

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA FOTODINÂMICA DO AZUL DE METILENO, AZUL DE TOLUIDINA E VERDE DE MALAQUITA CONTRA *Candida albicans*

Rossoni RD, Souza RC, Pereira CA, Jorge AOC, Junqueira JC

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista / UNESP, 12245-000, São José dos Campos, SP, Brasil,
rdrossoni@terra.com.br

Resumo- Terapia fotodinâmica consiste na combinação de um fotossensibilizador associado a uma fonte de luz que destroem células microbianas. O objetivo foi avaliar os efeitos da fotossensibilização do azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita por laser de baixa intensidade nas densidades de energia de 15,8, 26,3 e 39,5 J/cm² sobre *Candida albicans*. A partir de suspensões padronizadas de *C. albicans* foram realizados 120 ensaios para cada corante, divididos em quatro grupos de acordo com as seguintes condições experimentais: irradiação com laser e fotossensibilizador, irradiação somente com laser, tratamento somente com o fotossensibilizador, e ausência de laser e fotossensibilizador. A seguir, foram realizadas diluições seriadas e semeaduras para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey. Todos os fotossensibilizadores testados foram eficazes na redução de *C. albicans* após a realização da terapia fotodinâmica. A redução de UFC/mL foi entre 0,54 log₁₀ e 3,07 log₁₀ e foi dependente da densidade de energia testada. Concluiu-se que todos os fotossensibilizadores estudados foram eficazes na terapia fotodinâmica contra *C. albicans*.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, *Candida albicans*, azul de metileno, azul de toluidina, verde de malaquita

Área do Conhecimento: Odontologia

Introdução

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota comensal da cavidade bucal, entretanto na presença de fatores predisponentes podem se tornar patogênicas, produzindo infecções que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas (DE REPENTIGNY et al., 2000, LEUNG et al., 2000). Candidose oral é uma infecção oportunista que acomete principalmente pessoas imunocomprometidas. *C. albicans* é ainda considerada o principal fator etiológico nesta infecção e estima-se que seja de 70% a 80% dos microrganismos isolados oriundos de lesões na mucosa bucal (LI et al., 2007).

Durante os eventos de colonização e infecção, vários fatores de virulência são expressos pelas espécies de *Candida*, incluindo aderência do fungo aos tecidos do hospedeiro e secreção enzimática (CALDERONE et al., 2001). Muitas espécies de *Candida* secretam hidrolases, incluindo proteinases e fosfolipases (GHANNOUM et al., 2000) e produzem metabólitos ácidos, como os carboxílicos, além de outras substâncias tóxicas. Esses produtos podem lesar e interromper as funções celulares (HANNULA et al., 2001). Atualmente, muitos compostos antifúngicos estão disponíveis no mercado, entretanto esses

medicamentos possuem limitações, por apresentarem toxicidade ao hospedeiro e por desenvolverem resistência pelos microrganismos do gênero *Candida* (DONNELLY et al., 2008).

O aumento de casos de infecções causadas por cepas de *Candida* e conseqüentemente a utilização excessiva de antimicrobianos, favoreceu nas últimas décadas a resistência dessas leveduras aos agentes antifúngicos convencionais (PINTO et al., 2008). Esses agentes antifúngicos demonstram efeito mais fungistático do que fungicida, resultando em uma profilaxia inadequada (DONNELLY et al., 2007). Assim torna-se necessário o estudo de métodos alternativos de controle desses microrganismos, como a terapia fotodinâmica (TFD). A TFD é baseada na ativação de fotossensibilizadores por luz visível em baixas doses, com comprimento de onda apropriado, gerando espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete e superóxidos. Estes produtos são citotóxicos para a célula alvo, levando a morte do microrganismo por causarem desordens na parede celular e danos no DNA (ROMANOVA et al., 2003).

