV-C no intuito de se obter 5% de células sobreviventes. Feito isto, a solução irradiada foi transferida para um tubo esterilizado, adicionou-se o antibiótico nistatina e a mistura permaneceu em repouso durante 60 minutos, no intuito de selecionar células resistentes. Decorrido este tempo, a solução foi novamente centrifugada e ressuspensa em solução salina para em seguida alíquotas de 0,1ml serem inoculadas

em meio YEPD (que é um meio completo para o desenvolvimento da levedura cuja composição está descrita em 3.1.1) e incubadas à 30°C por 48h. As colônias crescidas no meio completo (MC) não são necessariamente mutantes e, para o isolamento dos possíveis mutantes, foram preparadas placas contendo meio mínimo para leveduras (MM). O meio mínimo possui o mínimo possível de nutrientes necessários ao desenvolvimento do microrganismo e leva as seguintes substâncias em sua composição (NEDER, 1992):

- K_2HPO_4 0,2g
- $(NH_4)_2SO_4$ 0,2g
- $MgSO_4$ 0,025g
- Glicose 0,2g
- Água destilada 1000ml

Placas contendo MM foram marcadas pelo lado de fora com números em ordem crescente, totalizando 26 números em cada placa. As colônias crescidas em MC também foram numeradas e uma pequena porção destas colônias foi inoculada, com o auxílio de uma alça de platina, nas placas com MM nos seus correspondentes números. Em seguida as placas foram incubadas à 30°C por 48 horas.

Dado o tempo de incubação foi feita a análise do crescimento. As células que se desenvolveram apenas em meio completo (YEPD) e que não apresentaram crescimento em meio mínimo foram consideradas mutantes, como descrito por Neder (1992), Kleiner et al. (1998). Estes mutantes foram então numerados e reativados em caldo YEPD para posterior caracterização.

3.5 PROVAS BIOQUÍMICAS

As provas bioquímicas são uma importante ferramenta para avaliação do metabolismo das células. No caso deste estudo, estes testes foram realizados para avaliar os efeitos causados pela irradiação dos microrganismos estudados. Com base nos experimentos citados por Heijden (2000), RIBEIRO e SOARES (2005) os testes se dividiram em quatro categorias:

- Assimilação de fontes de carbono;
- Assimilação de nitrogênio;
- Fermentação de carboidratos;

- Hidrólise da uréia.

Para avaliar a assimilação de fontes de carbono os microrganismos foram inoculados em meios de cultivo com fontes diferentes de carbono e incubados por 48h à 30°C. Foram estes o caldo glicose, caldo sacarose, caldo lactose, ágar maltose e ágar citrato, cujas composições estão descritas abaixo.

Meio base para carboidrato

- Peptona 10g;
- Extrato de carne 1g;
- NaCl 5g;
- Vermelho de fenol 0,018g
- Água destilada 1000ml;
- Carboidrato 1%

Ágar uréia

- Peptona 1g;
- Glicose 1g;
- NaCl 5g;
- Vermelho de fenol 0,012g;
- Fosfato dipotássio 2g;
- Água destilada 1000ml;
- Uréia 20g;
- Ágar 12g.

Ágar citrato

- Citrato de sódio 3g;
- Sulfato de magnésio 0,2g;
- dihidrogeno fosfato de potássio 1g;
- $\text{NaNH}_4 \text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,5g;
- Ágar 12g;
- Azul de bromotimol 0,08g
- Água destilada 1000ml;

Os meios de cultivo em questão possuem indicadores de pH e mudam de cor conforme o resultado positivo ou negativo para o teste. No caso, os testes com glicose, sacarose, lactose e maltose, a mudança de cor para o amarelo indica um resultado positivo e a permanência em rosa indica um resultado negativo, enquanto que no teste do citrato a mudança de cor do verde para o azul indica o resultado positivo o que significa que o micro-organismo é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono (RIBEIRO; SOARES, 2005).

A assimilação de nitrogênio foi feita inoculando-se os microrganismos em ágar ferro lisina. Este meio possui, além de um indicador, um aminoácido como fonte de nitrogênio e, quando a célula possui a capacidade de metabolizar este aminoácido, ocorre a mudança de cor do meio de cultivo para púrpura, indicando resultado positivo (RIBEIRO; SOARES, 2005).

A fermentação de carboidratos foi verificada através da adição de um tubo invertido (tubo de Durham) no tubo que continha o meios com carboidratos. A presença de bolhas neste tubo invertido após o tempo de incubação (48h à 30°C) indica um resultado positivo para fermentação (RIBEIRO; SOARES, 2005; HEIJDEN, 2000).

A hidrólise da uréia é avaliada através da inoculação das células em ágar uréia. Quando o microrganismo é capaz de hidrolisar a uréia em amônia, ocorre a alcalinização do meio e, devido a presença de um indicador de vermelho de fenol, o meio torna-se rosado o que indica resultado positivo (RIBEIRO; SOARES, 2005).

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS CÉLULAS MUTANTES DE *S. BOULARDII*

A atividade antimicrobiana das células das leveduras foi testada com cinco microrganismos patogênicos diferentes obtidos do banco de cepas do laboratório de microbiologia da UTFPR. São estes: *Escherichia coli* ATCC 8739 e ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Primeiramente todos os microrganismos foram ativados em caldo BHI *Brain-heart infusion*, que é um meio derivado de nutrientes de cérebro, coração, peptona e dextrose, durante 24 horas, para as células bacterianas, e 48 horas para células de leveduras (ANVISA, 2001). Dado o tempo de incubação, os microrganismos patogênicos foram diluídos em proporção de 1:10 e inoculados em placas de Petri contendo meio YEPD, pela técnica do espalhamento com alça de Drigalsky.

As células, de *S. boulardii* e dos mutantes isolados, foram centrifugadas à 3500 rpm por 15 min. Após a retirada do sobrenadante da cultura, as células foram ressuspensas com a adição de uma quantidade de solução salina cinco vezes menor do que a quantidade de meio de cultivo inicial (concentração de células) (BANDEIRA et al., 2008).

Discos confeccionados em papel filtro foram impregnados com esta solução concentrada de células e, após 15 min para impregnação, estes foram dispostos sobre as placas, previamente inoculadas pelo método do espalhamento, com os microrganismos patogênicos devidamente identificados (BANDEIRA et al., 2008).

Após este procedimento as placas foram levadas a estufa à 30°C por mais 24 horas (BANDEIRA et al., 2008).

A segunda metodologia utilizada para o mesmo teste foi realizada da seguinte maneira.

Os microrganismos mutantes foram ativados em caldo YEPD por 48 horas, em seguida foram inoculados em polos distintos de placas de Petri, com ágar YEPD estéril, para então serem incubados por mais 48 horas. Após este tempo as colônias desenvolvidas foram expostas aos raios UV-C por 10 min e o excesso da massa celular das colônias foi retirado com o auxílio de uma espátula esterilizada. O intuito deste procedimento é a verificação da ação antimicrobiana apenas dos metabólitos secundários produzidos pela levedura (ácidos orgânicos) que se difundem pelo meio de cultivo durante o desenvolvimento da colônia (BRAGA; SPESSOTO, 2008).

Para a etapa seguinte, os microrganismos patogênicos já ativados em caldo BHI por 24 horas foram diluídos em 1:10 e então inoculados nestas placas. O resultado foi lido 24 horas depois do procedimento (BRAGA; SPESSOTO, 2008)

3.7 UTILIZAÇÃO DA TFD COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

Os testes com TFD para avaliação da ação antimicrobiana tiveram as seguintes etapas: 1- avaliação da ação apenas da lâmpada de LEDs sobre as células; 2- Avaliação da ação apenas dos fotossensibilizadores (corantes), azul de metileno e verde malaquita, sobre as células; 3- Avaliação da combinação corante e exposição à lâmpada de leds (SOUZA et al., 2003; PRATES et al., 2010; SUZUKI, 2009).

O primeiro teste foi realizado primeiramente com a ativação dos microrganismos (*S. boulardii* e *C. albicans*) em caldo YEPD por 48h à 30°C. Posteriormente foram feitas diluições, em solução salina, até 1:10000 de acordo com a contagem em câmara de Neubauer. A partir desta diluição, alíquotas de 0,1ml foram transferidas para placas de Petri com o auxílio de uma micropipeta e espalhadas com alça de Drigalsky. Após o espalhamento, uma triplicata foi incubada sem ser exposta à lâmpada de LEDs e as demais triplicatas foram expostas por 3, 6, 9 e 12 minutos. A lâmpada de LEDs em questão possui potência de 1,5W e comprimento de onda de 630 nm, na faixa da luz vermelha, e foi posicionada à 5 cm da superfície do ágar, de maneira com que sua luz atingisse toda a superfície da placa. Feitas as exposições, as placas foram incubadas por 48h à 30°C, para posterior contagem das UFC (SILVA et al., 2007; KAPPKE et al., 2005; SUZUKI, 2009).

O segundo teste foi realizado colocando as células em contato com as substâncias fotossensibilizadoras (FS) em diferentes concentrações e tempos de exposição. Os corantes foram preparados na concentração de 0,1 mg/ml, sendo autoclavados logo após sua preparação. Após feitas as devidas diluições, seguindo a contagem em câmara de Neubauer, foi adicionado o FS de modo que fossem obtidas as concentrações de 1:1, 1:0,5 e 1:0,25 de FS nos tubos. Imediatamente após esta adição foi inoculada a primeira triplicata referente ao tempo zero de exposição ao FS. Dados os tempos 3, 6, 9 e 12 minutos uma triplicata foi inoculada para cada respectivo tempo. As placas foram incubadas nas mesmas condições anteriores.

O terceiro teste corresponde à combinação entre os dois fatores, contato com FS e exposição à lâmpada de LEDs. O procedimento para o contato com FS foi realizado da mesma maneira que para o experimento anterior e as concentrações utilizadas para o experimento foram de 1:0,5 para o azul de metileno e 1:0,25 para o verde malaquita. Tais concentrações foram selecionadas após os resultados dos testes de toxicidade, de modo a se obter entre 30 e 300 colônias na inoculação em placa após o tempo de contato das células com os corantes. As células foram sensibilizadas com 10 min de contato com o FS e em seguida inoculadas em placa de Petri para posterior exposição à lâmpada de LEDs. Os tempos utilizados foram de 0, 3, 6, 9 e 12 min (PRATES et al., 2010), (SOUZA et al., 2003).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para a análise estatística dos dados foram utilizados diferentes métodos.

