



**Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares  
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans*  
*in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica**

**Luis Cláudio Suzuki**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientadora: Dra. Martha Simões Ribeiro

São Paulo

2009



**Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares  
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans*  
*in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica**

**Luis Cláudio Suzuki**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientadora: Dra. Martha Simões Ribeiro

São Paulo

2009

*À minha esposa e companheira, que durante todo esse trabalho agüentou meus surtos, normais de todas as teses com bom humor e cuidando do nosso maior orgulho no período de maior estresse: minha singela dedicatória.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo exemplo ministrado durante minha existência, exaltando importância na carreira acadêmica, certamente se não fosse por eles nem pensaria na possibilidade de chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Cássia e Ricardo pelo exemplo direto imposto a mim, sem o sucesso deles talvez eu teria desistido de muitas coisas. Muito obrigado!

À minha orientadora Dra. Martha Simões Ribeiro, sempre confiando em mim e dando essa excelente oportunidade. Sem ela eu nunca teria me transformado em um pesquisador.

Ao meu filho Luis Eduardo Martins Suzuki, que me deu forças, orgulho e me impulsionou para que esse trabalho fosse executado. Esse trabalho é para você!

Ao IPEN, instituto nobre que enaltece grandiosamente meu trabalho.

Ao Renato Araújo Prates, mais do que um amigo e padrinho de casamento, conselheiro, colega de trabalho e prestativo colaborador desse trabalho.

À Ilka Tiemi Kato, além de madrinha de casamento uma grande amiga e importantíssima colaboradora do meu mestrado.

Ao Dr. Eriques, por fornecer a *Candida albicans* ATCC 90028 e sempre prestativo: um grande amigo e colaborador deste trabalho.

Ao Dr. Aécio Massayoshi Yamada Jr. por me introduzir no IPEN, me ensinando e ajudando no meu crescimento nesse mestrado. Um incentivador dentro do IPEN.

À Profa. Lília Coronato Courrol, pela ajuda e fornecimento de conhecimento, materiais e conselhos no seminário de área.

Ao Prof. Anderson Zanardi de Freitas e seus alunos Marcus e Marcelo, pelas leituras no OCT e ajuda na interpretação dos resultados.

À Marilu, Raul, Lourdes, Elisa, Nelson, Tatá, Bosco e Yolanda (*in memorian*), por criarem meu filho durante a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do IPEN, Melissa, Adriana, Aguinaldo, Sílvia, Daniela, Karin, Daniel, Cláudia, Patrícia, Cristina, Alessandro, Daiane, Antônio, Priscila, Thiagos, Moisés, Felipe, Juca e Cacau, por tornarem minha jornada de pesquisa dentro do CLA muito mais agradável do que eu imaginaria.

Aos sempre muito prestativos agentes Luis, Rubens e Amâncio: amizade e companheirismo durante minhas solitárias visitas nos fins de semanas de experimentos.

Aos Profs. Niklaus Ursus Wetter, Nilson Dias Vieira Junior e Denise Maria Zezell, por me aconselharem diversas vezes e me acolherem muito calorosamente dentro do CLA.

Ao Prof. Gessé Eduardo Calvo Nogueira, chefe da divisão de aplicação de lasers. Uma pessoa muito estimada por todos no CLA.

À Prof<sup>a</sup> Sonia Licia Baldochi, gerente do CLA.

Doralice, Elsa e Sueli, minhas amigas nesse instituto.

À dona Marta, por me acolher no CLA e sempre me fornecer um café quando eu mais necessitava durante meus experimentos.

**“A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces.”**

**Aristóteles**

**“Se alguém procura a saúde, pergunta-lhe primeiro se está disposto a evitar no futuro as causas da doença; em caso contrário, abstém-te de o ajudar.”**

**Sócrates**

# DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME FORMADO POR *Candida albicans* *IN VITRO* PARA ESTUDO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

Luis Cláudio Suzuki

## RESUMO

A terapia fotodinâmica, do inglês *photodynamic therapy* (PDT) é uma fototerapia baseada na utilização de um fotossensibilizador (FS) na presença da luz em baixa intensidade em comprimento de onda ressonante à absorção do FS e que podem sensibilizar sistemas biológicos, gerando espécies reativas de oxigênio. Estudos mostram que a PDT apresenta um efeito letal em *Candida albicans*. O biofilme formado por *C. albicans* é a causa mais freqüente de infecções associadas a cateteres, possuindo uma comprovada resistência a antifúngicos, sendo que a remoção do cateter colonizado é quase sempre necessária. No entanto, poucos trabalhos na literatura relatam o comportamento e a resposta de *C. albicans* organizado em biofilme frente à PDT. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver uma metodologia para formação *in vitro* de biofilme de *C. albicans*, verificar a sensibilidade do biofilme de *C. albicans* frente à terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando como FS o azul de metileno (AM) e a hipocrelina B:La<sup>+3</sup> e analisar o biofilme através da Tomografia de Coerência Óptica (OCT) antes e depois da PDT. Para a formação do biofilme, foram confeccionados discos de silicone elastomérico oriundos de cateteres. Os fotossensibilizadores foram diluídos em solução de PBS, sendo que o AM teve duas concentrações diferentes testadas no biofilme: 100µM e 1mM e a HBLa<sup>+3</sup> somente uma de 10µM. A irradiação de ambos os corantes com os microrganismos foi feita através de dois LEDs diferentes, um vermelho com  $\lambda = 630\text{nm} \pm 20\text{nm}$  e outro azul com  $\lambda = 460\text{nm} \pm 30\text{nm}$ . Foi realizada uma curva de fração de sobrevivência em função do tempo de irradiação de cada amostra com biofilme e de suspensão do microrganismo em formato de leveduras para verificar a susceptibilidade destes frente à PDT. As leveduras apresentaram 100% de redução em ambos os fotossensibilizadores, porém em tempos de irradiação diferentes (30s para a HBLa<sup>+3</sup> e 6 min para o AM na concentração de 100µM). Quando a terapia foi aplicada em biofilme, o AM em 100µM não apresentou nenhuma redução significativa, enquanto que em concentração de 1mM houve redução de 100% após 6 min de irradiação. Já a HBLa<sup>+3</sup> mostrou pouca redução em biofilme na concentração de 10µM (menos de 1 log de redução). Concluímos que o microrganismo *C. albicans* se organizou em biofilme padronizado nos discos elastoméricos oriundos de cateteres e através do OCT, o biofilme medido apresentou 110µm de espessura, informando uma mudança óptica ao ser submetido pela PDT com o AM 1mM.

# ***Candida albicans* BIOFILM DEVELOPMENT *IN VITRO* FOR PHOTODYNAMIC THERAPY STUDY**

**Luis Cláudio Suzuki**

## **ABSTRACT**

Photodynamic therapy (PDT) is a phototherapy based on the use of a photosensitizer (PS) in the presence of low intensity light with resonant wavelength of absorption of the PS and biological systems that can raise awareness, generating reactive oxygen species. Studies show that PDT has a lethal effect on *Candida albicans*. The biofilm formed by *C. albicans* is the cause of infections associated with medical devices such as catheters, with a proven resistance to antifungal agents, and the removal of the catheter colonized almost always is necessary. However, few studies in literature report the behavior and response of biofilm organized by *C. albicans* against PDT. The aims of this study were to develop a methodology for *in vitro* biofilm formation of *C. albicans*, evaluate the sensitivity of the biofilm of *C. albicans* to antimicrobial photodynamic therapy using PS as the methylene blue (MB) and hypocrellin B: La<sup>+3</sup> (HBLa<sup>+3</sup>) and analyze the biofilm by Optical Coherence Tomography (OCT). For biofilm formation, discs were made from elastomeric silicone catheters. The PS were dissolved in solution of PBS, and the MB had two different concentrations tested in the biofilm: 100µM and 1mM; HBLa<sup>+3</sup> only one of 10µM. The irradiation of both dyes with the microorganism was done by two different LEDs, one with red emission at  $\lambda = 630\text{nm} \pm 20\text{nm}$  and the other one blue emission at  $\lambda = 460\text{nm} \pm 30\text{nm}$ . We performed a curve of survival fraction versus time of irradiation of each sample with biofilm and suspension of the microorganism in the yeast form to verify the susceptibility of the front PDT. The yeast showed 100% reduction using both PS, but at different times of irradiation (30s to HBLa<sup>+3</sup> and 6 min for the MB at 100µM). When the therapy was applied in biofilm, the MB 100µM did not show any significant reduction, while at concentration of 1mM was reduced by 100% after 6 min of irradiation. The HBLa<sup>+3</sup> biofilm group showed a lower reduction in the concentration of 10µM in biofilm (less than 1 log reduction). OCT was performed for visualization and measurement of the thickness of the biofilm formed. The composition of the extracellular matrix of the biofilm polymer hindered the diffusion of PS inside, requiring higher concentrations of MB to disseminate it and to obtain satisfactory reduction for PDT. HBLa<sup>+3</sup> group, in higher concentration, formed aggregates difficulting its use for PDT. We conclude that the organism *C. albicans* was organized in biofilms in a standardized way using elastomeric discs from catheters and the OCT showed that the biofilm measured 110µm at thickness, showing an optical change when subjected to the PDT with MB 1mM.



