

## COMPARAÇÃO DOS CORANTES ERITROSINA E ROSA BENGALA NA TERAPIA FOTODINÂMICA EM BIOFILMES DE *Candida albicans*

**Anna Carolina Borges Pereira da Costa<sup>1</sup>, Vanessa Maria de Campos Rasteiro<sup>1</sup>, Cristiane Aparecida Pereira<sup>1</sup>, Rodney Dennis Rossoni<sup>1</sup>, Emily Setsuko Halter da Silva Hashimoto<sup>1</sup>, Cássia Fernandes Araújo<sup>1</sup>, Juliana Campos Junqueira<sup>1</sup>, Antonio Olavo Cardoso Jorge<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777- Jardim São Dimas, São José dos Campos – SP, [carol\\_biolog@yahoo.com.br](mailto:carol_biolog@yahoo.com.br)

**Resumo-** O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da Terapia Fotodinâmica (TFD) em biofilmes de *Candida albicans* mediada por rosa bengala e eritrosina, nas concentrações de 40 µM, irradiados pelo Diodo Emissor de Luz (LED) azul (440-460 nm). Foram utilizadas 7 cepas clínicas e 1 cepa padrão (ATCC 18804). Os biofilmes de cada cepa de *C. albicans* foram submetidos às seguintes condições experimentais (n=12): a) rosa bengala e LED (RB+L+); b) eritrosina e LED (E+L+); c) grupo controle, sem LED e sem fotossensibilizador (F-L-). Após irradiação dos biofilmes, foram feitas diluições seriadas e sementeiras em ágar Sabouraud dextrose (37°C/ 48 horas) para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e posterior análise de variância e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os biofilmes foram observados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados mostraram redução de biofilmes (0,15 log<sub>10</sub> e 0,12 log<sub>10</sub>), para os grupos E+L+ e RB+L+, respectivamente. A MEV revelou que a TFD foi efetiva na redução e destruição de blastoconídios e hifas. Conclui-se que a TFD mediada por eritrosina e rosa bengala associada ao LED foi efetiva na redução de biofilmes de *C. albicans*.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*, Terapia Fotodinâmica, eritrosina, rosa bengala e Diodo Emissor de Luz.

**Área do Conhecimento:** Odontologia.

### Introdução

A candidose bucal é uma infecção oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*, principalmente pela espécie *Candida albicans*, e geralmente está associada com fatores predisponentes como uso de agentes imunossupressores, antibióticos ou estrógenos (NAGLIK et al., 2008). Esta doença é caracterizada pela presença de biofilme formado por uma mistura heterogênea de blastoconídios, pseudohifas e hifas inseridas em substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (SENEVIRATNE et al., 2008).

Os biofilmes de *Candida* apresentam altos níveis de resistência aos desinfetantes e agentes antifúngicos (LAMFON et al., 2004); (RAMAGE et al., 2002). As investigações sobre os efeitos de diferentes concentrações dos medicamentos sobre o biofilme demonstraram que a resistência antifúngica aumenta de acordo com a progressão dos vários estágios de formação do biofilme (SAMARANAYAKE et al., 2005); (CHABRIER-ROSELLÓ et al., 2005). A redução da susceptibilidade aos antifúngicos por cepas de *Candida* spp., deve-se ao aumento da sobrevivência de pacientes imunodeprimidos e ao uso abusivo de antimicrobianos que desperta o interesse para

novas estratégias terapêuticas (SANT’ANA et al., 2002).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido indicada como opção de tratamento auxiliar contra infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*. Estudos recentes têm revelado seu potencial antifúngico com ação na membrana plasmática provocando aumento da permeabilidade com subsequente dano nos alvos intracelulares e diminuição da formação de tubos germinativos (LAMBRECHTS et al., 2005); (CORMICK et al., 2009); (GIROLDO et al., 2009); (MUNIN et al., 2007). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a ação dos corantes eritrosina e rosa bengala na TFD em biofilmes de *C. albicans*.

### Metodologia

Para os ensaios, foram utilizadas 7 cepas clínicas de *C. albicans* e 1 cepa padrão (ATCC 18804) provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / Universidade Estadual Paulista (UNESP). As cepas clínicas foram isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis. O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ UNESP.

