

Título em Português:	Investigação dos Efeitos da Inativação Fotodinâmica em Células Fúngicas Resistentes a Antifúngicos Utilizando Espectroscopia FTIR
Título em Inglês:	Investigation of the Effects of Photodynamic Inactivation on Antifungal Resistant Fungal Cells Using FTIR Spectroscopy
Autor:	Anna Luiza Franca de Oliveira Resende
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Kate Cristina Blanco
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Radiologia e Fotobiologia
Agência Financiadora:	CNPq - PIBIC

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM CÉLULAS FÚNGICAS RESISTENTES A ANTIFÚNGICOS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA FTIR

Anna Luiza França de Oliveira Resende

Gabriela Gomes Guimarães, Jennifer Machado Soares

Kate Cristina Blanco

Universidade de São Paulo - Instituto de Física de São Carlos

annaluizaforesende@usp.br

Objetivos

Investigar as alterações fenotípicas e bioquímicas em *Candida albicans* submetida à inativação fotodinâmica, utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para compreender os mecanismos de resposta celular ao tratamento.

Métodos e Procedimentos

Cultivo de *C. albicans*: Cepa ATCC 90028 reativada em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubada; inóculo ajustado para 10^8 UFC/ml; biofilmes formados para experimentos com hifas.

Concentração Inibitória Mínima (CIM): Anfotericina B preparada e distribuída por diluição sequencial em microplacas de 96 poços. Inóculo e meio de cultura adicionados, realização de controle positivo, negativo e do meio de cultura; incubação seguida de leitura em microplacas.

Inativação Fotodinâmica (IFD): Leveduras e hifas incubadas com curcumina por 20 min e expostas a luz LED (450 nm, 15 J/cm², Biotable®); amostras centrifugadas e avaliadas na CIM novamente.

Espectroscopia FTIR: Colônias foram distribuídas sobre o cristal presente no equipamento até evaporação parcial da

umidade; amostras foram escaneadas 250 vezes no intervalo 4000–500 cm⁻¹; espectros analisados pela segunda derivada, normalizados e interpretados por dendrogramas.

Resultados

A espectroscopia FTIR revelou alterações significativas nos perfis bioquímicos de *C. albicans* após a IFD, com mudanças detectadas em polissacarídeos (900–1200 cm⁻¹), proteínas (1400–1700 cm⁻¹), ácidos nucleicos (1215–1240 cm⁻¹) e lipídios (1700–1800 e 2800–3000 cm⁻¹). Essas modificações refletem respostas causadas pela IFD e pela geração de espécies reativas de oxigênio nas células, como possíveis danos oxidativos à parede celular e membranas, degradação de macromoléculas, desestabilização de funções metabólicas e maior suscetibilidade dos biofilmes, comprometendo a viabilidade celular. A análise de agrupamento hierárquico confirmou a clara separação entre grupos tratados e controles, evidenciando a sensibilidade do FTIR em detectar alterações induzidas pela IFD. Os achados demonstram que a IFD provoca alterações estruturais distintas nos diferentes morfotipos de *C. albicans* e reforçam o potencial da

espectroscopia FTIR como ferramenta não destrutiva para caracterizar tais mudanças e elucidar mecanismos de ação envolvidos.

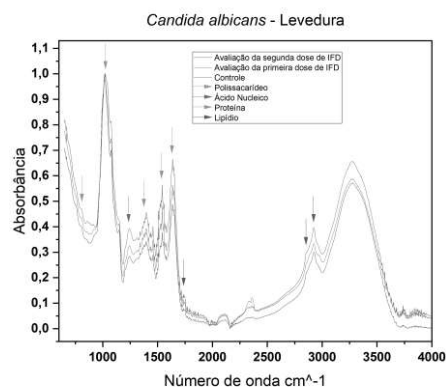


Figura 1: Absorbância normalizada em função do Número de onda para amostras de Levedura

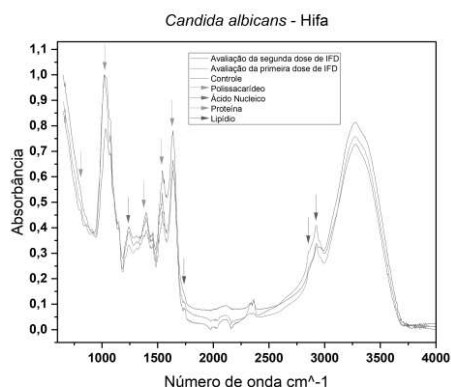


Figura 2: Absorbância normalizada em função do Número de onda para amostras de Hifa

