

INVESTIGAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DO VERDE MALAQUITA EM *Candida albicans*

L. R. FERREIRA*, A. M. DEANA*, M. E. S. SANTI*, R. G. LOPES*, A. S. SOUZA*, S. K. BUSSADORI* e R. A. PRATES*

*Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde - Universidade Nove de Julho/ UNINOVE, São Paulo, Brasil

e-mail: ro.farmac@hotmail.com e pratesra@uninove.br

Resumo: O objetivo desse estudo foi investigar a concentração inibitória mínima de verde de malaquita (VM) para *Candida albicans*. A terapia fotodinâmica (PDT) consiste numa modalidade terapêutica para o tratamento para doenças como câncer e possui também uma ação antimicrobiana expressiva. Vários estudos têm demonstrado que a PDT é altamente eficaz na destruição de micro-organismos. Para o experimento utilizamos uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 em caldo Sabouraud dextrose com concentrações decrescente de VM. Para obter as diluições desejadas de VM foram diluídas a partir de uma solução estoque a 200 mM. Os procedimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços e utilizamos 8 amostras para cada concentração. Após realizar o preenchimento total da placa de 96 poços, ela é incubada à temperatura de 37°C com leituras de crescimento após 12, 24 e 48 horas. Como resultado, observamos que o VM inibiu o crescimento de *C. albicans* nas concentrações superiores a $6,3 \times 10^{-2}$ mM.

Palavras-chave: Antimicrobianos, fotoinativação, Laser, Fotossensibilizador, Terapia fotodinâmica

Abstract: The aim of this study was to investigate the minimum inhibitory concentration of malachite green (MG) on *Candida albicans*. Photodynamic therapy (PDT) is a treatment modality for cancer and it also has a significant antimicrobial activity. We used an inoculum of *Candida albicans* ATCC 90028 in Sabouraud dextrose broth with decreasing concentrations of VM. The experiment was setup in 96 well plates with 8 wells for each concentration. The plates were incubated at 37°C for 12, 24 and 48 hours. Our results indicate that the MG inhibited the growth of *C. albicans* in concentrations higher than 6.3×10^{-2} mM.

Keywords: Antimicrobial, Malachite green, Minimum inhibitory concentration, Photodynamic therapy, Photoinactivation

Introdução

A terapia fotodinâmica, do inglês *photodynamic therapy* (PDT) consiste numa modalidade de fototerapia para o tratamento de doenças como câncer [1], e a PDT [1-8] possui também uma ação antimicrobiana expressiva. No entanto, apenas em meados da década de 70 que essa modalidade terapêutica ganhou relevância em estudos detalhados como alternativas para combater os efeitos da resistência microbiana. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a PDT é altamente eficaz na destruição de vírus e protozoários, assim como em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos [1-4]. A PDT consiste na ativação de fármacos fotossensíveis, também conhecidos como fotossensibilizadores (FSs), por fonte de luz ressonante. Esse fenômeno físico de absorção leva a uma cascata de reações moleculares que ao final resultam na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que apresentam alta reatividade com material biológico, culminando em elevada citotoxicidade [3].

Os FSs utilizados na PDT apresentam estrutura semelhante à clorofila e hemoglobina, devido suas moléculas constituírem anéis heterocíclicos. Esses FSs devem apresentar também comportamento biológico estável, ter caráter minimamente tóxico para tecidos do organismo e ser fotoquimicamente ativos [1].

O verde malaquita (VM) apresenta facilidade no trânsito através da membrana celular em bactérias. Este corante catiónico, pertencente à família dos triarilmetano, vem sendo usado como um fotossensibilizador, uma vez que promove a dissipação do potencial da membrana das células [4,5,7]. A literatura mostra a utilização de VM como fotossensibilizador para PDT com concentrações que variam de 0,1635 mM a 3 mM [4,5,7] e podem levar a alguma toxicidade no escuro para algumas espécies de microorganismos.

A literatura apresenta o VM como um potencial FS para PDT antimicrobiana, porém, existem divergências quanto aos parâmetros para a sua utilização, principalmente referente à concentração e toxicidade no escuro. Este fato prejudica a comparação entre os resultados na literatura e nos motiva a investigar a toxicidade do VM em *Candida*, para estabelecer uma

concentração onde esse FS não apresente toxicidade para *Candida albicans*.

Materiais e métodos

Para este experimento, foi utilizada uma suspensão de *C. albicans* ATCC 90028 que foi crescida em agar Sabouraud dextrose incubada por 48 horas a 37° C [6,7].