## SUMÁRIO:

	<b>Página</b>
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 ESTUDO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM LEVEDURAS	12
3.2 MEIO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	14
3.3 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO – DISCOS DE SILICONE ELASTOMÉRICO	15
3.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME	17
3.5 TERAPIA FOTODINÂMICA EM BIOFILME	19
3.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	21
3.7 ANÁLISE DA TERAPIA FOTODINÂMICA ATRAVÉS DA OCT	22
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

## LISTA DE TABELAS:

### Página

Tabela 1 Grupos utilizados para o estudo. O grupo FS se refere ao grupo que recebeu somente o fotossensibilizador por 10 minutos.....	13
Tabela 2: Grupos utilizados para o estudo.....	19
Tabela 3: Parâmetros utilizados na PDT em biofilme.....	21
Tabela 4. Fluências utilizadas nos grupos que foram submetidos à terapia fotodinâmica.....	21

## LISTA DE FIGURAS:

	<b>Página</b>
Figura 1. Espectro de absorção do azul de metileno no espectro visível. Nota-se que com o aumento da concentração há uma dimerização da molécula.....	6
Figura 2. Espectro de absorção da Hipocrelina B e da Hipocrelina B: La <sup>+3</sup> . Nota-se que a incorporação do íon La <sup>+3</sup> produz um <i>red shift</i> na banda de absorção do FS.....	7
Figura 3. Células aglutinadas, formando o <i>pellet</i> .....	14
Figura 4. Cateter elastomérico.....	16
Figura 5. Planificação dos cateteres.....	16
Figura 6. Lixa para aumentar rugosidade das amostras.....	16
Figura 7. Detalhe da lâmina circular.....	16
Figura 8. Discos cortados com 6,0 mm de diâmetro.....	16
Figura 9: Cronograma de crescimento do biofilme durante 5 dias.....	18
Figura 10. Amostras sendo irradiadas em placas de Petri com $\lambda=630\text{nm} \pm 20\text{nm}$ (A) e $460\text{nm} \pm 30\text{nm}$ (B).....	20

Figura 11. Biofilme de *C. albicans* formado em discos de silicone elastoméricos. A seta amarela indica uma hifa do biofilme e a seta vermelha indica uma levedura.....24

Figura 12. Fração de sobrevivência de *C. albicans* em forma de blastóporo e organizada em biofilme. Note que em concentrações iguais e sob os mesmos parâmetros de irradiação, o comportamento do biofilme e do blastóporo quando submetidos à terapia fotodinâmica são diferentes. Barras de erro representam o desvio padrão.....26

Figura 13. Fração de sobrevivência de *C. albicans* após PDT utilizando como fotossensibilizadores AM a 1mM e 0,1mM e HB:La<sup>+3</sup> em 10µM.....27

Figura 14. Fração de sobrevivência de biofilme de *C. albicans* após PDT utilizando como fotossensibilizadores AM a 100µM, a 1mM e HB:La<sup>+3</sup> em 10µM.....28

Figura 15. Imagem obtida pela técnica de OCT do biofilme formado por *C. albicans* em discos de silicone elastomérico. Note as setas vermelhas indicando a espessura do biofilme.....29

Figura 16. OCT realizada antes e depois da PDT com o AM 1mM. A camada superficial aonde a luz foi mais transmitida é aonde a água foi mais retida pelas hifas antes da PDT (seta vermelha). Note o aumento da espessura da camada aonde a luz foi mais transmitida, indicada pela seta amarela após a PDT.....30

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS:

AM – Azul de metileno

AsGaAl - Arseneto-Gálio-Alumínio

AT – Azul de toluidina

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH – Etanol

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FS - Fotossensibilizador

°C – Grau Celsius

HB – Hipocrelina B

HB: La<sup>+3</sup> – Hipocrelina B: Lantânio

HeNe – Hélio-Neônio

h - Hora

J/cm<sup>2</sup> – Joules por centímetro quadrado

L-FS- - Grupo controle

L+FS- - Grupo Irradiado sem fotossensibilizador

L-FS+ - Grupo não irradiado e exposto ao fotossensibilizador

L+FS+ - Grupo submetido à terapia fotodinâmica

La<sup>+3</sup> – Íon Lantânio

LaCl<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O – Cloreto de lantanídeo

λ – Comprimento de onda

LED – *Light Emmiting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

± - Mais ou menos

μ – Mícron

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

μM – Micromolar

mg/mL – Miligrama por mililitro

mL – Mililitro

mW/cm<sup>2</sup> – Microwatt por centímetro quadrado

min. - Minuto

M – Molar

nm – Nanômetro

OCT – *Optical Coherence Tomography* (Tomografia por Coerência Óptica)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PDT – *Photodynamic Therapy* (Terapia Fotodinâmica)

PF – Photofrin

RPM – Rotações por minuto

SE – Silicone elastomérico

UFC/mL – Unidade formadora de colônia por mililitro

UV – Ultravioleta

VM – Verde de malaquita

## 1.Introdução

A terapia fotodinâmica, do inglês *photodynamic therapy* (PDT) é uma fototerapia baseada na utilização de substâncias que são ativadas na presença da luz gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) e que podem sensibilizar sistemas biológicos<sup>1-10</sup>. As células que são consideradas alvos são coradas pelo fotossensibilizador (FS) e irradiadas por luz em comprimento de onda ressonante à absorção do corante. O processo fotoquímico rapidamente gera espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxidos, radicais hidroxilas, íons superóxidos e oxigênio singlete, sendo este último apontado como o maior responsável pelo dano celular no processo fotodinâmico. Essa técnica apresenta bons resultados contra um grande número de patógenos, inclusive microrganismos resistentes a antimicrobianos<sup>6, 10-13</sup>. Estudos mostram que a PDT apresenta um efeito letal em *Candida albicans*<sup>2, 14-16</sup>. No entanto, poucos trabalhos na literatura relatam o comportamento e a resposta de *C. albicans* organizado em biofilme frente à PDT, utilizando como FS o azul de metileno.

O fotossensibilizador e o comprimento de onda da fonte geradora de luz devem ser observados na utilização da PDT, pois a reação fotoquímica só ocorre quando uma série de parâmetros é obedecida. O fotossensibilizador deve ser irradiado dentro da sua banda de absorção, gerando o efeito iniciador da terapia fotodinâmica<sup>1</sup>.

*C. albicans* é um fungo normalmente encontrado no corpo humano sem, contudo, ocasionar um processo patológico em indivíduos saudáveis. Este microrganismo pode facilmente ser recuperado da mucosa oral, trato gastrointestinal, vagina e pele<sup>17</sup>. Entretanto, sob certas circunstâncias, este microrganismo pode causar uma infecção,

conhecida como candidose, que acomete principalmente pacientes imunodeficientes, podendo evoluir para infecção sistêmica<sup>17</sup>.

Além disso, a incidência de infecções hospitalares por fungos tem aumentado expressivamente nas últimas décadas. Até 60% dos óbitos oriundos de infecções hospitalares são causadas por fungos<sup>18</sup>. Neste contexto, as espécies do gênero *Candida* têm sido os agentes mais frequentemente encontrados, correspondendo à cerca de 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar e são a quarta causa de infecção da corrente sanguínea (precedida apenas pela estafilococcus coagulase-negativa, *Staphylococcus aureus* e enterococcus), conduzindo ao óbito em torno de 25 a 38% dos pacientes que desenvolvem candidemia<sup>18, 19</sup>.

A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Um dos principais mecanismos de virulência deste fungo é a sua versatilidade de adaptação, e capacidade de adesão em sítios variados. Principalmente a formação, em uma superfície, de comunidades microbianas denominadas biofilme<sup>20, 21</sup>.

O biofilme formado por fungos, especialmente por *C. albicans*, é a causa de infecções associadas a dispositivos médicos, como os catéteres<sup>21</sup>, geralmente formados por elastômeros. Este microrganismo é o principal patógeno encontrado em casos de infecções hospitalares, sendo que a remoção do cateter colonizado é quase sempre necessária. O biofilme formado nessas condições pode acarretar uma disseminação de patógenos na corrente sanguínea, o que implica alta morbidade e mortalidade dos pacientes hospitalizados<sup>21</sup>. O crescente número de pacientes imunocomprometidos, sobretudo



transplantados, eleva o grau de atenção a infecções causadas por leveduras patogênicas oportunistas. Em sua maioria, estes patógenos são do gênero *Candida spp.* Dados revelam que 60% das espécies de leveduras isoladas de pacientes com infecções por fungos, são da espécie *C. albicans*, o que torna a infecção por este microrganismo a mais prevalente dentre os fungos<sup>22</sup>. Estas infecções são particularmente sérias, pois as células organizadas em biofilme são resistentes a antifúngicos<sup>21, 23-25</sup>. A resistência a antifúngicos é adquirida no início da formação do biofilme, e aparentemente é regida por diferentes mecanismos em biofilme novo e maduro<sup>21</sup>. Sendo assim, novas terapias são necessárias para eliminar o biofilme<sup>2</sup>.

O biofilme é uma comunidade estruturada de células de microrganismos, embebida em uma matriz extracelular polimérica e aderente a uma superfície inerte ou viva formando uma estrutura tridimensional<sup>25</sup>. Essas células inicialmente se aderem à superfície, podendo ser a mucosa ou um dispositivo médico e, depois começam a produzir a matriz extracelular polimérica<sup>26</sup>. Com o amadurecimento do biofilme, sua estrutura possui uma arquitetura característica que possibilita uma propriedade fenotípica distinta da sua forma planctônica, principalmente a resistência a antimicrobianos. As maiores vantagens dos microrganismos se organizarem em comunidades consistem na maior facilidade de captação de nutrientes, favorecendo um crescimento mais ordenado da comunidade e uma maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e resistência a antimicrobianos, conforme já citado acima.

A composição do biofilme de *C. albicans* consiste em uma mistura de células hospedeiras, células em forma de leveduras, pseudohifas e hifas, além da matriz extracelular composta de proteínas e polissacarídeos. Seu desenvolvimento se dá em três

fases que dura aproximadamente 24-48 horas. Na fase inicial, a célula planctônica na forma de levedura adere na superfície do substrato. Essa aproximação das leveduras no substrato pode ser aleatória ou atraída por uma quimiotaxia. Após a aproximação das células, existe uma interação destas com a superfície sendo hidrofóbica e eletrostática. A produção de adesinas pela levedura e a aderência de plaquetas e fibrinas do hospedeiro no substrato ajudam ainda mais na adesão primária. Na fase secundária, as células aderidas proliferam formando microcolônias, e começam a produzir a matriz extracelular. Neste momento existe o aparecimento de mecanismos de comunicação intercelulares que leva a uma expressão diferencial de genes. Esses genes são responsáveis na transição de leveduras para hifas, na arquitetura da parede celular, na coesividade do biofilme dada pela matriz. E por último, quando as células começam a se confluírem, a rede formada começa a ser constituída de uma transição de células diferenciadas em pseudohifas, hifas e leveduras, tudo envolvido pela matriz extracelular polimérica e promovendo um crescimento tridimensional<sup>21</sup>.

Modelos *in vitro* foram utilizados para mostrar os estágios de desenvolvimento e processos para a formação do biofilme de *C. albicans*. Atualmente está claro que a interação célula-substrato e célula-célula; além da diferenciação em hifas e produção de matriz extracelular, são passos chaves para o desenvolvimento e maturação do biofilme<sup>25</sup>. Alguns autores ressaltam a facilidade de adesão primária em substratos hidrofóbicos, como elastômeros<sup>27, 28</sup>. Outro fator importante para essa aderência seria a topografia superficial do substrato. Em superfícies mais lisas a formação de biofilme é menor do que em superfícies rugosas<sup>17</sup>.

