

## Trabalho

**Título em Português:** Avaliação da terapia fotodinâmica antimicrobiana em *R. oryzae*

**Título em Inglês:** Evaluation of the antimicrobial photodynamic therapy in *R. oryzae*

**Autor:** Matheus Henrique da Silva Sousa

**Instituição:** Universidade de São Paulo

**Unidade:** Instituto de Física de São Carlos

**Orientador:** Cristina Kurachi

**Área de Pesquisa / SubÁrea:** Radiologia e Fotobiologia

**Agência Financiadora:** USP - Programa Unificado de Bolsas

## AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM *Rhizopus oryzae*

Matheus Henrique da Silva Sousa

Maria Julia Marques de Arruda

Fernanda Alves

Cristina Kurachi

Universidade de São Paulo (USP)

matheussouzah@usp.br

### Objetivos

O objetivo deste estudo é a avaliação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana, também conhecida como Inativação Fotodinâmica (IFD), em diferentes fases do crescimento do *R. oryzae*, utilizando azul de metileno (MB, do inglês methylene blue) e Photodithazine® (PDZ) como fotossensibilizadores, e testar a Anfotericina B (AMB) como um agente utilizado na pré, durante, e na pós-terapia.

### Métodos e Procedimentos

O fungo *R. oryzae* foi cultivado em meio sólido de Potato Dextrose Agar (PDA). A placa foi incubada em 37°C por 24 horas para obtenção da fase clara do crescimento e 48 horas para a fase escura.

Para obtenção das amostras de cada fase do crescimento, foram retirados discos de 8 mm de diâmetro, de cada placa, com o auxílio de uma seringa estéril. Então, os discos foram colocados em placas de 24 poços.

Os FSs escolhidos foram o MB e o PDZ. Foram testadas diversas concentrações do MB associado com o sal inorgânico Iodeto de Potássio (KI) e o surfactante Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Para o KI foi utilizada a concentração de 100 mM e pro SDS 0,03% e 0,05%. As concentrações de MB variaram entre 10 µM e 20 µM. Já para o PDZ as

concentrações variaram de 250 e 500 µg/mL. Além disso, ainda para o PDZ, utilizou-se o SDS 0,05% e a AMB na concentração 250µg/mL. O tempo de incubação do MB e do PDZ foi de 2 horas. O antifúngico foi testado em três ocasiões: (I) aplicado junto à IFD e (II) aplicado antes da IFD e (III) aplicado após a IFD. Na situação (I), o tempo de incubação foi de 2 horas (junto ao FS), e nas situações (II) e (III), o tempo de incubação foi de 1 hora.

Como fonte de luz, foi utilizado um dispositivo de luz LED centrado em 660 nm, com irradiância de 60 mW/cm² e dose de luz de 100 J/cm².

Para quantificar a taxa de inibição do crescimento após os tratamentos com IFD, foi utilizado o software ImageJ para cálculo da área de crescimento do fungo na placa. A equação utilizada para taxa de inibição de crescimento foi  $P(\%) = 100 - A_{fungo}/A_{placa}$ .

### Resultados

A figura 1 mostra os resultados utilizando o MB, que indicam que o MB, de forma geral, não apresentou boa resposta fotodinâmica. A melhor resposta foi para o protocolo com [MB] = 10µM + SDS 0,03%, houve uma inibição de 65% na fase clara. Já na fase escura, o único parâmetro efetivo foi [MB] 10µM + SDS 0,05%, com uma inibição de 40%.

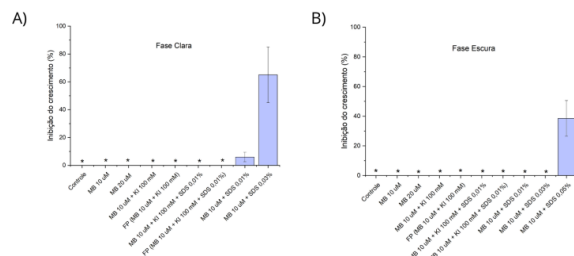


Figura 1: Inibição do crescimento na fase clara em A) e na fase escura em B), utilizando MB

As figuras 2 a 4 mostram os resultados da combinação da IFD juntamente com o antifúngico AMB em diferentes momentos (pré-IFD, junto a IFD e pós-IFD), mostram bons resultados na fase clara do fungo em todos os casos, especialmente no protocolo “IFD antes, AMB depois”, o qual atingiu 100% de inibição de crescimento. Para a fase escura, o mesmo protocolo foi o mais eficiente, com 60% de inibição do crescimento, como visto na figura 3.

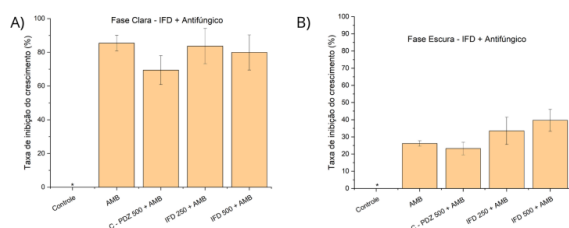


Figura 2: Inibição do crescimento na fase clara em A) e na fase escura em B), utilizando IFD + Antifúngico.