O experimento foi conduzido em uma câmara de fluxo laminar e após higienização e desinfecção com luz UV por 15 minutos. Uma pequena porção de *C. albicans* foi colhida do ágar e suspensa em caldo sabouraud dextrose até obter um inóculo com 60~70% de transmitância, que corresponde a uma concentração de 1×10^6 células fúngicas por mL [8]. Soluções estoque de VM 2 e 200 mM foram preparadas em água destilada e posteriormente armazenadas. Foram obtidas diluições de 100 a 0,2 mM em um primeiro experimento e de 1 a 0,002 mM em um segundo experimento.

Após a realização das diluições em placas de 96 poços, uma coluna foi preenchida com alíquotas contendo inóculo de *C. albicans* sem fotossensibilizador (controle positivo – C+) e uma coluna foi preenchida com meio de cultura sem fungos (controle negativo – C-).

As demais colunas foram preenchidas com 100 µl de inóculo (em caldo de sabouraud dextrose) para que na sequência do experimento as diluições seriadas do VM fossem realizadas partindo das soluções mães (200 mM e 2 mM), obtendo as concentrações finais de a) 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, $7,81 \times 10^{-1}$ e $3,90 \times 10^{-1}$, $1,95 \times 10^{-1}$ mM em um primeiro experimento, e b) 1, 0,5, 0,25, $1,25 \times 10^{-1}$, $6,25 \times 10^{-2}$, $3,12 \times 10^{-2}$, $1,56 \times 10^{-2}$, $7,81 \times 10^{-3}$, $3,90 \times 10^{-3}$ e $1,95 \times 10^{-3}$ mM em um segundo experimento. As diluições ficaram dispostas em colunas da placa, sendo que na décima coluna, alíquotas de 100 µl foram retiradas e desprezadas, para obter o mesmo volume de meio de cultura em cada um dos poços.

Após realizar o preenchimento total da placa de 96 poços, a mesma é incubada à temperatura de 37° C e sua leitura realizada em 24 e 48 horas. A leitura dos resultados é feita a partir da observação da turvação do meio de cultura, que após a incubação e crescimento microbiano, atinge 50% do grupo C+. Este valor de concentração é considerada a concentração inibitória mínima (CIM) [9]. Para chegar a esta visualização da CIM, o experimento foi realizado com 8 repetições por grupo e repetido 2 vezes.

Resultados e Discussão

Este experimento demonstrou que *C. albicans* na presença do fotossensibilizador verde de malaquita apresentou um atraso no crescimento fúngico nas doses mais elevadas. Esse achado se deve ao crescimento observado no grupo C+ no tempo esperado de 24 horas, onde ocorreu o retardo entre os grupos de 1 a 10 do experimento que utilizou doses mais elevadas de VM

entre 100 e 2×10^{-1} mM, evidenciando a existência de um mecanismo de inibição da mitose.



Figura 1 – Placa de 96 poços leveduras e VM.

Foi possível verificar que na concentração de $6,3 \times 10^{-2}$ mM ocorreu o crescimento de *C. albicans*, pois, a transmitância observada nessa concentração é igual ou menor que 50% comparado ao controle C+ [9]. Esse padrão de crescimento também foi observado nas concentrações inferiores (Fig. 1).

Os dados mostram que o VM em doses maiores do que $6,3 \times 10^{-2}$ mM (Tab. 1) apresentam efeito fungistático, visto que houve crescimento fúngico de aproximadamente 50% quando comparado à coluna 11 (C+). Entre todas as concentrações testadas com o VM e a cultura de *C. albicans* somente foi considerada positiva nas concentrações onde o crescimento fúngico se tornou evidente indicando suscetibilidade ao VM. Já em concentrações maiores o crescimento fúngico foi considerado negativo indicando que o VM afetou alguma parte do funcionamento interno da *C. albicans*. Sendo assim, é importante observar na literatura o grau de toxicidade no escuro apresentado pelos grupos sem irradiação. É importante ressaltar que dados de toxicidade dependem a concentração e do tempo de contato do fungo com o FS.

A PDT promete ser uma alternativa altamente eficaz para o combate de infecções, porém, a grande variedade de parâmetros existente na literatura motivaram nosso estudo a procura e quantificar uma dose onde o VM não apresente toxicidade para *C. albicans*. Também temos que ressaltar o retardando no crescimento microbiano, principalmente no período das primeiras 24 horas de incubação conforme visto em nossos estudos.

Souza et al. [5] observaram que o VM, assim como azul de metileno e azul de toluidina apresentam efeito fungicida sobre *C. albicans* quando submetido a PDT com irradiação laser de baixa potência. No presente estudo, foi utilizada uma concentração de 0,1mg/ml para os três FSs. Com isso obtiveram redução significativa de *C. albicans*. Nossos resultados demonstraram que esta concentração inibiu o crescimento de *C. albicans*, mesmo sem irradiação. É importante notar que existem diferenças metodológicas entre os dois trabalhos, e em nosso caso, o FS ficou em contato por mais de 24 horas com as células fúngicas para apresentar esta toxicidade.