O biofilme formado pela *C. albicans* possui uma comprovada resistência a antifúngicos<sup>23, 24</sup> e sua patogenicidade está fortemente relacionada a infecções hospitalares. Em sua maioria, estas infecções evoluem para um quadro de disseminação na corrente sanguínea, podendo ocasionar a morte do paciente<sup>23</sup>. Alguns estudos descrevem a difícil penetração e difusão de fármacos no biofilme, com redução de concentração de até 80%, relatando ser este um dos fatores de resistência<sup>29, 30</sup>. A busca de novas modalidades terapêuticas é imperativa, e dentre estas novas propostas encontra-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana para redução de *C. albicans*<sup>15</sup> organizada em biofilme.

Alguns FS são bem conhecidos, com eficiência comprovada na literatura. O azul de metileno (AM) é um dos corantes com propriedades fotossensíveis mais estudadas<sup>15, 16, 31-34</sup>. Seu espectro de absorção mostra uma banda ressonante na região vermelha do espectro eletromagnético, entre 600nm e 670nm (fig 1). Em recente estudo, Prates *et al.* utilizaram o AM em concentração de 100µM para a redução de *C. albicans* e obtiveram em 6 minutos de irradiação com um laser de  $\lambda=660\text{nm}$  e com dose de  $108\text{J}/\text{cm}^2$  uma redução de 100%<sup>16</sup>. A escolha do FS citado foi também devido à sua baixa toxicidade em baixas concentrações. O aumento de concentração de AM pode interferir no seu espectro de absorção devido à sua dimerização (fig 1). Com a dimerização da molécula de AM, existe uma mudança nas propriedades de absorção, aumentando mais o pico de absorção na região de 600nm além de uma maior eficiência fotodinâmica<sup>35, 36</sup>. Porém, nada foi relatado sobre sua ação fotodinâmica em biofilme de *C. albicans*.

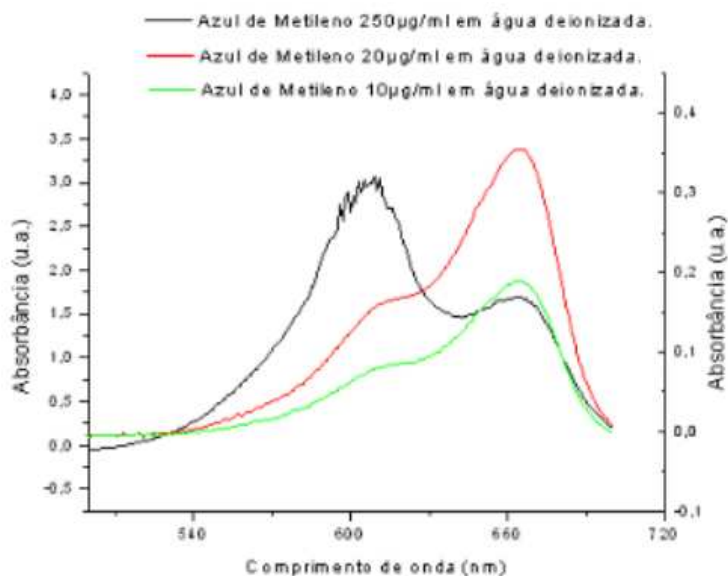


Figura 1. Espectro de absorção do azul de metileno no espectro visível. Nota-se que com o aumento da concentração há uma dimerização da molécula<sup>34</sup>.

A hipocrelina B é um corante de cor amarronzada derivado de um fungo parasita do bambu muito comum na China e no Sri Lanka, a *Hypocrella bambusae*. A sua toxicidade é baixa, com rápido metabolismo *in vivo*. O seu potencial fotodinâmico foi estudado, e quando este FS é irradiado na região que se estende desde 400nm até 530nm, a sua absorção permite eficiente excitação, promovendo mais espécies reativas citotóxicas para o microrganismo<sup>37</sup>. Seu pico de absorção é em 485nm, necessitando de uma fonte de luz azul para um melhor efeito na terapia fotodinâmica (fig 2.).

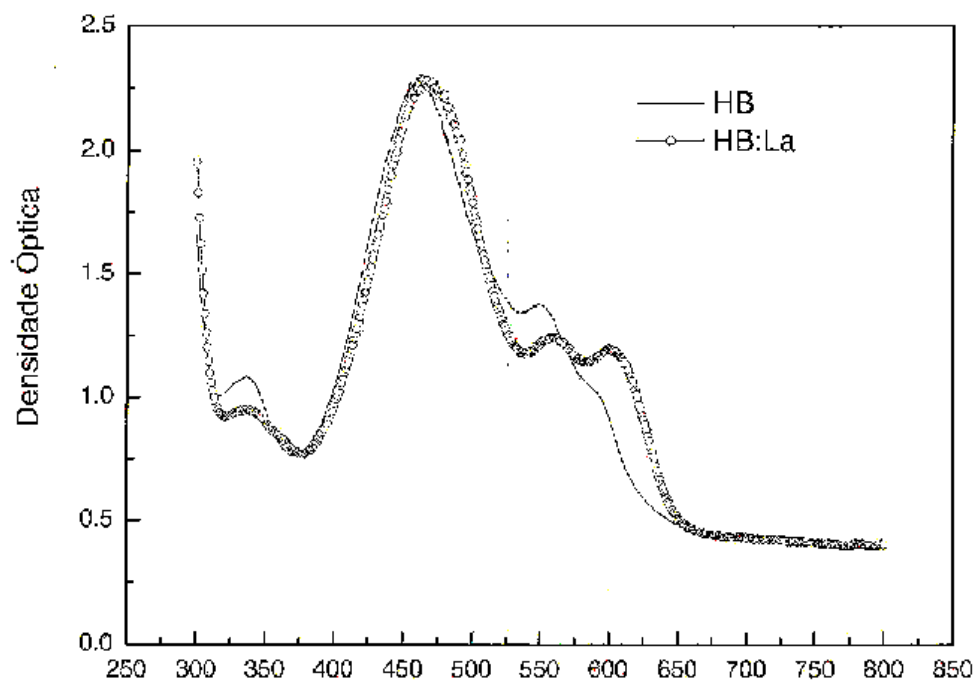


Figura 2. Espectro de absorção da Hipocrelina B e da Hipocrelina B:  $\text{La}^{+3}$ . Nota-se que a incorporação do íon  $\text{La}^{+3}$  produz um *red shift* na banda de absorção do FS entre 600 e 650 nm.

Segundo TOFFOLI<sup>37</sup>, em sua dissertação de mestrado, a  $\text{HB:La}^{+3}$  apresentou uma grande geração de oxigênio singleto quando irradiada em  $460\text{nm} \pm 30\text{nm}$ , maior que aquela obtida com a Hipocrelina B. Conseqüentemente, quando irradiada no mesmo comprimento de onda, mostrou melhores resultados de redução microbiana na concentração de  $10\mu\text{M}$  em células de *C. albicans*. A ação desse corante na terapia fotodinâmica mostrou-se eficiente, com redução de 100% do microrganismo em apenas 30s de irradiação, com uma fluência de  $10\text{J}/\text{cm}^2$ . Por esta razão, neste trabalho também investigamos a ação deste FS sob irradiação em biofilme organizado pelo mesmo microrganismo.

Para a análise em tempo real da PDT sendo realizada em biofilme de *C. albicans*, técnicas não destrutivas são necessárias para identificação de alterações em sua estrutura.

Sendo assim, utilizamos para este fim a tomografia por coerência óptica (OCT). Esta técnica de diagnóstico por imagem permite a análise tridimensional de uma estrutura sem ser invasiva. A OCT utiliza a coerência temporal da luz na produção de imagens de uma seção transversal em sistemas biológicos com alta resolução espacial. Em 1991, Huang et al descreveram essa técnica como uma ferramenta de análise em profundidade através do retroespalhamento da luz obtidas de um padrão de interferência.<sup>38</sup>

Estudos da utilização da PDT em *C. albicans in vitro* começaram a ser reportados na década de 90. Em 1993, Wilson e Mia<sup>39</sup> utilizaram como FS o azul de toluidina (AT), o AM e o cristal violeta e mostraram uma redução fúngica significativa com o AT irradiado com um laser de HeNe e com o azul de metileno sensibilizado por um laser de diodo de AsGaAl.

Mais recentemente, *Peloi et al* propôs a utilização de um diodo emissor de luz (LED) como fonte de luz para a PDT<sup>40</sup>. Os autores construíram um sistema LED emissor de luz vermelha com 5mW de potência no comprimento de onda de  $\lambda = 663\text{nm}$  e como FS utilizaram o AM. Os microrganismos submetidos à PDT foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *C. albicans*. A concentração de AM utilizado em *C. albicans* foi de  $63.20 \pm 11.30 \mu\text{M}$  e o tempo de irradiação foi de 10, 20 e 30min., obtendo mais de 2 logs de redução.

Prates *et al* em 2009 investigaram a influência dos parâmetros de luz na fotoinativação de fungos<sup>16</sup>. Os fungos testados foram *C. albicans*, *C. krusei* e *C. neoformans var. grubii*. Os autores testaram duas taxas de fluência distintas:  $100 \text{ mW/cm}^2$  e  $300 \text{ mW/cm}^2$  durante 3, 6 e 9 min., resultando fluências entre 18 a  $162 \text{ J/cm}^2$ . O laser

utilizado como fonte de luz tinha um comprimento de onda  $\lambda = 660$  nm, com uma potência de saída de 30 e de 90 mW. O FS escolhido foi o AM na concentração de 100  $\mu$ M. Os resultados mostraram uma redução microbiana de até 6 log, com um aumento de redução conforme aumentou a fluência; com a mesma fluência, porém com taxas de fluência diferentes, os autores encontraram diferenças estatisticamente significantes, mostrando a importância do tempo de exposição de luz.

