

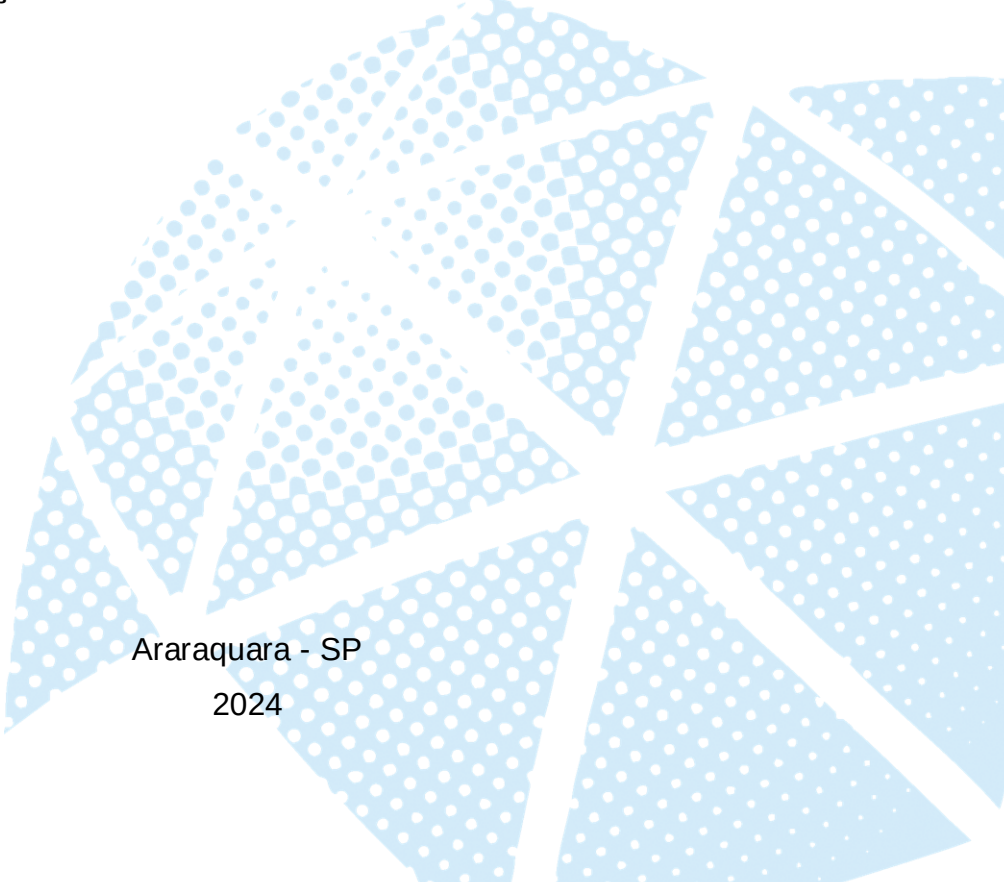
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara - SP

PEDRO MONTEIRO LOPES

**INIBIDOR ENZIMÁTICO DE Cu/Zn-SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NA
OTIMIZAÇÃO DA AÇÃO FOTODINÂMICA EM BIOFILMES DE *C. albicans***

Araraquara - SP

2024



PEDRO MONTEIRO LOPES

**INIBIDOR ENZIMÁTICO DE Cu/Zn-SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NA
OTIMIZAÇÃO DA AÇÃO FOTODINÂMICA EM BIOFILMES DE *C. albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção
do título de Bacharel em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Raquel
Fontana Mendonça

Araraquara - SP

2024

L864i

Lopes, Pedro Monteiro.

Inibidor enzimático de Cu/Zn-superóxido dismutase (SOD) na otimização da ação fotodinâmica em biofilmes de *C. albicans* / Pedro Monteiro Lopes. – Araraquara, 2024.
25 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Carla Raquel Fontana Mendonça.

1. Terapia fotodinâmica. 2. *C. albicans*. 3. Espécies reativas do oxigênio (EROs). 4. Superóxido dismutase (SOD). 5. Inibidor dietilditiocarbamato (DDC). I. Mendonça, Carla Raquel Fontana, orient. II. Título.

PEDRO MONTEIRO LOPES

**INIBIDOR ENZIMÁTICO DE Cu/Zn-SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NA
OTIMIZAÇÃO DA AÇÃO FOTODINÂMICA EM BIOFILMES DE *C. albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel(a) em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Data da defesa: 05/12/2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Túlio Morandin Ferrisse
UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara/Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - Câmpus de Araraquara

Profa. Dra. Andrei Nicoli Gebieluca Dabul Dias de Sousa
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/Departamento de Análises Clínicas - Câmpus de Araraquara

Profa. Dra. Analú Barros de Oliveira
UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara/Departamento de Clínica Infantil - Câmpus de Araraquara

Profa. Dra. Sarah Raquel de Annunzio
UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara - Câmpus de Araraquara

Profa. Dra. Amanda Koberstain Surur
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/Departamento de Análises Clínicas - Câmpus de Araraquara

*Dedico este trabalho aos meus colegas e
aos funcionários e professores da
UNESP, que me fizeram evoluir como
pessoa durante todo o período da
faculdade.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço à professora Carla Raquel Fontana Mendonça por estar presente durante essa fase e por ter me acolhido como seu aluno de iniciação científica. Agradeço também à Sarah Raquel De Annunzio e à Analú Barros de Oliveira pelos ensinamentos e pela paciência durante todo esse período de aprendizados e desafios. Finalmente, agradeço à minha família por estar sempre ao meu lado como meu mais forte alicerce.