O primeiro a ser descrito é o cálculo de desvio padrão para os valores das UFC das triplicatas realizadas. O desvio padrão destes valores é utilizado para estimar a dispersão estatística do número de UFC para cada instante de tempo. O cálculo de desvio é feito considerando os valores obtidos das triplicatas e a média aritmética destes valores e aplicando a equação 7 para estimativa de desvio padrão descrita por Vuolo (1998).

$$\sigma^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2. \quad (7)$$

Foi realizada uma correlação entre os dados obtidos para a curva de crescimento de *S. boulardii*. Esta correlação resultou em pontos experimentais que, através da regressão linear, foi possível obter a equação referente a reta ajustada e o coeficiente de determinação r^2 . Este coeficiente de determinação é uma correlação que permite determinar a precisão com que os valores se relacionam, ou seja, determinar o número de células por ml apenas medindo a absorbância do cultivo. Sua vantagem é de que a medição da absorbância é um processo com resultados imediatos ao contrário da verificação em placa, que necessita da inoculação de várias diluições e espera do tempo de incubação para verificação da melhor diluição o que despense de muito tempo e desperdício de materiais.

A regressão linear foi calculada pelo método dos mínimos quadrados descrito por Vuolo (1998) e Taylor (2009) e mostrado nas equações 8 e 9.

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}, \quad (8)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}. \quad (9)$$

A regressão linear também foi calculada pelo programa Statistica e o melhor resultado entre os dois métodos foi utilizado para análise dos resultados.

Após o cálculo da regressão linear foi realizado o cálculo do coeficiente de determinação (r^2), que está descrito por Vuolo (1998), usando a equação 10.

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - f_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}. \quad (10)$$

Este dado também foi calculado pelo programa Statistica (STATSOFT, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE *S. BOULARDII*

A contagem inicial de células, realizada em câmara de Neubauer, foi de 227 mil UFC/ml com desvio padrão de 11,9%. A contagem de UFCs das placas correspondentes ao tempo zero da curva foi observada uma ordem de grandeza próxima da contagem em câmara de Neubauer, com um valor de 61 mil UFC/ml. Estes dados, além de confirmarem o número inicial de células para realização da curva, também indicam que a contagem em câmara de Neubauer poderia ser utilizada para verificação da melhor diluição a ser inoculada nos meios de cultivo.

No acompanhamento da curva de crescimento foi possível observar a fase de crescimento logarítmico (ou fase Log) que se estendeu por aproximadamente 10 horas após o início do procedimento. Também foi possível observar o início da fase estacionária que aconteceu em aproximadamente 10 horas após o início do experimento. As Figuras 8 e 9 apresentam, respectivamente, os pontos obtidos experimentalmente que representam o crescimento da levedura em Log(UFC) em função do tempo e os pontos que representam a densidade óptica da cultura (medida com um feixe de luz de 600nm em espectrofotômetro) em função do tempo de crescimento.

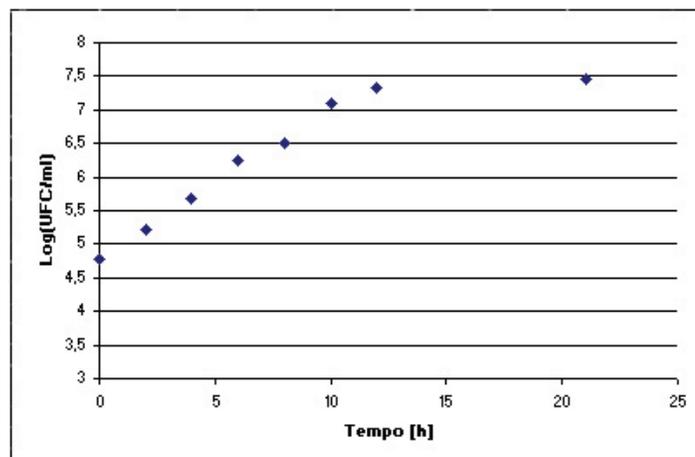


Figura 8: Log do número de UFC/ml de *S. boulardii* em função do tempo de crescimento em meio YEPD à 30°C

Fonte: autoria própria

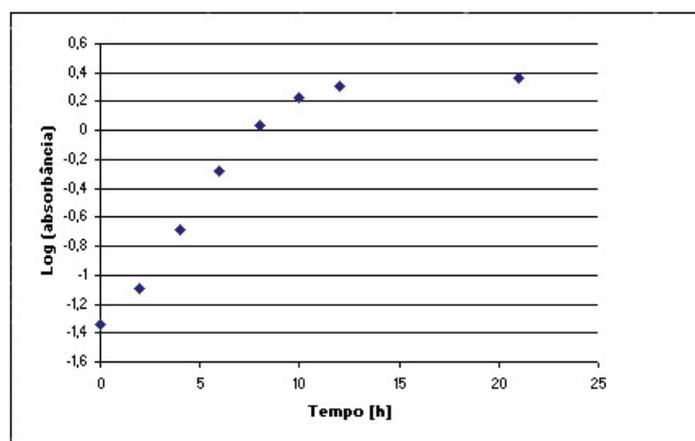


Figura 9: Log da absorbância do cultivo de *S. boulardii* em relação ao tempo de crescimento.

Fonte: autoria própria

A fase de adaptação (ou fase Lag) que normalmente ocorre no início de uma curva de crescimento, não foi observada, porque o microrganismo já estava bem adaptado ao meio YEPD e às condições de cultivo.

Com o acompanhamento da curva de crescimento foi possível correlacionar os resultados do cultivo em placas de Petri com os resultados das medições de absorbância correspondente a amostras para cada instante de tempo. A correlação entre os dados resultou nos pontos experimentais e, após o ajuste da reta foi possível calcular o coeficiente de determinação r^2 . Este coeficiente permitiu determinar o número de células por ml apenas medindo a absorbância do cultivo. A

Figura 10 apresenta esta correlação.

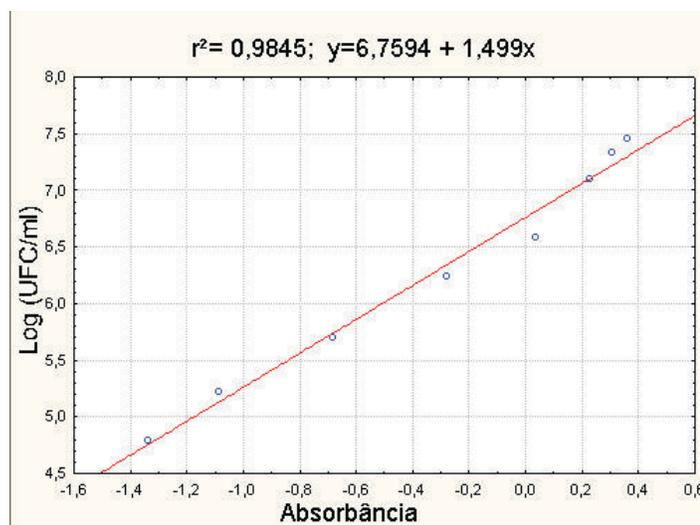


Figura 10: Correlação entre o número de UFC e a absorbância do meio obtidas durante a curva de crescimento de *S. boulardii*

Fonte: autoria própria

Como observado na Figura 10 o valor de r^2 foi de 0,9845. Isto significa que a precisão dos valores correlacionados é de 98%. A correlação utilizada foi a que apresentou melhor resultado para r^2 , calculada pelo programa Statistica em a equação obtida foi $y = 6,7594 + 1,499x$ onde, y representa o valor do log das UFC/ml e x representa o valor da absorbância da cultura celular. O valor calculado pelo método dos mínimos quadrados foi descartado pois apresentou uma precisão menor.

4.2 IRRADIAÇÃO DAS CÉLULAS DE *S. BOULARDII*

A porcentagem de células sobreviventes em função do tempo de exposição referente à primeira irradiação é apresentada na Figura 11.

A Figura 11 apresenta os pontos obtidos experimentalmente para exposição de células de *S. boulardii*. Cada ponto é referente ao número de células sobreviventes (eixo y) em função do tempo de exposição (eixo x). Foram calculados os desvios padrão para cada ponto experimental. O desvio padrão destes valores estima a dispersão estatística do número de UFC para cada instante de tempo.

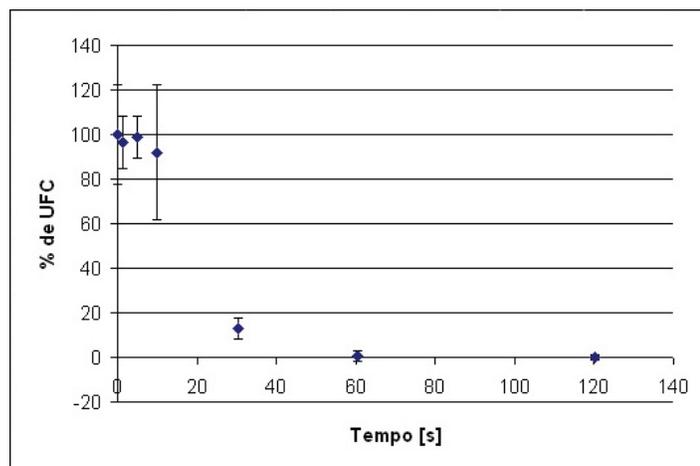


Figura 11: Percentual da população de *S. boulardii* expostas à radiação UV-C em doses crescentes

Fonte: autoria própria

A ação dos raios ultravioleta sobre as células no ponto situado aos 30 segundos de exposição, que representa uma intensidade de 1692 mJ/cm^2 , apresenta uma redução decimal de 0,89, ou seja, a população inicial teve uma redução de 90% 0,89 vezes. A partir dos 60 segundos (3384 mJ/cm^2) a redução decimal foi de 2,57, o que significa que a população inicial teve uma redução de 90% 2,57 vezes. Na prática obteve-se 100% das células inativadas a partir deste tempo. TORTORA et al. (2005) afirmam que quando os microrganismos são expostos à agentes antimicrobianos, estes normalmente morrem em uma taxa constante. Ao representar a curva de mortalidade logarítmica, pode-se observar com clareza que esta taxa é constante.

Com o resultado desta primeira irradiação, tornou-se possível a determinação dos tempos de exposição para a segunda irradiação. Os resultados obtidos com 1 segundo de exposição, por exemplo, não apresentam mudanças significativas na população inicial. Além disto, o desvio padrão elevado dos primeiros pontos da curva requereram uma repetição do experimento para maior precisão.