Também em 2009, Souza *et al* compararam a eficiência da PDT em *C. albicans* utilizando três FS distintos: o AM, o AT e o verde de malaquita (VM)<sup>41</sup>. O laser utilizado para a PDT tinha um comprimento de onda de  $\lambda = 660$  nm, potência de saída de 35mW e densidade de energia variando entre 15,8 J/cm<sup>2</sup>, 26,3 J/cm<sup>2</sup> e 39,5 J/cm<sup>2</sup>. A concentração dos FS foi de 0,1mg/mL. Os autores não encontraram diferenças estatísticas entre os FS estudados. Além disso, densidades de energia maiores aumentaram a redução microbiana, sendo a maior redução constatada com o AT, com uma densidade de energia de 39,5 J/cm<sup>2</sup>. Os autores concluíram que a PDT realizada com os três FS distintos e irradiado com um laser de baixa potência tem efeito fungicida.

Em biofilme, entretanto, os relatos de redução microbiana em PDT são escassos. Alguns autores reportam a utilização da PDT em biofilmes bacterianos<sup>42-44</sup> ou biofilmes da placa bacteriana bucal<sup>4, 32, 45, 46</sup>. Particularmente em biofilme de *C. albicans*, Chabrier-Roselló *et al.* analisou a PDT com o FS Photofrin (PF)<sup>47</sup>. Neste estudo, os autores relatam que o biofilme de *C. albicans* é sensível à fototoxicidade mediada pelo PF, sendo dose-dependente. A atividade metabólica do biofilme após a PDT foi significativamente menor do que do biofilme tratado com anfotericina B, pelo mesmo período de tempo. Os autores sugeriram que os mecanismos de defesa do biofilme usados para subverter substâncias

oxidativas antimicrobianas ou terapias antimicrobianas aparentemente não são eficazes durante a PDT com PF.

Sendo assim, neste trabalho procuramos desenvolver uma metodologia de desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* para estudo da PDT utilizando dois diferentes FS, uma vez que este microrganismo organizado em biofilme é resistente a antifúngicos necessitando de novas terapias. As infecções deste patógeno quando evoluem para um quadro de disseminação na corrente sanguínea podem ocasionar a morte do paciente. Além disso, investigamos a viabilidade de analisar o biofilme através da OCT. No melhor de nosso conhecimento, não há referências na literatura de biofilme de *C. albicans* submetido à PDT e analisado pela OCT.



## 2.Objetivos

1. Desenvolver uma metodologia para formação *in vitro* de biofilme de *C. albicans*;
2. Verificar a sensibilidade do biofilme de *C. albicans* frente à terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando como FS o azul de metileno e a hipocreline B:La<sup>+3</sup>;
3. Analisar o biofilme através da OCT antes e depois da PDT.

### 3. Materiais e métodos

Os fotossensibilizadores azul de metileno (AM) e a hipocrelina B (HB) utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich Corporation Ltda. O cloreto de lantanídeo usado ( $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) também foi da empresa Sigma-Aldrich Corporation Ltda. O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) utilizado como solvente da HB e do cloreto de lantânio foi adquirido da Vetec Química Fina Ltda.

O fungo *Candida albicans* ATCC90028 usado neste estudo foi obtido dos estoques do Laboratório de Leveduras Patogênicas do ICB-USP. Para a padronização do inóculo foi utilizado o espectrofotômetro (SP-220 com o software Winspec 2.3.1).

#### 3.1 Estudo da terapia fotodinâmica em leveduras

Para o estabelecimento de parâmetros da terapia fotodinâmica em biofilme, um estudo piloto foi realizado em levedura. A concentração de azul de metileno utilizada foi de  $100\mu\text{M}$  e a irradiação foi feita através de um LED vermelho. Já a concentração de Hipocrelina B: $\text{La}^{+3}$  utilizada foi de  $10\mu\text{M}$  e a irradiação desta foi através de um LED azul. As amostras de cada corante foram divididas em 4 grupos: Grupo controle, que não recebeu o tratamento; Grupo LED, que recebeu somente a irradiação do LED; Grupo fotossensibilizador, que recebeu somente o fotossensibilizador e o grupo PDT, que recebeu a associação LED e corante. O grupo PDT foi dividido em quatro tempos diferentes, dependendo do fotossensibilizador empregado (tabela 1). Os grupos que receberam os FSs

foram mergulhados na solução por 10 min. Os parâmetros de irradiação e os tempos de exposição estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Grupos utilizados para o estudo. O grupo FS se refere ao grupo que recebeu somente o fotossensibilizador por 10 minutos.

Fotossensibilizador	Concentração (mM)	Grupo LED	Grupo FS	Grupo PDT			
		Comprimento de onda	Tempo de Irradiação (min.)				
Azul de Metileno	0,1	630±20nm	0	3	6	9	12
HipocrelinaB:La+3	0,01	460±30nm	0	0,5	1	1,5	2

A irradiação nos grupos que utilizou azul de metileno foi feita por um LED de 260mW de potência (MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de  $\lambda=630\text{nm} \pm 20\text{nm}$ , com taxa de fluência de  $195,88\text{mW}/\text{cm}^2$ , durante 3, 6, 9 e 12 minutos de irradiação resultando em fluências de 35, 70, 106 e  $141\text{J}/\text{cm}^2$ . O diâmetro do feixe foi ajustado para irradiar toda a superfície do poço, em uma área de  $1,33\text{cm}^2$ . Já nos grupos que utilizamos a HB:La<sup>+3</sup>, a irradiação foi feita por um LED em  $460\text{nm} \pm 30\text{nm}$ , potência  $P=441\text{mW}$  e uma taxa de fluência de  $331\text{mW}/\text{cm}^2$  (Quantum, ECCO Fibras, Campinas, Brasil), com fluências de 10, 20, 30 e  $40\text{J}/\text{cm}^2$ . O diâmetro do feixe também foi ajustado de modo a irradiar toda a superfície do poço.

A irradiação de todos os grupos foram feitas em placas de 96 poços, com diâmetro de 6 mm e com 200 $\mu\text{L}$  de volume. A concentração de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de *C. albicans* utilizada foi de  $10^6$  UFC/mL com uma transmitância de  $73\% \pm 3\%$  em um feixe de  $\lambda= 530\text{nm}$ <sup>48</sup>.

### 3.2 Meios e condições de crescimento

Amostras de *C. albicans* foram crescidas em placas de Petri contendo meio de cultura agar de dextrose Sabouraud e foram incubadas por 24h a 37°C em atmosfera de ar. Estas células foram colhidas e novamente incubadas em um tubo de ensaio com 5mL de caldo Sabouraud dextrose (24h a 37°C) na mesma atmosfera<sup>27</sup>. As células foram então colhidas e lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH=7.2 0,15M e depois colhidas novamente para quantificação. Para a lavagem das células, o tubo de ensaio contendo o meio de cultura e as *C. albicans* foi agitado em um vórtex e depois centrifugado a 3.000RPM durante 10 minutos, sendo retirado todo o líquido sobrenadante deixando apenas o *pellet* de células no fundo (Fig 3.).



Figura 3. Células aglutinadas, formando o *pellet*.

Adicionamos 6mL de PBS e o tubo foi agitado em um vortex, repetindo o processo todo duas vezes, certificando assim a subtração de todo meio de cultura e mantendo somente as células de *C. albicans*. Em seguida, as células foram ressuspensas em 6mL de PBS, submetidas a diluições seriadas para quantificação e usadas imediatamente sobre o substrato.

Na literatura não existem relatos de quantificação da concentração de  $10^7$  UFC/mL através do espectrofotômetro, portanto, outro estudo piloto foi realizado para ser usado na criação de biofilme e a transmitância do comprimento de onda  $\lambda = 530\text{nm}$  foi mensurada em suspensão de *C. albicans*. O nível de transmitância na suspensão de PBS foi ajustado em 34% ~ 38%, que corresponde à concentração de  $10^7$  UFC/mL.

### **3.3 Preparação do substrato – Discos de silicone elastomérico**

Foram utilizados discos de silicone elastoméricos (SE) oriundos de cateteres (fig 4.) com 0,6cm de diâmetro (o mesmo diâmetro dos poços utilizados no estudo em levedura). Para a conformação em discos, os cateteres (originalmente em formato de tubo) foram previamente planificados entre duas placas de vidro e processados em autoclave, através de um aquecimento a vapor em uma temperatura de  $121^\circ\text{C}$  com uma pressão de  $1,58\text{kgf/cm}^2$  por 16 min (fig 5.). Este material foi lixado em granulação fina (lixa 400) para aumentar a superfície de contato e para melhorar a aderência primária das células fúngicas (fig 6.). Com o auxílio de uma lâmina circular (Fig 7.) as tiras de silicone foram cortados em discos (fig 8.). Esses discos obtidos foram lavados com água e sabão e enxaguados com água destilada. Após a secagem das amostras, prosseguimos com a esterilização em autoclave. A utilização deste material se deve à semelhança apresentada aos materiais usados em cateteres e a habilidade destes em crescer biofilme, segundo Hawser e Douglas<sup>23, 27</sup>.



Figura 4. Cateter elastomérico.

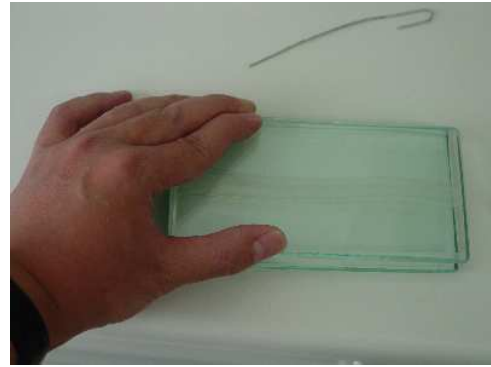


Figura 5. Planificação dos cateteres.



Figura 6. Lixa para aumentar rugosidade das amostras.



Figura 7. Detalhe da lâmina circular.

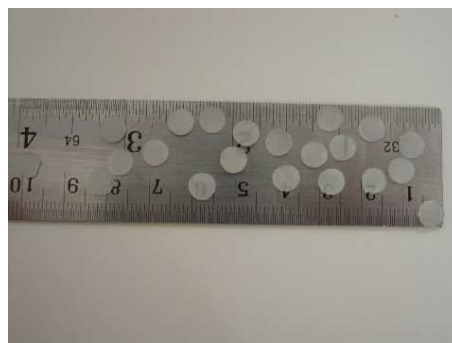


Figura 8. Discos cortados com 6,0 mm de diâmetro

### 3.4 Formação de biofilme

Os discos de silicone foram colocados em placas de cultura de células e foram incubados em soro fetal bovino durante 24h a 37°C em uma câmara incubadora com agitação orbital. Após este período, os discos foram lavados com PBS para remover o soro fetal bovino residual. Para certificar a uniformidade da formação de biofilme nos discos, estes foram imersos em 6mL do inóculo contendo  $10^7$  UFC/mL.