RESUMO

A maioria das infecções fúngicas nosocomiais é causada por espécies de *Candida*, sendo *Candida albicans* o agente etiológico mais comum de infecções sistêmicas. Vários fatores contribuíram para o aumento deste tipo de infecção nos últimos anos. Entre eles está o aumento de pacientes gravemente enfermos e / ou imunocomprometidos, o uso frequente de procedimentos médicos mais invasivos, o tratamento com antibióticos e glicocorticoides de amplo espectro, o recebimento de nutrição parenteral e o recebimento de diálise peritoneal ou hemodiálise. A resistência intrínseca à terapia antifúngica observada em alguns gêneros, juntamente com o desenvolvimento de resistência durante o tratamento em outros, está se tornando um grande problema para o manejo dessas doenças. Dados mundiais mostram que dentro de 35 anos, 300 milhões de pessoas morrerão devido a essa problemática e, financeiramente, mais de 60 trilhões de dólares serão gastos até 2050. A terapia fotodinâmica (TFD), é um método antimicrobiano bastante eficiente quando aplicada como monoterapia, e acreditamos que possa ser potencializada quando combinada com outras terapias ou compostos. Uma opção desta terapia combinada seria a associação da TFD com os inibidores da proteína superóxido dismutase (SOD), a qual é responsável por proteger organismos contra as espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, sendo o princípio da TFD baseado na formação de EROs, sua combinação com um inibidor de SOD pode vir a otimizar o tratamento. Dessa maneira, sabendo que o fungo *Candida albicans* produz SOD e que ela, além de auxiliar o microrganismo contra seu estresse oxidativo, potencializa sua virulência, o presente estudo visou avaliar a combinação da TFD mediada pelo fotossensibilizador azul de metileno (AM) em diferentes concentrações e em combinação com o inibidor dietilditiocarbamato (DDC) contra biofilmes de *C. albicans* ATCC 90028. Os resultados foram avaliados pelo método estatístico ANOVA. A terapia combinada utilizando concentrações de 200 µg/mL do AM e 10 µg/mL do DDC alcançou uma redução fúngica de cerca de 3 log a mais do que quando comparada com a monoterapia com mesma concentração do fotossensibilizador, resultados interessantes para futuros estudos.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; *C. albicans*; espécies reativas de oxigênio (EROs); superóxido dismutase (SOD); inibidor dietilditiocarbamato (DDC).

ABSTRACT

Most nosocomial fungal infections are caused by *Candida* species, with *Candida albicans* being the most common etiologic agent of systemic infections. Several factors have contributed to this type of infection in recent years. These include increased critically ill and/or immunocompromised patients, frequent use of more invasive medical procedures, treatment with antibiotics and broad-spectrum glucocorticoids, receiving parenteral nutrition, and receiving peritoneal dialysis or hemodialysis. The intrinsic resistance to antifungal therapy and the development of resistance during treatment is becoming a significant problem for managing these diseases. World data show that within 35 years, 300 million people will die from this problem, and financially, more than 60 trillion dollars will be spent by 2050. Photodynamic therapy (PDT) is a very efficient antimicrobial method when applied as monotherapy and it can be potentiated when combined with other therapies or compounds. An option for this combination therapy would be the association of PDT with inhibitors of the protein superoxide dismutase (SOD), which is responsible for protecting organisms against reactive oxygen species (ROS). Thus, as the PDT principle is based on the formation of ROS, its combination with a SOD inhibitor may optimize the treatment. Therefore, knowing that the fungus *Candida albicans* produces SOD and that, in addition to helping the microorganism against its oxidative stress, it potentiates its virulence, the present study aimed to evaluate the combination of PDT mediated by photosensitizer methylene blue at different concentrations and in combination with the diethyldithiocarbamate (DDC) inhibitor against biofilms of *C. albicans* ATCC 90028. The results were evaluated by the ANOVA statistical method. The combined therapy using concentrations of 200 µg/mL of AM and 10 µg/mL of DDC achieved a fungal reduction of approximately 3 logs more than monotherapy with the same photosensitizer concentration, which are promising results for future studies.