A segunda irradiação foi feita com intervalos de 5 segundos entre os pontos e 8 pontos no total (Figura 12). Pôde-se confirmar a sensibilidade das células de levedura à radiação UV-C, pois, houve uma redução decimal de 0,997 da população no tempo de 30s, ou seja, 90% das células foram inativadas com este tempo de exposição.

Também foi possível observar, relacionando os dados com os anteriores, que aos 40 segundos observa-se quase a totalidade de inativação dos microrganismos. Nesse tempo, apenas 0,59% da população inicial sobreviveu à exposição aos raios UV-C.

Em se tratando de descontaminação de superfícies Alexandre et al. (2008) igualmente obtiveram resultados significativos apenas a partir de 30 segundos de exposição ao irradiar com UV-C superfícies plásticas contaminadas por esporos de *Bacillus subtilis*.

Ao expor células mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* à uma intensidade de 10 J/m^2 (100 mJ/cm^2), Lenzi (2005) obteve uma redução decimal com menos de 125 J/m^2 (1250 mJ/cm^2) de intensidade da radiação UV-C o que indica que a célula mutante utilizada pelo autor é mais sensível que a linhagem não exposta do microrganismo. RESNICK e SETLOW (1972) em seus experimentos também obtiveram um resultado parecido, sendo que, menos de 1% da população, da linhagem sem irradiar, sobreviveu a uma intensidade de radiação de 150 J/m^2 (1500 mJ/cm^2). Os autores ainda chegaram a conclusão que a cepa mutante é cerca de 20 a 30 vezes mais sensível que a cepa sem irradiar.

O número de células sobreviventes à radiação ultravioleta C em função do tempo de exposição esteve de acordo com os dados encontrados para leveduras na literatura. Lobo et al. (2009) obtiveram 99,76% de inativação de *S. cerevisiae* com 60 segundos de exposição em um reator de 2,5 litros e de acordo com Birrell et al. (2001) existe uma redução decimal maior que 1 com uma intensidade de radiação próxima de 300 J/m^2 .

4.2.1 Verificação da ocorrência de fotorreativação em células de *S. boulardii*

Os resultados dos experimentos para a verificação da ocorrência de fotorreativação são apresentados na Figura 13 onde estão representadas os pontos referentes às triplicatas com e sem exposição à luz. Os pontos marcados por um triângulo representam o experimento com as placas

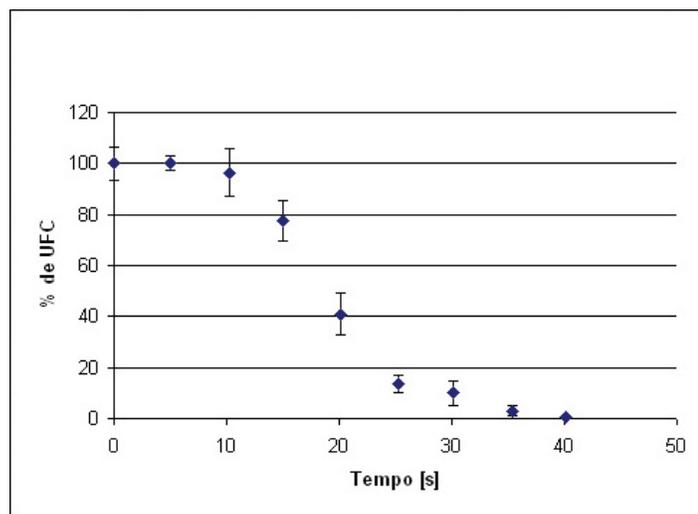


Figura 12: Percentual de redução da população de *S. boulardii* após segunda irradiação com UV-C nas mesmas condições

Fonte: autoria própria

sem exposição à luz visível após irradiação e os pontos marcados por um losango representam o experimento referente às placas expostas à luz visível durante 1 hora após irradiação.

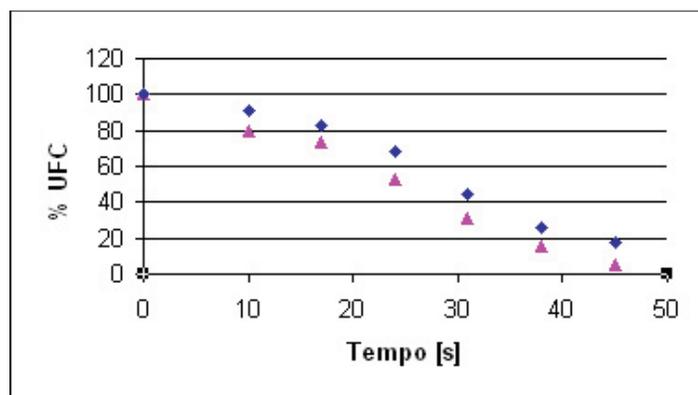


Figura 13: Comparação entre os percentuais de redução com e sem exposição à luz pós irradiação. Os triângulos representam as contagens sem exposição à luz e os losangos as contagens com exposição à luz.

Fonte: autoria própria

Na tabela 1 são apresentadas as comparações dos valores de reduções decimais dos dois experimentos e os respectivos desvios padrão do percentual de UFC referentes a estes experimentos.

Tabela 1: Comparação entre as reduções decimais (RD) de *S. boulardii* com e sem fotorreativação

Tempo (s)	RD Sem luz	Desvio padrão das UFC (experimento sem luz)	RD Com luz	Desvio padrão das UFC (experimento com luz)
0	0	6,8%	0	6,8%
10	0,1013	10,9%	0,0403	5,2%
17	0,1359	8,9%	0,0841	1,9%
24	0,2810	9,4%	0,1659	3,7%
31	0,5141	9,1%	0,3560	10,2%
38	0,8163	6,9%	0,5791	10,7%
45	1,2630	2,2%	0,7574	5,0%

Levando em consideração os desvios padrões das duas curvas, expressando os resultados em reduções decimais e fazendo a comparação entre os dois resultados é possível concluir que a fotorreativação foi muito pequena ou nula.

Foi realizada uma segunda irradiação para verificação da fotorreativação. Esta nova curva foi realizada nas mesmas condições que a anterior, com exceção da lâmpada ultravioleta que foi trocada por uma nova, com as mesmas características, devido à queima da lâmpada anterior. Os resultados deste experimento estão expressos na Figura 14 que apresentam os resultados da irradiação sem exposição (pontos marcados por um triângulo) à luz e com exposição à luz (pontos marcados por um losango) após a irradiação respectivamente.

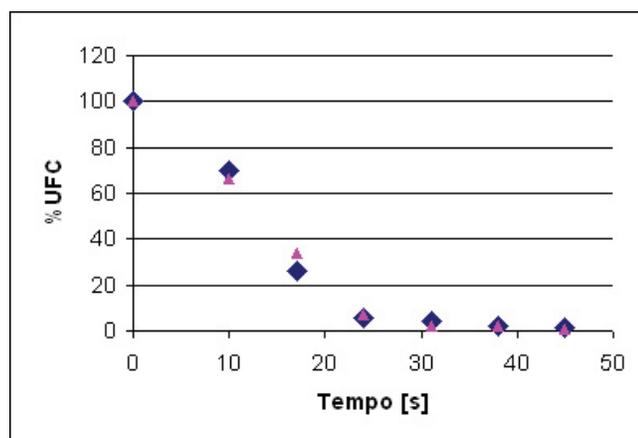


Figura 14: Percentual de células de *S. boulardii* sobreviventes a radiação UV-C sem exposição à luz após a irradiação (pontos representados por um triângulo) e com exposição à luz (pontos representados por um losango)

Fonte: autoria própria

Fazendo novamente a comparação entre as reduções decimais (RD) (Tabela 2) e levando em consideração os desvios padrão dos experimentos com e sem exposição a luz após a irradiação, nota-se que não houve a fotorreativação.

Tabela 2: Comparação entre as RD de *S. boulardii* com e sem fotorreativação (segunda irradiação)

Tempo (s)	RD Sem luz	Desvio padrão das UFC (experimento sem luz)	RD Com luz	Desvio padrão das UFC (experimento com luz)
0	0	2,67%	0	2,67%
10	0,1760	8,81%	0,1546	4,55%
17	0,4727	5,92%	0,5806	4,63%
24	1,1505	5,62%	1,2423	3,25%
31	1,6946	1,01%	1,3935	2,02%
38	1,6946	1,75%	1,6946	2,67%
45	2,1717	0,58%	1,8706	2,33%

Pode-se sugerir que, com o comprimento de onda utilizado não ocorre a fotorreativação pois com base no que afirma Aguiar (2000), este fenômeno apenas ocorre com comprimentos de onda entre 300 e 500 nm que estão na faixa dos raios ultravioleta A (UV-A). Outros fatores como extensão do dano provocado, pH e temperatura também podem afetar a fotorreativação além do comprimento de onda.

4.2.2 Comparação da eficiência entre as lâmpadas UV-C utilizadas

Comparando-se os resultados dos experimentos realizados com uma lâmpada UV-C com um tempo estimado de mais de 10000 horas de uso e de uma lâmpada nova (com zero horas de uso) fica evidente a diferença da eficiência na inativação do microrganismo em questão. Na Figura 15 é apresentada uma comparação entre os resultados de redução populacional com a lâmpada com mais de 10000 horas de uso (gráfico à esquerda) e com a lâmpada com zero horas de uso (gráfico à direita).