Foram utilizados os corantes rosa bengala e eritrosina (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) para a sensibilização dos biofilmes na concentração de 40  $\mu\text{M}$ .

A solução de cada corante foi preparada pela dissolução do pó em solução fisiológica tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e esterilizada por filtração em membrana com poros de diâmetro de 0,22  $\mu\text{m}$  (MFS, Dublin, EUA). Após a filtração, a solução do corante foi mantida no escuro.

Foi utilizada como fonte de luz um Diodo Emissor de Luz (LED) azul (MMOptics, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda variando de 440-460 nm, potência de 200 mW, fluência de 95 J.cm<sup>-2</sup> (energia de 36 J e tempo de 180 s) e taxa de fluência de 526 mW.cm<sup>-2</sup>.

Foi realizado monitoramento da temperatura na base da placa de 96 poços (Costar Corning, New York, EUA) com termômetro infravermelho (MX4, Raytek, Sorocaba, Brasil), observando-se que não houve aumento de temperatura após a irradiação com LED.

As condições de crescimento do biofilme foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Parahitiyawa et al. (2006), com modificações. Culturas de 18 horas a 37°C em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) foram semeadas em caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA). Após o período de incubação de 18 h a 37°C, as leveduras foram lavadas duas vezes com PBS, centrifugadas a 1800 x g por 5 min, ressuspensa em caldo infusão de cérebro coração (*Brain Heart Infusion*- BHI, Difco, Detroit, EUA) acrescido de 5% de sacarose e padronizada na concentração de 10<sup>7</sup> células/mL em espectrofotômetro (530 nm e DO de 0,381).

Os biofilmes foram formados em corpos-de-prova para confecção de prótese ocular com pino (Clássico, São Paulo, Brasil), constituídos de resina acrílica incolor, com 11 mm de diâmetro. Cada corpo-de-prova recebeu duas camadas de esmalte preto para unhas (Colorama, São Paulo, Brasil), no pino e na base. Desta forma, a área de aderência do microrganismo para formação do biofilme foi delimitada somente para a parte superior do corpo-de-prova. Em seguida, os corpos de prova foram embalados e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

Após esterilização, os corpos-de-prova foram colocados, com auxílio de pinça estéril, na primeira fileira de placas de 24 poços (Costar Corning, New York, EUA). Em seguida, foi adicionado em cada poço 2 mL do inóculo previamente padronizado e incubado a 37°C/ 180 min, para fase inicial de adesão. Decorrido este período, os corpos-de-prova foram transferidos, com auxílio de pinça estéril, para outros poços onde foram lavados com 2 mL de PBS seguida de agitação em agitador orbital (Solab, Piracicaba,

Brasil) por 5 min, para remoção das células não aderidas. Os corpos-de-prova foram transferidos, então, para outros poços da placa de 24 poços onde foram imersos em 2 mL de caldo BHI (Difco, Detroit, EUA) acrescido de 5% de sacarose e incubados a 37°C por 48 horas. O caldo foi trocado a cada 24 horas.

Os corpos-de-prova com os biofilmes formados foram transferidos para outros poços onde foram lavados novamente com 2 mL de PBS e colocados em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil) por 5 min, para remoção das células não aderidas. A seguir, foram realizados 30 ensaios para cada cepa divididos em três grupos de acordo com os grupos experimentais (n= 10), totalizando 240 ensaios: a) irradiado com LED na presença do fotossensibilizador rosa bengala (RB+L+); b) irradiado com LED na presença do fotossensibilizador eritrosina (E+L+); c) grupo controle, sem utilização de LED e fotossensibilizador (F-L-). Os corpos-de-prova submetidos às condições experimentais RB+L+ e E+L+ receberam 0,1 mL da solução dos respectivos corantes por 5 min (tempo de pré-irradiação) e foram irradiados por LED por 180 s. Os corpos-de-prova com os grupos experimentais F-L- receberam 0,1 mL de PBS, também por 5 min.

A seguir, os corpos-de-prova foram transferidos para tubos Falcon contendo 10 mL de PBS. Os tubos foram homogeneizados por 30 s em homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200 – Bandelin Eletronic) com potência de 50 W, para desprender o biofilme. A solução do tubo Falcon foi considerada como fator de diluição 10<sup>-1</sup>. A seguir, foram feitas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foi semeada em placas com ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram determinadas as UFC/mL e os valores transformados em logaritmo.