As amostras foram incluídas em uma placa de Petri contendo o inóculo com a concentração de  $10^7$ UFC/mL e incubadas por 90 min. a 37°C em câmara incubadora com agitação orbital. Em seguida, os discos foram cuidadosamente lavados em PBS para remover as células não aderidas ao substrato. As amostras foram novamente imersas no caldo de cultura Sabouraud dextrose e incubadas por 48h a 37°C na câmara incubadora com agitação orbital. A agitação durante o crescimento do biofilme aumenta a quantidade de síntese de matriz extracelular polimérica<sup>20</sup>. Após todo o procedimento de formação de biofilme, recolhemos algumas amostras aleatórias e analisamos a formação de biofilme através da microscopia óptica sobre placas de Petri contendo PBS em um aumento de 400x.

O esquema a seguir mostra o cronograma do procedimento experimental para crescimento do biofilme.

CRONOGRAMA DE CRESCIMENTO DO BIOFILME:

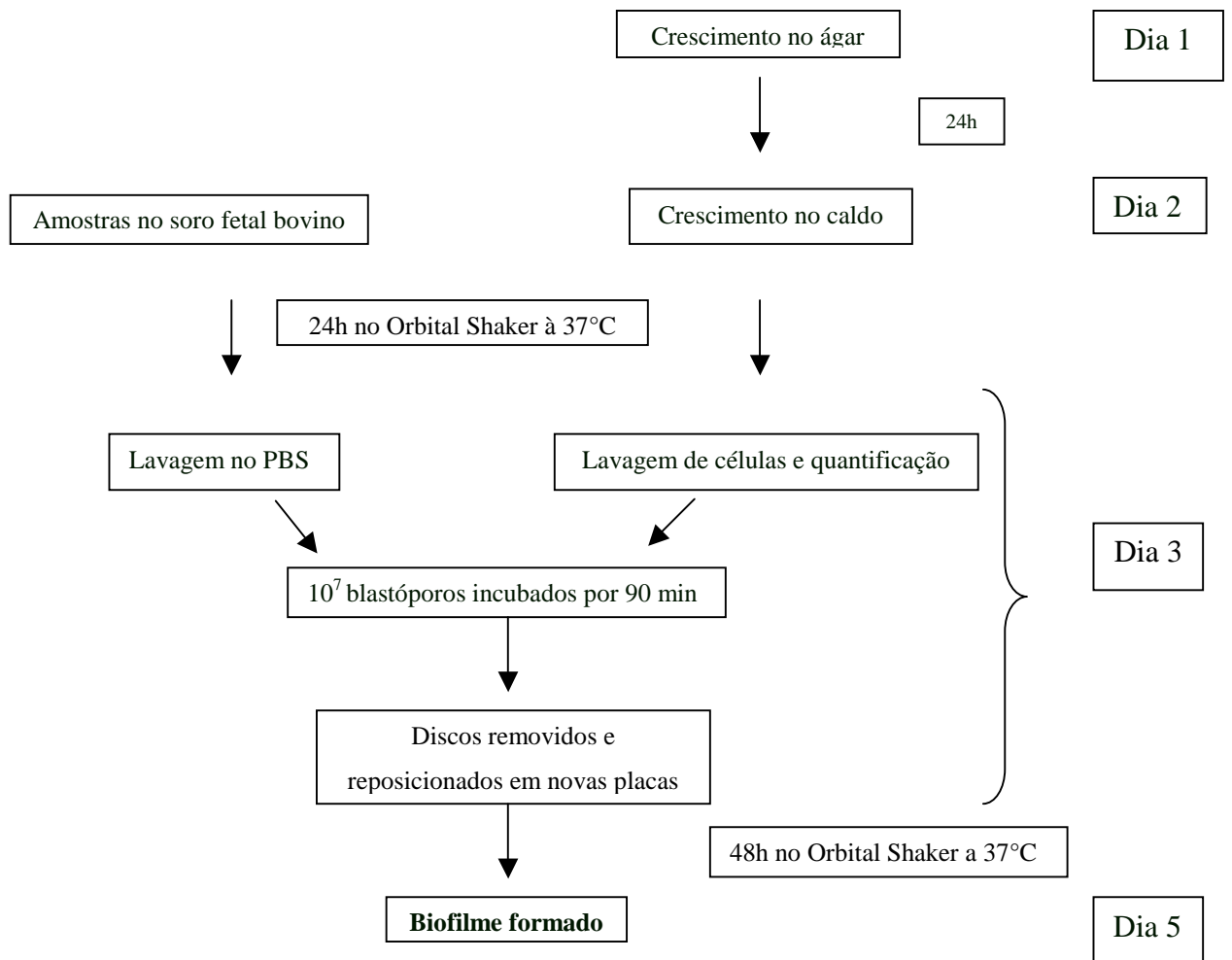


Figura 9: Cronograma de crescimento do biofilme durante 5 dias.



### 3.5 Terapia fotodinâmica em biofilme

Para a avaliação da susceptibilidade do biofilme à terapia fotodinâmica antimicrobiana, foi utilizado o corante azul de metileno como fotossensibilizador em uma concentração final de  $100\mu\text{M}$ <sup>15, 16</sup> e  $1\text{mM}$ . Este aumento na concentração foi devido à dificuldade de penetração e difusão dentro do biofilme em concentrações mais baixas. O grupo que utilizou a Hipocrelina B:La<sup>+3</sup> (HB:La<sup>+3</sup>) como fotossensibilizador teve sua concentração final ajustada para  $10\mu\text{M}$ <sup>37</sup>.

As amostras foram divididas em 4 grupos: grupo controle (L-FS-), que não recebeu o tratamento; grupo LED (L+FS-), que recebeu somente a irradiação do LED; grupo fotossensibilizador (L-FS+), que recebeu somente o fotossensibilizador durante 10 min e o grupo PDT (L+FS+), que recebeu a associação LED e corante por 10 min (tabela 2). O grupo PDT se subdividiu em outros grupos, variando o tempo de irradiação e a concentração no caso do AM.

Tabela 2: Grupos utilizados para o estudo.

Sigla	Característica do grupo
L-FS-	Grupo controle
L+FS-	Grupo Irradiado sem fotossensibilizador
L-FS+	Grupo não irradiado e exposto ao fotossensibilizador
L+FS+	Grupo submetido à terapia fotodinâmica

Para aplicação do corante, os discos SE foram imersos em solução aquosa de azul de metileno e solução de HB:La<sup>+3</sup> por 10min. Decorrido este período, os discos foram removidos da solução e irradiados (L+FS+), ou diretamente processados na diluição seriada (L-FS+).

A irradiação nos grupos que se utilizou azul de metileno foi feita pelo mesmo LED de 260mW de potência com comprimento de onda de  $\lambda=630\text{nm} \pm 20\text{nm}$ , com taxa de fluência de  $195,88\text{mW}/\text{cm}^2$ , durante 3, 6, 9 e 12 minutos de irradiação, resultando em fluências de 35, 70, 106 e  $141\text{J}/\text{cm}^2$  (fig 10A). O diâmetro do feixe foi ajustado para irradiar toda a superfície do disco SE, em uma área de  $1,33\text{cm}^2$ . Já nos grupos que utilizamos a  $\text{HB:La}^{+3}$ , a irradiação foi feita por um LED em  $460\text{nm} \pm 30\text{nm}$ , potência  $P=441\text{mW}$  e uma taxa de fluência de  $331\text{mW}/\text{cm}^2$  (fig 10B), com fluências de 10, 20, 30, 40, 60, 120 e  $180\text{J}/\text{cm}^2$  (Tabs. 3 e 4). O diâmetro do feixe também foi ajustado de modo a irradiar toda a superfície do disco. Esses tempos de irradiação foram determinados através do estudo piloto realizado em leveduras.

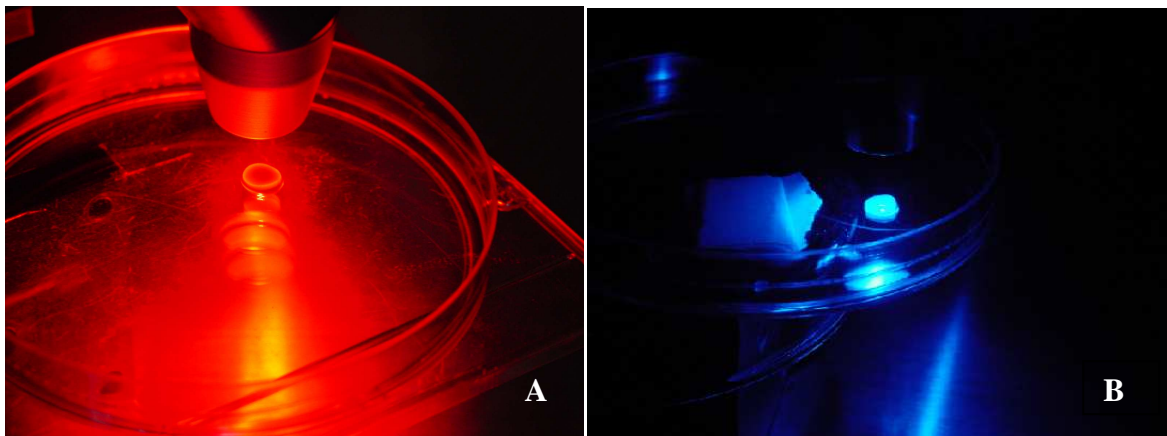


Figura 10. Amostras sendo irradiadas em placas de Petri com  $\lambda=630\text{nm} \pm 20\text{nm}$  (A) e  $460\text{nm} \pm 30\text{nm}$  (B).

Tabela 3: Parâmetros utilizados na PDT em biofilme

<b>Fotossensibilizador</b>	<b>Azul de Metileno</b>	<b>HipocreínaB:La+3</b>
Concentração (mM)	1 e 0,1	0,01
Comprimento de onda de irradiação (nm)	630 ± 20	460 ± 30
	0	0
	3	0,5
	6	1
Tempo de irradiação (min.)	9	1,5
	12	2
		3
		6
		9

Tabela 4. Fluências utilizadas nos grupos que foram submetidos à terapia fotodinâmica.

