

## EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM FOTOSSENSIBILIZADOR VERDE MALAQUITA EM *Candida albicans*

A. S. Sousa\*, R. A. Prates\*, M. E. S. Onofre\*, R. G. Lopes\*, S. K. Bussadori\*, L. R. Ferreira\* e A. M. Deana\*

\*UNINOVE, São Paulo, Brasil

e-mail: alinissousa@gmail.com

**Resumo:** Candidíase Oral é a mais frequente infecção fúngica, causada por leveduras do gênero *Candida spp.* Seu tratamento é realizado com antifúngicos tópicos ou sistêmicos, que pode levar a vários efeitos colaterais como, por exemplo, toxicidade para o paciente, além dos altos custos do tratamento. Tais fatos demonstram a necessidade de novas estratégias para tratamento desta infecção. Dentre as alternativas atuais, a terapia fotodinâmica (PDT) tem sido amplamente estudada pela comunidade científica nos últimos anos como tratamento de agentes infecciosos. O estudo realizado mostra que com o uso da PDT com o Verde Malaquita, houve redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no número de unidades formadoras de colônias (UFCs) através de sua ação fungicida tóxica, diminuindo o número de *C.albicans*, esta redução foi ainda maior quando houve a associação do fotossensibilizador (FS) com uma fonte de luz LED.

**Palavras-chave:** Candidíase oral, verde malaquita, *Candida albicans*, terapia fotodinâmica.

**Abstract:** Oral candidiasis is the most common opportunistic fungal infection caused by a proliferation or infection of the oral cavity by *Candida yeasts*. The treatment is performed with topical or systemic antifungal conventional. This therapy has many side effects, high cost, and most of them are fungistatic. These facts lead to the need for new strategies for treatment of this infection. The use of PDT as an alternative therapy has been widely used by the scientific community in recent years.. In this study, the usage of PDT with Malachite Green, resulted in a statistically significant reduction ( $p < 0.05$ ) on the number of colony unit formations due to the fungitoxic action, reducing the number of *C. albicans*. This reduction was increase when the photosensitize was activated with a LED light source.

**Keywords:** oral candidiasis, malachite green, *Candida albicans*, photodynamic therapy.

### Introdução

Entre os fungos, *Candida sp* é o gênero predominante na microbiota humana sendo, *Candida albicans* a espécie mais frequente. Esse patógeno é comumente encontrado na cavidade oral, no trato gastrointestinal e

na vagina de pessoas clinicamente sadias e tem a capacidade de se desenvolver em uma variedade de formas morfológicas e na presença de fatores predisponentes podem se tornar patogênicas, produzindo infecções que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas [1, 2].

A candidíase é considerada a doença mais universal dentre as infecções oportunistas e está associada tanto a alterações locais ou sistêmicas. Com prevalência em pacientes: submetidos à antibioticoterapia; portadores de diabetes; AIDS; xerostomia; imunossupressão e usuários de prótese dentária ou com perda de dimensão vertical (queilite angular).

Na cavidade bucal, esse fungo se desenvolve como biofilme, que consiste em uma comunidade complexa de células microbianas embebidas em uma matriz extra celular de polissacarídeo [4]. Quando as células se organizam em biofilme, apresentam propriedades fenotípicas distintas em relação à forma planctônica e maior resistência aos agentes antimicrobianos [4].

Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais prevalente e mais virulenta do gênero cândida, outras espécies são frequentemente isoladas, tais como: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis*.

O uso indiscriminado de antifúngicos causam resistência do fungo, apresenta muitos efeitos colaterais, além do alto custo e sua ação é fungistática. A aplicação da terapia fotodinâmica (PDT) tem sido investigada na inativação de microrganismos patogênicos ao hospedeiro humano e vem sendo pesquisada na odontologia a fim de estabelecer protocolos eficientes e indolores aos pacientes [4]

Três componentes são essenciais para a aplicação da técnica: a fonte de luz, o corante (fotossensibilizador) e o oxigênio. O fotossensibilizador deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficaz, possuir toxicidade mínima às células normais, seletividade pela célula-alvo, ser administrado de forma local, tópica, ou no interior da cavidade e, depois de um tempo ideal, ser irradiado com luz em dose e comprimento de onda adequados.

Neste trabalho será apresentado um estudo da viabilidade do uso da PDT associada ao fotossensibilizador Verde Malaquita para inativação de *C.*

*albicans* em diferentes concentrações e parâmetros de irradiação.

### Materiais e métodos

Foi preparada uma suspensão padronizada de *Candida albicans* (ATCC 90028) contendo  $10^6$  UFC/mL em um tubo falcon contendo 6 ml de solução PBS estéril com 70% de transmitância e levado ao vortex por 20s[3].