A irradiação dos biofilmes foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar e com a luz apagada, onde foi utilizado um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço evitando-se assim o espalhamento de luz.

A análise estatística dos dados foi realizada no Programa Minitab 14, considerando-se nível de significância de 5%, utilizando-se análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey.

Os corpos-de-prova com os biofilmes da cepa padrão de *C. albicans* e uma cepa clínica submetidos a cada tratamento experimental: RB+L+ (n= 2), E+L+ (n= 2) e F-L- (n= 2), conforme descrito anteriormente, foram analisados por MEV. Assim, os corpos-de-prova foram transferidos para placas de 24 poços (Costar Corning, New York, EUA) e fixados por solução de glutaraldeído a

2,5% por 1 hora. Em seguida, os corpos-de-prova foram submersos em 2 mL de soluções de álcool na concentração de 10%, 25%, 50%, 75% e 90% por 20 min e, posteriormente, em 100% de álcool por 1 hora. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para secagem completa dos corpos-de-prova.

A seguir, os corpos-de-prova foram transferidos para stubs de alumínio e recobertos com ouro por 160 s a 40 miliampères (Denton Vacuum Desk II). Após a metalização, os corpos-de-prova foram examinados e fotografados em MEV (Jeol JSM5600).

### Resultados

Os biofilmes de *C. albicans* submetidos a TFD (E+L+ e RB+L+) apresentaram redução do número de células em relação ao grupo controle (F-L-), entretanto somente 3 cepas apresentaram diferença estatisticamente significativa para o grupo E+L+ e 2 cepas para o grupo RB+L+ (Tabela 1).

Tabela 1- Valores em UFC /mL (Log) das 8 cepas de *C. albicans* submetidas aos diferentes tratamentos experimentais (n= 10): F-L-, RB+L+ e E+L+.

Cepas	UFC/mL		
	F-L-	RB+L+	E+L+
ATCC 18804	6,88 <sup>A</sup>	6,62 <sup>B</sup>	6,68 <sup>AB</sup>
1	6,43 <sup>A</sup>	6,39 <sup>A</sup>	6,43 <sup>A</sup>
2	6,61 <sup>A</sup>	6,53 <sup>A</sup>	6,60 <sup>A</sup>
3	6,24 <sup>A</sup>	6,13 <sup>A</sup>	5,93 <sup>B</sup>
4	6,34 <sup>A</sup>	6,32 <sup>A</sup>	6,10 <sup>A</sup>
5	6,45 <sup>A</sup>	6,37 <sup>A</sup>	6,40 <sup>A</sup>
6	6,04 <sup>A</sup>	5,96 <sup>A</sup>	5,93 <sup>A</sup>
7	6,91 <sup>A</sup>	6,65 <sup>B</sup>	6,62 <sup>B</sup>
Média ± DP*	6,49±0,30	6,37±0,24	6,34±0,31

A e B: Diferença estatisticamente significativa (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

\*DP: Desvio Padrão.

A Tabela 2 mostra os valores de redução em  $\log_{10}$  dos grupos RB+L+ e E+L+ em relação ao grupo controle (F-L-) para todas as cepas estudadas. Foi observada maior média de redução do número de células de 0,15  $\log_{10}$ , quando submetido a TFD mediada por eritrosina, enquanto que para o rosa bengala a média de redução foi 0,12  $\log_{10}$ .

A MEV revelou que o biofilme do grupo controle (F-L-) da cepa padrão foi composto somente por blastoconídios e a cepa clínica foi constituída por

um biofilme heterogêneo formado por blastoconídios, pseudohifas e hifas, e ambos apresentaram SPE (Figura 1- A1 e A2). Os biofilmes submetidos a TFD apresentaram redução das camadas superiores e para a cepa clínica houve também redução de hifas, além disso no aumento de 5000 vezes pode-se observar que as células estavam deformadas, observado principalmente nos biofilmes tratados com eritrosina e LED (Figura 1- C1 e C2).

Tabela 2- Redução em  $\log_{10}$  das UFC/mL para as 8 cepas de *C. albicans* submetidas a Terapia Fotodinâmica com rosa bengala (RB+L+) e eritrosina (E+L+) em relação ao grupo controle (F-L-).