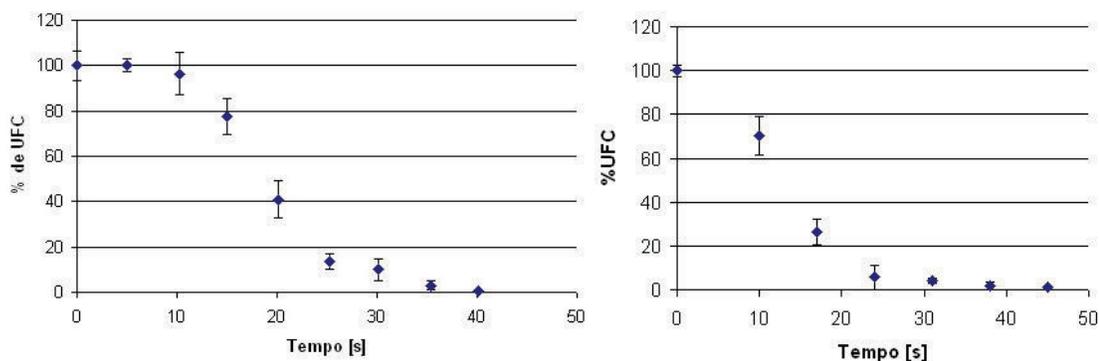


Figura 15: Comparação entre os resultados com as lâmpadas com 10000 horas (gráfico à esquerda) e zero horas de uso (gráfico à direita)

Fonte: autoria própria

O tempo de exposição para uma redução decimal da população de *S. boulardii* com a lâmpada com mais de 10000 horas de uso, fica em torno de 40 segundos, mas este tempo reduz para cerca de 25 segundos com a utilização da lâmpada nova. Com este resultado é possível concluir que a eficiência da lâmpada germicida diminuiu claramente com o tempo de utilização. Neste caso, a eficiência da lâmpada com mais de 10000 horas de uso diminuiu em torno de 41% em relação à lâmpada sem uso prévio ao experimento. O desgaste das lâmpadas UV com o tempo é influenciado pelos ciclos de acondicionamento e desligamento e pela potência aplicada por unidade de comprimento da lâmpada. A Figura 4.2.2 apresenta a variação da intensidade de radiação de lâmpadas UV em função do tempo (DROSTE, 1997).

Fonte: adaptado de (DROSTE, 1997)

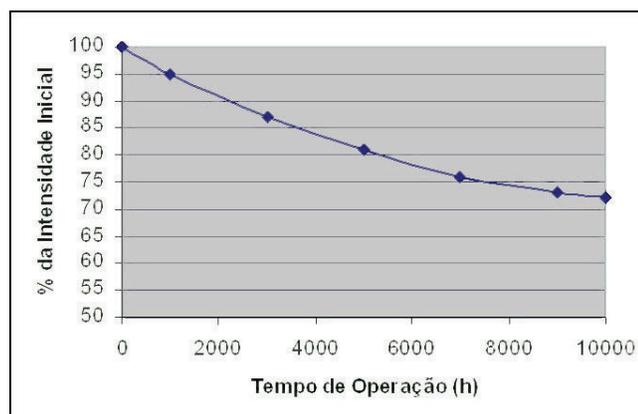


Figura 16: Variação da intensidade de radiação de lâmpadas UV-C em função do tempo

Após este experimento, os experimentos seguintes foram realizados apenas com a lâmpada UV-C com zero horas de uso.

4.3 PROVAS BIOQUÍMICAS EM MUTANTES DE *S. BOULARDII*

Foram isolados ao todo 10 linhagens mutantes da levedura *S. Boulardii*, que posteriormente foram submetidos a testes bioquímicos para verificação de algumas atividades metabólicas. Os resultados das provas bioquímicas nos mutantes isolados (Tabela 3) mostram claramente as alterações no metabolismo das leveduras irradiadas.

Tabela 3: Resultados das provas bioquímicas em mutantes de *S. boulardii*

Mutante	Glicose	Sacarose	Lactose	Uréia	F. lisina	Citrato
<i>S. boulardii</i>	+ g*	+ sg**	+	-	-	-
Mut 1	+ sg	-	-	-	-	-
Mut 2	+ sg	-	-	-	+	-
Mut 3	+ g	-	-	-	+	-
Mut 4	+ g	-	+	-	+	-
Mut 5	-	-	-	-	+	-
Mut 6	+ g	+ g	+	-	+	-
Mut 7	+ g	-	+	-	+	-
Mut 8	-	-	-	-	+	-
Mut 9	+ g	-	-	-	+	-
Mut 10	+ g	+ sg	-	-	-	-

*g: com produção de gás

**sg: sem produção de gás

+: resultado positivo

-: resultado negativo

Como pode-se observar na Tabela 3, a maioria dos mutantes teve alterações na assimilação de fontes de carbono. Os mutantes número 5 e 8 perderam a capacidade de assimilar a glicose, enquanto os mutantes 1 e 2 ainda possuem esta capacidade, mas a produção de gás na presença deste açúcar não mais acontece, diferentemente da *S. boulardii* padrão (sem irradiar) que pode ser observada na primeira linha da tabela. Com exceção dos mutantes 6 e 10, todos os demais perderam a capacidade de fermentação e assimilação da sacarose. A utilização da lactose como fonte de carbono ficou comprometida na maioria dos mutantes com exceção dos números 4, 6 e 7.

Nenhum dos mutantes isolados teve a aquisição da capacidade de hidrólise da uréia enquanto que, com exceção dos mutantes 1 e 10, os demais passaram a utilizar a lisina como fonte de nitrogênio, o que não acontece na célula não irradiada. Por outro lado, nenhum dos mutantes se desenvolveu no meio citrato e conclui-se que não sejam capaz de metabolizá-lo.

4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS MUTANTES

4.4.1 Análise macroscópica

A Figura 17 apresenta as características observadas na análise macroscópica das células irradiadas com UV-C.

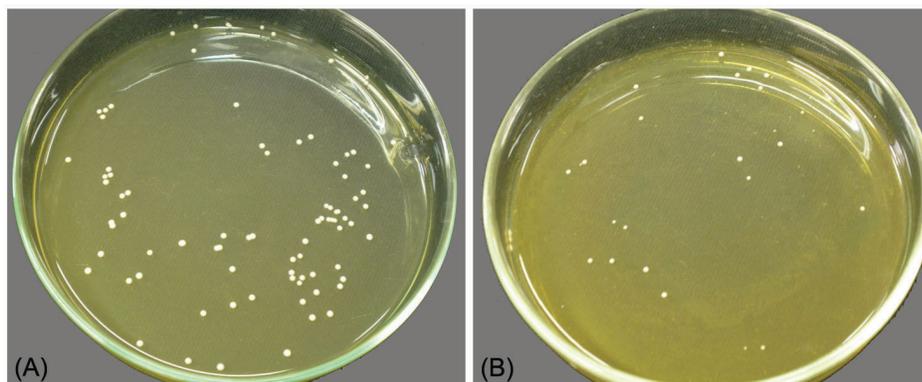


Figura 17: Colônias de *S. boulardii* em ágar YEPD após crescimento por 48 horas à 30°C. (A) Colônias sem exposição à radiação. (B) Colônias após irradiação.

Fonte: autoria própria

É possível observar que as colônias continuaram a apresentar a mesma coloração, formato e textura, porém a comparação feita na Figura 17 mostra que o tamanho de algumas das colônias irradiadas aparenta ser menor com as mesmas condições de inoculação e incubação (inoculadas em ágar YEPD pela técnica do espalhamento e incubadas à 30°C por 48h) que das colônias não irradiadas. Com estas observações sugere-se que as colônias irradiadas precisam de mais tempo

para se desenvolver como as colônias que não foram irradiadas. Entretanto, para confirmação desta afirmação é necessária a realização de medição das colônias após um certo período de incubação e da análise estatística destes dados.

4.4.2 Análise microscópica

A análise microscópica das células irradiadas apresentou basicamente o mesmo tipo de alteração para a maioria dos mutantes. As células irradiadas apresentam um alongamento ligeiramente maior em comparação com as células não irradiadas, mas apesar disto, as colônias (macroscópicas) não apresentam alteração em seu formato.

A Figura 18 apresenta micrografias das células de *S. boulardii*, com um aumento de 400x de alguns das linhagens mutantes isoladas.

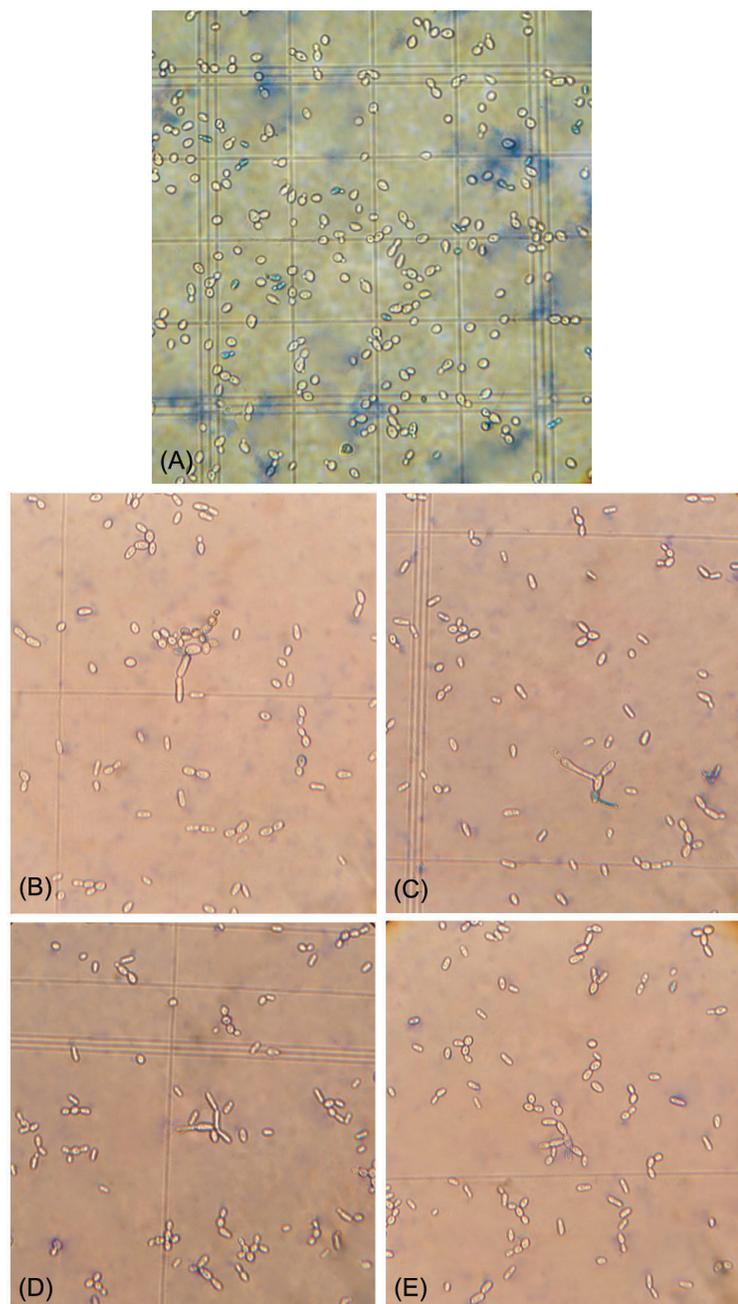


Figura 18: Microscopia de células de *S. boulardii* com aumento de 400x sem coloração. (A) Sem exposição ao UV-C. (B) linhagem mutante nº 1. (C) linhagem mutante nº 2. (D) linhagem mutante nº 4. (E) linhagem mutante nº 7.