Fluências utilizadas neste estudo (J/cm <sup>2</sup> )							
HB:La <sup>+3</sup>	10	20	30	40	60	120	180
AM		35		70		106	141

### 3.6 Análise microbiológica:

Após os tratamentos realizados, todas as amostras foram introduzidas individualmente em tubos tipo *eppendorf* contendo 1mL de PBS. Os tubos foram identificados e agitados em um vortex por 60s.

Após a homogeneização das amostras, retiramos 20µL de cada tubo e submetemos a diluição seriada em placas de 96 poços contendo 180µL de PBS (até a diluição 10<sup>-4</sup> da

concentração inicial). Alíquotas de 10 $\mu$ L foram removidas de cada diluição e escurridas em triplicata em meio de cultura Agar de dextrose Sabouraud. Subsequentemente, elas foram incubadas a 37°C durante 12h ~ 16h para a contagem de UFC.

### **3.7 Análise da terapia fotodinâmica através da OCT:**

As amostras com biofilme formado na superfície foram mergulhadas cuidadosamente em solução de PBS para a remoção de excesso de meio de cultura, com a finalidade de não atrapalhar a leitura, uma vez que o índice de refração do meio de cultura não é conhecido e pode variar durante o crescimento do biofilme. Subsequentemente, os discos foram posicionados em placas de Petri estéreis, mantendo-a sempre fechada e, assim, evitando a desidratação do biofilme.

O equipamento de OCT (OCP930SR, Thorlabs, EUA) utilizado neste estudo emite luz proveniente de um LED com emissão em 930nm, potência de 2mW e resolução lateral e longitudinal no ar de 6,2 $\mu$ m. Para a terapia fotodinâmica utilizamos como corante o AM na concentração de 1mM e fonte de luz um LED com  $\lambda = 630 \pm 20$ nm. O tempo de pré-irradiação foi de 10 minutos e após esse tempo, removemos o excesso de AM sobre a amostra, lavando-a cuidadosamente com PBS.

O sinal captado mostra inicialmente um pico intenso originado pela reflexão (mudança de fase entre dois meios de índice de refração diferentes: o ar e a água do biofilme). O índice de refração utilizado para o cálculo da profundidade foi de 1,30 (o mesmo da água). O software que analisou os sinais obtidos foi desenvolvido no Labview

pelo Prof. Anderson Zanardi de Freitas, do Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP.

### **3.8 Análise estatística**

As amostras foram realizadas em triplicata e em pelo menos dois dias separados. Os resultados foram analisados por one-way ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste TUKEY. O nível de significância adotado foi de 5%.

#### 4. Resultados e discussão

*C. albicans* é um fungo com a capacidade de se organizar em biofilme dependendo das condições ambientais e do substrato utilizado. Porém, o desenvolvimento de uma metodologia para padronizar o crescimento do biofilme no substrato não é trivial. É de fundamental importância a uniformidade das rugosidades criadas pela lixa de granulação fina para que a aderência primária das leveduras seja igual em todas as amostras. A figura 11 mostra o biofilme formado, analisado por microscopia óptica realizada sobre uma amostra, com o aumento original de 400x. É possível observar que conseguimos obter uma quantidade de microrganismos padronizada, com uma formação uniforme de hifas e leveduras na superfície dos discos elastoméricos.

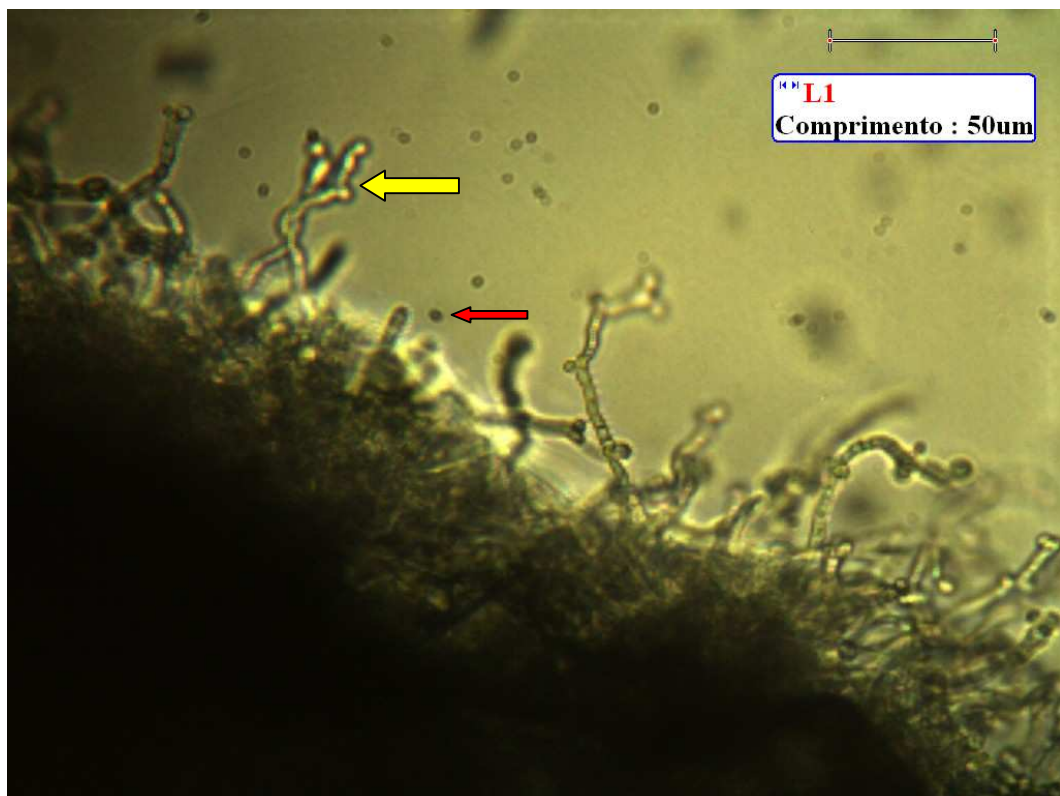


Figura 11. Biofilme de *C. albicans* formado em discos de silicone elastoméricos. A seta amarela indica uma hifa do biofilme e a seta vermelha indica uma levedura.

Em todos os testes antimicrobianos com PDT, grupos controle foram feitos para observação dos efeitos da irradiação, a toxicidade do corante no escuro e controle ambiental. Em todos os experimentos, não foi encontrada qualquer diferença estatística significativa entre estes grupos. Estes resultados convergem aos achados na literatura, onde não foram encontradas evidências de efeitos da irradiação ou toxicidade do azul de metileno nas concentrações e tempo de pré-irradiação estudados<sup>2, 14, 16, 31, 32, 49</sup>, bem como na utilização da hipocrelina B La<sup>+337</sup>.

O microrganismo, quando organizado em biofilme, mostrou uma resistência maior à terapia fotodinâmica antimicrobiana sob os mesmos parâmetros utilizados na *C. albicans* em suspensão, quando o FS utilizado foi o azul de metileno. Quando o fungo está na forma de blastóporo, com o AM a 100µM, a terapia mostrou uma redução de 100% após irradiação de 6 minutos. Entretanto, quando organizada em biofilme, não houve redução quando este FS foi utilizado na mesma concentração neste período de tempo (fig. 12).

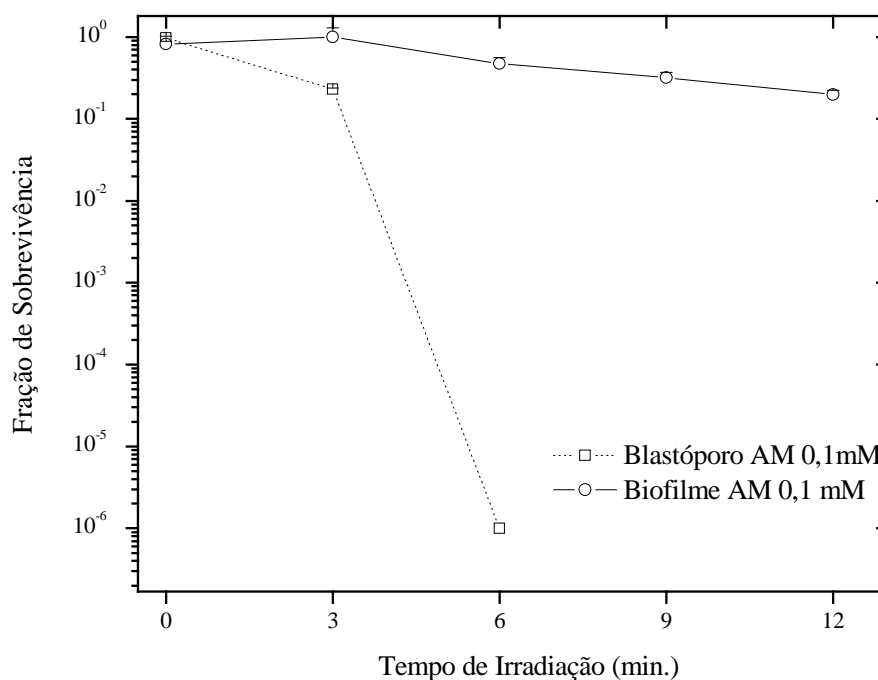


Figura 12. Fração de sobrevivência de *C. albicans* em forma de blastóporo e organizada em biofilme. Note que em concentrações iguais e sob os mesmos parâmetros de irradiação, o comportamento do biofilme e do blastóporo quando submetidos à terapia fotodinâmica são diferentes. Barras de erro representam o desvio padrão.