Como a maioria das espécies microbianas não apresenta componentes fotossensíveis endógenos, torna-se importante o uso de um fotossensibilizador, com capacidade de atrair para si a luz e iniciar a formação de radicais livres

(WILSON et al., 1992). Desta forma, a ação de diversos fotossensibilizadores, principalmente corantes fenotiazínicos, porfirinas e ftalocianinas, têm sido investigadas. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar os efeitos da fotossensibilização do azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita por laser de baixa intensidade nas densidades de energia de 15,78, 26,31 e 39,47 J/cm² sobre a viabilidade de *Candida albicans*.

Metodologia

Foi preparada uma suspensão padronizada de *C. albicans* (ATCC 18804) contendo 10⁶ células/mL. Para isso, *C. albicans* foi semeada em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubada a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, o microrganismo foi cultivado em caldo Sabouraud (Difco, Detroit, USA) e incubado a 37°C por 16 horas. Posteriormente, o crescimento fúngico foi centrifugado a 1300 xg durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido e o sedimento ressuspenso em 5 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%).

A contagem do número de células na suspensão foi realizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,680.

A partir da suspensão padronizada de *C. albicans*, foram realizados 360 ensaios, sendo 120 para cada fotossensibilizador testado. Esses ensaios foram divididos de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo L+F+= irradiado com laser na presença do fotossensibilizador; Grupo L+F= irradiado somente com laser; Grupo L-F+= tratado somente com o fotossensibilizador; Grupo L-F= não irradiado pelo laser e sem fotossensibilizador.

Para a sensibilização de *C. albicans* foram utilizados os corantes azul de metileno, azul de toluidina e verde malaquita (Synth, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,1 mg/mL para cada um. As soluções de cada fotossensibilizador foram preparadas pela dissolução dos corantes em solução fisiológica (NaCl 0,85%) e filtração em membrana esterilizada com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, São Paulo, Brasil). Após a filtração as soluções com os fotossensibilizadores foram mantidas em ambiente escuro.

A fonte de luz utilizada foi o laser de Arseneto de Gálio Alumínio (Easy Laser, Clean Line, Taubaté, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm.

De acordo com os grupos experimentais, previamente descritos, foram adicionados 0,1 mL

de suspensão de *C. albicans* 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 L+F+ e L-F+ receberam 0,1 mL de fotossensibilizador, já para os ensaios dos grupos L+F- e L-F- foram adicionados 0,1 mL de solução fisiológica. Em seguida, todas as placas foram agitadas durante 5 minutos em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). Após esse período, o conteúdo dos poços das placas dos grupos L+F+ e L-F+ foram irradiados de acordo com o protocolo apresentado (Tabela 1). A irradiação foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar com a luz apagada, onde foi utilizado um anteparo negro fosco com orifício de diâmetro coincidente ao da entrada do poço evitando assim o espalhamento de luz.

Após a irradiação foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA).

Decorrido o tempo de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e os números obtidos foram transformados em logaritmo (Log). Os resultados foram submetidos a análise de variância ANOVA e teste de Tukey, considerando-se diferença estatística quando $p \leq 0,05$, com o auxílio do software Minitab (Inc. PA, USA).

Tabela 1- Protocolo utilizado para irradiação com laser AsGaAl (660 nm)

Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia (J)	Potência (mW)	Área Irradiada (cm ²)	Tempo (s)
15,8	6	35	0,38	171s
26,3	10	35	0,38	285s
39,5	15	35	0,38	428s

Resultados

A fotossensibilização do azul de metileno, azul de toluidina e verde malaquita por laser de baixa intensidade promoveu redução no número de UFC/mL (Log) de *C. albicans*. O laser de baixa intensidade sozinho também promoveu redução no número de *C. albicans*. Esses resultados indicam que a terapia fotodinâmica apresentou efeito antifúngico sobre *C. albicans*.