Após a homogeneização e irradiação das amostras, foi retirado 20  $\mu$ L de cada poço e submetido a diluição seriada em placa de 96 poços contendo 180  $\mu$ L de PBS (até a diluição de  $10^{-4}$  da concentração inicial). Alíquotas de 10  $\mu$ L foram removidas de cada diluição e escorridas em triplicatas em meio de cultura Agar de dextrose Sabouraud e foram incubadas por 36 h a 37° C para contagem de UFC/ml.

Tabela 1: Parâmetros espectroscópicos e de irradiação.

Parâmetro	
Comprimento de onda Central (nm)	626,37
Largura espectral da banda (FWHM) (nm)	17,4
Modo de operação	Onda contínua
Energia média radiante (mW)	335
Polarização	Aleatória
Perfil do feixe	Multimodo
Área do feixe (cm <sup>2</sup> )	2,84
Intensidade do alvo (mW/cm <sup>2</sup> )	118
N. de sessões de tratamento	1
Tempo de exposição (s)	300 600 1200 3600
Energia radiante (J)	100 200 400 1200
Exposição radiante (J/cm <sup>2</sup> )	35 70 140 280
Técnica de aplicação	Próximo ao fundo do poço

Para estabelecer os parâmetros da terapia fotodinâmica com o FS Verde Malaquita, as concentrações utilizadas foram de 400  $\mu$ Mol e 800  $\mu$ Mol e a irradiação foi feita através de um LED vermelho, cujas propriedades espectroscópicas podem ser observadas na Tabela 1. As amostras foram divididas em 4 grupos: grupo controle (L-FS-), que não recebeu o tratamento; grupo LED (L+FS-), que recebeu somente a irradiação do LED; grupo fotossensibilizador (L-FS+), que recebeu somente o fotossensibilizador durante 10 min e o grupo PDT (L+FS+), que recebeu a associação LED e FS. No grupo PDT foram feitos diferentes tempos de irradiação, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Os dados foram analisados utilizando a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey. O nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ .

### Resultados e Discussão

A análise de variância do grupo com 400  $\mu$ M de fotossensibilizador resultou em um valor de  $p = 0,0024$ , indicando que um ou mais grupos são diferentes entre si. A Figura 1 mostra a redução microbiana em UFC/ml

(log10) utilizando concentração de fotossensibilizador de 400  $\mu$ M.

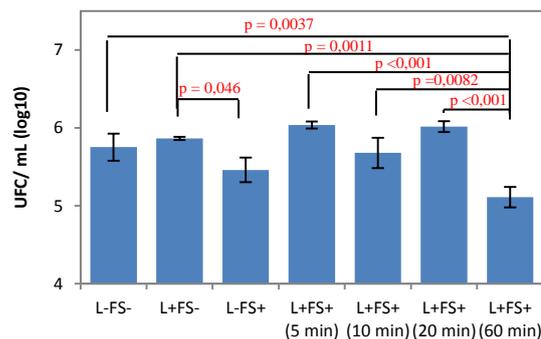


Figura 1: Redução microbiana em UFC/ml (log10) utilizando uma concentração de fotossensibilizador de 400  $\mu$ M.

A Figura 1 mostra que, ao analisar apenas os grupos que ficaram por menos tempo em contato com o FS (L+FS+, de 5 min, 10 min e 20 min), não há diferença estatisticamente significativa entre estes e os grupos controle (L-FS- e L+FS-), porém a população de UFCs é sistematicamente maior do que no grupo L-FS+ sendo que houve uma redução significativa do número de UFC/mL (Log) de *C. albicans* em relação ao grupo L+FS-. Observa-se também que ao irradiar o inóculo com FS por 60 min (L+FS+ 60 min) há uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos L-FS- e L+FS-, porém não houve aumento significativo na morte celular em comparação com o grupo L-FS+ [6-15].

Além da redução no número de UFCs, observou-se também que houve um atraso no crescimento das colônias. Após 24h do término do experimento, prazo este previsto para o crescimento das UFCs, as placas de agar ainda não apresentavam colônias, ou estas eram muito pequenas para serem contadas, portanto houve a necessidade de refazer a contagem 36h após o experimento. Observa-se portanto uma ação tóxica do fotossensibilizador, porém tal ação ocorreu também para o grupo onde não foi utilizada a fotoativação pelo LED.

A Figura 2 mostra uma típica foto do crescimento das UFC ao colocar 800  $\mu$ M de FS no inóculo.