A HB:La<sup>+3</sup> em uma concentração de 10 $\mu$ M obteve em leveduras uma eficiência superior ao AM na concentração de 100 $\mu$ M. O tempo necessário para reduzir em 100% o número de células viáveis de *C. albicans* foi de 6min. para o AM (fig. 13) e 10s para a HB:La<sup>+3</sup> e uma fluência menor também, de 70J/cm<sup>2</sup> para o AM e de 10J/cm<sup>2</sup> para a HB:La<sup>+3</sup> (fig. 13). Porém, ao fotossensibilizar o biofilme, a HB:La<sup>+3</sup> apresentou uma menor eficiência quando comparada àquela obtida em leveduras (fig 13). Provavelmente, na concentração de 10 $\mu$ M, o FS não conseguiu penetrar na matriz extracelular polimérica, impedindo sua difusão no biofilme para que ocorresse o processo fotodinâmico de maneira



efetiva. Alguns autores observaram que a matriz extracelular polimérica dificulta a difusão de antifúngicos, e quando o fármaco penetra no biofilme, a sua concentração é bem menor do que a concentração externa<sup>20, 29, 50, 51</sup>. Isso explica a dificuldade de difusão do fotossensibilizador em concentrações eficientes para a terapia fotodinâmica. No estudo com a HB:La<sup>+3</sup>, nós tentamos aumentar a concentração do FS para verificar sua eficácia. Quando utilizamos a HB:La<sup>+3</sup> em concentração de 100µM, observou-se um precipitado do FS no biofilme, e quando utilizamos para a redução em leveduras, a HB:La<sup>+3</sup> não demonstrou nenhuma redução microbiana, inviabilizando seu uso em concentrações maiores (fig. 14).

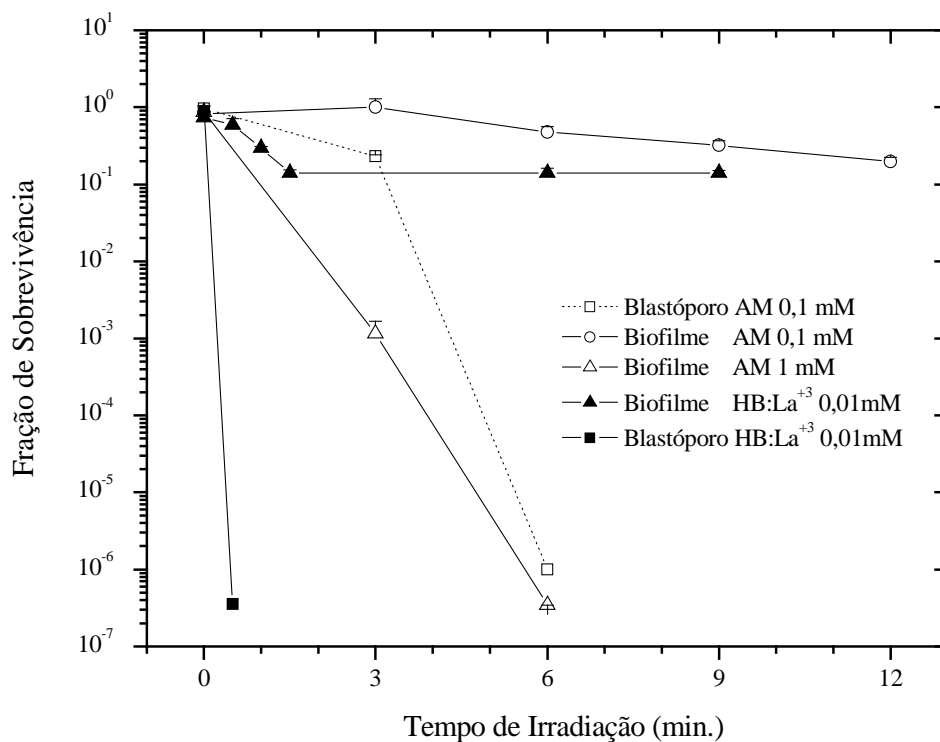


Figura 13. Fração de sobrevivência de *C. albicans* após PDT utilizando como fotossensibilizadores AM a 1mM e 0,1mM e HB:La<sup>+3</sup> em 10µM.

Por outro lado, a utilização de uma maior concentração de AM melhorou a distribuição do FS dentro do biofilme. Alguns autores mostraram que o biofilme, por ser

rico em polissacarídeos, é capaz de reduzir significativamente, mas não bloquear, a penetração dos antimicrobianos<sup>30, 52</sup>. Utilizando o azul de metileno a 1,0mM, obtivemos uma redução acima de 99% em 3min. de irradiação, e de 100% após 6min (fig. 14). Estes achados sugerem que o AM em uma concentração de 1,0mM, mesmo com os fatores de defesa do biofilme, é difundido na matriz extracelular polimérica em concentrações suficientes para a PDT.

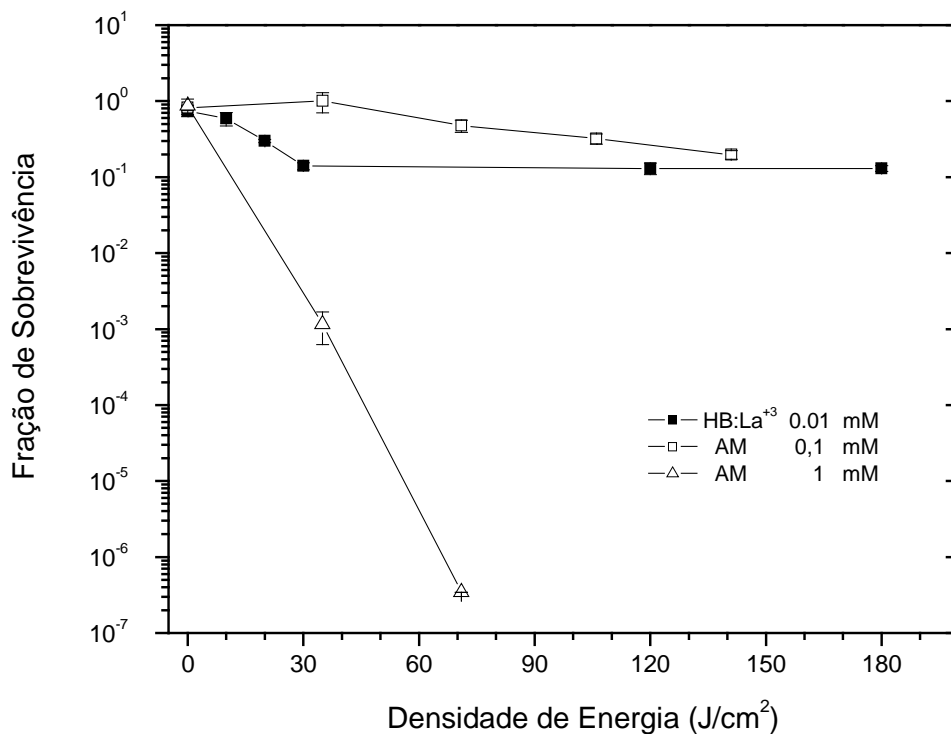


Figura 14. Fração de sobrevivência de biofilme de *C. albicans* após PDT utilizando como fotossensibilizadores AM a 100 $\mu$ M, a 1mM e HB:La<sup>+3</sup> em 10 $\mu$ M.

A figura 16 mostra a arquitetura do biofilme através da técnica de OCT. Observa-se que o biofilme apresenta uma superfície mais celular, caracterizada pelo alto espalhamento da luz (região mais brilhante) seguida de uma camada mais densa (região mais escura), que é o disco de SE. A espessura de biofilme formado foi de 110 $\mu$ m (fig 15).

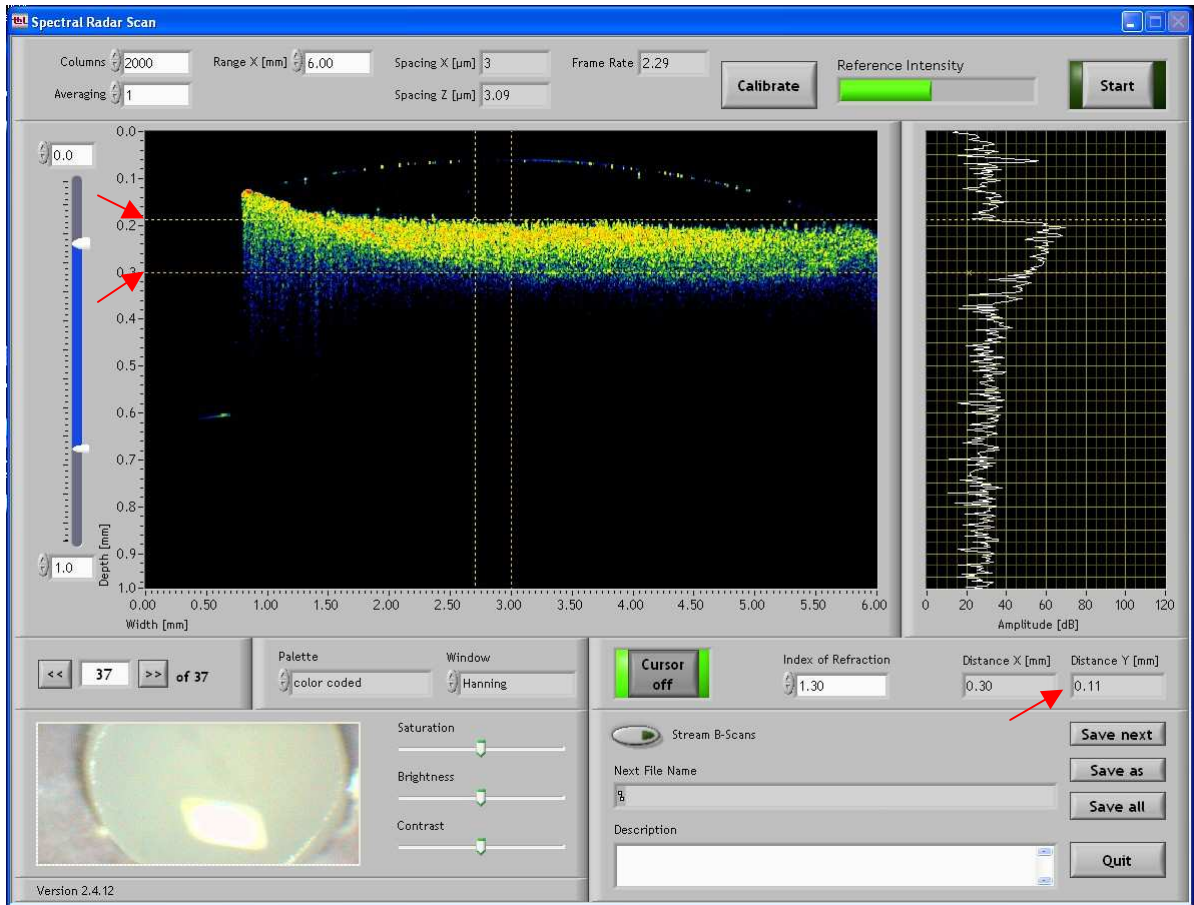


Figura 15. Imagem obtida pela técnica de OCT do biofilme formado por *C. albicans* em discos de silicone elastomérico. Note as setas vermelhas indicando a espessura do biofilme.

