

## TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA PELOS CORANTES ROSA BENGALA E ERITROSINA EM CULTURAS PLANCTÔNICAS DE *Candida albicans*

**Vanessa Maria de Campos Rasteiro<sup>1</sup>, Anna Carolina Borges Pereira da Costa<sup>1</sup>,  
Cristiane Aparecida Pereira<sup>1</sup>, Cássia Fernandes Araújo<sup>1</sup>, Emily Setsuko Halter da  
Silva Hashimoto<sup>1</sup>, Rodnei Dennis Rossoni<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, [vanessam.campos@yahoo.com.br](mailto:vanessam.campos@yahoo.com.br)

**Resumo-** O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da terapia fotodinâmica (TFD) em culturas planctônicas de *Candida albicans* utilizando os fotossensibilizadores rosa bengala e eritrosina e Diodo Emissor de Luz (LED) azul (440-460 nm). Foram utilizadas 7 cepas clínicas e 1 cepa padrão (ATCC 18804). Os grupos experimentais (n=10) foram: a) irradiado com LED e fotossensibilizador rosa bengala (RB+L+); b) irradiado com LED e fotossensibilizador eritrosina (E+L+); c) irradiado apenas com LED (F-L+); d) tratado com rosa bengala na ausência de luz (RB+L-); e) tratado com eritrosina na ausência de luz (E+L-); e) grupo controle, sem LED e sem fotossensibilizador. Após irradiação, foram feitas diluições seriadas e sementeiras em ágar Sabouraud dextrose (37°C por 48 horas) para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), e a seguir submetidos à análise de variância e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Foi observada redução de 1,97 log<sub>10</sub> para RB+L+ e 3,45 log<sub>10</sub> para E+L+. Concluiu-se que a TFD mediada por rosa bengala e eritrosina juntamente com LED apresentaram efetiva ação, constituindo uma alternativa para o tratamento de doenças fúngicas.

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

### Introdução

A candidose constitui um indicador da progressão da infecção por HIV, revelando distúrbio imunológico dos pacientes, pois a imunidade celular específica desempenha importante papel na prevenção da candidose (SAMARANAYAKE et al. 2009). A candidose bucal é a manifestação fúngica mais comum em pacientes com AIDS (COOGAN et al., 2006). É relatado que 84% de indivíduos HIV positivos desenvolvem pelo menos um episódio de colonização por *Candida* spp.

Episódios recorrentes e exposição prévia aos antifúngicos convencionais são as principais causas de falha terapêutica para o tratamento da candidose bucal em pacientes com AIDS (WILHEIM et al., 2009).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido empregada no tratamento de infecções localizadas por fungos e outros microrganismos. O mecanismo deste tratamento é dado pela interação de um corante não tóxico sensível a luz, seguida da irradiação de luz visível de comprimento de onda adequado com subsequente produção de espécies reativas de oxigênio, como radicais livres e oxigênio singlete (PERUSSI

2007). O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da TFD em culturas planctônicas de *Candida albicans* mediada pelos fotossensibilizadores rosa bengala e eritrosina

### 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 (Sigma, São Paulo, Brazil) na concentração de 40 µM.

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 µm (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>.

As cepas foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Decorrido este período, a levedura foi cultivada em caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) a 37°C por 16 horas.

O crescimento microbiano no caldo foi centrifugado a 1300 Xg durante 10 minutos e lavado duas vezes com PBS. O botão de células foi ressuspensionado em PBS.

Foi preparada uma suspensão padronizada de cada cepa de *C. albicans* em PBS, na concentração de 10<sup>6</sup> células/mL. A padronização da suspensão foi realizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284.

Cada cepa foi submetida a diferentes condições experimentais. Foram realizados 60 ensaios a partir de cada cepa, totalizando 480 ensaios. Os ensaios foram divididos de acordo com os seguintes grupos experimentais (n= 10): a) irradiado com LED na presença do fotossensibilizador rosa bengala (RB+L+); b) irradiado com LED na presença do fotossensibilizador eritrosina (E+L+); c) somente irradiado com LED (F-L+); d) tratado com o fotossensibilizador rosa bengala na ausência de luz (RB+L-); f) tratado com o fotossensibilizador eritrosina na ausência de luz (E+L-); e) grupo controle, sem utilização de LED e fotossensibilizador (F-L-).