Os grupos L+F- exibiram número de UFC/mL (Log) superiores aos grupos L+F+ e inferiores aos grupos L-F- para todas as condições experimentais. Esses resultados indicam que o uso isolado do laser também teve algum efeito sobre *C. albicans*. Os resultados dos grupos L-F+ foram semelhantes aos grupos L-F- em todos os fotossensibilizadores e densidades de energia estudados, demonstrando que os fotossensibilizadores usados isoladamente não apresentaram efeito fungicida.

A taxa de redução de UFC/mL (Log) de *C. albicans* observada nos grupos L+F+ em relação aos grupos L-F-, foi maior nos experimentos com azul de toluidina em relação aos demais fotossensibilizadores para todas as densidades de energia observadas. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os corantes estudados. Além disso a redução microbiana aumentou com o aumento da densidade de energia do laser. A maior redução de *C. albicans* foi de 3 log₁₀ com a fotossensibilização do azul de toluidina na densidade de energia de 39,5 J/cm² (Tabela 2).

Tabela 2- Médias de redução de *Candida albicans* (log₁₀) obtidas nos grupos submetidos a irradiação laser na presença do fotossensibilizador (L+F+) em relação aos grupos sem exposição ao laser e ao fotossensibilizador (L-F-)

Fotossensibilizador	15,8 J/cm ²	26,3 J/cm ²	39,5 J/cm ²
Azul de Toluidina	0,70 ± 0,16	1,19 ± 1,25	3,07 ± 1,67
Azul de Metileno	0,56 ± 0,46	0,82 ± 0,18	2,71 ± 1,35
Verde de Malaquita	0,54 ± 0,18	0,79 ± 0,20	2,25 ± 1,99
P	0,431	0,441	0,555

Não houve diferença estatisticamente significativa (ANOVA, p< 0,05)

Discussão

Candida albicans é um microrganismo isolado com frequência da cavidade bucal de indivíduos saudáveis. Esta levedura é o principal responsável pelas diferentes formas de candidose bucal, superficial ou sistêmica (RAMAGE et al., 2005). Além disso, existem relatos de isolamento de *C. albicans* em biofilmes dentários (NIKAWA et al.,

2003), o que demonstra que estas leveduras podem estar correlacionadas não somente no desenvolvimento de candidoses bucais, mas também na patogênese de cáries e doenças periodontais (JÄRVENSIVU et al., 2004). Devido ao aumento da resistência de cepas de *Candida* spp. aos antifúngicos disponíveis e aos efeitos colaterais causados por eles, têm sido registrado uma procura por novas alternativas como a TFD (COLOMBO et al., 1995; PERVAIZ et al., 2001).

No presente estudo a fotoativação pelos fotossensibilizadores azul de metileno, azul de toluidina ou verde malaquita na concentração de 0,1 mg/mL, seguida pela irradiação do laser de baixa potência AsGaAl nas densidades de energia de 15,8, 26,3 e 39,5 J/cm² reduziu o número de UFC/mL (Log) de *C. albicans*. Esses resultados estão de acordo com vários trabalhos (WILSON e MIA 1993; SOUZA et al., 2006; GIROLDI et al., 2007; PRATES et al., 2007). Wilson e Mia (1993) realizaram fotossensibilização do azul de toluidina por laser de He-Ne (632,8 nm) e encontraram redução de UFC/mL de *C. albicans* em 77%, *C. tropicalis* em 65%, *C. stellatoidea* em 63% e *C. Kefyr* em 40%. No estudo realizado por Souza et al. (2006), a associação do fotossensibilizador azul de metileno e laser InGaAlP (685 nm) provocaram percentuais de redução de 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis*, 91,6% para *C. krusei* e 82,3% para *C. tropicalis*. Recentemente, Giroldi et al. (2007), observaram decréscimo significativo no crescimento de *C. albicans* quando o fotossensibilizador azul de metileno foi associado a um laser diodo (684 nm). No único trabalho realizado, até o presente momento, com o fotossensibilizador verde malaquita combinado com laser AsGaAl (660 nm e 9 J/cm²), Prates et al. (2007) obtiveram uma redução de 2-3 log₁₀ de bactérias da espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Neste trabalho, as maiores reduções de UFC/mL (Log) após a TFD foram obtidas com o fotossensibilizador azul de toluidina, seguido por azul e metileno e verde malaquita. Entretanto, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Usacheva et al. (2001) avaliaram a eficácia dos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina associados aos lasers de argônio (630 nm) e diodo (664 nm) sobre diferentes bactérias. Os autores observaram que o fotossensibilizador azul de toluidina exibiu atividade bactericida maior do que o azul de metileno, para os dois lasers utilizados. A inativação completa das bactérias foi alcançada com o azul de toluidina em concentrações 1,5 a 7 vezes menores que as do azul de metileno. Os autores sugerem que a solubilidade do azul de toluidina seja mais elevada na região hidrofóbica da membrana e assim este

