

COMPARAÇÃO ENTRE OS FOTOSSENSIBILIZADORES ROSA BENGALA E EOSINA Y EM CULTURA PLANCTÔNICA DE *Candida albicans*.

Machado A.K.S.¹; Costa A.C.B.P.¹; Pereira C.A.¹; Freire F.¹; Silva M. P.¹; Beltrame Jr M.²; Junqueira J.C.¹; Jorge A.O.C.¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP)/ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas – São José dos Campos, SP – Brasil – e-mail: anakarinasm@ig.com.br

²Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), Av. Shishima Hifumi, 2911- Urbanova – São José dos Campos, SP – Brasil – e-mail: beltrame@univap.br

Resumo- A Terapia Fotodinâmica tem sido apontada como um tratamento coadjuvante para as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação dos fotossensibilizadores xantenos, Rosa Bengala (RB) e Eosina Y (EY), irradiados pelo LED (L) verde (532 ± 10 nm) na Terapia Fotodinâmica em culturas planctônicas de *Candida albicans* (ATCC 18804). Suspensões de *Candida* (10⁶ células/ml) foram submetidas às seguintes condições de irradiação (n=10): a) RB+ L+ b) RB+ L- c) EY+ L+ d) EY+ L- e) F- L+ f) F- L-. Foram feitas diluições seriadas e semeaduras em Agar Sabouraud Dextrose (37°C por 48 horas) para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e, posterior, análise de variância e teste de Tukey (p≤0,05). Foi observado efeito fotodinâmico a partir de concentrações de 12,5 µM dos fotossensibilizadores, com redução de 5,12 log₁₀ para o Rosa Bengala e 2,94 log₁₀ para o Eosina. Os resultados demonstraram que os fotossensibilizadores xantenos foram efetivos na redução de *C. albicans*, sendo Rosa Bengala mais eficaz do que o Eosina.

Palavras-chave: *Candida albicans*, rosa bengala, eosina Y, terapia fotodinâmica, diodo emissor de luz verde.

Área do Conhecimento:

Introdução

A microbiota bucal dos humanos é altamente complexa e diversa, sendo caracterizada pela presença de cerca de 400 espécies bacterianas além de protozoários, fungos, micoplasmas e vírus (MARCOTTE & LAVOIE, 1998, ZANIN et al, 2003). O fungo *Candida spp*, principalmente a espécie *Candida albicans*, é integrante da microbiota comensal da cavidade bucal. Entretanto, na presença de fatores predisponentes podem se tornar patogênicas, produzindo infecções que vão desde lesões nas mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas (DE REPENTIGNY et al, 2000; Leung et al, 2000). A candidose oral, infecção fúngica oportunista (SIDRIM et al, 1999), de grande importância odontológica, pode evoluir gravemente em pacientes imunossuprimidos. A presença de *Candida spp*. na cavidade oral de indivíduos saudáveis varia de 35 - 38% a 40 - 60% (REGO et al, 2003).

Células fúngicas e células humanas são eucarióticas. Desse modo, muitas substâncias com propriedades antifúngicas acarretam uma série de efeitos colaterais ao homem, fato que limita o avanço da terapia antifúngica (ROCHA, 2004). Mediante este contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) deve ser empregada como

uma modalidade de tratamento complementar eficaz de infecções bucais e, não como substituição a tratamentos convencionais (GARCEZ et al, 2003). A TFD parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto não tóxico (fotossensibilizador) e oxigênio resulta em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células, eliminando os microrganismos (MACHADO, 2000).

Com base em algumas vantagens, como largo espectro de ação, possibilidade de desenvolvimento de protocolos com redução do microrganismo e dano tecidual limitado, baixa probabilidade de desenvolver mutagenicidade e uso de fonte de luz de baixo custo para ativação do fotossensibilizador (JORI et al, 2006).

Os fotossensibilizadores do grupo xanteno, Rosa Bengala e Eosina Y, localizados no citoplasma, são compostos cíclicos com três anéis aromáticos em arranjo linear com um átomo de oxigênio no centro do anel, que absorvem luz na região do visível e não se ligam à membrana celular. Rosa Bengala é um haleto derivado da fluoresceína que tem sido usado em oftalmologia como um corante para diagnóstico de várias doenças externas ao olho, podendo eliminar microrganismos. Eosina Y é um derivado tetrabromo da fluoresceína e pode ser usado para

corar o citoplasma, o colágeno e as fibras musculares para exame ao microscópio (PERUSSI, 2007).

Este trabalho apresenta a comparação dos fotossensibilizadores Rosa Bengala e Eosina Y, sob a ação do diodo emissor de luz verde (LED), em culturas planctônicas de *Candida albicans*.