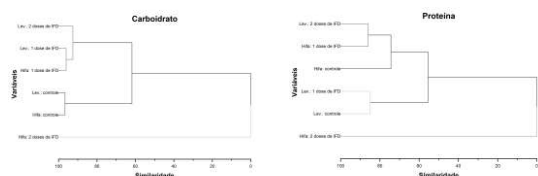


Figura 3: Análise de agrupamento hierárquico da região do espectro dos carboidratos e das proteínas

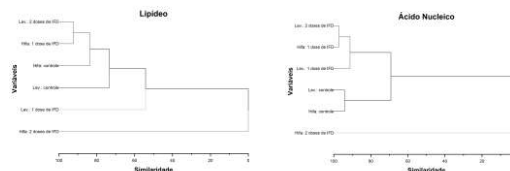


Figura 4: Análise de agrupamento hierárquico da região do espectro dos lipídeos e ácidos nucleicos

Conclusões

Os resultados indicam que a IFD representa uma estratégia promissora contra cepas resistentes a antifúngicos, podendo atuar como alternativa ou adjuvante terapêutico. A espectroscopia FTIR mostrou-se uma técnica eficaz para identificar e monitorar essas alterações, contribuindo para o avanço no entendimento e aplicação da IFD.

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Anna Luiza e Gabriela realizaram a coleta e análise dos dados. Todos os autores conceberam, planejaram o estudo, participaram da redação e revisão final do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Referências

- [1] Lasch, P.; Naumann, D. *Infrared Spectroscopy in Microbiology*. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, 2015, pp. 1–32. doi:10.1002/9780470027318.a0117.pub2.
- [2] Adt, I. et al. *FTIR spectroscopy to analyse structural modifications during morphogenesis of Candida albicans*. Arch. Microbiol., 185(4):277–285, 2006. doi:10.1007/s00203-006-0094-8.
- [3] Kamaruzzaman, A. N. A. et al. *FTIR spectral changes in Candida albicans biofilm after antifungal exposure*. Malaysian Appl. Biol., 51(4):57–66, 2022. doi:10.55230/mabjournal.v51i4.11.
- [4] Benov, L. *Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions*. Med. Princ. Pract., 24(Suppl. 1):14–28, 2015. doi:10.1159/000362416.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PHOTODYNAMIC INACTIVATION ON ANTIFUNGAL RESISTANT FUNGAL CELLS USING FTIR SPECTROSCOPY UNDERGRADUATE STUDENT

Anna Luiza França de Oliveira Resende

Gabriela Gomes Guimarães, Jennifer Machado Soares

Kate Cristina Blanco

University of São Paulo – São Carlos Institute of Physics

annaluizaforesende@usp.br

Objectives

Investigate the phenotypic and biochemical changes in *Candida albicans* subjected to photodynamic inactivation, using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) to understand the mechanisms of cellular response to the treatment.

Materials and Methods

Cultivation of *C. albicans*: Strain ATCC 90028 reactivated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated; inoculum adjusted to 10^8 CFU/ml; biofilms formed for experiments with hyphae.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC): Amphotericin B prepared and distributed by sequential dilution in 96-well microplates. Inoculum and culture medium added, positive and negative control performed, and culture medium included; incubation followed by reading in microplates.

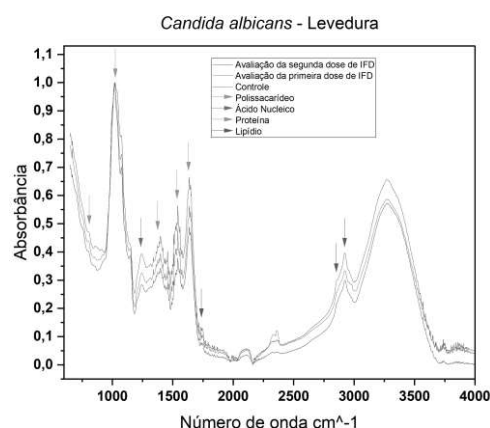
Photodynamic Inactivation (PDI): Yeasts and hyphae incubated with curcumin for 20 min and exposed to LED light (450 nm, 15 J/cm^2 , Biotable®); samples centrifuged and evaluated for MIC again.

