

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**BRUNA ALBUQUERQUE GARCIA**

**TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR AZUL DE ORTOTOLUIDINA:  
INFLUÊNCIA DO REGIME DE TRATAMENTO, SUPERFÍCIE  
E MATRIZ EXTRACELULAR EM BIOFILME DE *CÂNDIDA ALBICANS IN VITRO* E  
TOXICIDADE EM MODELO ANIMAL**

**FORTALEZA**

**2019**

**BRUNA ALBUQUERQUE GARCIA**

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR AZUL DE ORTOTOLUIDINA:  
INFLUÊNCIA DO REGIME DE TRATAMENTO, SUPERFÍCIE  
E MATRIZ EXTRACELULAR EM BIOFILME DE *CÂNDIDA ALBICANS IN VITRO* E  
TOXICIDADE EM MODELO ANIMAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Matthes de Freitas Pontes

Coorientadora: Profa. Dra. Simone Duarte

**FORTALEZA**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G198t Garcia, Bruna Albuquerque.  
Terapia fotodinâmica mediada por azul de ortoluidina: influência do regime de tratamento, superfície e matriz extracelular em biofilmes de *Cândida albicans* in vitro e toxicidade em modelo animal / Bruna Albuquerque Garcia. – 2019.  
89 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Karina Matthes de Freitas Pontes.  
Coorientação: Profa. Dra. Simone Duarte.

1. *Cândida albicans*. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Matriz extracelular. 4. Toxicidade. I. Título.

CDD 617.6

---

BRUNA ALBUQUERQUE GARCIA

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA MEDIADA POR AZUL DE  
ORTOTOLUIDINA: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MATRIZ EXTRACELULAR  
EM BIOFILMES DE *CÂNDIDA ALBICANS IN VITRO* E TOXICIDADE LOCAL E  
SISTÊMICA *IN VIVO*

Tese de Doutorado a ser apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da  
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica.

NOTA \_\_\_\_\_  
DATA DA APROVAÇÃO \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Karina Matthes de Freitas Pontes (orientadora)  
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – UFC

---

Rômulo Rocha Régis  
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – UFC

---

Paulo Goberlânio de Barros Silva  
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – UFC

---

Bruna Marjorie Dias Frota de Carvalho  
Centro Universitário Christus – UNICHRISTUS

---

Ramille Araújo Lima  
Centro Universitário Christus – UNICHRISTUS

## DEDICATÓRIA

A Deus, o Senhor da minha vida, que por tamanha graça e misericórdia deu Sua vida por nós. Por ter me sustentando todos os dias e abençoado grandiosamente toda a minha caminhada.

Aos meus pais, Eduardo e Marta, por toda dedicação e amor, que estiveram sempre ao meu lado apoiando todas as minhas escolhas e me direcionando para o melhor caminho. Tenho muito orgulho em gritar para os quatro ventos que sou filha de vocês.

Aos meus irmãos João e Camila, minha cunhada Cynara e minhas sobrinhas Laura e Clara, que são bênçãos na minha vida. Por sempre me fazerem sentir amada, mostrando o real sentido da família.

À minha princesa Donatella, por toda companhia durante as horas intermináveis em frente ao computador e pelo amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Profa. Dra. Karina Matthes de Freitas Pontes, por ter sido uma inspiração durante esses dez anos em que trabalhamos juntas. Por ter acreditado no meu potencial ainda na graduação e por ter me conduzido aos primeiros passos desse universo lindo da pesquisa e do ensino. Por me mostrar que, na vida, podemos ter tudo o que amamos se nos dedicarmos e tratarmos o próximo com gentileza. Foi uma honra tê-la como orientadora.

À minha coorientadora Profa. Dra. Simone Duarte, por ter tornado tão especial uma das mais enriquecedoras experiências da minha vida. Por ter me acolhido em seu laboratório em Indianápolis, Indiana, EUA, de forma tão amorosa e por não ter medido esforços em abrir oportunidades para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À minha eterna *roomie* Bia, por ter me recebido com tanto carinho e por ter despertado em mim um amor ainda maior pela pesquisa através do seu entusiasmo e paixão por tudo o que faz; é lindo ver a sua dedicação à pesquisa. Por ter sempre me incentivado a descobrir o meu melhor, mesmo quando eu mesma não acreditava que era capaz. Seus ensinamentos, considerações e apoio foram fundamentais para que essa tese fosse concluída.