Metodologia

Para a realização deste estudo foi utilizada cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804) mantida no laboratório da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ Universidade Estadual Paulista (UNESP). O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/ Universidade Estadual Paulista (UNESP).

A sensibilização da cepa de *Candida albicans* ocorreu através do uso de fotossensibilizadores do grupo xanteno, Rosa Bengala (RB) e Eosina Y (EY), cuja solução foi preparada pela dissolução do pó em solução Fisiológica Tampão Fosfato (PBS). O corante Eosina Y foi aquecido em Banho Maria a 45-50°C por 10 minutos para solubilização e filtração. Após a filtração, a solução foi mantida sob o abrigo da luz.

A ação dos fotossensibilizadores Rosa Bengala e Eosina Y, na Terapia Fotodinâmica, sobre culturas planctônicas, foi verificada através de um espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) que mensurou o espectro de absorção correspondente a cada corante. O Diodo Emissor de Luz verde (LED) foi utilizado como fonte de luz (MMOptics, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de $532 \pm 10\text{nm}$, potência de 90mw, fluência de $42,63\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (energia de 16,2J e tempo de 180s) e taxa de fluência de $237\text{mw}\cdot\text{cm}^{-2}$.

A cepa de *Candida albicans* foi semeada em Agar Sabouraud Dextrose e incubada a 37°C por 48 horas. Preparou-se uma suspensão padronizada da cepa em PBS, na concentração de 10^6 células/ml em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil).

Na fotossensibilização da suspensão utilizaram-se os corantes Rosa Bengala e Eosina Y nas concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 μM para determinação da curva de morte.

Adicionou-se 0,1ml da suspensão de *Candida albicans* em cada orifício da Placa de Microtitulação com 96 poços de fundo plano (Costar Corning, New York, EUA) com área de $0,38\text{ cm}^2$. Em seguida, os grupos RB+ L-, RB+ L+, EY+ L- e EY+ L+ receberam 0,1ml de cada concentração das respectivas soluções dos fotossensibilizadores. Os grupos F-L- e F-L- receberam 0,1ml PBS.

A placa foi agitada por 5 minutos (tempo de pré-irradiação) em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após, os grupos com as respectivas concentrações dos fotossensibilizadores e LED; e o grupo F-L- foram irradiados.

Com o término da irradiação, obtiveram-se diluições seriadas. Alíquotas de 0,1ml foram semeadas, com auxílio da Alça Drigalski, em placas com Agar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, as Unidades formadoras de Colônias (UFC) por ml foram contadas e transformadas em logaritmo.

Resultados

Foi observado efeito fotodinâmico a partir de concentrações de 12,5 μM dos fotossensibilizadores, com redução de 5,12 \log_{10} para o Rosa Bengala e 2,94 \log_{10} para o Eosina Y. O espectro de absorção dos corantes no espectrofotômetro foi de 450-550 nm para Eosina Y e de 490-580 nm para Rosa Bengala.

O Gráfico 1 apresenta um comparativo dos valores das médias e desvios padrões em UFC/ml (\log_{10}) obtidas para os grupos xantenos, RB e EY. Pode-se observar que os fotossensibilizadores em questão foram efetivos na redução dos microrganismos pertencentes ao grupo F+L+ quando comparado aos demais (F+L- e F-L+), nos quais não foram verificadas alterações significantes em relação ao grupo controle (F-L-).

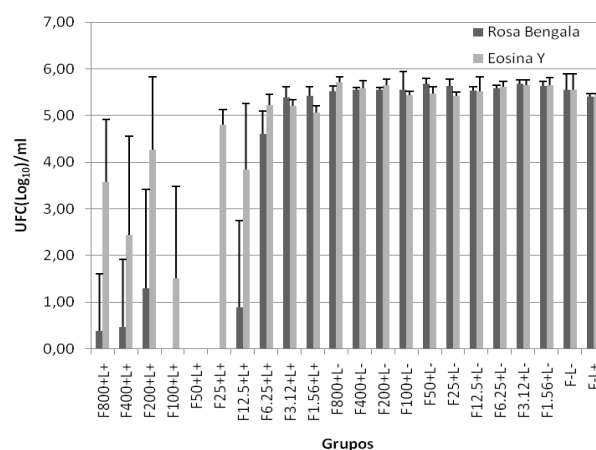


Gráfico 1 - Médias e desvios padrões em UFC/ml (\log_{10}) obtidas para os grupos xantenos, RB e EY.

Na análise comparativa dos fotossensibilizadores com os grupos controle foi observada diferença estatística entre o grupo (F+L+) e os demais, demonstrando que o Rosa Bengala e o Eosina Y associados ao LED apresentaram redução no número de microrganismos. Os grupos tratados somente com

corante ou irradiação não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (F-L-).

Discussão

A Terapia Fotodinâmica surgiu como um tratamento coadjuvante, e não substitutivo, de grande importância, principalmente em casos de resistência dos microrganismos.

O fotossensibilizador ideal caracteriza-se por baixa toxicidade após administração, não induzindo a reação alérgica nem hipotensão, ser facilmente sintetizado, ser um composto puro, hidrossolúvel e ser eliminado facilmente pelo paciente (CASTANO et al, 2004). Além de ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficaz e seletivo (GARCEZ et al, 2003).

No estudo realizado, a análise da Terapia Fotodinâmica com fotossensibilizadores do grupo xanteno, Rosa Bengala e Eosina Y, irradiada pelo emissor de luz verde (LED) sobre culturas planctônicas de *Candida albicans*, verificou-se diferença estatisticamente significativa de UFC nos grupos F+L+ e controle.

Os resultados obtidos demonstraram que o fotossensibilizador Rosa Bengala apresentou maior atividade antifúngica, reduzindo o número de microrganismos significativamente quando comparado ao Eosina Y.

Conclusão

Concluiu-se que o fotossensibilizador Rosa Bengala foi mais eficaz do que o Eosina Y na terapia fotodinâmica sobre *Candida albicans*.

Referências

- Castano AP, Demidova, TN, Hamblin, MR. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One – Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. 2004; 279-293.
- De Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of Binding of *Candida albicans* to Small Intestinal Mucin and its Role in Adherence to Mucosal Epithelial Cells. Infect Immun. 2000; 68: 3172-3179.
- Garcez AA, et al. Terapia Fotodinâmica em Odontologia: Laser de Baixa Potência para Redução Microbiana. Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent. 2003; 57 (3): 223-225
- Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic Therapy for the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. Lasers Surg Med. 2006; 38 (5): 468-81.

- Leung WK, Dassanayake RS, Yau JYY, Jin LJ, Yam WC, Samaranayake LP. Oral Colonization Phenotypic and Genotypic Profiles of *Candida* species in Irradiated, Dentate, Xerostomic Nasopharyngeal Carcinoma Survivors. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 2219-2226.

- Machado AEH. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. Química Nova. 2000; 23 (2).

- Marcotte H, Lavoie MC. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin. A Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62 (1): 71-109.

- Perussi JR. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. Quím. Nova. 2007; 30 (4): 988-94.

- Rego MA, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Effects of Oral Environment Stabilization Procedures on Counts of *Candida* spp. in Children. Pesqui Odontol Bras. 2003; 17 (4): 332-6.

- Rocha MFG, Sidrim JJC. Drogas Antifúngicas Utilizadas na Terapêutica Contemporânea. In Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004; 50-62.

- Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999; 289.

- Zanin ICJ, Junior AB, Zanin F, Gonçalves RB. Terapia Fotodinâmica na Odontologia (TFD). RGO. 2003; 51 (3): 179-182.

Prezada Comissão de Avaliação,

Agradeço as correções sugeridas.

As legendas nas barras laterais de X e Y foram devidamente denominadas conforme trabalho acima.

Em relação ao termo “cultura planctônica” utilizada no trabalho está correto. Em Microbiologia, quando trabalhamos com microrganismos em suspensão designamos de cultura planctônica. Para elucidar melhor tal afirmação, segue abaixo as referências bibliográficas de artigos científicos:

Théraud M, Bédowin Y, Guiguen C, Gangneux JP. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *J Med Microbiol.* 2004 Oct; 53 (Pt 10): 1013-8.

Khodse VB, Bhosle NB. Differences in carbohydrate profiles in batch culture grown planktonic and biofilm cells of *Amphora rostrata* Wm. Sm. *Biofouling.* 2010 Jul; 26 (5): 527-37.

Nielsen DS, Cho GS, Hanak A, Huch M, Franz CM, Arneborg N. The effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *Int J Food Microbiol.* 2010 Jul 31; 141 Suppl 1:553-9. Epub 2010-Apr 14.

Scheffield CL, Crippen TL, Andrews K, Bongaerts RJ, Nisbet DJ. Planktonic and biofilm communities from 7-day-old chicken cecal microflora cultures: characterization and resistance to *Salmonella* colonization. *J Food Prot.* 2009 Sep; 72(9): 1812-20.

Atenciosamente,

Michelle Peneluppi Silva