fotossensibilizador poderia interagir mais facilmente com a membrana bacteriana do que o azul de metileno. Em consequência, a concentração azul de toluidina dentro da célula do microrganismo deve ser significativamente mais elevada do que aquela do azul de metileno.

A redução de UFC/mL (Log) de *C. albicans* aumentou conforme foram utilizadas densidades de energia mais altas do laser de 15,8 J/cm² a 39,5 J/cm² para todos os fotossensibilizadores avaliados. Esses resultados também foram descritos por Hamblin et al. (2002) e Gad et al. (2004). Estes autores verificaram que um acréscimo na densidade de energia de 10 J/cm² até 40 J/cm² resultaram numa significativa redução de bactérias Gram – positivas (GAD et al., 2004) e bactérias Gram – negativas (HAMBLIN et al., 2002).

Em relação aos efeitos isolados do laser (Grupo L+F-), também foram observadas reduções de UFC/mL (Log) de *C. albicans*, sugerindo uma possível susceptibilidade desta levedura ao laser. Maver-Biscanim et al. (2005) demonstraram que o laser de baixa potência apresentou efeito fungicida mesmo na ausência do fotossensibilizador. Esses autores encontraram diminuição da inflamação do palato em pacientes com estomatite por prótese após terapia com laser (comprimento de onda de 685 nm, densidade de energia de 3 J/cm² e potência de 30 mW) aplicada por 5 dias consecutivos. Além disso, menor número de leveduras foi isolado do palato e da base da prótese depois do uso do laser. *In vivo* esta observação poderia ser interpretada sendo resultado da resposta imune do hospedeiro à terapia fotodinâmica, este estudo indica um efeito direto na levedura. A susceptibilidade intrínseca de algumas espécies de leveduras à irradiação do laser, como observada no estudo atual para *C. albicans* e igualmente por Souza et al. (2006) para *C. tropicalis*, sugere a presença de fotossensibilizadores endógenos nestes microrganismos.

O efeito isolado dos fotossensibilizadores na ausência de irradiação laser (Grupos L-F+) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controle (Grupos L-F-). Estes resultados sugerem que tanto azul de toluidina, como azul de metileno e verde malaquita não possuem efeito citotóxico para *C. albicans*. Porém tais dados divergem de relatos de estudos nos quais, sem a irradiação de luz, o azul de metileno e o azul de toluidina demonstraram atividade antifúngica natural (USACHEVA et al., 2001, WAINWRIGHT e CROSSLEY 2002, CALZAVARA-PINTON et al., 2005). Por outro lado, Prates et al. (2007) não encontraram efeito bactericida quando o fotossensibilizador verde malaquita foi utilizado isoladamente em bactérias

da espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

As divergências encontradas no presente estudo, em relação à literatura, devem-se a ausência de parâmetros pré-definidos para utilização da TFD, o que torna difícil uma comparação fidedigna dos resultados obtidos entre os diferentes trabalhos. Além disso, a concentração, o tempo de incubação e o tipo de fotossensibilizador, assim como o estado fisiológico dos microrganismos, período de exposição e densidade de energia do laser, podem igualmente influenciar os resultados de TFD (TEICHERT et al. 2002).