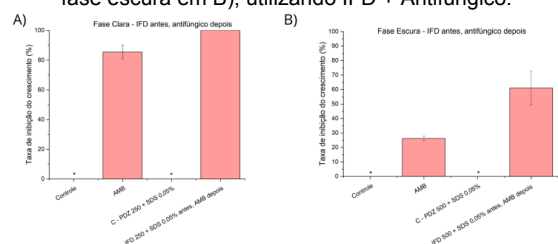


Figura 3: Inibição do crescimento na fase clara em A) e na fase escura em B), utilizando IFD antes, Antifúngico depois.

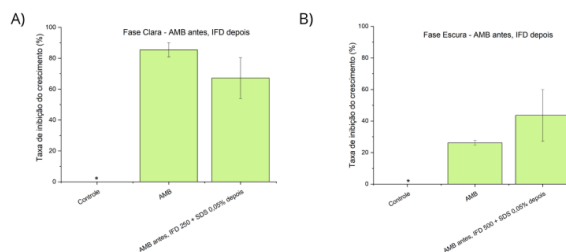


Figura 4: Inibição do crescimento na fase clara em A) e na fase escura em B), utilizando AMB antes e IFD depois

## Conclusões

Em suma, no estudo *in vitro* nas hifas de *R. oryzae*, é possível notar que o uso apenas do MB não foi eficaz para IFD. No caso de associação de PDZ com o antifúngico, o melhor protocolo foi o caso da IFD antes e um tratamento antifúngico após, em que obteve-se 100% de inibição para a fase clara e 60% para a fase escura. Os protocolos testados na fase de hifa do *R. oryzae* apresentaram somente uma resposta parcial, sendo que na fase clara os valores mais altos de inibição do crescimento foram obtidos. Os resultados apresentados demonstram o potencial do uso da IFD para o controle do crescimento do *R. oryzae*, no entanto a otimização do protocolo deve ser investigada.

## Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - auxílios no. 2013/07276-1 e 2014/50857-8 ) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - auxílio no. 465360/2014-9 ).

## Referências

- [1] Marques, M.J.A.M., Alves, F., Sousa, M.H.S. et al. Morphological aspects and the effectiveness of photodynamic inactivation against *Rhizopus oryzae* in different life cycles. *Photochem Photobiol Sci* 23, 1323–1339 (2024). <https://doi.org/10.1007/s43630-024-00597-4>

## EVALUTION OF THE ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY OF *Rhizopus oryzae*

Matheus Henrique da Silva Sousa

Maria Julia Marques de Arruda

Fernanda Alves

Cristina Kurachi

Universidade de São Paulo (USP)

matheussouzah@usp.br

### Objectives

The purpose of this study is to evaluation of antimicrobial Photodynamic Therapy, also known as Photodynamic Inactivation (PDI), in different phases of *R. oryzae* growth, using Methylene Blue (MB) and Photodithazine® (PDZ) as photosensitizers, and testing Amphotericin B (AMB) as an agent used pre, during, and post-therapy.

### Materials and Methods

The fungus *R. oryzae* was cultivated on solid Potato Dextrose Agar (PDA) medium. The plate was incubated at 37°C for 24 hours to obtain the white phase of growth and 48 hours for the black phase.

To obtain samples from each growth phase, 8 mm diameter discs were removed from each plate using a sterile syringe. Then, the discs were placed in 24-well plates.

The PSs chosen were MB and PDZ. Several concentrations of MB associated with the inorganic salt Potassium Iodide (KI) and the surfactant Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) were tested. For KI, a concentration of 100 mM was used and for SDS 0.03% and 0.05%. MB concentrations varied between 10 µM and 20 µM. For PDZ, concentrations varied between 250 and 500 µg/mL. Furthermore, for PDZ, 0.05% SDS and AMB at a concentration of 250µg/mL were used. The incubation time for MB and PDZ was 2 hours. The antifungal was

tested on three occasions: (I) applied together with PDI and (II) applied before PDI and (III) applied after PDI. In situation (I), the incubation time was 2 hours (next to the FS), and in situations (II) and (III), the incubation time was 1 hour.

As a light source, an LED light device centered at 660 nm was used, with an irradiance of 60 mW/cm<sup>2</sup> and a light dose of 100 J/cm<sup>2</sup>.

To quantify the growth inhibition rate after PDI treatments, ImageJ software was used to calculate the fungal growth area on the plate. The equation used for growth inhibition rate was  $P(\%) = 100 - A_{fungi}/A_{plate}$ .

### Results

Figure 1 shows the results using the MB, which indicate that the MB, in general, did not present a good photodynamic response. The best response was for the protocol with [MB] = 10µM + 0.03% SDS, there was a 65% inhibition in the white phase. In the black phase, the only effective parameter was [MB] 10µM + 0.05% SDS, with an inhibition of 40%.