Fonte: autoria própria

Na Figura 18 (A), que representa as células não irradiadas, pode-se observar a predominância de células com formato arredondado e muitas destas, possuem pequenas outras células aderidas às suas superfícies como consequência da divisão/reprodução celular.

Ao observar a Figura 18 (B), (C), (D) e (E) pode-se notar um certo alongamento em um grande número de células. Diferentemente do que ocorre com a *C. albicans* (figura 1), não foi observada a formação de pseudo-hifas pela *S. boulardii*, portanto, o alongamento observado apenas nas linhagens mutantes pode ter ocorrido em resultado de uma divisão celular incompleta, ou seja, até o momento da microscopia não havia ocorrido a separação, tampouco sinais de possível separação, entre as células mãe e filha após a divisão por brotamento. Este pode ser o motivo pelo qual as colônias irradiadas possuem um tamanho reduzido em relação ao tamanho das colônias não irradiadas após incubadas nas mesmas condições de tempo e temperatura. Entretanto, esta afirmação para ser confirmada, é necessária a realização de testes mais precisos como a medição das células e um estudo estatístico dos dados, que não foi possível fazer durante a realização deste trabalho.

4.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL PROBIÓTICO DAS CÉLULAS DE *S. BOULARDII*

Nos testes realizados para verificação do potencial probiótico das células não foi possível a detecção de halos de inibição contra nenhum dos microrganismos patogênicos testados em qualquer dos mutantes testados, inclusive das células de *S. boulardii* não expostas ao UV-C. Apesar da utilização de duas metodologias apresentadas em Bandeira et al. (2008) e BRAGA e SPESSOTO (2008), os microrganismos não responderam aos testes. A Figura 19 apresenta os crescimentos das colônias de *S. boulardii* (nas periferias das placas) e o crescimento do patógeno *E. Coli* (preenchendo o restante das placas).

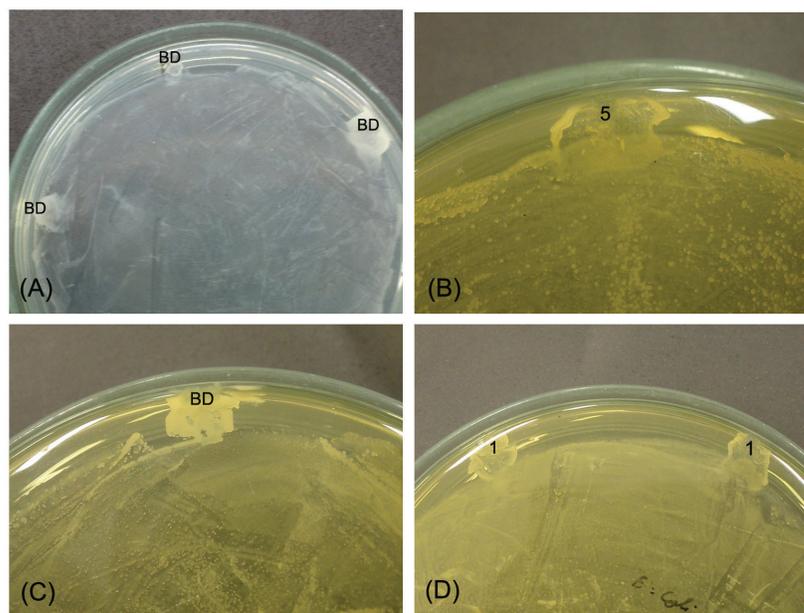


Figura 19: Resultados dos testes de potencial probiótico da *S. boulardii* contra *E. coli*. Microorganismos inoculados em àgar YEPD e incubados à 30°C por 24h, (*E. coli* inoculada previamente pela técnica de espalhamento e *S.boulardii* inoculada logo após com alça de inoculação

Fonte: autoria própria

Na Figura 19 (A), o crescimento das colônias de *S. boulardii* não exposta à radiação, nas periferias da placa, identificadas pelas letras "BD", o crescimento que preenche o restante da placa é o patógeno *E. coli*. Em 19 (B) temos o crescimento do mutante nº 5, identificado pelo número 5 e no restante da placa pode-se ver o crescimento de *E. coli*. A Figura 19 (C) apresenta também o crescimento da *S. boulardii* e 19 (D) apresenta o crescimento do mutante nº 1 nas periferias da placa indicados pelo número 1 e o crescimento que preenche o restante das placas corresponde a *E. coli*.

Nota-se que não houve inibição alguma contra este microrganismo e os limites das colônias de *S. boulardii* e as células da linhagem mutantes chegaram a entrar em contato com crescimento bacteriano. Como pode ser observado na Figura 19 (B), o crescimento da bactéria *E. coli* até mesmo ultrapassa os limites da colônia da levedura mutante mostrando que esta não possui nenhum efeito sobre seu crescimento. Os demais micro-organismos testados apresentaram resultados semelhantes, ou seja, não foram detectados halos de inibição ante a *S. boulardii* e os mutantes testados.

Em seus estudos Bandeira et al. (2008) obtiveram uma leve inibição quando testaram a ação da *S. boulardii* contra *E. coli*. Os autores não informam as medidas dos halos obtidos

e ainda afirmam que na literatura pesquisada, outros autores também tiveram dificuldades para detectar os halos de inibição, tanto para difusão em ágar com o microrganismo quanto para com o sobrenadante da cultura. Martins et al. (2005) testaram o potencial probiótico da *S. cerevisiae* contra vários patógenos, inclusive *E. coli*, e tampouco observou halos de inibição. Nas discussões destes autores, foi possível observar que outros autores já conseguiram medir halos de inibição com *S. boulardii*, também quando testado contra *E. coli*.

Com um microrganismo diferente, BRAGA e SPESSOTO (2008), realizaram a segunda metodologia utilizada neste trabalho, obtiveram sucesso ao medir os halos de inibição, quando testaram a ação de bactérias isoladas da planta *Cordia verbenacea*. Pode-se concluir que esta técnica para verificação do halo de inibição é válida, apenas não sendo possível a observação deste halo com o microrganismo testado neste trabalho.

4.6 IRRADIAÇÃO DE CÉLULAS DE *CANDIDA ALBICANS* COM UV-C

A irradiação de células de *Candida albicans* seguiu a mesma metodologia da irradiação da *S. boulardii*. Também foram obtidos pontos experimentais que representam o percentual de mortalidade da levedura em relação ao tempo de exposição à radiação. A Figura 20 apresenta os pontos obtidos para a irradiação de *C. albicans* com UV-C.

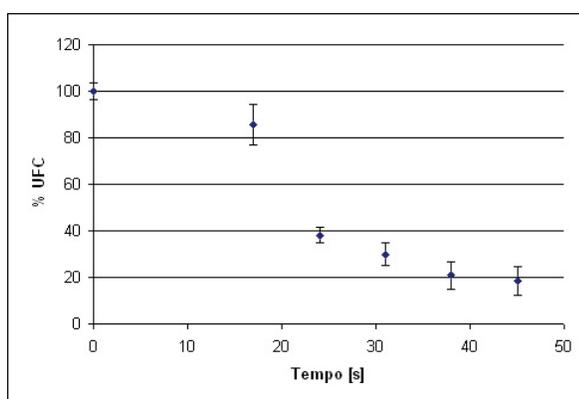


Figura 20: Percentual de sobrevivência de células de *C. albicans* expostas à tempos crescentes de exposição à radiação UV-C

Fonte: autoria própria

Neste experimento é possível observar que no tempo máximo de exposição (45 segundos) a redução decimal foi de apenas 0,737, o que significa redução de apenas 66% da população. Por este motivo, na repetição da curva, o tempo de exposição foi estendido em mais 15s, ou seja, até 60 segundos. A Figura 21 mostra a sensibilidade da célula com um tempo de exposição que varia entre 10 e 60 segundos.

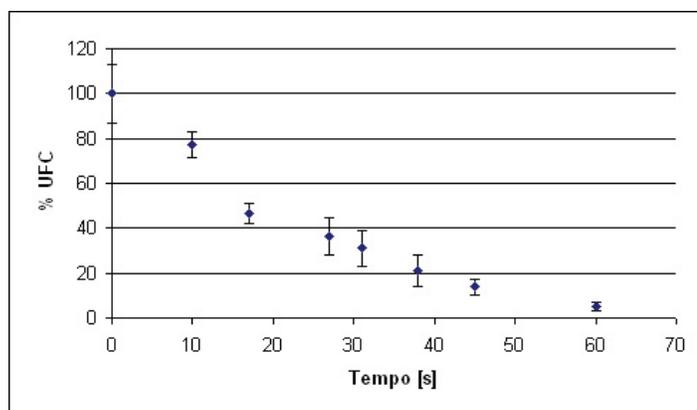


Figura 21: Percentual de células de *C. albicans* sobreviventes após exposição à radiação UV-C com o tempo de exposição estendido até 60 segundos.

Fonte: autoria própria

A exposição da *C. albicans* a um tempo 15 segundos mais longo confirma que esta levedura precisa de uma intensidade de radiação um pouco maior para se ter uma redução decimal igual a 1. Interpretando o gráfico nota-se que esta redução ocorre em torno dos 55 segundos de exposição à radiação.

Ao fazer experimentos de descontaminação de superfícies Farrell et al. (2009) também obtiveram resultados muito parecidos ao expor células de *C. albicans*, além de outros micro-organismos. Aproximadamente aos 55 segundos os autores também obtiveram a redução decimal desta levedura. Crandall (1983) que também irradiou este microrganismo, obteve uma redução decimal aos 40 segundos de exposição e com 60 segundos, apenas 1% de sobreviventes foram detectados.

4.6.1 Verificação da fotorreativação das células de *C. albicans*

Como feito com as células de *S. boulardii*, após a irradiação com raios ultravioleta, o micro-organismo foi exposto a uma fonte de luz visível para verificação da ocorrência de fotorreativação. A diferença do primeiro experimento está em que a fonte luminosa à que a levedura *C. albicans* foi exposta, consiste em uma lâmpada de LEDs de 1,5 W de potência e fluxo luminoso

de 36 lm, enquanto que para *S. boulardii* a fonte luminosa utilizada foi a própria iluminação do laboratório.