De acordo com as condições experimentais, foram adicionados 0,1 mL de suspensão de *C. albicans* padronizada em cada orifício de placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizadas e com tampa (Costar Corning, New York, EUA). Posteriormente, os ensaios dos grupos RB+L+, E+L+, RB+L- e E+L- receberam 0,1 mL de fotossensibilizador já para os ensaios dos grupos F-L+ e F-L- foram adicionados 0,1 mL de PBS. Em seguida, todas as placas foram agitadas durante 5 minutos (tempo de pré-irradiação) em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após este período, o conteúdo dos poços das placas dos grupos RB+L+, E+L+, F-L+ foram irradiados pelo LED por 180 s.

Após a irradiação, a partir de cada amostra, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA). Após incubação a 37°C por 48 horas, foi feita a contagem das

Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) que foram transformadas em logaritmo.

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

## Resultados

Foi observado efeito fototóxico dos corantes rosa bengala e eritrosina para todas as cepas testadas com diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controles (F-L-, F-L+, RB+L- e E+L-), enquanto que estes corantes e a fonte de luz utilizados isoladamente não apresentaram efeito citotóxico (Tabela 1).

Tabela 1- Valores em UFC/mL(log<sub>10</sub>) das cepas de *C. albicans* submetidas aos diferentes tratamentos experimentais: F-L-, F-L+, RB+L-, E+L-, RB+L+ e E+L+.

Cepas	UFC/mL(log <sub>10</sub> )					
	F-L-	F-L+	RB+L-	E+L-	RB+L+	E+L+
ATCC	5,73 <sup>A</sup>	5,66 <sup>A</sup>	5,62 <sup>A</sup>	5,71 <sup>A</sup>	4,53 <sup>B</sup>	0,00 <sup>C</sup>
1	5,82 <sup>A</sup>	5,91 <sup>A</sup>	5,89 <sup>A</sup>	5,86 <sup>A</sup>	5,12 <sup>B</sup>	5,05 <sup>B</sup>
2	5,46 <sup>A</sup>	5,43 <sup>A</sup>	5,47 <sup>A</sup>	5,44 <sup>A</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>
3	5,60 <sup>A</sup>	5,70 <sup>A</sup>	5,89 <sup>A</sup>	5,75 <sup>A</sup>	4,79 <sup>A</sup>	4,72 <sup>B</sup>
4	5,41 <sup>A</sup>	5,35 <sup>A</sup>	5,50 <sup>A</sup>	5,46 <sup>A</sup>	4,72 <sup>B</sup>	4,99 <sup>AB</sup>
5	5,57 <sup>A</sup>	5,57 <sup>A</sup>	5,57 <sup>A</sup>	5,69 <sup>A</sup>	4,96 <sup>B</sup>	0,00 <sup>C</sup>
6	5,67 <sup>A</sup>	5,65 <sup>A</sup>	5,70 <sup>A</sup>	5,67 <sup>A</sup>	5,02 <sup>C</sup>	5,27 <sup>B</sup>
7	5,37 <sup>A</sup>	5,26 <sup>A</sup>	5,28 <sup>A</sup>	5,49 <sup>A</sup>	4,49 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>

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

A Tabela 2 mostra os valores de redução em log<sub>10</sub> dos grupos RB+L+ e E+L+ em relação ao grupo controle (F-L-) para todas as cepas estudadas. Foi observada redução do número de células para as culturas planctônicas de 3,45 log<sub>10</sub> quando submetidos a TFD mediada por eritrosina, enquanto que para o rosa bengala a média de redução foi de 1,97 log<sub>10</sub>.

Tabela 2- Redução em log<sub>10</sub> das UFC/mL para as cepas de *C. albicans* submetidas a TFD (RB+L+ e E+L+) em relação ao grupo controle (F-L-)

Cepas	UFC/mL (log <sub>10</sub> )	
	RB+L+	E+L+
ATCC	1,58	5,61
1	0,86	0,74
2	5,46	5,46
3	1,28	4,20
4	0,99	0,33
5	0,61	5,57
6	0,65	0,39
7	4,37	5,29
Média±DP*	1,97	3,45

\*DP: Desvio Padrão

## 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 para as culturas planctônicas das cepas de *C. albicans* estudadas.