Conclusão

Em resumo, conclui-se que a irradiação do laser de baixa intensidade e a terapia fotodinâmica utilizando o azul de metileno, o azul de toluidina ou o verde da malaquita apresentaram efeito fungicida sobre *C. albicans*.

Agradecimentos

Agradecemos pelo suporte financeiro à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo 06/54896-1).

Referências

- CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol 9: 327-335, 2001.
- CALZAVARA-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.
- COLOMBO, A.L; BARCHIESI, F; MCGOUGH, D.A; RINALDI, M.G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol 33:535-540, 1995.
- 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 68:3172-3179, 2000.
- DONNELLY, R.F; MCCARRON, P.A; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res 163:1-12, 2008.

- 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.
- GAD, F; ZAHRA, T; HASAN, T; HAMBLIN, M.R. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of Gram-positive pathogenic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 48: 2173-2178, 2004.
- GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 13:122-143, 2000.
- 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.
- HAMBLIN, M.R; O'DONNELL, D.A; MURTY, N. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. J Antimicrob Chemother 49: 941-951, 2002.
- HANNULA, J; DOGAN, B; SLOTS, J; OKTE, E; ASIKAINEN, S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. Oral Microbiol Immunol 16:113-118, 2001.
- JÄRVENSIVU, A; HIETANEN, J; RAUTEMMA, R; SORSA, T; RICHARDSON, M. *Candida* yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. Periodon Oral Microbiol 10:106-112, 2004.
- KOWALTOWSKI, A.J; TURIN, J; INDIG, G.L; VERCESI, A.E.C. Mitochondrial effects of triarylmethane dyes. J Bioenerg Biomemb 31:581-590, 1999.
- LEUNG, W.K; DASSANAYAKE, R.S; YAU, J.Y.Y; JIN, L.J; YAM, W.C; SAMARANAYAKE, L.P. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. J Clin Microbiol 38:2219-2226, 2000.
- LI, L; REDDING, S; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. J Dent Res 86:204-215, 2007.
- 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.
- NIKAWA, H; YAMASHIRO, H; MAKIHIRA, S. *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. Mycoses 46:471-478, 2003.
- PERVAIZ, S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. FASEB J 15:612-617, 2001.
- PINTO, P.M; WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B; LYON, J.P. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. obtained from patients with different predisposing factors to candidosis. Microbiol Res 163:579-585, 2008.
- 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.
- RAMAGE, G; SAVILLE, S.P; THOMAS, D.P; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell 4:633-638, 2005.
- ROMANOVA, N.A; BROVKO, L.Y; MOORE, L. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. Appl Environ Microbiol 69:6393-6398, 2003.
- 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.
- TEICHERT, M.C; JONES, J.W; USACHEVA, M.N; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral. Radiol Endod 93:155-160, 2002.
- USACHEVA, M.N; TEICHERT, M.C; BIEL, M.A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue O bacterial efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. Lasers Surg Med 29:165-173, 2001.

- WAINWRIGHT, M; CROSSLEY, K.B. Methylene blue - a therapeutic dye for all seasons. J Chemother 14: 431-443, 2002.
- WILSON, M; DOBSON, J. Lethal photosensitization of oral anaerobic-bacteria. Clin Infect Dis 16: 414-415, 1993.
- WILSON, M; DOBSON, J; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser irradiation. Curr Microbiol 25:77-81, 1992.
- WILSON, M; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. J Oral Pathol Med 22:354-357, 1993.
- YAMAOKA, K; SASAI, R. Pulsed electric linear dichroism of triphenylmethane dyes adsorbed on montmorillonite K10 in aqueous media. J Colloid Interf Sci 225:82-93, 2000.