Na Figura 22 é possível observar uma comparação entre os pontos do experimento sem fotorreativação (representado pelos pontos marcados por um losango) e com fotorreativação (representado pelos pontos marcados por um triângulo).

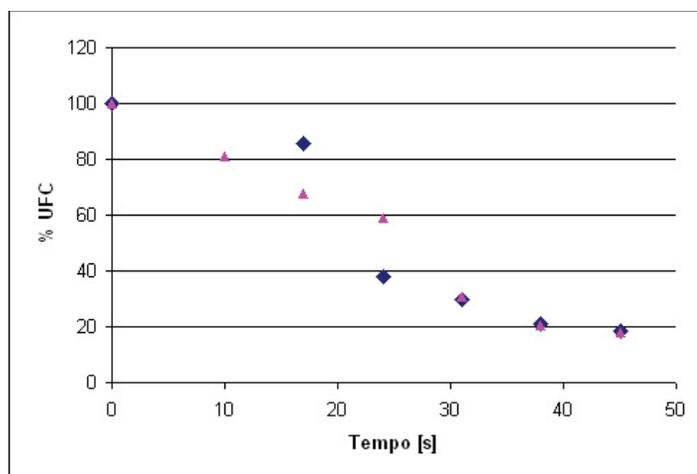


Figura 22: Comparação da redução populacional de *C. albicans* com fotorreativação (pontos representados por um triângulo) e sem fotorreativação (pontos representados por um losango).

Fonte: autoria própria

Os desvios padrão obtidos para as triplicatas de cada ponto e a comparação entre as reduções decimais estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Reduções decimais de *C. albicans* dos experimentos com e sem fotorreativação e desvios padrão

Tempo (s)	RD Sem luz	Desvio padrão das UFC (experimento sem luz)	RD Com luz	Desvio padrão das UFC (experimento com luz)
0	0	3,51%	0	3,51%
10	-0,0309	1,51%	0,0917	9,25%
17	0,0679	8,84%	0,1688	11,09%
24	0,4179	3,24%	0,2309	11,44%
31	0,5241	4,86%	0,5145	3,48%
38	0,6819	5,83%	0,6854	2,12%
45	0,7372	6,24%	0,7431	4,86%

Ao comparar os dois experimentos, considerando estes desvios, pode-se afirmar que não houve a ocorrência da fotorreativação das células de *C. albicans* ao serem expostas à lâmpada de LEDs (comprimento de onda de 630nm). A não ocorrência de fotorreativação também pode ser concluída apenas com a observação da disposição dos pontos experimentais, uma vez que, em alguns pontos, os resultados dos dois experimentos possuem pontos que coincidem ou os valores do

experimento sem a exposição à luz são mais elevados que os valores do experimento com exposição à luz. Segundo Aguiar (2000) a fotorreativação apenas ocorre com a exposição das células irradiadas a um comprimento de onda entre 300 e 500nm que compreende a faixa de comprimento de onda dos raios ultravioleta A (UV-A).

4.7 UTILIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

4.7.1 Avaliação da ação da lâmpada de LEDs sobre as células de *C. albicans*

A Figura 23 apresenta os pontos experimentais obtidos do procedimento que considera o efeito apenas da luz da lâmpada de LEDs sobre as células de *C. albicans*, sem a ação das substâncias fotossensibilizadoras, em diferentes tempos de exposição.

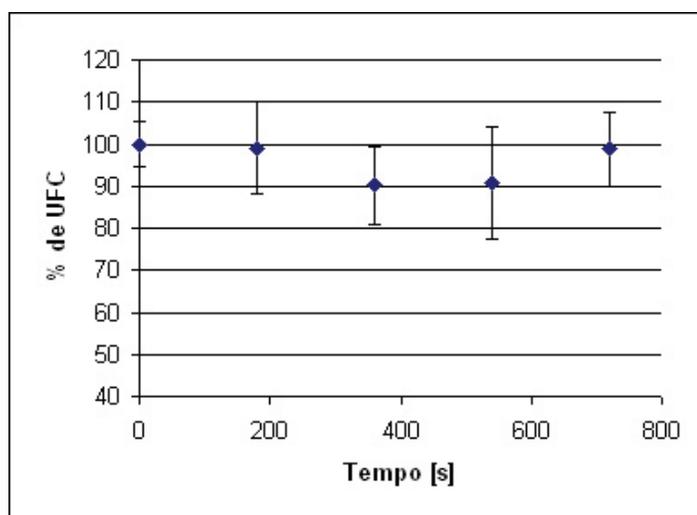


Figura 23: Percentual de redução populacional de *C. albicans* após exposição à lâmpada de LEDs em tempos crescentes sem a ação dos FS.

Fonte: autoria própria

Nota-se que a luz da Lâmpada de LEDs (630nm) não causa efeito sobre as células quando na ausência da substância FS. Em seus experimentos Prates et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes para este tipo de experimento, apesar da utilização de laser de baixa potência de 660nm, com potências ajustadas entre 30mW e 90mW. Os autores afirmam que não foi possível a observação de qualquer alteração na sobrevivência das células sem a presença do FS.

4.7.2 Teste de toxicidade dos corantes azul de metileno e verde malaquita sobre *C. albicans*

Também foi avaliada a ação apenas dos corantes sobre as células. A ação do corante azul de metileno, com concentração de 0,1mg/ml, nas proporções de 1:1, 1:0,5 e 1:0,25 pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5: Células de *C. albicans* sobreviventes ao FS azul de metileno

Concentração do FS	Tempo de contato da célula com FS	Média das UFC/placa
1:1	0s	102,3± 16
1:1	600s	86,00 ±15
1:0,5	0s	198,67 ±67
1:0,5	600s	197,33 ±19,66
1:0,25	0s	224,00 ±32
1:0,25	600s	212,00 ±89

Nota-se que a diminuição na população da levedura, após sensibilização pelo FS, é pouco ampla e possui maior intensidade na concentração de 1:1. A medida que foi realizada a diminuição da concentração do corante (1:0,50 e 1:0,25), a ação do mesmo sobre os microrganismos também diminui. Entretanto, os desvios calculados para estes valores mostram que a ocorrência desta diminuição talvez não tenha acontecido.

Rossoni et al. (2008) relataram em seus estudos que não houve diferença significativa na redução da população inicial de *C. albicans* com os corantes sem a presença da luz, entretanto, o autor cita que há estudos em que a redução populacional da levedura ocorre na presença do FS azul de metileno. Os estudos de Souza et al. (2003) mostram que a *C. albicans* não sofre alterações estatisticamente relevantes na presença deste corante. A ação antimicrobiana do azul de metileno contra *C. albicans* também não foi detectada nos resultados de Suzuki (2009)

A Tabela 6 apresenta os resultados do teste de toxicidade do corante verde malaquita nas proporções de 1:1, 1:05 e 1:25.

Tabela 6: células de *C. albicans* sobreviventes à exposição ao FS verde malaquita

Concentração	Tempo de contato da célula com FS	Média das UFC/placa
1:1	0s	164± 26,5
1:1	600s	50,3±11,6
1:0,5	0s	77,6 ±19,7
1:0,5	600s	62,6± 23,1
1:0,25	0s	111,67 ±16
1:0,25	600s	94,33 ±14

O corante verde malaquita se mostrou mais tóxico que o azul de metileno usado nas mesmas proporções. É possível perceber que na proporção de 1:1 houve uma redução de aproximadamente 69% na população inicial enquanto que, com o azul de metileno nesta proporção, a redução foi de apenas 15%. Igualmente como ocorrido com o azul de metileno, o corante verde também diminuiu sua toxicidade ao se diminuir a concentração. A diminuição da população pelo verde malaquita é evidente mesmo levando em consideração os desvios padrão ao contrário do que acontece com o azul de metileno.

4.7.3 TFD como agente antimicrobiano

A associação de corante e luz foi o último passo para a avaliação da TFD como agente antimicrobiano. A Figura 24 apresenta o comportamento de *C. albicans* após 10 minutos de contato com o fotossensibilizador azul de metileno 1:1 e posterior irradiação com tempos variáveis.

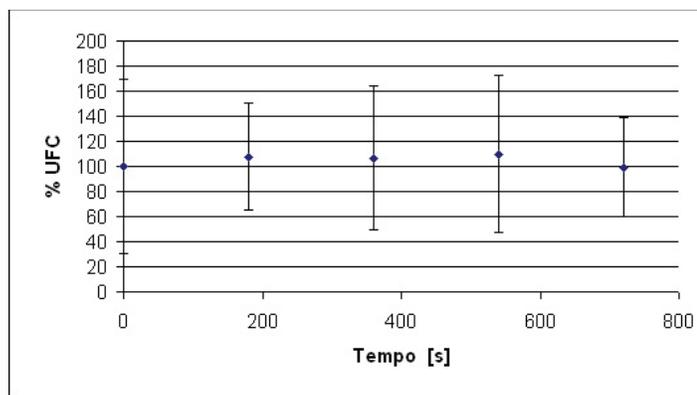


Figura 24: Irradiação de *C. albicans* após sensibilização por 10 minutos com azul de metileno (0,1mg/ml) na proporção de 1:1.

Fonte: autoria própria

A Figura 25 apresenta a curva referente à irradiação com lâmpada de LEDs, com intensidade de 1901,25 lux, após sensibilização por 10 minutos em azul de metileno em proporção 1:0,5.

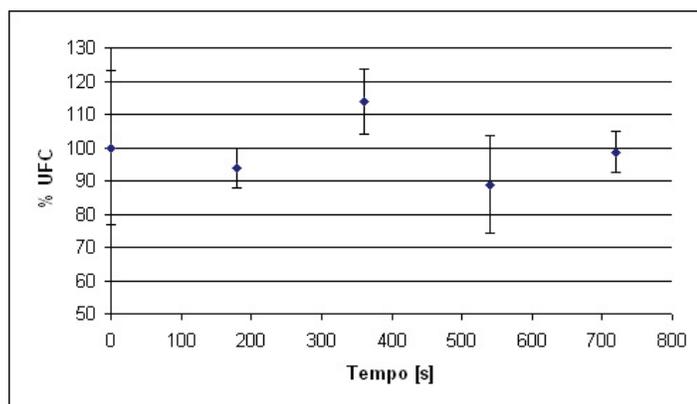


Figura 25: Irradiação de *C. albicans* após sensibilização por 10 minutos com azul de metileno (0,1mg/ml) na proporção de 1:0,5.