FTIR Spectroscopy: Colonies were distributed over the crystal present in the equipment until partial evaporation of moisture; samples were scanned 250 times in the range of 4000–500

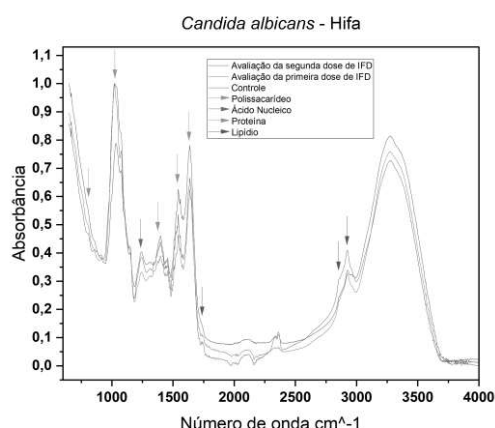
cm^{-1} ; spectra analyzed by second derivative, normalized, and interpreted by dendrograms.

Results

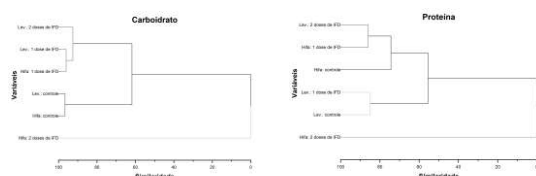
FTIR spectroscopy revealed significant changes in the biochemical profiles of *C. albicans* after IFD, with alterations detected in polysaccharides ($900\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$), proteins ($1400\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$), nucleic acids ($1215\text{--}1240 \text{ cm}^{-1}$), and lipids ($1700\text{--}1800$ and $2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$). These modifications reflect responses caused by IFD and the generation of reactive oxygen species in the cells, such as possible oxidative damage to the cell wall and membranes, degradation of macromolecules, destabilization of metabolic functions, and increased susceptibility of biofilms, compromising cell viability. Hierarchical clustering analysis confirmed the clear separation between treated and control groups, highlighting the sensitivity of FTIR in detecting IFD-induced changes. The findings demonstrate that IFD causes distinct structural changes in the different morphotypes of *C. albicans* and reinforce the potential of FTIR spectroscopy as a non-destructive tool to characterize such changes and elucidate the mechanisms of action involved.



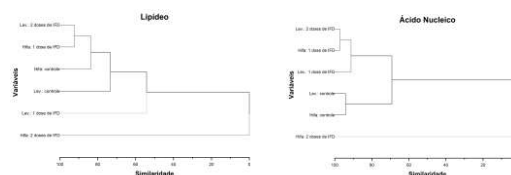
Picture 1: Normalized absorbance as a function of wavelength for Yeast samples



Picture 2: Normalized absorbance as a function of Wavenumber for Hifa samples



Picture 3: Hierarchical clustering analysis of the carbohydrate and protein spectrum region



Picture 4: Hierarchical clustering analysis of the lipid and nucleic acid spectrum region

Conclusions

The results indicate that IFD represents a promising strategy against antifungal-resistant strains, potentially acting as a therapeutic alternative or adjuvant. FTIR spectroscopy has proven to be an effective technique for identifying and monitoring these changes, contributing to the advancement in the understanding and application of IFD.

The authors declare no conflict of interest.

Anna Luiza and Gabriela performed data collection and analysis. All authors conceived and designed the study, participated in the writing and final revision of the abstract. All authors approved the final version of the abstract.

References

- [1] Lasch, P.; Naumann, D. *Infrared Spectroscopy in Microbiology*. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, 2015, pp. 1–32. doi:10.1002/9780470027318.a0117.pub2.
- [2] Adt, I. et al. *FTIR spectroscopy to analyse structural modifications during morphogenesis of Candida albicans*. Arch. Microbiol., 185(4):277–285, 2006. doi:10.1007/s00203-006-0094-8.
- [3] Kamaruzzaman, A. N. A. et al. *FTIR spectral changes in Candida albicans biofilm after antifungal exposure*. Malaysian Appl. Biol., 51(4):57–66, 2022. doi:10.55230/mabjournal.v51i4.11.
- [4] Benov, L. *Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions*. Med. Princ. Pract., 24(Suppl. 1):14–28, 2015. doi:10.1159/000362416.