Keywords: photodynamic therapy; *C. albicans*; reactive oxygen species (ROS); superoxide dismutase (SOD); diethyldithiocarbamate (DDC) inhibitor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD	Terapia Fotodinâmica
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
DDC	Dietilditiocarbamato
FS	Fotossensibilizador
AM	Azul de Metileno
SOD	Superóxido Dismutase
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
YNB	Yeast Nitrogen Base
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA DO TEMA	18
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	<i>Cepa fúngica e meio de cultivo</i>	<i>19</i>
4.2	<i>Meios de cultivo e reativação da cepa</i>	<i>19</i>
4.3	<i>Fotossensibilizadores e fontes de luz</i>	<i>20</i>
4.4	<i>Inibidor de Cu/Zn-SOD</i>	<i>20</i>
4.5	<i>Avaliação da concentração fungicida mínima do inibidor Dietilditiocarbamato</i>	<i>20</i>
4.6	<i>Terapia fotodinâmica</i>	<i>20</i>
4.7	<i>Teste de susceptibilidade fúngica frente à TFD em biofilme</i>	<i>21</i>
4.8	<i>Grupos experimentais avaliados</i>	<i>22</i>
4.8.1	<i>Grupo controle de crescimento (CC)</i>	<i>22</i>
4.8.2	<i>Grupo Luz (L+FS-)</i>	<i>22</i>
4.8.3	<i>Grupo fotossensibilizador (L-FS+)</i>	<i>23</i>
4.8.4	<i>Grupo inibidor de CuZn-SOD (L-I+)</i>	<i>23</i>
4.8.5	<i>Grupo inibidor de CuZn-SOD + Luz (L+I+)</i>	<i>23</i>
4.8.6	<i>Grupo terapia fotodinâmica (L+FS+I-)</i>	<i>23</i>
4.8.7	<i>Grupo inibidor de CuZn-SOD + fotossensibilizador (L-FS+I+)</i>	<i>23</i>
4.8.8	<i>Grupo terapia fotodinâmica combinada (L+FS+I+)</i>	<i>23</i>
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A candidíase é uma doença causada por fungos do gênero *Candida*, os quais são responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas nos hospitais. As doenças causadas por esses fungos variam muito em grau de risco, sendo que podem afetar o hospedeiro superficialmente, como no caso de infecções de pele e de mucosas, ou de maneira mais profunda e invasiva: quando o fungo ataca sistematicamente. De todas as espécies pertencentes ao gênero em questão, a provida de maior patogenicidade é a *Candida albicans*, responsável por cerca de 60% dos casos de candidíase (Barbedo; Sgarbi, 2010), além de ser a espécie fúngica que apresenta maior capacidade de formar biofilmes (Pereira Gonzales; Maisch, 2011).

Os biofilmes são estruturas comunitárias formadas por milhares de microrganismos envoltos por substâncias poliméricas secretadas pelas próprias células. Apesar de estarmos acostumados em pensar nos microrganismos em sua forma de vida planctônica, cerca de 80% das infecções bacterianas e fúngicas estão relacionadas a biofilmes. Biofilmes são conhecidos por sua alta capacidade de sobreviver em ambientes hostis, como aparelhos medicinais e feridas, além de sua incrível tolerância a medicamentos, podendo chegar a ser 1000 vezes maior que quando em suspensão (Hu *et al.*, 2018). *C. albicans* apresenta uma morfologia única quando em forma de biofilme, consistindo em “uma camada basal de blastoconídios com uma densa matriz composta de exopolissacarídeos e hifas”. Somado a isso, a espécie produz mais biofilme que qualquer outra espécie do gênero, fato que está muito relacionado com sua alta capacidade de causar infecções e resistir ao sistema imune (Barbedo; Sgarbi, 2010).

Esse microrganismo é encontrado na microbiota de 30 a 60% das pessoas, geralmente no trato gastrointestinal e genitourinário, estando em equilíbrio com o sistema imunológico de seu hospedeiro, enquanto age como um comensal (Cardoso, 2013). No entanto, *C. albicans* é um fungo oportunista e, em indivíduos imunocomprometidos, pode causar muitos danos ou, até mesmo, levar à morte.

Em torno de 42% dos casos em que o patógeno ataca sistemicamente, o paciente não sobrevive. Em um estudo que analisou a resistência da espécie contra o antifúngico fluconazol, Ford e Funt *et al.* (2015) conseguiram provar a relação entre esta e a alta taxa de mortalidade citada. Segundo eles, os melhores e mais utilizados medicamentos para o tratamento de infecções fúngicas, incluindo o fluconazol,

apenas para o crescimento do microrganismo, dando tempo para que ocorra o desenvolvimento de resistência ao fármaco. Além disso, no mesmo estudo foram identificados vários outros mecanismos provindos de mutações, como o polimorfismo de nucleotídeo único, o qual foi encontrado em 240 genes da espécie e que pode estar envolvido no desenvolvimento rápido de meios para sobreviver às drogas em questão, fato esse que justifica a urgência das pesquisas de novas terapias capazes de tratar infecções fúngicas (Ford; Funt *et al.*, 2015).