Fonte: autoria própria

Em virtude do efeito tóxico causado pelo verde malaquita nas leveduras, foi utilizada apenas a concentração de 1:0,25 para este corante. A porcentagem da população de células sensibilizadas também por 10 minutos nesta concentração e, exposta a mesma taxa de fluência, está mostrada na Figura 26.

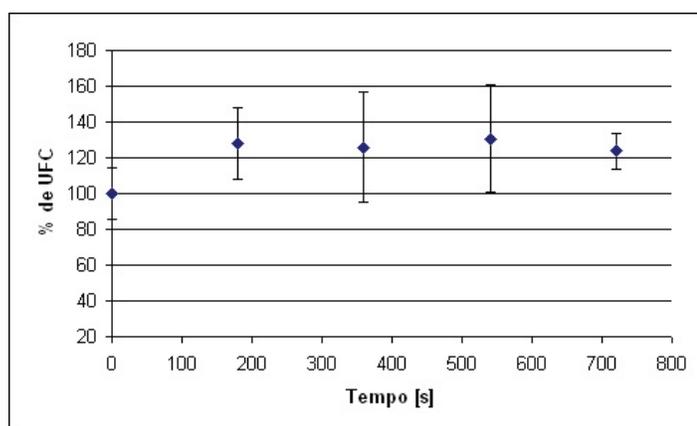


Figura 26: Irradiação de *C. albicans* após sensibilização por 10 minutos com verde malaquita (0,1mg/ml) na proporção de 1:0,25.

Fonte: autoria própria

Nota-se que não houve diferença significativa na contagem das células, tanto para as concentrações de azul de metileno, quanto para a concentração utilizada de verde malaquita. Com isto, tem-se que estes corantes associados com a lâmpada de LEDs e a metodologia utilizada, não apresentam ação antimicrobiana contra a *C. albicans*. Entretanto, em estudos realizados por Rossoni et al. (2008), Souza et al. (2003) e Prates et al. (2010), foi constatada a ocorrência da mortalidade celular proporcionalmente a intensidade de radiação luminosa recebida pelas células, porém ambos os trabalhos se utilizaram de lasers de baixa potência com taxa de fluência maior e com comprimento de onda semelhante (entre 660 nm e 685nm) para irradiação, e não de lâmpadas de LEDs.

Nas Figuras 27 e 28 estão representadas as contagens para os testes de TFD contra a levedura *S. boulardii* sensibilizadas com azul de metileno e verde malaquita respectivamente.

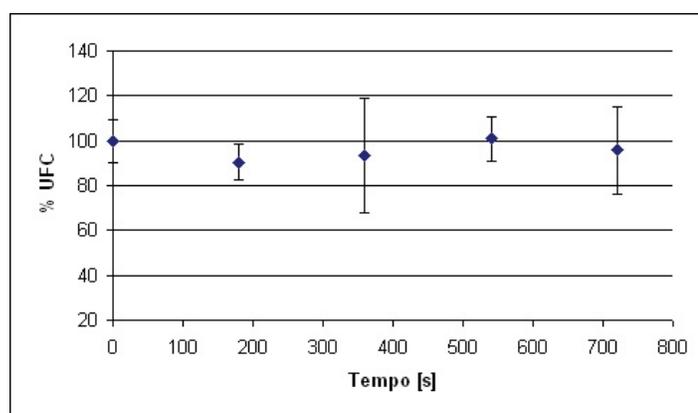


Figura 27: Irradiação de *S. boulardii* após sensibilização por 10 minutos com azul de metileno (0,1mg/ml) na proporção de 1:0,5

Fonte: autoria própria

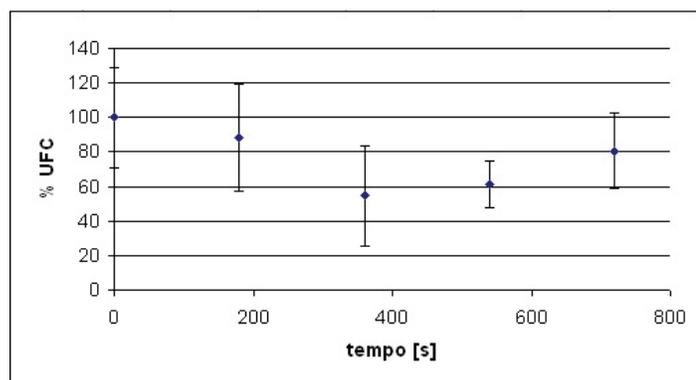


Figura 28: Irradiação de *S. boulardii* após sensibilização por 10 minutos com verde malaquita (0,1mg/ml) na proporção de 1:0,25.

Fonte: autoria própria

Novamente, como citado para *C. albicans*, a levedura *S. boulardii* não apresentou inativação celular significativa com a metodologia testada, porém ambos microrganismos apresentaram diferença significativa nos tamanhos das colônias antes e após irradiação. A Figura 29 apresenta uma comparação nos tamanhos das colônias antes e após a irradiação.

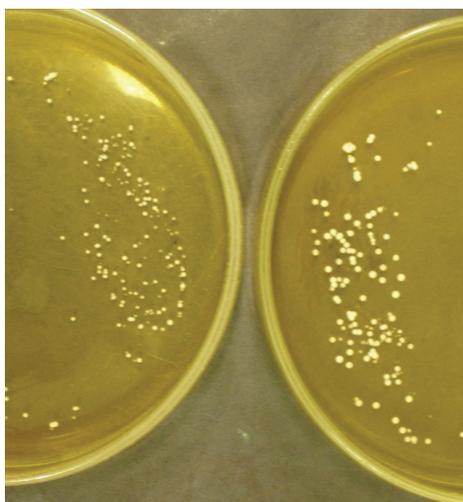


Figura 29: Colônias de *C. albicans* crescidas em meio YEPD à 30°C durante 48h e fotossensibilizadas por 10 minutos com verde malaquita (0,1mg/ml) com e sem exposição à lâmpada de LEDs. À esquerda: colônias não irradiadas. À direita: colônias irradiadas durante 12min com lâmpada de LEDs.

Fonte: autoria própria

Os tamanhos das colônias diferem visivelmente entre a placa não irradiada (da esquerda) e irradiada por 12 minutos (placa da direita). Uma vez que todas as placas foram inoculadas com o microrganismo sensibilizado com corante e incubadas sob as mesmas condições, nota-se que a

placa não irradiada possui colônias pouco desenvolvidas e de tamanho reduzido, enquanto que a placa exposta à radiação possui colônias de maior tamanho. Como já mencionado anteriormente, as placas não diferem significativamente em número de colônias mas, os tamanhos das colônias de todas as placas irradiadas em diferentes tempos, são maiores que os das colônias das placas que não foram expostas à lâmpada de LEDs. Uma conclusão possível seria de que esta radiação, utilizada com esta metodologia, pode auxiliar no desenvolvimento das células que foram expostas às substâncias tóxicas dos fotossensibilizadores.

Na literatura não foi possível encontrar um estudo semelhante que comparasse as colônias antes e após irradiação com lâmpada de LEDs. A maioria dos estudos é feito com laser de baixa potência e com metodologia diferente da utilizada neste trabalho além disto, a maioria dos estudos apresenta conclusões referentes a ação antimicrobiana desta técnica o que não ocorreu com a realização desta metodologia.

5 CONCLUSÃO

- A curva de crescimento mostra a avaliação do crescimento da levedura *S. boulardii* em função do tempo, sendo possível a completa visualização da fase logarítmica de crescimento do microrganismos. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9845 significa que a estimativa do número de UFC/ml possui 98% de precisão.
- A avaliação da eficiência da lâmpada ultravioleta em relação a sua vida útil mostrou que uma lâmpada com mais de 10000 horas de uso diminui em aproximadamente 41% sua eficiência da inativação dos microrganismos.
- A avaliação dos danos provocados pela radiação na levedura *S. boulardii* sugere, através de provas bioquímicas, que a radiação ultravioleta provoca alterações no seu metabolismo.
- Não foi possível a avaliação do potencial probiótico das células de *S. boulardii*.
- A irradiação de células de *C. albicans* mostrou que este microrganismo é mais resistente a radiação em relação a *S. boulardii*, sendo necessários 60 segundos de exposição para uma redução decimal de *C. albicans* e apenas aproximadamente 40 segundos para uma redução decimal em *S. boulardii*.
- Na verificação da fotorreativação foi possível observar que este fenômeno não ocorre ao expor as células irradiadas à lâmpada de LEDs e tampouco ao expor à luz fluorescente da sala onde o experimento foi realizado.
- Os testes de toxicidade revelaram que os corantes utilizados possuem naturalmente certa ação antimicrobiana sendo, o azul de metileno menos tóxico em comparação ao verde malaquita. A ação tóxica destes corantes também diminui proporcionalmente à diminuição de sua concentração.
- Com a utilização da terapia fotodinâmica como agente antimicrobiano concluiu-se que a metodologia utilizada não apresentou a inibição dos microrganismos testados. Porém, foi observado que as colônias das placas que foram expostas à lâmpada de LEDs, após as células inoculadas terem entrado em contato com as substâncias tóxicas dos FS, apresentaram-se

aparentemente mais desenvolvidas em tamanho em relação às colônias das placas que permaneceram ao abrigo da luz.

5.1 TRABALHOS FUTUROS

- Teste da ação da lâmpada germicida utilizada para microrganismos ainda mais resistentes à radiação em relação às leveduras estudadas.
- Utilização de outras fontes de radiação para estudos dos efeitos biológicos provocados por estas.
- Utilização de uma fonte de radiação ultravioleta A (UV-A) para verificação da fotorreativação.
- Realização de microscopia eletrônica dos mutantes induzidos pela radiação.
- Verificação do potencial probiótico da *S. boulardii* utilizando uma amostra concentrada do sobrenadante da cultura celular líquida.
- Fazer medição do diâmetro das colônias para determinar se há diferença significativa entre os tamanhos das colônias não expostas à lâmpada de LEDs após sensibilização com corantes.