Cepas	UFC/mL	
	RB+L+	E+L+
ATCC 18804	0,26	0,20
1	0,04	0,00
2	0,08	0,01
3	0,11	0,31
4	0,02	0,24
5	0,08	0,05
6	0,08	0,11
7	0,26	0,29
Média ± DP*	0,12±0,09	0,15±0,13

\*DP: Desvio Padrão.

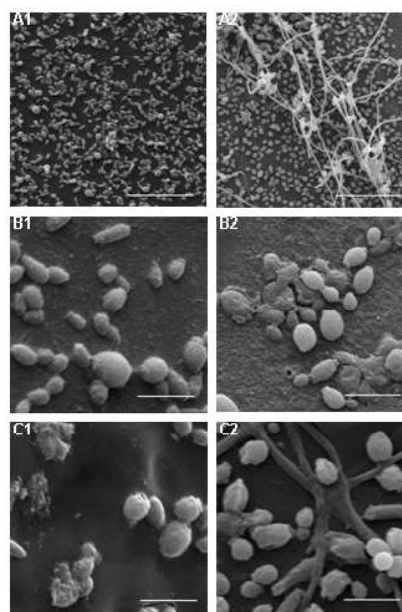


Figura 1- MEV dos biofilmes da cepa padrão e uma cepa clínica submetidos aos grupos experimentais (n= 2): F-L-, RB+L+ e E+L+. Cepa

padrão submetida aos tratamentos F-L- (1000x) (A1), RB+L+ (5000x) (B1), E+L+ (5000x) (C1). Cepa clínica submetida aos tratamentos F-L- (1000x) (A2), RB+L+ (5000x) (B2), E+L+ (5000x) (C2). Barras para 1000x, 40  $\mu\text{m}$ . Barras para 5000x, 7  $\mu\text{m}$ .

## Discussão

Os resultados demonstraram que os fotossensibilizadores eritrosina e rosa bengala utilizados em baixas concentrações (40  $\mu\text{M}$ ) associados ao LED apresentaram efeito fotodinâmico significativo contra biofilmes de *C. albicans*.

O biofilme submetido a TFD apresentou média de redução de 0,12 e 0,15  $\log_{10}$  para terapia fotodinâmica com rosa bengala (RB+L+) e eritrosina (E+L+), respectivamente, em relação ao grupo controle (F-L-). Dentre as cepas testadas, somente 3 apresentaram diferença estatisticamente significativa para o grupo E+L+ e 2 cepas para o grupo RB+L+. Esta pequena redução deve ter ocorrido, pois o biofilme é mais resistente aos antimicrobianos do que células planctônicas, provavelmente, em decorrência da heterogeneidade da população do biofilme, restrição da penetração de antimicrobianos devido a matéria da matriz extracelular, diminuição da taxa de crescimento das células dentro do biofilme e diferença de expressão de genes (SAMARANAYAKE et al., 2005); (NOBILE; MITCHELL, 2006); (RAMAGE et al., 2001).

Hawser e Douglas (1995) avaliaram a suscetibilidade de biofilmes de *C. albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, 5-fluorocitosina, itraconazol e cetoconazol e observaram que estes biofilmes foram altamente resistentes a estes antifúngicos permanecendo 5 a 8 vezes mais ativos metabolicamente do que as células planctônicas e 30 a 2000 vezes mais resistentes do que a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Dentre as cepas testadas, o biofilme formado pela cepa padrão pareceu ser o mais sensível a TFD. Os resultados em MEV demonstraram que o biofilme era formado somente por blastoconídios, enquanto que o biofilme formado pela cepa clínica apresentou uma mistura complexa de blastoconídios, pseudohifas e hifas, o qual sugere um biofilme maduro, o que provavelmente contribuiu para o perfil mais resistente (SENEVIRATNE et al., 2008); (NOBILE; MITCHELL, 2006). Além disso, no estudo realizado por Bliss et al. (2004), os autores avaliaram a TFD mediada por fotofrin em leveduras do gênero *Candida* observando após o tratamento células deformadas, uma vez que os

blastoconídios foram mais sensíveis a TFD do que as formas filamentosas.

