EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO SOBRE CEPAS DE *TRICHOPHYTON RUBRUM*: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Náthaly Vitoria Carvalho Ferdinando (PIC), Ana Luiza de Paula Vasconcelos (Coautora), Marcel Guimarães Martins (Coautor), Érika Seki Kioshima (Coautora), Juliana Aparecida Fernandes (Co-orientadora), Patricia de Souza Bomfim Mendonça (Orientadora).
E-mail: ra146574@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde / Micologia Médica.

Palavras-chave: Dermatofitose; Fotossensibilizador; Espécies reativas de oxigênio.

RESUMO

O *Trichophyton rubrum* é o principal agente etiológico das onicomicoses em humanos, e seu tratamento convencional demanda longos períodos, apresenta efeitos colaterais e enfrenta crescente resistência. A Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como alternativa promissora, associando um fotossensibilizador, luz de comprimento de onda específico e oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio que induzem dano microbicida. O estudo avaliou *in vitro* a eficácia antifúngica da TFD mediada por azul de metileno (AM) sobre *T. rubrum*. Utilizou-se uma cepa padrão, com inóculo ajustado a 1,0 x 10^5 conídios/mL. O AM foi diluído seriadamente em placa de 96 poços (7,815 a 0,001 mM), incubado por 20 minutos a 25 °C no escuro e irradiado com LED vermelho nas fluências de 20, 40 e 60 J/cm². A ação antifúngica foi avaliada pela concentração fungicida mínima e pela contagem de unidades formadoras de colônias, expressa em $\log_{10}$ UFC/mL. O controle escuro não apresentou atividade antifúngica em nenhuma concentração testada, confirmando que o AM na ausência de luz não possui ação antifúngica. Por outro lado, na fluência de 20 J/cm² houve inibição do crescimento fúngico entre 0,244 e 0,015 mM, enquanto que em 40 e 60 J/cm² a janela antifúngica foi ampliada para 0,488 a 0,007 mM, com resultados semelhantes entre si. Observou-se que concentrações altas ou baixas de AM foram ineficazes, devido à agregação do corante em dímeros e à quantidade insuficiente de moléculas associadas às células, respectivamente. Conclui-se que a TFD mediada por azul de metileno constitui um método alternativo promissor contra *T. rubrum*.

INTRODUÇÃO

O *Trichophyton rubrum* é um fungo dermatófito considerado o principal agente etiológico das onicomicoses em humanos, cuja infecção ocorre pela transmissão entre indivíduos ou pelo contato com objetos contaminados (SMIJS; PAVEL, 2011). No geral, as dermatofitoses apresentam grande desafio terapêutico, pois os antifúngicos convencionais demandam longos períodos de administração e apresentam efeitos colaterais, o que leva à baixa adesão dos pacientes,

favorecendo a propagação dessas cepas e a aquisição de mecanismos de resistência (LI *et al.*, 2021). Nesse sentido, a Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como método alternativo promissor, associando um fotossensibilizador, luz de comprimento de onda específico e oxigênio molecular, promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio que induzem dano microbicida (SMIJS; PAVEL, 2011). Devido à ausência de um alvo celular específico, a TFD apresenta baixa probabilidade de seleção de cepas resistentes (GUFFEY *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2021). O azul de metileno (AM) é um fotossensibilizador reconhecido por sua alta absorção na faixa do vermelho (660 nm), com atividade contra bactérias e fungos, baixa toxicidade para humanos e baixo custo (GUFFEY *et al.*, 2017). No entanto, esse composto, na ausência de luz, não possui ativação, portanto não apresenta atividade. Diante da relevância clínica das dermatofitoses e das limitações dos tratamentos atuais, o presente estudo propõe avaliar a eficácia antifúngica da TFD mediada por azul de metileno *in vitro* sobre *Trichophyton rubrum*, visando o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento das dermatofitoses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolado
Foi utilizada uma cepa de *T. rubrum*, repicada em ágar batata dextrose (PDA) e estocada a 25 °C durante 12 dias. O inóculo foi preparado em solução salina 0,85% estéril e filtrado com algodão por meio de uma seringa, para obtenção de microconídios, ajustando-se para 1,0 x 10^5 conídios/mL.