Aos queridos Ramille, Paulinho e Laís, por toda a colaboração e dedicação no desenvolvimento de um capítulo dessa tese. O apoio, os ensinamentos e a paciência de vocês foram fundamentais para que eu pudesse desenvolver esse novo desafio.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, que foi minha casa durante onze anos, responsável por toda minha formação durante a graduação, mestrado e doutorado. Tenho muito orgulho em dizer que sou “cria” da UFC e me sinto muito honrada por ter tido a oportunidade de estudar aqui.

Ao coordenador Vicente de Paulo A. Saboia e aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFC, que muito me ensinaram e apoiaram. A dedicação e a capacidade demonstrada por todos sempre foram grandes inspirações para a minha carreira.

Aos queridos professores Wagner Araújo de Negreiros e Rômulo Rocha Régis, por todos os ensinamentos e pela ajuda no meu desenvolvimento clínico e acadêmico.

Aos amigos do nosso grupo de pesquisa, Iana, Matheus, Ivo, Kadidja, Adamastor, Janaína, Bruna e Guilherme, por toda a colaboração e companheirismo.

Aos alunos do Programa, que tive o privilégio de conhecer durante o doutorado e com quem sempre pude trocar conhecimentos e dividir conquistas; em especial a amiga Nara, por ter me dado suporte, incentivado e vivido comigo o sonho do doutorado sanduíche.

À amiga Nicolle, por entender tão bem minhas dúvidas e anseios e por sempre estar presente com uma palavra de apoio.

Aos amigos de Indianápolis, Sávio e Carol, por terem sido meu apoio e companhia durante o período do doutorado sanduíche. Por terem compartilhado todo conhecimento e experiência no laboratório e por terem tornado meus dias mais felizes em Indy. Sem vocês essa experiência não teria sido tão especial.

Ao amigo Omar, por todo apoio e incentivo na superação da timidez e dos desafios de morar em um novo país, com nova língua e nova cultura. Seu apoio foi fundamental para meu desenvolvimento durante o doutorado sanduíche em Indianápolis.

Aos Titulares e Suplentes da banca de defesa, pela disponibilidade e apoio.

À equipe do Laboratório de Engenharia de Sistemas de Computação da UFC, especialmente ao Prof. Jarbas Aryel e ao aluno David Mota, pela ajuda na confecção do dispositivo do estudo.

À equipe do Biotério do Centro Universitário Christus, pelo apoio no desenvolvimento de parte dessa tese.

À instituição de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de doutorado regular e da bolsa de doutorado sanduíche.

O desenvolvimento desta tese foi uma caminhada com superação de desafios, desenvolvimento pessoal, transformação e amadurecimento profissional, que foi possibilitada pelo carinho e apoio de pessoas queridas que Deus colocou em minha vida. E a todos que, de alguma forma, ajudaram na confecção deste trabalho, se hoje concluo essa etapa, o mérito é compartilhado com todos vocês.

**MEU SINCERO “MUITO OBRIGADA!”.**

## RESUMO

Os tratamentos para infecções causadas por *Candida albicans* são um desafio devido às altas taxas de recorrências. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tem sido sugerida como uma abordagem alternativa para essas infecções. Desse modo, esta tese, composta por quatro capítulos, objetiva: (1) comparar os resultados da TFDa contra biofilmes de *C. albicans* formados em dois diferentes substratos – resina acrílica ou placa de poliestireno; e dois regimes de aplicação da TFDa – duas vezes ao dia em um período de 48 horas, ou aplicação única após 48 horas de formação do biofilme; (2) comparar os resultados da TFDa em biofilmes de uma cepa padrão de *C. albicans* e de duas cepas mutantes com componentes da matriz extracelular reduzidos; (3) avaliar a toxicidade local e sistêmica da TFDa *in vivo*; (4) desenvolver um projeto de patente de um dispositivo portátil adaptado à cavidade oral para aplicação da TFDa. No estudo 01, biofilmes de *C. albicans* foram incubados com o fotossensibilizador azul de ortotoluidina (TBO; 44  $\mu\text{M}$ ), seguido da aplicação de luz (635 nm; 175,2  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Foram usados como controle negativo água ultrapura e como controle positivo 0,12% de clorexidina. Biofilmes foram avaliados pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), peso seco (PS) e microscopia confocal. No estudo 02, biofilmes tratados com TFDa foram incubados em TBO (44  $\mu\text{M}$ ), seguido da aplicação de luz (635 nm; 87,6  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 175,2  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Foram usados como controle negativo água ultrapura e como controle positivo 0,12% de clorexidina. Os efeitos do TBO sozinho e da luz sozinha também foram avaliados. Biofilmes foram avaliados por UFC, PS, DNA extracelular, proteínas solúveis e insolúveis, polissacarídeos solúveis e insolúveis e microscopia confocal. No estudo 03, aplicações oral e tópica de TBO foram realizadas em camundongos durante sete dias consecutivos. Nos animais tratados com TFDa, primeiro foi aplicado TBO (22  $\mu\text{M}$ ), seguido por luz (635 nm; 152  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Como controle negativo, os animais foram tratados com solução salina estéril e, como controle positivo, com suspensão de nistatina. Os efeitos do TBO sozinho e da luz sozinha também foram avaliados. Após cada aplicação tópica, 0,3 mL de cada solução foi administrado por gavagem para todos os grupos. Toxicidades locais e sistêmicas foram avaliadas por análises histológicas e variação de massa corporal e dos órgãos. Os resultados do estudo 01 demonstraram que biofilmes formados em placa de poliestireno são mais resistentes a TFDa do que os biofilmes formados em resina acrílica. O estudo 02 mostrou que cepas mutantes foram mais susceptíveis a TFDa do que a cepa padrão. O terceiro capítulo mostrou que TFDa não afetou o desenvolvimento do peso do corpo e dos órgãos dos animais; no entanto, a aplicação direta da luz em contato com o palato causou uma diminuição da espessura do epitélio deste. Em conclusão, os resultados

