

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE DIFERENTES TIPOS DE PRÓPOLIS ASSOCIADAS À TERAPIA FOTODINÂMICA: ESTUDO *IN VITRO* SOBRE *Candida albicans*

Natanael de Lemos Albuquerque¹; Rafael Inácio de Almeida²; Wesley Soares Holanda Silva³; Gyulia Machado Lisboa Rabelo⁴; Ticiano Gomes do Nascimento⁵; Regianne Umeko Kamiya⁶.

¹Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/6384549967356849>

²Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/3092918267542695>

³Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/5649318430586574>

⁴Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/9092642011380180>

⁵Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/6296388037177344>

⁶Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/2211101374412036>

DOI: 10.47094/IVCNNESP.2023/RE.96

PALAVRAS-CHAVE: Fotoquimioterapia. Antifúngico.

ÁREA TEMÁTICA: Outros.

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT) surgiu como uma solução não invasiva para tratar várias infecções causadas por bactérias, fungos e vírus, principalmente aquelas que são resistentes aos tratamentos e drogas convencionais. O laser pode promover reparação tecidual, modulação da inflamação e analgesia. Ademais, o laser pode apresentar efeito antimicrobiano, quando combinado com agentes fotossensibilizadores.

Os fotossensibilizadores naturais possuem um grande histórico de uso na medicina. Por serem bastante hidrofílicos são eliminados rapidamente do organismo, o que reduz as chances de toxicidade (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019). Um exemplo disso é a própolis: uma substância composta principalmente de pólen, cera e secreções salivar de abelhas. A sua composição química é incerta e pode variar de acordo com a estação e os tipos de plantas polimerizadas.

Diante do exposto, este estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da PDT associada à diferentes tipos de própolis sobre fungos da espécie *Candida albicans*, um patógeno oportunista da cavidade bucal, frequentemente relacionados com o desenvolvimento de candidíase.

OBJETIVO

A pesquisa busca avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de diferentes tipos de própolis, com ou sem a aplicação do PDT, em micro-organismos causadores de doenças de interesse médico e odontológico, como espécies de *Candida albicans*.

METODOLOGIA

Este estudo consiste em uma pesquisa experimental de caráter quali-quantitativo, de natureza básica, que objetiva determinar a mínima concentração de extrato de própolis capaz de inibir eficientemente o crescimento microbiano de cepas isoladas de leveduras do gênero *Cândida*.

O desempenho dos extratos de própolis foi avaliado em quatro etapas principais:

1. Preparo dos extratos de própolis: Os três tipos de própolis (marrom, verde e vermelha) foram extraídos por meio da técnica de maceração com solução hidroalcoólica.
2. Cepas Microbianas e condições de crescimento: Foram selecionadas as cepas de *Candida albicans* (ATCC 36801 e SC5314), doada pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, RJ. As cepas foram reativadas em meio Sabouraud Destrose Agar com clorofenicol. As culturas foram incubadas a 37°C em microaerofilia (5% de CO₂) por 24-48 horas para obter unidades formadoras de colônias (UFCs) isoladas.
3. Padronização do inóculo inicial: Os inóculos iniciais foram padronizados utilizando a Escala MacFarland 0.5, seguindo o protocolo recomendado pelo CLSI.
4. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre células planctônicas: Os testes foram realizados de acordo com estudos prévios (Hakimiha *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2014; Azizi *et al.*, 2018), com algumas modificações. Resumidamente, colônias isoladas em meios semisseletivos foram utilizadas para o preparo dos inóculos usando-se a Escala MacFarland 0,5. Cerca de 10⁷ UFCmL⁻¹ de fungos foram inoculados em 180 µL de meio BHI dispostos em microplacas de poliestireno com 96 poços (diluição 1:10) contendo entre 46, 93, 187, 375, 750, 1500 ou 3000 µg/mL de extrato de verde, marrom ou vermelha diluído serialmente, em duplicata. Solução de azul de toluidina à 0,01% (0,1 mg/ml) e veículo controle foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. As microplacas foram incubadas à 37°C por 5 min e as células viáveis (crescimento positivo) foram evidenciadas com resazurina à 0,1% e incubação por 20 min à 37°C. A CFM foi definida como a menor faixa de concentração do extrato capaz de suprimir o crescimento fúngico pelos resultados colorimétricos da resazurina (Fonseca *et al.*, 2020).
5. 4. Atividade antibiofilme do extrato de própolis com e sem PDT – determinação da concentração inibitória mínima (CIM) sobre biofilmes: Biofilmes pré-formados em superfície de poliestireno, com 48 horas de crescimento em meio YP (1,5% de extrato de levedura e 1% de glicose) suplementado com glicose a 0,5%, foram tratados com extrato de própolis concentrado com ou sem a PDT associada (100 mW, 9J por 90 segundos, 320J/cm²) e (100 mW, 9J por 120 segundos, 320J/cm²). Após a formação do biofilme, o sobrenadante foi substituído por uma suspensão contendo extrato de própolis (7500 e 15000 µg/mL) ou azul de toluidina (0,01%) ou veículo controle. Após incubação por 24 horas a 37°C, uma duplicata foi irradiada. As células de biofilme expostas ao extrato de própolis, com ou sem irradiação, foram removidas assepticamente dos poços, diluídas seriamente (diluição de 10) em solução salina esterilizada, plaqueadas

nos meios semisseletivos correspondentes e quantificadas (UFC/mL) após 48 horas de incubação. Azul de toluidina 0,01% e meio de cultura sem fotossensibilizantes foram utilizados como controles. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do biofilme foi definida como a menor concentração dos fotossensibilizantes capaz de inibir 90% ou mais das células em relação ao veículo controle, com ou sem irradiação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 resume os valores de CFM dos extratos marrom, verde e vermelha sobre células planctônicas de *C. albicans*. Não houve atividade fungicida nas concentrações testadas (tabela 1).