Fotossensibilizador
O azul de metileno foi fornecido pelo Prof. Dr. Wilker Caetano, do Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) da Universidade Estadual de Maringá. O composto foi preparado em solução estoque a 0,5% (15,63 mM).

Fonte de Luz
A luz utilizada foi um LED (*Light Emitting Diode*), de cor vermelha, desenvolvido pelo Laboratório de Físico-Química da Universidade Estadual de Maringá. As condições de fluências foram: 20, 40 e 60 J/cm², com potência da luz de 80% e com tempos de irradiação de 12, 24 e 36 minutos, respectivamente.

Avaliação da susceptibilidade antifúngica
Em placa de 96 poços, foram realizadas diluições 1:2 do azul de metileno em água destilada estéril com concentrações variando 7,815 a 0,001 mM Resultando em 100 µL do fotossensibilizador em cada poço na sua respectiva concentração e 100 µL do inóculo padrão, incubados por 20 minutos a 25 °C em câmara úmida e no escuro, e irradiados no LED vermelho nas fluências pré-estabelecidas. A ação antifúngica foi avaliada pela contagem de células viáveis (UFC/mL) com resultado em $\log_{10}$ UFC/mL. A análise qualitativa pela concentração fungicida mínima (CFM) também foi realizada. O ensaio foi realizado em duplicata.

Análises Estatísticas
Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5.0®, com análise estatística pelo teste *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) e teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para confirmação de que o fotossensibilizador isolado não possui atividade, foi realizado o teste de controle escuro. Conforme a Figura 1A, não houve atividade em nenhuma das concentrações testadas, o que confirma que o AM depende da irradiação para exercer efeito antifúngico. Nas placas irradiadas, a TFD mostrou atividade em todas as fluências testadas. Na fluência de 20 J/cm², a inibição completa do crescimento foi observada entre 0,244 e 0,061 mM na análise qualitativa (Figura 1B); em 0,030 e 0,015 mM houve pequeno crescimento nessa análise, mas na quantitativa essas concentrações não apresentaram crescimento detectável (Figura 2A). Em 0,488 mM houve redução parcial de cerca de 1,2 $\log_{10}$ UFC/mL, sem erradicação. Por outro lado, nas fluências de 40 e 60 J/cm² houve inibição completa nas concentrações de 0,488 a 0,007 mM (Figuras 1C, 1D, 2B e 2C). Nota-se, portanto, que o aumento da fluência ampliou a janela de atividade nas duas extremidades, um degrau de diluição acima (0,488 mM) e um abaixo (0,007 mM) em relação aos 20 J/cm².

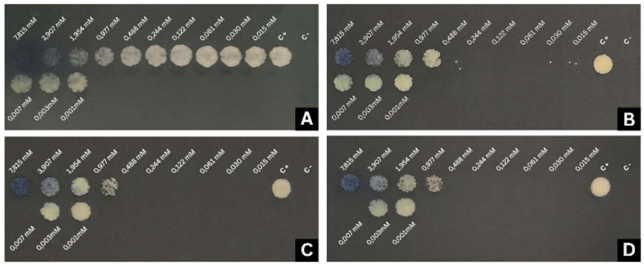


Figura 1 – Análise qualitativa do crescimento de *Trichophyton rubrum* após TFD mediada por azul de metileno (7,815 a 0,001 mM). (A) Controle escuro (sem irradiação); (B) 20 J/cm²; (C) 40 J/cm²; (D) 60 J/cm². C+: controle positivo (viabilidade do fungo); C−: controle negativo (esterilidade).