Poços	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[mM]	1	0,5	0,25	1,3E-01	6,3E-02	3,1E-02	1,6E-02	7,8E-03	3,9E-03	2,0E-03	C (+)	C (-)
[mM]	100	50	25	12,5	6,3E+00	3,1E+00	1,6E+00	7,8E-01	3,9E-01	2,0E-01	C (+)	C (-)

Tabela 1 – Concentrações de VM em mM utilizadas no experimento. As células com fundo colorido representam as concentrações que não foram tóxicas para *C. albicans*. A concentração inibitória mínima foi de $6,3 \times 10^{-2}$ mM. As concentrações menores confirmaram o crescimento fúngico.

Rolim et al. [10] comparam os efeitos dos mesmos FSs que Souza et al. [5], porém em seu experimento utilizaram uma cultura bacteriana de *Streptococcus mutans*, onde obtiveram uma redução frente aos grupos controle. No entanto, essa redução frente à PDT com VM não foi biologicamente significativa. Nos outros FSs, a redução de 1,4 log de *S. mutans* foi promissora, visto que a produção de EROs promove forte ação antimicrobiana.

Vilela et al. [11] utilizaram uma concentração de 2 mM de VM e submetem a PDT frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Essa dose elevada apresentou redução bacteriana, porém quando comparada com outros FSs como azul de metileno e azul de toluidina sua eficácia se torna menor, pois em concentrações muito menores esses dois FSs também apresentam reduções microbianas, tal fato se dá pela baixa produção de oxigênio singlete produzida por VM [10].

Junqueira et al. [4] demonstraram que o VM na concentração de 0,1% apresentou um bom potencial para PDT antimicrobiana em bactérias e fungos. Este achado é corroborado por outros estudos que também observaram capacidade fotodinâmica de VM [4,5,7,10,11]. Porém, o presente resultado nos indica que temos que levar em conta uma possível toxicidade no escuro para este FS, que pode atrasar o crescimento de fungos. Mais estudos são necessários para quantificar este atraso no crescimento microbiano causado por VM e quais os mecanismos de ação por trás deste fenômeno.

Conclusão

O verde malaquita apresentou inibição do crescimento de *Candida albicans* em concentrações superiores a $6,3 \times 10^{-2}$ mM.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde por prover material laboratorial e infra-estrutura da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) para realização dos experimentos.

Referências

- [1] Hamblin M.R; Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 3(5):436-50, 2004.
- [2] Donnelly, R.F; Mccarron, P.A; Tunney, M.M; David-Woolfson, A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B Biol* 86:59-69, 2007.
- [3] Donnelly, R.F; Mccarron, P.A; Tunney, M.M. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* 163:1-12, 2008.
- [4] Junqueira, M.A; Ribeiro, R.D; Rossoni, J.O; Barbosa, S.M.R; Querido, Jorge, A.O.C; Antimicrobial Photodynamic Therapy: photodynamic Antimicrobial Effects of Malachite Green on *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, and *Candida*, *Photomedicine and Laser Surgery*, 28: S67-S72, 2010.
- [5] Souza, R.C; Junqueira J.C; Rossoni, R.D; Pereira, C.A; Munin, E; Jorge, A.O.C; Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*, *Laser Med Sci*, 25, p. 385-389, 2010.
- [6] Giroldo, L.M; Felipe, M.P; Oliveira, M.A; Munin, E; Alves, L.P; Costa, M.S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci* 24:109-112, 2009.
- [7] Prates, R.A; Yamada, A.M.J; Suzuki, L.C. Bacterial effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B Biol* 86:70-76, 2007.
- [8] Prates R.A; Kato, I.T; Ribeiro, M.S; Tegos, G.P; Hamblin, M.R. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother* 66:1525-1532, 2011.
- [9] Andrews, Jennifer M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48 (suppl 1): 5-16. 2001.
- [10] Rolin, JP; de-Melo M.A; Guedes, S.F; Albuquerque-Filho, F.B; de Souza J.R; Nogueira, N.A; Zanin, I.C; Rodrigues, L.K; The

antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, n.106, p. 40-46, 2012.

- [11] Vilela, S; Godinho F., Junqueira, JC; Barbosa, J.O; Majewski, M; Munin, E; Jorge, A.O.C; Photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An in vitro study, archives of oral biology, n.57, p. 704-710, 2012.