A terapia fotodinâmica (TFD), um método que tem sido muito estudado, já mostrou muitos resultados positivos, tanto contra patógenos sensíveis aos antimicrobianos, quanto contra os resistentes (Pereira Gonzales; Maisch, 2011). Além disso, é uma excelente alternativa, por ser uma modalidade muito eficaz de se combater infecções e por não apresentar efeitos colaterais significantes (Hu, 2020). Para que a ação fotodinâmica ocorra, são necessários três fatores essenciais: o fotossensibilizador, a luz e o oxigênio dissolvido no tecido a ser tratado. O primeiro deve ser uma substância não tóxica que, quando excitada por uma fonte de luz visível com determinado comprimento de onda, (depende do fotossensibilizador utilizado) absorve essa energia luminosa e, em seguida, pode seguir dois tipos de reação. Ambos se iniciam da mesma forma: o fotossensibilizador em seu estado fundamental (singlete) é excitado, podendo passar para o estado de tripleto excitado de longa vida. Essa molécula, por sua vez, ao entrar em contato com o oxigênio, pode tanto se transformar em espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, através da transferência de elétrons (reação do tipo I), quanto transferir energia para as moléculas de oxigênio, formando oxigênio singlete altamente reativo, o qual também é uma ERO (reação do tipo II). Essas espécies moleculares atacam rapidamente as células ao seu redor, causando rupturas na membrana celular ou de organelas e, finalmente, a morte das células-alvo (Hu, 2020; Oniszczuk, 2016). A ocorrência dessas reações varia de acordo com a fotoquímica do fotossensibilizador utilizado no tratamento. O azul de metileno (AM), por exemplo, apresenta maior formação de oxigênio singlete, quando excitado em sua forma monomérica. Em contrapartida, ao ser dissolvido em solução aquosa, é a reação do tipo I que predomina, devido a sua tendência de dimerização (Dutra, 2016, p. 45).

Apesar de serem altamente prejudiciais à saúde humana, as EROs têm uma vida muito curta, por serem altamente reativas e, dessa maneira, fazem da

terapia fotodinâmica um método localizado de tratamento, afetando minimamente células não-alvo (Oniszczyk, 2016).

Ainda é muito discutida a possibilidade dos microrganismos desenvolverem resistência às EROs, no entanto, pelo fato de que a TFD é um método terapêutico que ataca múltiplos alvos celulares, diferenciando-se da maioria das terapias antimicrobianas, é improvável que isso ocorra (Pereira Gonzales; Maisch, 2011). Dovigo *et al.* (2011) demonstrou que cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol são menos sensíveis à TFD que as cepas não resistentes. Ainda assim, o tratamento se mostrou muito eficaz contra ambas.

O método em questão também foi muito eficiente contra biofilmes do fungo (Pereira *et al.*, 2010), porém, a combinação da TFD com outros antimicrobianos pode trazer resultados ainda mais eficientes. Ao combiná-la aos peptídeos antimicrobianos (de Freitas, 2018) ou a inibidores da enzima superóxido dismutase (SOD) (Kimani *et al.*, 2011), por exemplo, os resultados promissores sugerem que a técnica pode ser potencializada.

A enzima SOD tem como função defender a célula contra o estresse oxidativo e, sendo assim, ela pode atenuar os efeitos da TFD. Segundo Sun *et al.* (2017), as enzimas SOD têm um papel importante para o aumento da virulência de microrganismos patogênicos, incluindo a *C. albicans*. O fungo possui seis tipos diferentes da enzima em sua célula, dos quais as SOD 1-3 são localizadas no citoplasma e as SOD 4-6 ficam ancoradas pelo glicosilfosfatidilinositol, associadas à parede celular. O inibidor de SOD teria como efeito o acúmulo de EROs na célula patogênica, aumentando a eficácia da TFD, sendo que, para cada tipo de SOD, deve-se utilizar um inibidor adequado. As SOD1, SOD4, SOD5 e SOD6 do fungo, por exemplo, são Cu/ZN-SOD e, um inibidor conhecido para essa enzima é o dietilditiocarbamato (DDC).

Em uma pesquisa realizada por Sun *et al.* (2017) os autores avaliaram se o inibidor iria auxiliar na morte celular de *C. albicans* a partir do tratamento via honokiol, uma substância retirada da árvore *Magnolia officinalis* e muito utilizada na cultura chinesa por suas propriedades medicinais. Concluiu-se que o honokiol age como um pró-oxidante no fungo e que, nesse caso, pode ser potencializado pelo inibidor DDC.

Dessa maneira, este estudo visa avaliar os efeitos da combinação da TFD, mediada pelo fotossensibilizador AM, com o DDC contra o fungo *Candida albicans* ATCC 90028

2 JUSTIFICATIVA DO TEMA

A resistência antimicrobiana é um grave problema de escala global. Dados mostram que, se o desenvolvimento da resistência continuar crescente, na velocidade que está hoje, dentro de 35 anos, ela será responsável por mais de 300 milhões de pessoas mortas. Economicamente, até 2050, teriam sido perdidos um total de 60 a 100 trilhões de dólares caso o problema não seja freado. No entanto, muitos pesquisadores de universidades estão trabalhando a fundo para encontrar novos meios de se combater o problema evidenciado, seja pelo desenvolvimento de novas drogas, vacinas ou terapias (O'Neill, 2014). No último caso, seria ideal que fosse desenvolvida uma técnica capaz de eliminar os microrganismos sem estimular nenhum tipo de resistência futura.

Uma alternativa muito viável, que atende essa questão, é a terapia fotodinâmica (TFD), pois, além de eficiente, possui efeitos adversos mínimos, se comparada com o tratamento antibiótico ou antifúngico. A TFD é baseada no uso da luz e de um fotossensibilizador específico para a geração de radicais livres de maneira localizada e é possível combiná-la a outros tipos de tratamento ou substâncias, com o objetivo de potencializar seus efeitos (HU, 2020; ONISZCZUK, 2016).