Embora os biofilmes não tenham formado abundante SPE, o perfil de sensibilidade foi baixo, uma vez que este componente é importante para promover adesão e formação do biofilme, constitui defesa contra fagocitose e limita a difusão de substâncias (SENEVIRATNE et al., 2008); (DOUGLAS, 2003). A produção de SPE *in vitro* é influenciada pela escolha do método para o desenvolvimento do biofilme, pois de acordo com Hawser e Douglas (1995) e Blankenship e Mitchell (2006) o biofilme formado em agitação produz mais SPE do que em condições estáticas.

Chabrier-Roselló et al. (2005) estudaram o efeito fotodinâmico do fotossensibilizador fotofrin irradiado por lâmpada de mercúrio contra biofilme e tubo germinativo de *C. albicans* e observaram que para o biofilme submetido a TFD houve significativa redução da atividade metabólica em relação ao biofilme tratado com anfotericina B. Após o tratamento foi observado que o tubo germinativo perdeu a integridade da membrana levando a morte celular. O tubo germinativo é importante para a formação de hifas que constituem o biofilme maduro.

Os resultados da MEV revelaram que as células submetidas a TFD apresentaram-se deformadas. Demidova e Hamblin (2005) demonstraram que o fotossensibilizador rosa bengala produziu efeito fotodinâmico provocando danos no exterior da célula de *C. albicans* quando deixado em solução.

O mecanismo de ação da TFD ocorre através da formação de radicais livres e oxigênio singleto que reagem com várias estruturas celulares e vias metabólicas diferentes. Sendo assim a principal vantagem da TFD é o improvável desenvolvimento de resistência, em que enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase, protegem contra alguns radicais livres, mas não contra oxigênio singleto (KONOPKA; GOSLINSK, 2007).

O tratamento de doenças que acometem a cavidade bucal, como a candidose, requer novas terapias como a TFD, visto que este sítio apresenta fácil acesso à luz e aplicação tópica de substâncias (KONOPKA; GOSLINSK, 2007). Esta nova terapia poderia auxiliar no tratamento quando a administração de antifúngicos não for possível devido a presença de cepas resistentes e efeitos colaterais indesejados. Os resultados obtidos no presente estudo encorajam para que sejam feitos estudos *in vivo* para avaliar a efetividade do tratamento em hospedeiro.

## Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a Terapia Fotodinâmica mediada pelos

corantes eritrosina e rosa bengala irradiados pelo LED demonstraram efeito antifúngico na redução de biofilmes de *C. albicans*.

### Referências

- BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr. Opin. Microbiol.** V.9, p.588-594, 2006.
- BLISS, J.M. et al. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrobial. Agents Chemother.** V.48, p.2000-2006, 2004.
- CHABRIER-ROSELLÓ, Y. et al, Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrobial. Agents Chemother.** V.49, p.4288-4295, 2005.
- CORMICK, M.P. et al, Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **Eur. J. Med. Chem.** V.44, p.1592-1599, 2009.
- DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial. Agents Chemother.** V.49, p.2329-2335, 2005.
- DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol.** V.11, p.30-36, 2003.
- GIROLDO, L.M. et al, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers Med. Sci.** V.24, p.109-112, 2009.
- HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial. Agents Chemother.** V.39, p.2128-2131, 1995.
- KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J. Dent. Res.** V.86, p.694-707, 2007.
- LAMBRECHTS, S.A.G. et al. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrobial. Agents Chemother.** V.49, p.2026-2034, 2005.
- LAMFON, H. et al. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. **J. Antimicrob. Chemother.** V.53, p.383-385, 2004.
- MUNIN E. et al. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Photochem. Photobiol. B. Biol.** V.88, p.16-20, 2007.
- NAGLIK, J.R. et al. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Yeast Res.** V.283, p.129-139, 2008.
- NOBILE, C.J.; MITCHELL, A.P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cell Microbiol.** V.82, p.1382-1391, 2006.
- RAMAGE, G. et al. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to flucanazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **J. Antimicrob. Chemotherapy.** V.49, p.973-980, 2002.
- SAMARANAYAKE, Y.H. et al. *In vitro* method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. **J. Clin. Microbiol.** V.43, p.818-825, 2005.
- SANT'ANA, P.L. et al. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V.97, p.253-257, 2002.
- SENEVIRATNE, C.J. et al. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis.** V.14, p.582-590, 2008.