Semelhante a análise qualitativa, os gráficos da Figura 2 mostraram que a atividade antifúngica da TFD+AM pode ser distinta quantitativamente dependendo da concentração do fotossensibilizador e da fluência utilizada. A atividade fungicida (eliminação de 100% do crescimento fúngico) ocorreu exclusivamente nas concentrações intermediárias de 0,244 a 0,015 mM para 20 J/cm², e de 0,488 a 0,007 mM para 40 e 60 J/cm². Por outro lado, tanto as concentrações mais baixas (0,003 e 0,001 mM) quanto as mais elevadas (7,815 a 0,977 mM) não inibiram o crescimento fúngico. A ineficácia em concentrações baixas de AM decorre da quantidade insuficiente de moléculas associadas às células fúngicas diminuindo as reações fotoquímicas características da TFD. Por outro lado, a ausência de inibição em concentrações elevadas corrobora com os achados de Xu et al. (2024), que demonstraram a tendência de agregação do AM na forma de dímeros, fenômeno que compromete a atividade fotodinâmica.

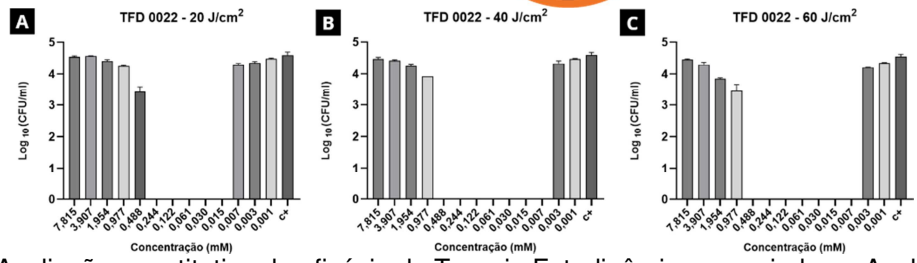


Figura 2 – Avaliação quantitativa da eficácia da Terapia Fotodinâmica associada ao Azul de Metileno sobre *Trichophyton rubrum.* Contagem de unidades formadoras de colônias (log_{10}CFU/mL) de *T. rubrum* após TFD+AM (7,815 a 0,001 mM) nas fluências de (A) 20, (B) 40 e (C) 60 J/cm². C+: controle positivo (viabilidade do fungo). Média ± desvio-padrão (ANOVA *one-way*, teste de *Tukey*).

CONCLUSÕES

Podemos concluir que, mesmo em doses baixas de luz, como 20 J/cm², a TFD mostra atividade significativa de erradicação de *T. rubrum* em diferentes concentrações do AM. Os resultados de 40 e 60 J/cm² foram semelhantes, mostrando que, possivelmente, a partir de certa dose de luz, já se tem o máximo de atividade. A existência de uma janela ótima indica que aumentar a concentração do fotossensibilizador não implica maior atividade, sendo necessário considerar o estado de agregação do AM. Concluímos que a TFD mediada por azul de metileno é um método alternativo promissor contra dermatófitos, especificamente frente ao *T. rubrum*.

AGRADECIMENTOS

CNPq/Universal processo número 408561/2023-8; à Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo suporte institucional; e ao grupo de pesquisa MICOTEC, pelo apoio e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

GUFFEY, J. S.; PAYNE, W.; ROEGGE, W. *In vitro* fungicidal effects of methylene blue at 625-nm. **Mycoses**, v. 60, n. 11, p. 723-727, 2017.

LI, C. *et al.* Different susceptibility of spores and hyphae of *Trichophyton rubrum* to methylene blue mediated photodynamic treatment *in vitro*. **Mycoses**, v. 64, n. 1, p. 48-54, 2021.

SMIJS, T.G.M.; PAVEL, S. The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 2–13, 2011.

XU, J. *et al.* Matrix effect on singlet oxygen generation using methylene blue as photosensitizer. **Inorganics**, v. 12, n. 6, p. 155, 2024.