

EFICÁCIA ANTIFÚNGICA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA AO AZUL DE METILENO SOBRE LEVEDURAS DA ESPÉCIE *Candida parapsilosis*

Greicielle Haruko Suzuki (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Luiza de Paula Vasconcelos (DAB/UEM), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Co-orientador), Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Orientador). E-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.

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

Palavras-chave: onicomicose; fotoinativação; antifúngico.

RESUMO

A resistência antifúngica junto às poucas opções terapêuticas antifúngicas comparadas aos antibióticos tem sido dificuldade para o tratamento de doenças fúngicas, principalmente a onicomicose - doença prevalente e de tratamento longo, difícil, além da possível recidiva mesmo após tratada. Dessa forma, o presente estudo têm o objetivo de avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica (TFD) como opção terapêutica para as infecções nas unhas. A metodologia consiste em gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e levar à morte celular do fungo agente da onicomicose. Assim, foram feitos testes *in vitro* associando o Azul de Metileno ao LED vermelho em diferentes concentrações do fotossensibilizador e utilizadas duas diferentes fluências da luz. Foi possível observar que o AM não possui ação antifúngica sozinho e que também é importante o tempo de incubação para que o fotossensibilizador se agregue aos conídios. Além disso, observou-se que a luz é primordial para o efeito fungicida na *Candida parapsilosis*. Sendo assim, concluiu-se que a TFD é eficaz e possui uma faixa de atividade antifúngica, sendo um tratamento promissor e que possibilita ainda mais estudos.

INTRODUÇÃO

A onicomicose é uma doença causada por fungos nas unhas e geralmente ocorre devido a um desequilíbrio de saúde do paciente - seja por doença (HIV, diabetes) ou queda do sistema imunológico. As unhas acometidas mostram manchas esbranquiçadas na superfície e deformação; além disso, por ser um tecido queratinizado, a unha é um alvo difícil para tratamentos com antifúngicos; dessa forma, a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido destaque como uma opção terapêutica ao gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e a morte celular do fungo³. O diagnóstico das onicomicoses aponta que a *Candida* spp. é o gênero mais prevalente¹, a se destacar a espécie *Candida parapsilosis*. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade antifúngica da TFD associada ao Azul de

Metileno (AM) e sistema LED, e também se há ação fungicida do fotossensibilizador na ausência de luz.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismo

Utilizou-se cepa padrão de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, armazenada no Laboratório de Micologia - UEM (Universidade Estadual de Maringá). Reativada e cultivada em placa de *Sabouraud Dextrose Ágar* (SDA).

Fotossensibilizador e fonte de luz

O Azul de Metileno (AM) foi fornecido pelo grupo parceiro em pesquisa, o Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF), da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A luz utilizada foi o LED vermelho (660nm), desenvolvido pelo Laboratório de Físico-Química da UEM, a qual foi testada em duas fluências diferentes.

Teste de susceptibilidade

O inóculo para todos os testes foi de 2×10^6 UFC/mL. O AM foi testado dentre as concentrações de 5000 µg/mL a 0,0011 µg/mL em diferentes concentrações do fotossensibilizador na ausência de luz e associadas ao LED. Os tempos de incubação avaliados variaram de 15 minutos e 30 minutos. Foram testadas duas fluências de luz: 30,11 J/cm² e 50,34 J/cm². A atividade antifúngica foi avaliada qualitativamente através da Concentração Fungicida Mínima (CFM) por meio da semeadura de 10 µL de cada poço da placa de 96 poços em placa com *Sabouraud Dextrose Ágar* (SDA) e incubada por 48h à temperatura ambiente (30°C). Também foi avaliado o crescimento fúngico de forma quantitativa - Unidade Formadora de Colônias (CFU) -, dispondo-se de 20 µL em placas de SDA incubadas durante 48h também à temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliou-se qualitativa e quantitativamente a ação do fotossensibilizador em 10 concentrações do AM na ausência de luz, porém verificou-se que não houve atividade antifúngica em comparação ao controle positivo (ausência de AM) demonstrado na figura 1. Dessa forma, observa-se que não há inibição do crescimento fúngico, pela ação isolada do AM, ou seja, sem a ação da luz associada ao fotossensibilizador, demonstrando que a fotoativação é importante para a ação antifúngica de AM.

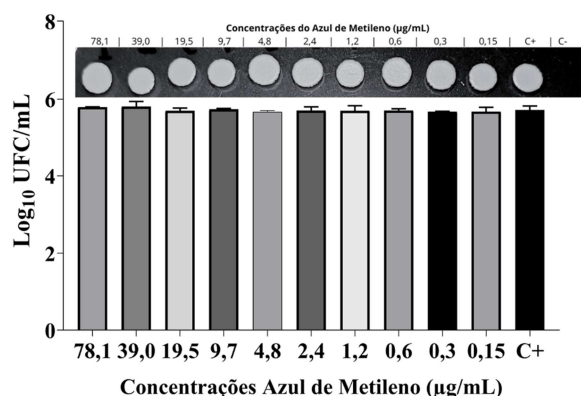


Figura 1 – Avaliação antifúngica qualitativa e quantitativa do Azul de Metileno na ausência de luz. Controle positivo (C+) – inóculo fúngico na ausência da luz e do AM. Controle negativo (C-) – meio de cultura na ausência do inóculo fúngico.