Tabela 1. Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos de própolis e extratos de plantas sobre células planctônicas, pelo método colorimétrico da resazurina:

Espécies de Micro-organismos	Extrato de Própolis Marrom		Extrato de Própolis Verde		Extrato de Própolis Vermelha	
	SEM PDT	COM PDT	SEM PDT	COM PDT	SEM PDT	COM PDT
<i>Candida albicans</i> ATCC 36802	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000
<i>Candida albicans</i> SC 5314	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000	>3000

Fonte: Laboratório de Biologia e Microbiologia celular – ICBS/UFAL (2022)

Para os testes antibiofilme, foram testadas concentrações dos extratos superiores à 3000 µg/ml. Foram usadas as concentrações de 7500 e 15000 µg/ml, associado ou não a PDT, com tempo de 90 segundos de exposição. Como os resultados também não foram promissores (dados não demonstrados), aumentou-se o tempo de exposição ao laser de 90 para 120 segundos, na tentativa de promover possíveis alterações ou melhorias na Terapia Fotodinâmica (PDT). Os resultados estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de diferentes fotossensibilizadores SEM E COM PDT (9J/120 seg) sobre células organizadas em biofilmes monoespécie (48 horas em microaerofilia), após 24 horas de exposição ao antimicrobiano:

Espécies de Micro-organismos	Azul de Toluidina		Própolis Marrom		Própolis Verde		Própolis Vermelha	
	%		µg/ml		µg/ml		µg/ml	
	SEM PDT	COM PDT	SEM PDT	COM PDT	SEM PDT	COM PDT	SEM PDT	COM PDT
<i>Candida albicans</i> ATCC 36802	> 0.01%	> 0.01%	7500	7500	7500	7500	7500	7500
<i>Candida albicans</i> SC 5314	> 0.01%	> 0.01%	7500	7500	7500	7500	7500	7500

Fonte: Laboratório de Biologia e Microbiologia celular – ICBS/UFAL (2022)

A tabela 2 demonstra que na concentração de 7500 µg/ml a formulação tamponada da própolis foi capaz de inibir a formação do biofilme em mais de 90%, estando associado ou não à PDT.

Embora nenhum dos extratos tenham apresentado eficácia de 100%, todos eles demonstraram desempenho melhor que o fotossensibilizador azul de toluidina, que na concentração de 0,01% (comercialmente preconizada), não foi capaz de inibir nenhuma cepa microbiana em biofilme.

A resistência circunstancial das cepas de *Candida albicans*, especialmente na forma de biofilme, apresenta um desafio significativo para o desenvolvimento de ações antifúngicas efetivas. Os biofilmes são estruturas complexas que protegem as células fúngicas, dificultando a penetração de agentes antifúngicos convencionais. Isso se deve a uma combinação de fatores, como a matriz extracelular do biofilme e a capacidade das células fúngicas de se adaptarem e sobreviverem em ambientes hostis. Independente do tipo, as própolis avaliadas demonstraram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* e foram capazes de inibir a formação e a viabilidade de biofilmes, independentemente da sua associação à PDT. Esse estudo sugere que a própolis pode ser uma opção terapêutica viável para o tratamento de infecções fúngicas resistentes, oferecendo uma abordagem alternativa ao uso de antifúngicos convencionais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de própolis testados apresentaram atividade antibiofilme sobre *Candida albicans*, independentemente do uso da PDT. O potencial antimicrobiano dos extratos de própolis é promissor quando comparável com o azul de toluidina. Entretanto, mais estudos serão necessários para o desenvolvimento de uma formulação de própolis aplicável à PDT para atividade antibiofilme de *C. albicans*.

PRINCIPAIS REFERÊNCIAS

- Azizi, A. et al. **Comparison of the antimicrobial efficacy of photodynamic therapy with two mediators against *Lactobacillus acidophilus* in vitro.** Photodiagnosis Photodyn Ther, v. 21, p. 357-362, Mar 2018. ISSN 1873-1597.
- CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro et al. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira.** Química Nova, v. 32, p. 1523-1527, 2009.
- CARMELLO, Juliana Cabrini et al. **Antimicrobial photodynamic therapy reduces adhesion capacity and biofilm formation of *Candida albicans* from induced oral candidiasis in mice.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 27, p. 402-407, 2019.
- Hakimiha, N. et al. **The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources.** J Appl Oral Sci, v. 22, n. 2, p. 80-4, Apr 2014. ISSN 1678-7765.
- NÚÑEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. **PDT - Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia.** 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. 253 p.
- RABELO, Gyulia. **Efeitos da terapia fotodinâmica e fotossensibilizadores (azul de toluidina e própolis vermelha) sobre micro-organismos causadores da cárie dental e de infecções endodôntica.** Trabalho de conclusão de curso (TCC) – Faculdade de

odontologia da Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022.

Siqueira, Anderson et al. **Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre Enterococcus faecalis.** Revista de Odontologia da UNESP [online]. 2014, v. 43, n. 6, pp. 359-366.