REFERÊNCIAS

- ABOSEREH, N. A.; SOLIMAN, E. A. M.; EL-KHALEK, A. B. A. Mutation induction for genetic improvement of *Saccharomyces boulardii* which used as probiotic yeast. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 6, p. 478–482, 2006.
- AGUIAR, A. M. de S. **Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de águas com cor e turbidez moderadas**. Dissertação (Mestrado) — Escola de Engenharia da UFMG, Belo Horizonte, 2000.
- ALCARDE, A.; WALDER, J. Efeito da radiação gama na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa m-300-a) em mosto de mel de cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, v. 54, 1997.
- ALEXANDRE, F. A.; FARIA, J. de A. F.; CARDOSO, C. F. Avaliação da eficiência da radiação ultra violeta na esterilização de embalagens plásticas. **Ciênc. agrotec**, v. 32, p. 1524–1530, 2008.
- ANDRADE, D.; ANGERAMI, E. L.; PADOVANI, C. R. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. doi: 10.1590/S0034-89102000000200010, 2000.
- ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Araras-SP: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 33 p.
- ANVISA, A. N. de V. S. **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos**. 64p., 2001.
- AZEVEDO, J. L. de. **Genética de microrganismos**. Goiânia: [s.n.], 1998. 490 p.
- BAKOS, R. M. **Efeitos agudos da radiação ultravioleta B na expressão imunoistoquímica das metaloproteinases -2 e -9 em nevos melanocíticos**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- BANDEIRA, R. O. et al. Potencial antimicrobiano de *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* contra *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*. **XVII CIC e X ENPOS**, 2008.
- BIRRELL, G. W. et al. A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting uv radiation sensitivity. **PNAS**, v. 98, p. 12608 – 12613, 2001.
- BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro: [s.n.], 2002. 826 p.
- BRAGA, M. O.; SPESSOTO, A. M. Produção de antimicrobianos por bactérias endofíticas isoladas de *cordia verbenacea* (erva-baleeira). **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 3, 2008.
- CAMPANHA, N. H. **Efeito da irradiação com microondas sobre células de *Candida albicans***. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de odontologia de Araraquara, 2005.
- CONSORTIUM, T. G. et al. Comparative genomics of protoploid *Saccharomycetaceae*. **Genome research**, v. 19, p. 1696–1709, 2009.

CORDEIRO, A. C. de S.; LEITE, S. G. F.; DEZOTTI, M. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* **Química nova**, v. 27, p. 689–694, 2004.

CRANDALL, M. Uv-induced mitotic co-segregation of genetic markers in *Candida albicans*: Evidence for linkage. **Current Genetics**, v. 7, p. 167–173, 1983.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, p. 2329 – 2335, 2005.

DENKI, S. **Sankyo Denki germicidal lamps. Co., Ltda.** Japão, Co., Ltda.

DOMARCO, R. et al. Efeitos do tratamento combinado de irradiação gama e refrigeração no crescimento de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) em suco de laranja. **Scientia Agricola**, v. 53, p. doi: 10.1590/S0103–90161996000100003, 1996.

DROSTE, R. L. **Theory and practice of water and wastewater treatment.** Canada: Jhon Wiley and Sons, 1997.

EINSENBURG, R. L. **Radiology: an illustred history.** [S.l.]: St. Louis: Mosby, 1992.

EPIPHANIO, R.; BIDOIA, E. D.; CORSO, C. R. absorção de ions de ferro e floculação de células de *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo eletrolítico. **Arq. Inst. Biol.**, v. 68, p. 51–54, 2001.

FARRELL, H.; GARVEY, M.; ROWAN, N. Studies on the inactivation of medically important-candida species on agar surfaces using pulsed light. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 956 – 966, 2009.

FERREIRA, T. C. **Clonagem e expressão do fator 1 humano induzível por hipóxia (HIF-1) na levedura *saccharomyces cerevisiae*.** Dissertação (Mestrado) — Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

FOURY, F.; GOFFEAU, A. Genetic control of enhanced mutability of mitochondrial dna and gama-ray sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 76, p. 6529–6533, 1979.

FRIEDL, A. A. et al. Radiation-induced chromosome aberrations in *Saccharomyces cerevisiae*: Influence of dna repair pathways. **Genetics**, v. 148, p. 975–988, 1997.

GUEDES, A. M. M. et al. Tecnologia de ultravioleta para preservação de alimentos. **B. CEPPA**, v. 27, p. 59–70, 2009.

HEIJDEN, I. M. van der. Identificação laboratorial de leveduras de importância médica. In: INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL II, HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FMUSP. [S.l.], 2000.

KAPPKE, J. **Estudo dos danos provocados pela radiação gama em células de *E. coli*.** Dissertação (Mestrado) — UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ CAMPUS CURITIBA, Curitiba, 2007.

KAPPKE, J. et al. Evaluation of *Escherichia coli* cells damages induced by ultraviolet and proton beam radiation. **Brazilian Journal of Physics**, v. 35, p. 805–807, 2005.

KLEINER, A. A. P.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. de. **Genética de fungos no laboratório.** Manaus: Universidade do Amazonas, 1998. 138 p.

KOWALSKI, W. J. **Design and Optimization of UVGI Air Disinfection Systems**. Tese (Doutorado) — The Pennsylvania State University, Pennsylvania, 2001.

KOWALSKI, W. J. et al. Mathematical modeling of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. **Quantitative Microbiology**, v. 2, p. 249270, 2002.

KOZMIN, S. et al. Uva radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7, 8 - dihydro - 8 - oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 102, p. 13538 – 13543, 2005.

KUHN, O. J. et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 27, p. 13–20, 2006.

LAGRANHA, V. L. **Correção in vitro da deficiência de arilsulfatase A em fibroblastos em pacientes com leucotistrofia metacromática através do uso de células recombinantes microencapsuladas**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

LEADON, S. A.; COOPER, P. K. Preferential repair of ionizing radiation-induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective in cockayne syndrome. **PNAS**, v. 90, p. 10499–10503, 1993.

LENZI, C. F. **Estudos de complementação fenotípica do mutante pso2-1 de *Saccharomyces cerevisiae* pelos genes uvr de *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

LOBO, M. G.; COSTA, B. P. da; WISBECK, E. Avaliação da desinfecção de água por reator utilizando radiação ultravioleta. **REVISTA DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS**, v. 3, p. 1981–8858, 2009.

LUCARINI, A. C.; SILVA, L. A. D.; BIANCHI, R. A. Um sistema para contagem semi-automática de microrganismos. **PESQUISA & TECNOLOGIA**, v. 26, p. 36 – 40, 2004.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**, p. 49–52, 2000.

MARTINS, C. V. B.; HORII, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Fusão de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por floculação e produção de h2s. **Scientia Agricola**, v. 55, p. doi: 10.1590/S0103–90161998000100012, 1998.

MARTINS, F. dos S.; BARBOSA, F. H. F.; NICOLI, J. R. O probiótico *Saccharomyces boulardii*. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 9, p. 171 – 182, 2009.

MARTINS, F. dos S. et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. **REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA**, v. 5, 2005.

MARTINS, M. I. et al. Análise do citoesqueleto de células de hep-2 após tfd com luz não coerente. **XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, v. 435-438, 2007.

MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V.; MARTINS, A. M. da S. Determination of decimal reduction time (d value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes. **BMC Infectious Diseases**, v. 3, p. 24–34, 2003.

MIGOWSKI, E.; PUGLIESE, B. S. Gastreenterite aguda: por que dose maior de *Saccharomyces boulardii* na fase aguda? **Revista Brasileira de Clinica Médica**, v. 7, p. 267–271, 2009.

- MODEST, M. F. **Radiative Heat Transfer**. New York: [s.n.], 1993.
- NEDER, R. N. **Microbiologia: Manual de laboratório**. São Paulo: Livraria Nobel, 1992.
- NEPPELENBROEK, K. H. et al. Efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de resinas reembasadoras rígidas e resina acrílica para base de prótese. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, p. 305–311, 2006.
- NOGUEIRA, A. C. S. **Efeito da radiação ultravioleta na cor, na perda proteica e nas propriedades mecânicas do cabelo**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- PELCZAR, M. J. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2^a. ed. São Paulo: editora Makron Books, 1996.
- PIGATTO, G. **Irradiação UV em *Xanomonas campestris pv. campestris* visando a produção da goma xantana**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual Paulista, 2008.
- PRATES, R. A. et al. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, p. 53–57, 2010.
- RESNICK, M. A.; SETLOW, J. K. Repair of pyrimidine dimer damage induced in yeast by ultraviolet light. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 109, p. 979–986, 1972.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. 1. ed. [S.l.: s.n.], 2003. 356 p.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática Roteiro e manual, bactérias e fungos**. [S.l.]: Editora Atheneu, 2005. 112 p.
- RODRIGUES, A. M.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. doi: 10.1590/S0101–20612001000100013, 2001.
- ROSSONI, R. D. et al. Comparação da eficácia fotodinâmica do azul de metileno, azul de toluidina e verde malaquita contra *Candida albicans*. **Faculdade de odontologia de São José dos Campos**, v. 7, p. 2142–2145, 2008.
- RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Principles of disinfecting patient-care items. **Disinfection, Sterilization and Antiseptics in Health Care**, p. 133–149, 1998.
- SCHWINGEL, A. R. **Terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento da candidose em pacientes portadores do vírus HIV**. Dissertação (Mestrado) — Instituto de pesquisas energéticas e nucleares - IPEN, 2007.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2007. 552 p.
- SOMMER, R. et al. Increased inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by protraction of uv irradiation. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, p. 1977–1983, 1996.
- SOUZA, S. C. de et al. Fotossensibilização de quatro espécies do gênero candida por radiação laser de baixa potência. **VII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, p. 1392–1396, 2003.

STANGARLIN, J. R. et al. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, p. 91–98, 2010.

STATSOFT, I. **STATISTICA (data analysis software system)**. www.statsoft.com: [s.n.], 2004. Version 7. Disponível em: <www.statsoft.com>.

SUZUKI, L. C. **Desenvolvimento de biofilme causado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica**. Dissertação (Mestrado) — instituto de pesquisas energéticas nucleares, autarquia associada à universidade de São Paulo, 2009.

TAYLOR, J. Statistics 191: Introduction to applied statistics. In: **Simple Linear Regression**. Stanford University: [s.n.], 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 827 p.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4^a. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718 p.

VIEIRA, M. R. **Estudo da biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** Dissertação (Mestrado) — UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU - FURB, Blumenau, 2006.

VUOLO, J. H. **Fundamentos da teoria dos erros**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1998. 247 p.