

AVALIAÇÃO DA FOTOATIVACÃO DA ERITROSINA B ISOLADA E CARREADA POR NANOFIBRAS SOBRE A ESPÉCIE *Trichophyton rubrum*

Letícia Carolinne Rissi Zanelli (PIBIC/CNPq/UEM), Wilker Caetano (DQI/UEM), Thais Lazzarotto Braga (DQI/UEM), Maria Clara Mazócoli Siqueira (DQI/UEM), Juliana Aparecida Fernandes (DAB/UEM), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Coorientador), Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Orientador).

E-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área: Ciências da Saúde e Subárea: Microbiologia, Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Inativação Fotodinâmica, Onicomiose, Dermatomicose

RESUMO

A Eritrosina B (ERI), um corante rosa-cereja da família dos xantenos, é utilizada como fotossensibilizador (FS) na Terapia Fotodinâmica (TFD). A TFD envolve a aplicação de um FS que, ao absorver luz em um comprimento de onda específico, produz espécies reativas de oxigênio que eliminam células-alvo. Infecções por espécies do gênero *Trichophyton* são difíceis de tratar devido à crescente resistência antifúngica das drogas convencionais. Neste sentido, a busca por novas opções terapêuticas é importante. Neste trabalho, a TFD associada à ERI, mostrou eficiente atividade antifúngica em concentrações a partir de 6,25 μM . Esses resultados foram motivadores para testar a ERI associada à nanofibras, caracterizados como curativos médicos. Inicialmente o teste com os polímeros+ERI (em solução), mostrou eficácia antifúngica, eliminando completamente o crescimento fúngico. Por outro lado, a combinação TFD+ERI+nanofibras não teve efeito satisfatório. Esses resultados sugerem potencial da utilização da ERI associada à nanofibras no contexto da TFD para pesquisas futuras.

INTRODUÇÃO

Trichophyton rubrum é um fungo dermatófito que causa infecções na pele, unhas e couro cabeludo, sendo um dos principais responsáveis por onicomicoses e infecções cutâneas em humanos. A transmissão ocorre por contato direto entre pessoas ou com superfícies contaminadas. O tratamento de *T. rubrum* é desafiador devido à resistência de várias cepas e ao número limitado de antifúngicos. A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem se destacado como uma nova abordagem terapêutica, combinando um fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio gerando reações que eliminam microrganismos. Como a TFD não se baseia em um alvo celular específico, a chance de desenvolvimento de resistência é menor. A Eritrosina B (ERI), um corante rosa-cereja aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para uso alimentício, tem sido usada como FS na TFD devido à sua eficácia contra diferentes microrganismos. Embora ainda haja poucas informações sobre sua eficácia contra *T. rubrum*, dados preliminares sugerem que as cepas desse fungo

respondem de maneiras variadas a tratamentos antifúngicos e à TFD. Portanto, explorar o uso da TFD associada à ERI, especialmente em tecnologias como nanofibras para "curativos médicos", pode representar uma nova estratégia promissora para o tratamento de micoses causadas por *T. rubrum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismo

Foi utilizada uma cepa de *Trichophyton rubrum*, armazenada pelo Laboratório de Micologia Médica, UEM, a -80°C.

Fotossensibilizador e fonte de luz

A Eritrosina B foi fornecida pelo Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF-UEM). A luz utilizada foi um LED (Light Emitting Diode), de cor verde (510nm), desenvolvida pelo Laboratório de Físico-Química da UEM, e a irradiação para todos os ensaios foi de 20 minutos.