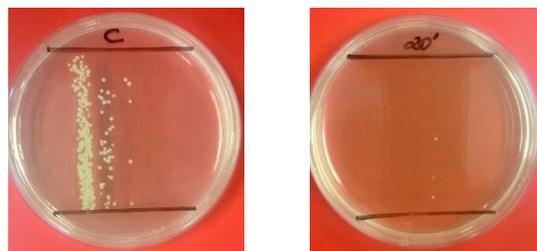


Figura. 2 – Grupo controle L-FS- e Grupo L+FS+ 20min. Observe que na diluição de -3 existe o crescimento de colônias microbianas enquanto não podemos observar em -1 e -2.

Na Figura 2 observa-se que, o utilizar uma concentração maior do FS, houve um crescimento das colônias apenas nas estrias onde a concentração do FS foi diminuída para 800  $\mu$ M e 80  $\mu$ M através da diluição seriada do inóculo, sendo que nas estrias de maior concentração de FS (800  $\mu$ M e 80  $\mu$ M), não foram observadas UFCs.

Estes dados demonstram, pela primeira vez, que o Verde Malaquita produz uma ação fungicida tóxica, reduzindo o número de *C. albicans* mesmo na ausência de luz. O motivo desta ação ainda carece de maiores investigações, que serão fruto de trabalhos futuros do grupo.

As diferentes concentrações estudadas objetivaram encontrar uma dose que tenha maior citotoxicidade para a célula, quando utilizada a terapia fotodinâmica, porém notou-se que, diferentemente de outros FS já consagrados na literatura como, por exemplo, o Azul de Metileno ou o Azul de Toluidina, o Verde Malaquita quanto em grandes concentrações apresenta uma alta toxicidade para *C. albicans*, mesmo na ausência de luz.

Em um estudo separado feito por este mesmo grupo foi determinada a mínima concentração tóxica do Verde Malaquita em *C. albicans* [15]

### Conclusão

Neste trabalho foi evidenciado o potencial que o fotossensibilizador Verde de Malaquita, aliado a um sistema de iluminação por LED, possui para a inativação de *C. albicans*. Os resultados sugerem porém que este fotossensibilizador possui uma certa toxicidade para a *C. albicans* mesmo na ausência de luz, sendo portanto necessárias futuras investigações para melhor compreender o seu efeito.

### Referências

- [1] Calderone, R.A; Fonzi, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol 9: 327-335, 2001.
- [2] Giroldo, L.M; Felipe, M.P; Oliveira, M.A; Munin, E; Alves, L.P; Costa, M.S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. Lasers Med Sci 24:109-112, 2009.
- [3] Prates, R.A; Yamada, A.M.J; Suzuki, L.C. Bacterial effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Photochem Photobiol B Biol 86:70-76, 2007.
- [4] Ramage, G; Saville, S.P; Thomas, D.P; López-Ribot, J.L. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell 4:633-638, 2005.
- [5] Souza, S.C; Junqueira, J.C; Balducci, I; Koga-ito, C.Y; Munin, E; Jorge, A.O.C. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. J Photochem Photobiol B Biol 83:34-38, 2006.
- [6] Martins Jda S, Junqueira J.C, Faria R.L, Santiago N.F, Rossoni R.D, Colombo CE, Jorge A.O. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 111:71-7, 2011
- [7] Maver-Biscanin, M; Mravak-Stipetic, M; Jerolimov, V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. Photomed Laser Surg 23:328-332, 2005
- [8] Calvazara-Pinton, P.G; Venturini, M; Sala, R.A. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. J Photochem Photobiol B Biol 78:1-6, 2005.
- [9] Donnelly, R.F; Mccarron, P.A; Tunney, M.M; David-Woolfson, A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. J Photochem Photobiol B Biol 86:59-69, 2007.
- [10] Donnelly, R.F; Mccarron, P.A; Tunney, M.M. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res 163:1-12, 2008.
- [11] Bliss, J.M; Bigelow C.E; Foster T.H; Haidaris C.G. Susceptibility of candida species to photodynamic effects of photofrin. Antimicrob Agents Chemother 48:2000-6, 2004.
- [12] Maver-Biscanin M; Mravak-Stipetic M; Jerolimov V; Biscanin A. Fungicidal effect of diode laser irradiation in patients with denture stomatitis. Lasers Surg Med 35:259-62, 2004.
- [13] Sousa R.C; Junqueira J.C; Rossoni R.D; Pereira C.A; Munin E, Jorge A.O. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against candida albicans. Lasers Med Sci 25:385-9, 2010.
- [14] Mima, E.G; Pavarina A.C; Dovigo L.N; Vergani C.E, Costa C.A; Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of candida albicans to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 109: 392-401, 2010.
- [15] Ferreira, L. R; Deana, A. M; Santi, M. E. S; Garcia, R. Sousa, A. S; Bussadori, S. K. e Prates, R. A. Investigação Da Concentração Mínima Inibitória do Verde Malaquita em *Candida albicans*. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica