

## TERAPIA FOTODINÂMICA EM CULTURA DE *CANDIDA ALBICANS*

**Daniela A. Mardegan, Letícia Dias Lima, Sheila M. A. Rocha, Marta M.V. Balbi,  
Carlos Eduardo Werneck, Renato Amaro Zângaro**

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D),  
Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Av Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova  
12244-000 - São José dos Campos - SP - Brasil  
[mardegan@univap.br](mailto:mardegan@univap.br), [leticia\\_dlima@zipmail.com.br](mailto:leticia_dlima@zipmail.com.br), [martabalbi@hotmail.com](mailto:martabalbi@hotmail.com)

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica, *Candida albicans*, Laser de Baixa Potência.  
**Área do Conhecimento:** III Engenharias

**RESUMO** - As infecções causadas pelo gênero *Candida sp* estão entre as mais comuns, sendo responsáveis por infecções orais, em mucosas e cutâneas. Atualmente tem sido realizadas diversas pesquisas no intuito de combater a candidíase com o uso da Terapia fotodinâmica, que envolve a ação da luz laser associada a um corante fotossensibilizante e que tem mostrado resultados satisfatórios em estudos *in vitro*. O propósito deste estudo foi determinar a eficácia da terapia fotodinâmica em *Candida albicans*. Para realização deste experimento colônias de *Candida albicans* foram tratadas com dois corantes fotossensibilizantes Azul de Evans (AE) e Eosina Azul de Metileno (EAM) em concentrações de 0,1mg/ml, 0,5mg/ml e 1,0mg/ml e expostas a radiação de um laser de baixa potência LBP (GaAIs), 30mW, por 12 e 22 segundos e densidades de energia de 10J/cm<sup>2</sup> e 20J/cm<sup>2</sup> respectivamente. As colônias foram cultivadas em meio Agar Saboraund durante 48 horas antes da irradiação. Quando comparada a eficácia dos dois corantes verificou-se para o corante EAM na concentração de 0,5mg/ml e irradiação de 10J/cm<sup>2</sup>, uma inibição do crescimento das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de 100%. Entretanto utilizando 20J/cm<sup>2</sup>, os índices de inibição alcançados foram inferiores. É possível inibir o crescimento dos microorganismos (*C. albicans*) associados ao EAM e irradiados com LBP desde que observadas certas dosimetrias.

### Introdução

Diversas leveduras provocam geralmente em pacientes imunodeprimidos lesões em órgãos profundos, a partir de processos superficiais (Teichert, et al., 2002). Dentre estas leveduras se destacam a *Candida albicans*, com poder invasivo e produtora de proteinases e fosfolipases. Tais enzimas facilitam a fixação da levedura principalmente nas mucosas, formando placas esbranquiçadas. Geralmente em tais formas de candidíase, o seu aparecimento se torna oportunista, já que a *Candida albicans* faz parte da microflora no organismo do hospedeiro (Lacaz, 1991).

As infecções por *Candida albicans* encontram-se entre as mais comuns que afetam a espécie humana. A incidência de tais infecções, em particular na ocorrência de vulvovaginites (Ferrer, 2000), candidíases da cavidade bucal (Teichert, et al., 2002, Sen et al., 1997, Wilson e Mia, 1993) entre outros (Tsarfaty, et al., 2000, Oliveira, et al., 2001) nos levam a investigar a ação de fotossensibilizantes que, quando utilizados juntamente com o laser de baixa

potência, promovem morte celular podendo assim ser utilizado no tratamento de infecções microbianas (Bertoloni, et al., 2000), podendo

ainda reduzir a atividade celular do microorganismo, seja por fotoinativação (Isak, et al., 2000, Polo et al., 2000) ou indução de dano em componentes celulares devido a produção e aumento de oxigênio singlete em algumas organelas (Carré et al., 1999).

A Terapia Fotodinâmica consiste de um agente fotossensibilizante e oxigênio, que na presença da luz laser em comprimentos de onda específicos (dependendo do comprimento de onda de absorção do corante) pode induzir alterações citotóxicas no meio intracelular, levando a célula a morte. (Moor, 2000). Pelo fato do agente absorver luz com elevada eficiência, geralmente na região do espectro visível, alguns deles são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas, levando a forte oxidação, como causa de dano celular, lise da membrana e inativação protéica. A terapia fotodinâmica tem sido empregada na fotoerradicação de vírus,

bactérias e fungos, incluindo *Candida albicans* (Machado, 2000, Sibata, et al., 2000, Teichert, et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar através do uso de dois corantes vitais, Eosina Azul de Metileno (EAM) e Azul de Evans (AE) a ação

da terapia fotodinâmica em *Candida albicans* utilizando um laser diodo de GaAlAs com potência de 30mW, fazendo um estudo comparativo entre os dois corantes vitais.

### Metodologia

A partir das colônias de *C. albicans* em meio Agar Saboraud Dextrose (Biobrás), removeu-se as unidades formadoras de colônias e realizou-se uma diluição do fungo em solução fisiológica (0,9%) na concentração de 1% de acordo com a Escala de Mac Farland (Teichert et al., 2002). Com esta diluição realizada, foi utilizado 50µl do inóculo e 50µl das diluições dos corantes Eosina Azul de Metileno (Synth) e Azul de Evans (Merck) nas concentrações 0,1mg/ml, 0,5mg/ml e 1,0mg/ml, em seis tubos de ensaio estéreis.

Os fungos foram semeados com alça calibrada 0,1µl e incubados em estufa (Fanem Ltda MOD 002 CB), a 37°C e observados seu crescimento em 24 e 48 horas, com a respectiva diluição dos corantes. Foram mantidas para cada placa experimental uma placa somente com inóculo e corante, sem irradiação. A irradiação foi efetuada após 48 horas sobre cada colônia da placa experimental, utilizando Laser de Diodo GaAlAs com 30mW de potência emitindo radiação em 685nm (DMC Equipamentos Ltda, Unidade Thera Lase®). O diâmetro das colônias semeadas em placa de Petri, foram padronizadas em 2mm para irradiação, e foram posicionadas no interior da capela de fluxo laminar (Veco). Dentre as colônias distribuídas em uma placa de Petri, foram escolhidas colônias padrão, uma recebendo densidade de energia de 10J/cm<sup>2</sup> e a outra de 20J/cm<sup>2</sup>.

As colônias irradiadas foram novamente semeadas e incubadas a 37°C acompanhando-se o crescimento em 24 e 48 horas, onde foram realizadas as contagens de UFC (unidade formadoras de colônias).

### Resultados

Após o período de incubação da *Candida albicans* a 37°C, observou-se as culturas submetidas ao AE em 24 horas nas concentrações 0,1mg/ml, 0,5mg/ml e 1,0mg/ml.

Na figura 1, para AE sem irradiação observa-se inibição total do crescimento, enquanto que após aplicação do laser observa-se tendência ao crescimento com o aumento da energia de irradiação.

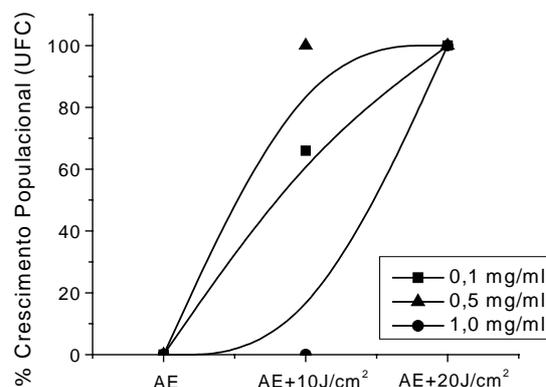


Figura 1 - Crescimento Populacional (UFC) x Corante AE 24 horas.

A figura 2 mostra em 48 horas para AE sem irradiação, a inibição de UFC para o corante na concentração de 0,1mg/ml. Nas concentrações 0,5mg/ml e 1,0mg/ml, tanto para AE não irradiadas ou irradiadas com 10J/cm<sup>2</sup> e 20J/cm<sup>2</sup>, nota-se que não houve inibição de UFC.

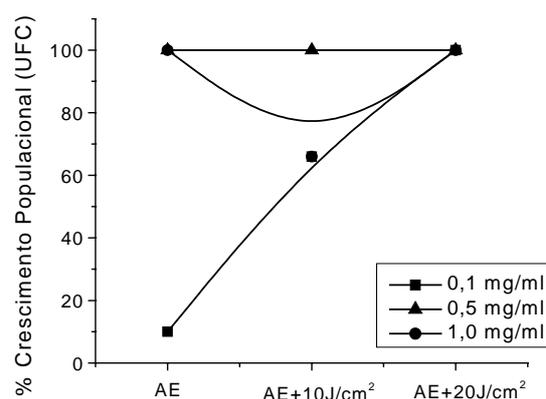


Figura 2 - Crescimento Populacional (UFC) x Corante AE em 48 horas.

A figura 3 apresenta o crescimento populacional de colônias com EAM em 24 horas. Observa-se nas três concentrações, inibição quase total com tendência ao

crescimento a medida que se aumenta as doses de energia, exceto para a concentração de 1,0mg/ml que apresenta inibição total.

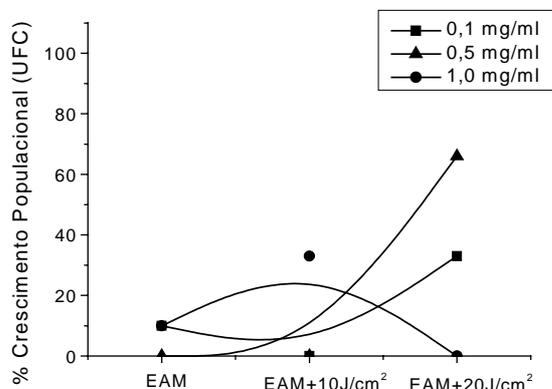


Figura 3 - Crescimento Populacional (UFC) x Corante EAM em 24horas.

Na análise da figura 4, as colônias com EAM não irradiadas tem um crescimento máximo nas três concentrações em 48 horas. Este mesmo grupo de colônias irradiadas com 10J/cm² e 20J/cm² apresentam uma tendência de queda do crescimento populacional, sendo que esta tendências é máxima para 10J/cm².

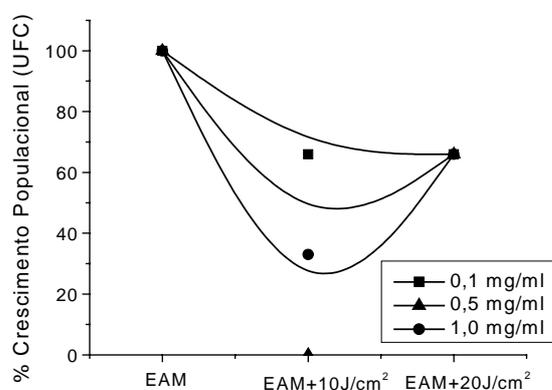


Figura 4 – Crescimento Populacional (UFC) x Corante EAM em 48 horas.

### Discussão e Conclusões

A interação do corante vital AE em culturas de *Candida albicans* sem irradiação, produziu maior efeito citotóxico em 24 horas em todas as diluições, fato este observado pela inibição no crescimento de colônias, não ocorrendo o mesmo efeito após 48 horas de incubação, exceto para a diluição de 0,1mg/ml. Desta forma observou-se uma tendência no aumento do crescimento populacional de UFC, tanto para 24 como para 48 horas de incubação,

sendo correlacionada com o aumento da dose de radiação.

Com relação ao corante EAM em 24 horas sem irradiação, houve maior inibição do crescimento das colônias devido a ação citotóxica. Em 48 horas, verifica-se a proliferação do microorganismo com o corante não irradiado, devido provavelmente a redução do efeito tóxico do corante sobre o microorganismo. Observa-se neste caso a tendência do crescimento de colônias com aumento da energia de irradiação.

O corante EAM irradiado com 10J/cm², produz fotoinativação total das colônias para a concentração 0,5mg/ml tanto em 24 como em 48 horas, fato verificado por Teichert *et al.* (2002) que utilizou a mesma concentração em *Candida albicans*, porém com 275J/cm de energia liberada através de uma fibra óptica difusora.

Para AE nas concentrações utilizadas, não se observa a ação do efeito fotodinâmico aliás, a radiação ao contrário, provoca o crescimento de colônias sugerindo possível efeito fotoestimulador.

### Referências

Bertoloni, G, Lauro FM, Cortella G, Carré V, Gaud O, Sylvain I, Bourdon, Ferrer J. (2000), "Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors", *Intrenational Journal of Gynecology & Obstetrics*, n. 7, S22-S27.

Carré V., Gaud o, Sylvain I, Bourdon O, Spiro M, Blais J, Granet R, Krausz P, Guilloton M (1999), "Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 48, p. 57-62.

Ferrer J, (2000), "Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors", *International Journal of Ginecology & Obstetrics*, v. 71, p. 21-27.

Isak SJ, Eyring EM, Spikes JD, Meekins PA, (2000), "Direct blue dye solutions: photo properties", *Journal of Photochemistry and Photobiology*, V. 134, p. 77-85.

Lacaz Carlos da Silva, Porto. Edward, Martins. José Eduardo Costa, (1991), *Micologia Medica*, 8. ed. Ver. e ampl. São Paulo Ed. Sarvier.

Machado, A. E. H.(2000), "Terapia Fotodinâmica; Princípio, Potencial de Aplicação e Perspectiva". *Nova Química*, v. 23, n. 2, p. 237-243.

Moor ACE (2000), "Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy". *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 57, p. 1-13.

Oliveira RDR, Maffei CML, Martinez R. (2001), "Infecção urinária hospitalar por leveduras do Gênero *Candida*". *Ver Med Brasil*, v. 41, n. 3, p. 231-235.

Polo L, Segalla A, Bertoloni G, Jori G, Schaffner K, Reddi E. (2000), "Polylysine-porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens", *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 59, p. 152-158.

Sen BH, Safavi KE and Spangberg LW. (1997), "Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues", *Achs oral Biol.*, vol. 42, n. 7, p. 513-520.

Sibata; C., H., Oleinick, N.,L.; Kinsella;T., J.(2000), "Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment", *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, p. 870-880.

Teichert MC., Jones JW., Usacheva MN., Biel MA. (2002), "Treatment of oral candidiasis with methylene bleu-mediated photodynamic therapy in na immunodeficient murine model" - *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 93, n 2, p. 155-160.

Tsafaty I, Sandovsky-Losica H, Mittelman L, Berdicevsky I, Segal E. (2000), "Cellular actin is affected by interaction with *Candida albicans*", *FEMS Microbiology Letters* 189, p. 225-232.

Wilson, M., Mia, N. (1993), "Sensitivation of *Candida-albicans* to Killing by Low-Power Laser-Light", *Journal of oral Pathology & Medicine*, v. 22, n. 8, p. 354-357, Sept.