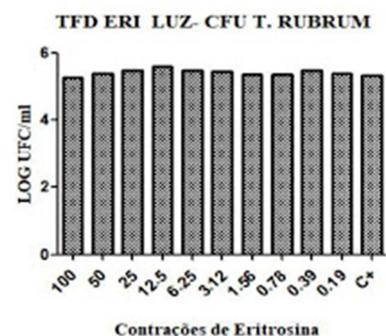
Teste de Susceptibilidade

A ERI foi testada de forma isolada (livre em solução), incorporada aos polímeros (F108 1%, PVA 10%_{m/V} e ácido cítrico 20%_{m/V} em relação ao PVA, com ou sem eritrosina na concentração de 1.10^{-4} M, em solução) que constituíram a fibra polimérica e associada à fibra polimérica propriamente dita. Para todos os testes, foi utilizado *T. rubrum* na concentração de 1×10^6 conídios/mL. Controle escuro (+ERI-Luz), controle claro (+ERI+Luz) e controle fúngico (-ERI-Luz) foram utilizados. Os tempos de pré-incubação da ERI variaram de acordo com cada ensaio, sendo: 10 minutos para a ERI livre, 30 e 60 minutos para a ERI com polímeros e 4 e 24 horas para ERI com a fibra. A atividade antifúngica foi avaliada qualitativamente, através das sementeira de 10 uL de cada poço em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), e a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico foi determinada como concentração fungicida mínima (CFM). Além disso, foi avaliado a ação antifúngica de forma quantitativa, e para isso, cada poço testado em diferentes condições foi plaqueado em SDA em pelo menos três diferentes diluições. As colônias viáveis foram contadas e o resultado expresso em unidades logarítmicas das Unidades Formadoras de Colônia (\log_{10} UFC/mL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 A e B, mostra a ausência de atividade antifúngica da ERI (+ERI-Luz) contra *T. rubrum*. A Figura 1A mostra que o crescimento fúngico foi semelhante ao controle fúngico (-ERI-Luz). Além disso, a avaliação quantitativa Figura 1B, mostrou resultados semelhantes, onde o crescimento de *T. rubrum* foi quantitativamente semelhante ao controle fúngico. Estes resultados mostram que a ERI isoladamente nas concentrações testadas não possui atividade antifúngica.

B



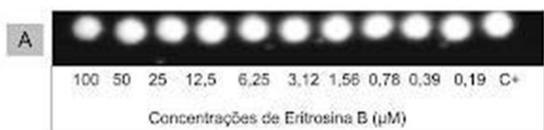


Figura 1. Avaliação da atividade antifúngica da Eritrosina B na ausência de luz. A) avaliação qualitativa. C+: Controle positivo: fungo sem ação da Eritrosina B) avaliação quantitativa. C+: Controle positivo: fungo sem ação da Eritrosina; Concentrações de Eritrosina em µM.

Os testes para avaliação do tempo de irradiação, mostram na Figura 2 A e B, que o crescimento fúngico foi semelhante entre as duas avaliações, ou seja, a luz isoladamente não inibe o crescimento fúngico. A Figura 3 A e B mostram que a associação das 10 diferentes concentrações de ERI com o tempo de irradiação de 20 minutos mostrou atividade fungicida a partir de 12,5 µM, e redução logarítmica importante do crescimento de *T. rubrum* em 6,25 µM.

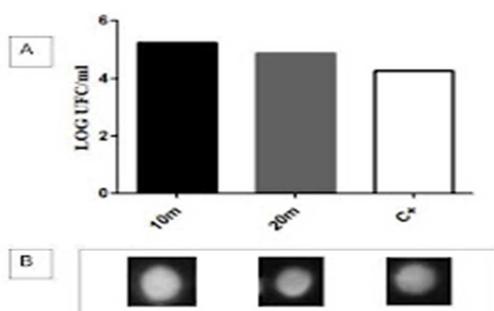


Figura 2. Avaliação da atividade antifúngica de diferentes fluências de luz. A) avaliação quantitativa. 10m: 10 minutos de irradiação. 20m: 20 minutos de irradiação. C+: Controle positivo: fungo sem ação da luz. B) avaliação qualitativa. 10m: 10 minutos de irradiação. 20m: 20 minutos de irradiação. C+: Controle positivo: fungo sem ação da luz.

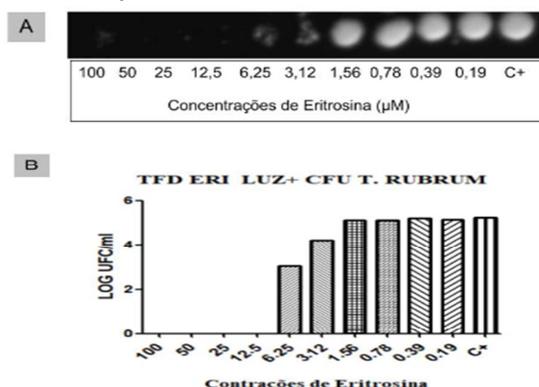


Figura 3. Avaliação da atividade antifúngica da Eritrosina B associada a TFD, com 10 minutos de incubação e 20 minutos de irradiação. A) avaliação qualitativa. C+: Controle positivo: fungo sem ação da Eritrosina B) avaliação quantitativa. C+: Controle positivo: fungo sem ação da Eritrosina; Concentrações de Eritrosina em µM.