desses estudos sugerem que a TFDa é uma abordagem terapêutica segura e promissora contra *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*, terapia fotodinâmica, matriz extracelular, toxicidade, polimetil metacrilato, poliestireno, substrato.

## ABSTRACT

*Candida albicans* infections treatments is challenging due to the high recurrence rates. The antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been suggested as an alternative approach for these infections. Thus, this thesis, comprised by 4 chapters, aimed: (1) Comparing aPDT results against *C. albicans* biofilms formed on two different substrates – acrylic resin or polystyrene plate; and two aPDT application regimens – twice-daily over the course of 48 hours or one time after 48 hours biofilm formation (2) Comparing the outcomes of aPDT on biofilms of *C. albicans* wild-type strain and two mutant strains with reduced extracellular matrix components. (3) Assessing the local and/or systemic toxicity of aPDT *in vivo*. (4) Developing a device patent design adapted to oral cavity to applied aPDT. In study 1, *C. albicans* biofilms were incubated with the photosensitizer toluidine blue O (TBO; 44  $\mu\text{M}$ ) before having light (635 nm; 175.2  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). As a negative control, ultrapure water, and as a positive control 0.12% chlorhexidine were used. Biofilms were evaluated for colony forming units (CFU), dry weight (DW). Confocal scanning laser microscopy (CLSM) was performed. In study 2, biofilms treated with aPDT were incubated with TBO (44  $\mu\text{M}$ ) before light (635 nm; 87.6  $\text{J}/\text{cm}^2$  and 175.2  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). As a negative control, ultrapure water, and as a positive control 0.12% chlorhexidine were used. The effect of TBO and light alone were also assessed. Biofilms were evaluated for CFU, DW, extracellular DNA, soluble and insoluble protein, water-soluble polysaccharides, alkali-soluble polysaccharide and CSLM. In study 3, oral and topical administration of TBO (22  $\mu\text{M}$ ) were performed in mice during seven consecutive days. In the animals treated with aPDT, first the TBO was applied and then the light (635 nm; 152  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). As negative control, the animals were treated with sterile saline solution and as a positive control with oral nystatin. The effects of TBO alone and of light alone were also assessed. After the topical applications, 0.3 ml of each solution was administrated by gavage for all groups. Local and systemic toxicity were evaluated for histological analysis and body/organs mass variation. The study 1 demonstrated that the biofilms formed on polystyrene plate are more resistant to aPDT than biofilms formed on acrylic resin. The result of the study 2 showed that the mutant strain was more susceptible to aPDT than the wide type strain. The third manuscript showed that aPDT did not affect the development body weight and the weight of organs; however, the direct application of light in contact with the palate caused a decrease of epithelium thickness. In conclusion, the results of these studies suggest that aPDT is a safe and promising therapeutic approach against *C. albicans*.

**Keywords:** *Candida albicans*, photodynamic therapy, extracellular matrix, toxicity, polymethyl methacrylate, polystyrene, substrate.