A média de redução em  $\log_{10}$  para a cultura planctônica foi de 1,97 e 3,45 para os grupos RB+L+ e E+L+. Demidova e Hamblin (2005) avaliaram o efeito fotodinâmico de rosa bengala na concentração de 200  $\mu\text{M}$  em *C. albicans* obtendo redução de 4 e 6  $\log_{10}$  para as densidades celulares de  $10^7$  e  $10^6$  células/mL respectivamente, além disso estes autores observaram que *C. albicans* foi mais resistente do que as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, provavelmente devido ao seu tamanho 10 a 50 vezes maior do que as bactérias, pois apresentam mais alvos para o oxigênio singlete por unidade de célula e membrana nuclear.

Foi observada diferença de sensibilidade para os grupos RB+L+ e E+L+ entre as cepas clínicas, demonstrando que cepas isoladas de diferentes pacientes apresentam respostas diferentes.

Souza et al.(2006) estudaram o efeito da TFD mediada por azul de metileno e laser de diodo InGaAlP em cepas de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* obtendo redução em  $\log_{10}$  de 1,01, 1,03, 1,33 e 0,96, respectivamente, destacando a importância de mais estudos devido aos diferentes comportamentos das leveduras do gênero *Candida*.

O LED de emissão de luz vermelha tem sido utilizado na TFD contra leveduras do gênero *Candida* obtendo-se resultados significativos (PELOI et al., 2008); (SOARES et al., 2009).

Não foi encontrado na literatura trabalho de TFD mediado por eritrosina contra leveduras do gênero *Candida*. Entretanto foram encontrados trabalhos avaliando a ação da TFD mediada por eritrosina associada à irradiação por lâmpada de filamento de tungstênio de 400 W contra biofilme de *Streptococcus mutans* com redução de 3,0  $\log_{10}$  após irradiação contínua e 3,7  $\log_{10}$  com fracionamento da luz, destacando o excelente potencial deste fotossensibilizador para utilização na TFD em Odontologia (WOOD et al.,2006); (METCALF et al., 2006).

## Conclusão

Concluiu-se que a TFD mediada por rosa bengala e eritrosina juntamente com LED apresentaram efetiva ação antifúngica, constituindo uma alternativa para o tratamento de doenças fúngicas.

## Referências

- COOGAN, M.M.; FIDEL, Jr. P.L.; KOMESU, M.C.; MAEDA, N.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida* and mycotic infections. **Adv Dent Res.** V.19, p.130-138, 2006.
- 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.
- METCALF, D.; ROBINSON, C.; DEVINE, D.; Wood, S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. **J. Antimicrob. Chemother.** V. 58, p.190-192, 2006.
- PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light emitting-diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J. Biosci.** V.33, p.231-237, 2008.
- PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quím. Nova.** V.30, p.988-994 2007.
- SAMARANAYAKE, L.P.; LEUNG, W.K.; JIN, L. Oral mucosal fungal infections. **Periodontol 2000.** V.49, p.39-59, 2009.
- SOARES, B.M.; SILVA, D.L.; SOUSA, G.R.; AMORIM, J.C.F.; RESENDE, M.A.; PINOTTI, M.; CISALPINO, P.S. *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Photochem. Photobiol. B. Biol.** V.94, p.65-70, 2009.
- SOUZA, S.C.; JUNQUEIRA, J.C.; BALDUCCI, I.; ITO-KOGA, C.Y.; MUNIN, E.; JORGE, A.O.C. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Photochem. Photobiol. B. Biol.** V.83, p.34-38, 2006.
- WILHEIM, A.B.; MIRANDA-FILHO, D.B.; NOGUEIRA, R.A.; RÉGO, R.S.M.; LIMA, K.M.; PEREIRA, L.M.M.B. The resistance to fluconazol in patients with esophageal candidiasis. **Arq Gastroenterol.** V.46, p.32-37, 2009.
- WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.** V.57, p.680-684, 2006.