O dietilditiocarbamato (DDC) é um exemplo dessas substâncias. Sua função é inibir a enzima superóxido dismutase (SOD), a qual protege as células contra o estresse oxidativo o que, possivelmente, inibe os efeitos da TFD, além de ter papel no aumento da virulência da *Candida albicans*, um fungo oportunista que, segundo estudos realizados por Ford e Funt *et al* (2015), apresentou resistência ao fluconazol, um dos antifúngicos mais utilizados.

O DDC já foi combinado à outra substância chamada honokiol, também pró-oxidativa, e apresentou efeitos muito positivos contra esse mesmo fungo (Sun, 2017). Por isso e por todas as preocupações trazidas junto ao desenvolvimento de resistência antifúngica pelo fungo em questão, esse estudo visou combinar a TFD com o DDC, a fim de potencializar a morte celular do patógeno e evitar danos futuros. Os experimentos foram realizados contra biofilmes por conta da problemática da menor

efetividade da TFD contra essas comunidades microbianas e pela grande capacidade da *C. albicans* em formá-las.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a combinação da TFD mediada por AM e do inibidor de Cu/Zn-SOD, DDC, sobre *C. albicans* em biofilmes *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o inibidor Cu/Zn-SOD possui uma concentração fungicida mínima sobre os biofilmes de *C. albicans*;
- Encontrar o melhor tempo de pré-incubação do azul de metileno e do inibidor DDC na inativação de *C. albicans*;
- Através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), verificar a toxicidade de cada um dos tratamentos: TFD, Cu/Zn-SOD e da terapia combinada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepa fúngica e meio de cultivo

Foi utilizada a cepa de *Candida albicans* ATCC 90028, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) Manguinhos, RJ, Brasil.

4.2 Meios de cultivo e reativação da cepa

Como meios de cultivo, foram utilizados o caldo RPMI e o ágar SDA (Ágar Sabouraud Dextrose). De 5 a 10 colônias do fungo foram retiradas do ágar SDA e inoculadas em um tubo de ensaio contendo 5 mL do caldo RPMI. O inóculo foi incubado em estufa de aerobiose a 37°C durante 24 horas.

4.3 Fotossensibilizadores e fontes de luz

Para a terapia fotodinâmica, foi utilizado o fotossensibilizador azul de metileno (AM), adquirido pela Sigma, *Chemical Co. St Louis, MD*. Foram testadas as concentrações de 100 e 200 µg/mL do fotossensibilizador em biofilme (PEREIRA, 2010). A fonte de luz que foi utilizada é formada por 48 LEDs de 660nm de comprimento de onda (luz vermelha) e um sistema de refrigeração para evitar o superaquecimento (IrradLED® – biopdi, São Carlos, SP, Brasil).

4.4 Inibidor de Cu/Zn-SOD

O inibidor dietilditiocarbamato (DDC) foi adquirido na Sigma, *Chemical Co. St Louis, MD*.

4.5 Avaliação da concentração fungicida mínima do inibidor Dietilditiocarbamato

A partir da técnica de microdiluição em caldo, presente nas diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), a CBM do inibidor em questão foi realizada sobre *C. albicans*. Para encontrar a melhor concentração para os testes, foi realizada a análise da concentração fungicida mínima utilizando concentrações de 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL e 120 µg/mL.

4.6 Terapia fotodinâmica

Toda a extensão dos poços das placas de 96 poços foi irradiada. Para definir a dose de luz aplicada (densidade de energia), a partir das dimensões do campo de irradiação, do tempo de exposição das amostras à luz e da potência de cada LED, foi realizado o cálculo com o uso da seguinte fórmula:

$$\text{Dose de luz (J/ cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times t \text{ (segundos)}$$

Sendo, J: Joules; cm²: centímetro quadrado; I: intensidade; W: Watt; t: tempo.

Após a realização de testes com potência de 100 J/cm², 150 J/cm² e 200 J/cm², optou-se pela utilização da menor potência testada, visto que as outras inibiram muito o crescimento do fungo. O mesmo ocorreu com a concentração do fotossensibilizador. Para a concentração do AM, optou-se pela de 100 µg/mL pelo mesmo motivo: concentrações maiores eram muito tóxicas ao crescimento fúngico.