Em seguida, foram realizados testes para avaliar qualitativamente a inibição fúngica em 20 concentrações diferentes, com exposição de 15 e 30 minutos, ambas sob fluência de 50,34 J/cm² - observados na figura 2 - através de CFM em SDA. Foi possível observar que o AM+luz possui ação antifúngica nas concentrações de 39,0 a 4,8 µg/mL, havendo uma variação com crescimento fúngico na concentração de 156,2 e 78,1 µg/mL; assim, observa-se melhor inibição na incubação de 30 minutos quando comparada à de 15 minutos. Sendo que as duas mostram resultados com a TFD que não foram visualizados no teste somente com o AM; isso é evidenciado também em um estudo no Rio de Janeiro que obteve melhora satisfatória na lâmina ungueal de 70% dos pacientes ao utilizar TFD associada à laserterapia de baixa intensidade e azul de metileno².



Figura 2 – Avaliação antifúngica do Azul de Metileno em 15 (A) e 30 (B) minutos de incubação sob fluência de 50,34 J/cm. Controle positivo (C+) – inóculo fúngico na ausência do AM. Controle negativo (C-) – meio de cultura na ausência do inóculo fúngico. Linha A com as concentrações descritas acima da figura. Linha B com as concentrações descritas abaixo da figura.

Além disso, foi avaliado qualitativa e quantitativamente a atividade antifúngica da irradiação da luz com AM em duas fluências - 30,11 e 50,34 J/cm² -, demonstrado na figura 3. É possível observar que ainda houve crescimento fúngico em 9,7 e 4,8 µg/mL na menor fluência do LED (figura 3A), enquanto na mesma concentração não houve crescimento fúngico na placa irradiada com fluência de 50,34 J/cm² (figura 3B) desde 78,1 a 9,7 µg/mL.

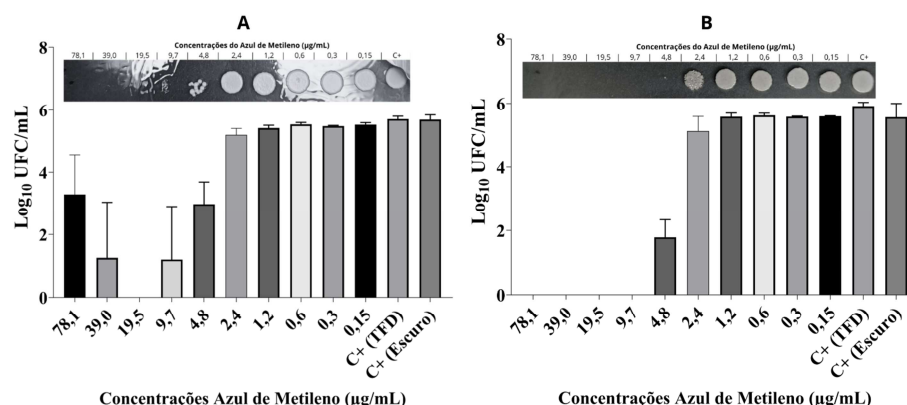


Figura 3 – Avaliação antifúngica qualitativa e quantitativa do Azul de Metileno em fluência 30,11 J/cm² (A) e 50,34 J/cm² (B). Controle positivo (C+) – inóculo fúngico na ausência da luz e do AM. Controle negativo (C-) – meio de cultura na ausência do inóculo fúngico.

CONCLUSÕES

Este estudo encontrou um intervalo de concentrações do AM, que quando associado à luz inibiu o crescimento fúngico. Além disso, verificou-se que a fluência influencia no potencial antifúngico do AM, o que reforça o papel fundamental da TFD. Estes resultados inspiram mais estudos da TFD+AM sobre agentes fúngicos como *C. parapsilosis*, pois evidenciam uma possibilidade promissora para pacientes acometidos por essa condição de difícil tratamento clínico.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Processo: 408561/2023-8. Agradeço a oportunidade de realizar o presente estudo no Laboratório de Micologia (UEM), com auxílio da Físico-Química e NUFESP (UEM), Fundação Araucária (bolsa de estudos) e das professoras orientadoras.

REFERÊNCIAS

1. Araújo, A.J.G. de, Bastos OMP, Souza MAJ, Oliveira JC de. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. An Bras Dermatol. 2003Jul;78(4):445–55.
2. Frigo, Fernanda Dorigon; Pérez Júnior, Eugenio Fuentes; Pires, Ariane Da Silva; Coutinho, Vânia Lima; Gonçalves, Francisco Gleidson De Azevedo; Lima, Juliana Agra. Laserterapia de baixa intensidade com terapia fotodinâmica no tratamento de onicomicose. Revista Enfermagem UERJ, [S. l.], v. 30, n. 1, p. e64955, 2022.
3. Silva, A. P. da. Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica. Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.