A superfície do biofilme é rica em água, retida pelas hifas formadas apresentando uma maior transmissão de luz (fig 16). Durante a terapia fotodinâmica, essa camada foi aumentando, sugerindo a destruição da arquitetura do biofilme provavelmente ocasionada pela lise destas células que a compõem como as leveduras, hifas e pseudo hifas de *C. albicans*.

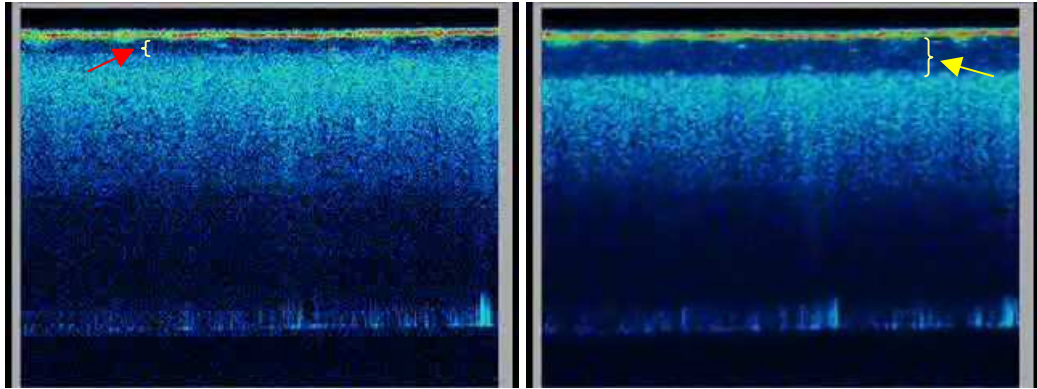


Figura 16. OCT realizada antes e depois da PDT com o AM 1mM. A camada superficial aonde a luz foi mais transmitida é aonde a água foi mais retida pelas hifas antes da PDT (seta vermelha). Note o aumento da espessura da camada aonde a luz foi mais transmitida, indicada pela seta amarela após a PDT.

## 5. Conclusões

O microrganismo *C. albicans* se organizou em biofilme mediante as condições ambientais estabelecidas pela metodologia desenvolvida. Obtivemos uma formação de biofilme padronizado nos discos elastoméricos oriundos de cateteres com espessura de 110 $\mu$ m.

Os FS utilizados AM e HB:La<sup>+3</sup> foram efetivos na redução de *C. albicans* em forma de leveduras após a terapia fotodinâmica nas concentrações de 100 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, respectivamente. O mesmo microrganismo quando organizado em biofilme nos substratos de silicone elastomérico teve uma maior resistência à terapia nestas concentrações.

O AM em 100 $\mu$ M não apresentou eficiência na ação antimicrobiana da PDT em biofilme. Com o aumento da concentração em 10 vezes, o AM foi eficiente em reduzir 100% de *C. albicans* após 6min. de irradiação.

A HB:La<sup>+3</sup> mostrou-se um fotossensibilizador eficiente em leveduras na concentração de 10 $\mu$ M. Em biofilme, nesta concentração, este FS não se mostrou efetivo.

A OCT mostrou-se uma ferramenta possível de ser utilizada para medir o biofilme e verificar em tempo real a ação da terapia fotodinâmica.

## Referências bibliográficas

1. Chan, Y. and C.H. Lai, *Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy*. Lasers Med Sci, 2003. **18**(1): p. 51-5.
2. Donnelly, R.F., P.A. McCarron, and M.M. Tunney, *Antifungal photodynamic therapy*. Microbiol Res, 2008. **163**(1): p. 1-12.
3. Meisel, P. and T. Kocher, *Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art*. J Photochem Photobiol B, 2005. **79**(2): p. 159-70.
4. Soukos, N.S., et al., *Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model*. Lasers Surg Med, 2003. **33**(3): p. 161-8.
5. Soukos, N.S., et al., *Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and Streptococcus sanguis evaluated in vitro*. Lasers Surg Med, 1996. **18**(3): p. 253-9.
6. Wilson, M. and J. Dobson, *Lethal Photosensitization of Oral Anaerobic-Bacteria*. Clinical Infectious Diseases, 1993. **16**: p. S414-S415.
7. Wilson, M. and C. Yianni, *Killing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by low-power laser light*. J Med Microbiol, 1995. **42**(1): p. 62-6.
8. Wilson, M., *Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections*. Photochem Photobiol Sci, 2004. **3**(5): p. 412-8.
9. Wilson, M. and J. Pratten, *Lethal photosensitisation of Staphylococcus aureus in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time*. Lasers Surg Med, 1995. **16**(3): p. 272-6.
10. Wainwright, M., *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. J Antimicrob Chemother, 1998. **42**(1): p. 13-28.
11. Prates, R.A., et al., *Bactericidal effect of malachite green and red laser on Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Photochem Photobiol B, 2007. **86**(1): p. 70-6.
12. Teichert, M.C., et al., *Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002. **93**(2): p. 155-60.
13. Lambrechts, S.A., et al., *Photodynamic therapy for Staphylococcus aureus infected burn wounds in mice*. Photochem Photobiol Sci, 2005. **4**(7): p. 503-9.

14. Demidova, T.N. and M.R. Hamblin, *Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(6): p. 2329-35.
15. Prates, R.A., et al. *The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells*. in *Mechanisms for Low-Light Therapy III*. 2008: SPIE.
16. Prates, R.A., et al., *Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manne*. *Laser Physics*, 2009. **19**(5): p. 1038-1044.
17. Seneviratne, C.J., L. Jin, and L.P. Samaranayake, *Biofilm lifestyle of Candida: a mini review*. *Oral Dis*, 2008. **14**(7): p. 582-90.
18. Tamura, N.K., et al., *[Virulence factors for Candida spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands]*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2007. **40**(1): p. 91-3.
19. Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet, *Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients*. *Lancet Infect Dis*, 2003. **3**(11): p. 685-702.
20. Al-Fattani, M.A. and L.J. Douglas, *Biofilm matrix of Candida albicans and Candida tropicalis: chemical composition and role in drug resistance*. *J Med Microbiol*, 2006. **55**(Pt 8): p. 999-1008.
21. Mukherjee, P.K., et al., *Candida biofilm: a well-designed protected environment*. *Med Mycol*, 2005. **43**(3): p. 191-208.
22. Freydiere, A.M., R. Guinet, and P. Boiron, *Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods*. *Med Mycol*, 2001. **39**(1): p. 9-33.
23. Kuhn, D.M., et al., *Comparison of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces*. *Infect Immun*, 2002. **70**(2): p. 878-88.
24. Chandra, J., et al., *Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(18): p. 5385-94.
25. Blankenship, J.R. and A.P. Mitchell, *How to build a biofilm: a fungal perspective*. *Curr Opin Microbiol*, 2006. **9**(6): p. 588-94.
26. Jett, B.D., et al., *Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria*. *Biotechniques*, 1997. **23**(4): p. 648-50.
27. Hawser, S.P. and L.J. Douglas, *Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro*. *Infect Immun*, 1994. **62**(3): p. 915-21.

28. Nett, J. and D. Andes, *Candida albicans biofilm development, modeling a host-pathogen interaction*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 340-5.
29. De Beer, D., R. Srinivasan, and P.S. Stewart, *Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection*. Appl Environ Microbiol, 1994. **60**(12): p. 4339-44.
30. Davies, D., *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(2): p. 114-22.
31. Garcez, A.S., et al., *Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion*. J Endod, 2008. **34**(2): p. 138-42.
32. Garcez, A.S., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection*. Lasers Surg Med, 2007. **39**(1): p. 59-66.
33. Konan, Y.N., R. Gurny, and E. Allemann, *State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy*. J Photochem Photobiol B, 2002. **66**(2): p. 89-106.
34. Nuñez, S.C., *Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica, in IPEN-CNEN*. 2007: São Paulo.
35. Gabrielli, D., et al., *Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions*. Photochem Photobiol, 2004. **79**(3): p. 227-32.
36. Severino, D., et al., *Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue*. Photochem Photobiol, 2003. **77**(5): p. 459-68.
37. Toffoli, D.J., *Caracterização Espectroscópica de Complexos Hipocrelina B:Lantanídeos para uso em terapia fotodinâmica, in Centro de Lasers e Aplicações*. 2008, IPEN-CNEN/SP: São Paulo. p. 90.
38. Huang, D., et al., *Optical coherence tomography*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1178-81.
39. Wilson, M. and N. Mia, *Sensitisation of Candida albicans to killing by low-power laser light*. J Oral Pathol Med, 1993. **22**(8): p. 354-7.
40. Peloi, L.S., et al., *Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue*. J Biosci, 2008. **33**(2): p. 231-7.
41. Souza, R.C., et al., *Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against Candida albicans*. Lasers Med Sci, 2009.



42. Di Poto, A., et al., *The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on Staphylococcus aureus biofilms*. Biomaterials, 2009. **30**(18): p. 3158-66.
43. Sbarra, M.S., et al., *Photodynamic action of merocyanine 540 on Staphylococcus epidermidis biofilms*. Int J Artif Organs, 2008. **31**(9): p. 848-57.
44. Sharma, M., et al., *Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(1): p. 299-305.
45. Wood, S., et al., *Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(4): p. 680-4.
46. Muller, P., B. Guggenheim, and P.R. Schmidlin, *Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro*. Eur J Oral Sci, 2007. **115**(1): p. 77-80.
47. Chabrier-Rosello, Y., et al., *Sensitivity of Candida albicans germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(10): p. 4288-95.
48. Pfaller, M.A., et al., *Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(8): p. 1437-41.
49. Donnelly, R.F., et al., *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, 2007. **86**(1): p. 59-69.
50. Davey, M.E. and A. O'Toole G, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 847-67.
51. Mukherjee, P.K. and J. Chandra, *Candida biofilm resistance*. Drug Resist Updat, 2004. **7**(4-5): p. 301-9.
52. Suci, P.A., et al., *Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(9): p. 2125-33.