4.7 Teste de susceptibilidade fúngica frente à TFD em biofilme

Primeiramente, a cepa de *C. albicans*, armazenada a -80 °C, foi descongelada e semeada em placas Petri com meio de cultura SDA (Ágar Sabouraud Dextrose) suplementado com cloranfenicol (50 mg/L) e incubada à 37°C durante 48h. Em seguida, em 9 mL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB), foram inoculadas e incubadas de 5 a 10 colônias à 37 °C por 16 horas. Após a incubação, foram transferidos 1000 µL das culturas para novos tubos Falcon contendo 9,0 mL de meio YNB, que foram incubados até as células de *Candida* atingirem o meio da fase de crescimento exponencial (ou mid-log), correspondente à densidade óptica (DO) 0.55 ±0.08. A concentração das suspensões de *Candida* foi ajustada em espectrofotômetro DO 540 nm de 1.0, que corresponde a uma concentração de 10⁷ UFC/mL. Em seguida, ao atingir a DO necessária, os tubos foram submetidos à centrifugação (4 graus, 5000 rpm, por 10 minutos) seguida de lavagem do meio, a qual consiste na retirada e reposição do RPMI. O processo de centrifugação e lavagem do meio foi feito três vezes seguidas. Depois, em uma placa de 96 poços, foram transferidas alíquotas de 100 µL do inóculo para os seus devidos orifícios, dependendo do grupo de estudo, e 100 µL de meio RPMI. Após 90 minutos em estufa (fase de adesão) os poços foram submetidos a nova lavagem e reposição de 200 µL de RPMI para que, em seguida, fossem incubadas a 37°C por 24 horas. Passado o tempo, os poços foram submetidos a nova lavagem e colocados em estufa por mais 24 horas. Por fim, após duas novas lavagens utilizando o meio PBS, foi possível iniciar os tratamentos para cada grupo. Tanto o AM, quanto o DDC foram pesados e diluídos, separadamente, em solução salina preparada com 8,5 g de NaCl em um litro de água destilada. Ambas as soluções

foram preparadas com o dobro da concentração desejada, visto que seriam diluídas em PBS, como será descrito a seguir. Para o DDC, deve ser realizado o cálculo considerando que 24% da sua composição é água; ela deve ser desconsiderada do peso. Após preparadas as soluções, 100 µL de cada uma delas foram utilizados para cada um dos poços de seus respectivos grupos, junto a 100 µL do meio PBS utilizado na última lavagem. Finalizada a preparação das lacas de 96 poços, seguiu-se para a irradiação. Passado o tempo de irradiação (784 segundos, 127,53 mW/cm²), os poços foram lavados mais 2 vezes, repostos com RPMI e raspados com auxílio de ponteiras, para soltar as células de biofilme do fundo dos poços. Por fim, após serem transferidos para nova placa de 96 poços, foi efetuado o plaqueamento por meio de alíquotas de 5 µL de cada uma das diluições pelo método da gota em triplicatas. A contagem de colônias ocorreu 48 horas após incubação em estufa de aerobiose a 37 °C.

Para o cálculo da UFC/mL, foi utilizada a fórmula abaixo:

$$UFC/mL = \frac{\text{Número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Sendo n o valor absoluto da diluição feita e q , a quantidade pipetada em mL que foi semeada na placa contendo o meio sólido.

4.8 Grupos experimentais avaliados

4.8.1 Grupo controle de crescimento (CC)

Nesse grupo, não ocorreu nenhum tipo de tratamento. Enquanto os grupos L+ estavam sob irradiação de luz, efeitos do DDC e/ou do AM, esse grupo permaneceu no escuro e apenas com meio PBS, servindo como parâmetro para a avaliação dos efeitos dos demais grupos.

4.8.2 Grupo Luz (L+FS-)

Neste grupo houve irradiação de luz, mas na ausência do fotossensibilizador e do inibidor. Assim, foi avaliado se a luz sozinha tem efeitos tóxicos para o fungo.

4.8.3 Grupo fotossensibilizador (L-FS+)

Este grupo esteve sob presença, apenas, do fotossensibilizador, permanecendo no escuro. Isso serviu para a avaliação da toxicidade do AM contra o biofilme de *C. albicans*.

4.8.4 Grupo inibidor de CuZn-SOD (L-I+)

Para avaliação da toxicidade do inibidor DDC sobre as amostras, o grupo foi exposto apenas a sua presença, sendo conservado no escuro.

4.8.5 Grupo inibidor de CuZn-SOD + Luz (L+I+)

Neste grupo, avaliou-se a hipótese de o inibidor ter alguma ação ao ser irradiado com a luz. Desta forma, a solução do inibidor foi dispensada nas amostras microbianas para que, mais tarde, fossem irradiados por luz.

4.8.6 Grupo terapia fotodinâmica (L+FS+I-)

Na ausência do DDC, este grupo avaliou a ação da terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno contra o fungo em questão. Assim, foram preparadas alíquotas com as concentrações do FS já definidas e, após serem adicionadas no local do biofilme, foram irradiadas com as doses de luz já mencionadas.

4.8.7 Grupo inibidor de CuZn-SOD + fotossensibilizador (L-FS+I+)

Na ausência de luz, foi avaliada a possibilidade de uma interação entre o inibidor enzimático e o azul de metileno que pudesse ser tóxica ao microrganismo.

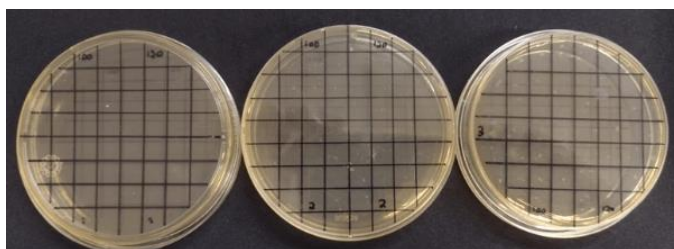
4.8.8 Grupo terapia fotodinâmica combinada (L+FS+I+)

Na presença de azul de metileno e do inibidor DDC, foi realizada a TFD. Assim, alíquotas de ambos os compostos foram dispensadas sobre os biofilmes e, em seguida, irradiadas com as mesmas doses de luz mencionadas anteriormente

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

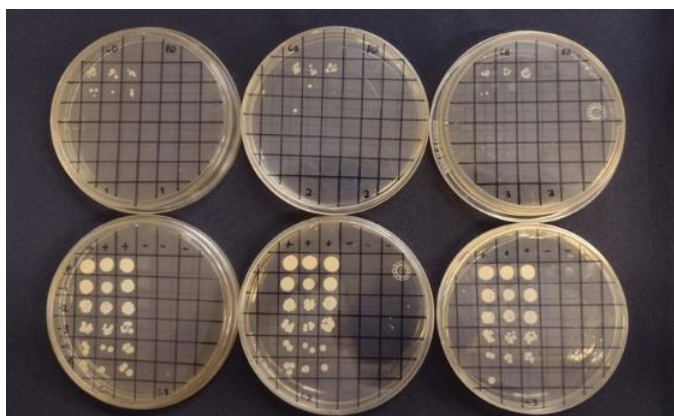
No início dos experimentos, como já dito, foi realizado o teste da concentração fungicida mínima para o DDC, o qual mostrou que a concentração adequada para os experimentos seria de 10 µg/mL. Os resultados desses testes podem ser observados nas imagens 1, 2, 3 e 4.

Figura 1 - Testes nas concentrações de 100 e 120 µg/mL.



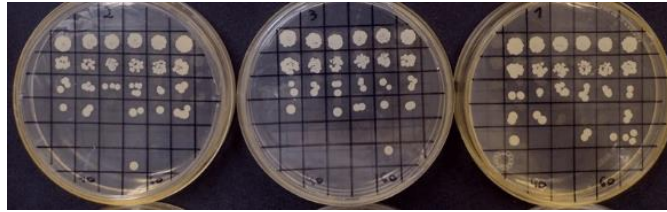
Fonte: Próprio autor.

Figura 2 - Testes nas concentrações de 60 e 80 µg/mL.



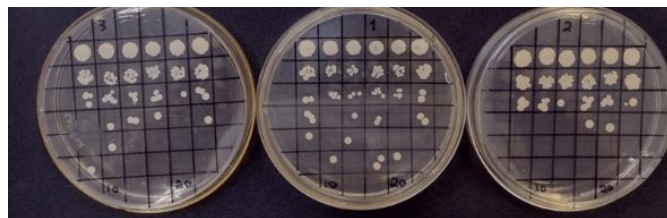
Fonte: Próprio autor.

Figura 3 - Testes nas concentrações de 40 e 60 µg/mL.



Fonte: Próprio autor.

Figura 4 - Testes nas concentrações de 10 e 20 µg/mL

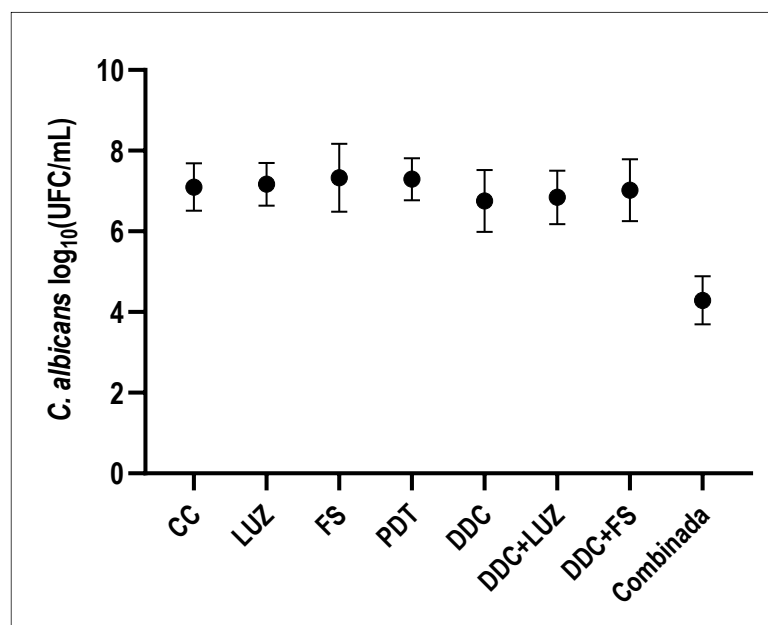


Fonte: Próprio autor.

A partir das figuras 1, 2, 3 e 4, percebe-se a necessidade de se utilizar a concentração de 10 µg/mL, visto que todas as outras concentrações apresentaram certo grau de inibição fúngica, fator que atrapalharia na interpretação de resultados futuros. O mesmo foi feito com a concentração do azul de metileno e com a potência de luz a ser irradiada, mas com menor quantidade de testes, como já informado anteriormente.

Após a realização dos experimentos, foi realizada a análise descritiva dos dados, que mostrou que eles são normais e de variância constante, sendo considerados homocedásticos. Foi possível realizar a comparação dos grupos experimentais a partir do Gráfico 1:

Gráfico 1 - Resultados alcançados para cada um dos grupos experimentais contra biofilmes de *Candida albicans* ATCC 90028.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

O Gráfico 1 apresenta os dados para cada grupo experimental juntamente à sua média de confiança. É possível perceber que todos os grupos se mantiveram sem grandes reduções do biofilme fúngico, com exceção do último que, com uma redução de cerca de 3 log, representa o grupo da terapia fotodinâmica combinada ao inibidor da enzima superóxido dismutase.

Por se tratar de um estudo inédito, não é possível fazer uma comparação com outros estudos sob as mesmas condições. No entanto, ao compararmos com alguns resultados já obtidos contra a *C. albicans*, percebe-se que a abordagem do presente estudo tem potencial.

Lopes *et al.* (2013) observaram uma redução de 30% a 62% na formação de biofilmes de *C. albicans* ao utilizarem a quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica (PACT) com azul de toluidina como fotossensibilizador. Apesar de promissores, esses resultados são inferiores à redução de 3 log na viabilidade de biofilmes alcançada neste estudo, que utilizou a combinação de TFD com a inibição de Cu/Zn-superóxido dismutase (SOD).

Adicionalmente, o trabalho de Sun *et al.* (2017), já mencionado anteriormente, destacou a capacidade do honokiol de induzir apoptose mediada por EROs em células planctônicas de *C. albicans*, promovendo disfunção mitocondrial. Embora eficaz para

células individuais, os efeitos sobre biofilmes não foram abordados, o que diferencia e destaca os resultados obtidos neste estudo.

Assim, os dados aqui apresentados reforçam que a combinação de TFD com inibição de SOD não apenas aumenta a produção de ROS, mas também supera mecanismos antioxidantes de defesa, promovendo um impacto significativo na viabilidade de biofilmes de *C. albicans*. Essa abordagem representa uma contribuição inovadora para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no combate a infecções fúngicas associadas a biofilmes.

REFERÊNCIAS

- BARBEDO, L.; SGARBI, D. Candidíase. **DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010. Disponível em: <http://ole.uff.br/wp-content/uploads/sites/303/2018/02/r22-1-2010-4-Candidiase.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2020.
- BIEL, M. A. Photodynamic Therapy of Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *In*: CLIFTON, N. J. **Methods in Molecular Biology**, v. 635, fev. 2010. p. 175-194. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-697-9_13. Acesso em: 04 ago. 2020.
- CARDOSO, P. S. **Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans***. 2013. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013. Disponível em: https://eq.uc.pt/bitstream/10316/26087/1/Tese_Tom%20Silva%20Cardoso.pdf. Acesso em: 04 ago. 2020.
- DUTRA, D. A. M. **Avaliação do fotossensibilizador azul de metileno em formulações para terapia fotodinâmica antimicrobiana**. 2016. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/6112/DUTRA%20DANILO%20ANTONIO%20MILBRADT.pdf?isAllowed=y&sequence=1>. Acesso em: 29 dez. 2024.
- DE FREITAS, L. *et al.* Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, mar. 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-22687-x>. Acesso em: 26 mai. 2020.
- DOVIGO, L. N. *et al.* Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 54, n. 2, p. 123-130, mar. 2011. DOI [10.1111/j.1439-0507.2009.01769.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01769.x). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19889173/>. Acesso em: 04 ago. 2020.
- FORD, C. B.; FUNT, J. M. *et al.* The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**, v. 4, p. 1-27, fev. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.00662>. Acesso em: 04 ago. 2020.
- HU, X. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, jun. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6030385/>. Acesso em: 22 mar. 2020.
- KIMANI, S. G. *et al.* Antioxidant Inhibitors Potentiate the Cytotoxicity of Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 1, p. 175-187, jan. 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.2011.01022.x>. Acesso em: 30 jul. 2020.
- LOPES, N. N.; MARTINS, T. D.; IKEDA, T. I.; CAMARGO, T. L.; SUZUKI, L. C. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, n. 12, p. 2833–2840, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24178908/>. Acesso em: 29 dez. 2024.

NÚÑES, S. C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica**. 2007. Tese requisito para Doutorado (Doutorado em Tecnologia Nuclear – Materiais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O’NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, dez. 2014. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf. Acesso em: 12 out. 2020.

ONISZCZUK, A. *et al.* The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Lublin, v. 83, p. 912-929, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>. Acesso em: 04 ago. 2020.

PEREIRA, C. A. *et al.* Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 3, p. 341-348, nov. 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10103-010-0852-3>. Acesso em: 04 ago. 2020.

PEREIRA GONZALES, F.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. **Fungal Biology**, v. 116, n. 1, p. 1-10, out. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878614611001814?via%3Dihub>. Acesso em: 04 ago. 2020.

SUN, L. *et al.* Honokiol induces reactive oxygen species mediated apoptosis in *Candida albicans* through mitochondrial dysfunction. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1-17, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172228>. Acesso em: 04 ago. 2020.