Esses resultados foram importantes para avançar nos testes com as formulações de polímeros de ERI. A Figura 4, mostra que a ERI com os polímeros (em solução) teve ação fungicida nas condições testadas, quando comparado ao branco (-ERI) e ao controle fúngico (+inóculo-ERI). Conhecendo esse resultado, avaliamos a ERI impregnada na nanofibra, mas em condições de liberação em meio líquido. Para isso, 1 cm² das nanofibras com ou sem eritrosina foram incubadas com inóculo fúngico nos tempos previamente descritos. A figura 5 mostra que as nanofibras não

liberaram ERI suficiente para inibir de forma eficiente o crescimento fúngico. Sendo que o crescimento dos testes ficou semelhante ao controle positivo.

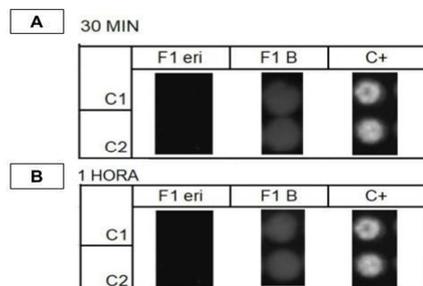
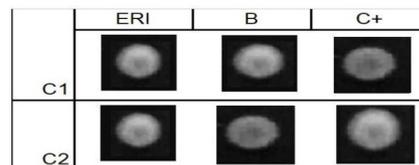


Figura 4. Avaliação da atividade antifúngica das formulações de ERI associada a TFD com tempo de incubação de 30 minutos e 1 hora. A) e B) avaliação qualitativa. F1 eri: formulado com eritrosina (+ERI+LUZ); F1 B: formulado branco (-ERI+LUZ), C+; controle positivo (+ERI-LUZ); C1: 500uL formulação+500uL inóculo; C2: 250uL água



destilada+250uL formulação+ 500uL de inóculo, em 30 minutos e 1 hora

Figura 5. Avaliação da atividade antifúngica das nanofibras em soluções líquidas associada a TFD com tempo de incubação de 4 e 24 horas. Avaliação qualitativa. ERI: eritrosina (+ERI+LUZ); B: branco (-ERI+LUZ); C+: controle positivo (-ERI-LUZ); C1: 4 horas de incubação no shaker a 90rpm/25°C; C2: 24 horas de incubação no shaker a 90rpm/25°

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a TFD associada à ERI tem eficácia antifúngica contra *T. rubrum*, o dermatófito epidemiologicamente mais frequente nas infecções fúngicas de pele e unhas. E ainda foi possível observar, a potencial atividade antifúngica dessa associação quando a ERI está associada aos polímeros que constituem as nanofibras. Mais investigações são necessárias, para encontrar a melhor estratégia de formulação e ensaios laboratoriais para avaliar a ação antifúngica das nanofibras.

AGRADECIMENTOS

Laboratório de Micologia Médica, Físico-Química e NUFESP - UEM. CNPq e Fundação Araucária. CNPq/Universal 408561/2023-8.

REFERÊNCIAS

- CONRADO, P. C. V. et al. **Promising onychomycosis treatment with hypericin-mediated photodynamic therapy: Case reports.** Photodiagnosis and photodynamic therapy. v. 42, n. 103498, p. 103498, 2023.
- Yassunaka, N. N.; de Freitas, C. F.; Rabello, B. R.; Santos, P. R.; Caetano, W.; Hioka, N.; Nakamura, T. U.; de Abreu Filho, B. A.; Mikcha, J. M. G. **Photodynamic Inactivation Mediated by Erythrosine and Its Derivatives on Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria.** ERIr. Microbiol.2015, 71 (2), 243–251.