

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

ELIANE MENDES RODRIGUES

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DOS FUNGOS CAUSADORES DE
ONICOMICOSSES *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum***

**PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF FUNGI *Trichophyton rubrum* and
Microsporum gypseum CAUSING ONYCHOMYCOSIS**

São Paulo – SP

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

ELIANE MENDES RODRIGUES

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DOS FUNGOS CAUSADORES DE ONICOMICOSSES *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica.

Prof^o. Dr^o. Drauzio Eduardo Naretto Rangel
Orientador

São Paulo – SP

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

R612i RODRIGUES, Eliane Mendes.

Inativação fotodinâmica dos fungos causadores de onicomicoses
Trichophyton rubrum e *Microsporum gypseum* / Eliane Mendes
Rodrigues. São Paulo: Universidade Brasil, 2022.
62 f. il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do
Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.
Orientação: Prof. Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel.

1. Onicomicose. 2. LED. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Tratamento. 5.
Azul de metileno. I. Rangel, Drauzio Eduardo Naretto. II. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

TERMO DE APROVAÇÃO

ELIANE MENDES RODRIGUES

**“INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DOS FUNGOS CAUSADORES DE ONICOMICOSSES
Trichophyton rubrum E Microsporum gypseum”**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel (presidente-orientador)

Prof(a). Dr(a) Claudio Alberto Tellez Soto (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Tacyana Pires de Carvalho Costa (FACULDADE UNINASSAU - ALIANÇA)

Prof(a). Dr(a). Lucélia Campelo de Melo Santos (SECRETARIA DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE ALTOS-PI)

São Paulo, 04 de outubro de 2022.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Campus Itaquera
Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030
Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070
www.ub.edu.br



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DOS FUNGOS CAUSADORES DE ONICOMICOSSES *Trichophyton rubrum* E *Microsporum gypseum*"

Autor(es):

Discente: **Eliane Mendes Rodrigues**

Assinatura: Eliane Mendes Rodrigues

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel**

Assinatura: _____

Drauzio Rangel

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)**

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não (✓):

Data: 04/10/2022

Campus Itaquera

Rua Carolina Fonseca, 584, Itaquera - São Paulo/SP | 08230-030

Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070

www.ub.edu.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por sua proteção e por guiar meus passos colocando pessoas especiais nos momentos certos da minha vida, por confortar meu coração nos momentos difíceis e por me dar coragem para continuar a caminhada.

Aos meus pais, Eponina e Raimundo (*in memoriam*), pelos exemplos de trabalho, dedicação, respeito e honestidade. Pelo apoio, incentivo e por compreenderem minha ausência em alguns momentos. À todos os meus irmãos, Rosilene, Rosivaldo, Rosângela, Rogério, Etiene, Eliene e Rui por fazerem parte desse sonho.

Ao meu companheiro de vida, meu esposo, Ely Rodrigues, pelo apoio incondicional, companheirismo e carinho, sempre me incentivando e me compreendendo.

As minhas amigas e companheiras de sonhos e lutas Nayanna Judithe, Daniela Ferraro, Ana Claudia, e amigos Daniel Mussuri, Roberto Rodrigues, Marcelo Vais e tantos outros que fizeram parte da construção desse sonho, hoje, uma realidade. Ao Sr. João César (*in memoriam*) e família que me acolheram, assim como tantos outros em São Paulo-SP.

À Universidade Brasil (UnB) e a Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) por me concederem esta oportunidade de formação e qualificação profissional.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Dráuzio Rangel por aceitar esse desafio e por me conduzir com dedicação, atenção, carinho, compreensão e paciência, sempre disposto a me auxiliar. À Prof^a Dr^a Livia Assis por me mostrar os caminhos a percorrer em busca da realização desse sonho. À Prof^a Dr^a Alessandra pela contribuição na pesquisa. Aos amigos e técnicos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil que me auxiliaram na realização dos experimentos e no compartilhamento de idéias e angustias: Alcides, Denise, Jailda e Valeska.

Aos colegas de turma, que permearam esta caminhada com conhecimentos, palavras de incentivo e ensinamentos, construindo, dia após dia, meu caminho para o aperfeiçoamento acadêmico e profissional.

*“Sonho que se sonha só, é um sonho,
mas sonho que se sonha junto, é
realidade”*

RESUMO

A onicomicose é uma das doenças mais comuns na área da dermatologia e refere-se à infecção fúngica da lâmina ungueal com alta incidência na população geral. As opções de tratamento disponíveis para onicomicose têm uso limitado devido aos efeitos colaterais, interações medicamentosas e contraindicações, buscando-se assim a aplicação de um tratamento alternativo. Nos últimos anos, a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) têm sido reconhecida como opções alternativas de tratamento para várias doenças infecciosas, inclusive as dermatológicas. Entretanto, ainda não é completamente elucidado os parâmetros ideais para uma terapia segura e efetiva no tratamento da onicomicose. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia da aPDT, *in vitro*, nos fungos *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) e *Microsporum gypseum* (*M. gypseum*), fungos causadores de onicomicoses. Nos ensaios, *in vitro*, foi utilizado os fungos *T. rubrum* (ATCC 28188) e *M. gypseum* (ATCC 24102), divididos em 13 grupos experimentais: grupo C (controle – sem tratamento); grupo MB (tratado com azul de metileno); grupo R100 (tratado apenas com luz na dose de 100 J/cm²) e grupos T10, T20, T30, T40, T50, T60, T70, T80, T90 e T100, tratado com luz nas densidades de energia 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm², 40 J/cm², 50 J/cm², 60 J/cm², 70 J/cm², 80 J/cm², 90 J/cm², e 100 J/cm². Para o tratamento, foi usado azul de metileno (AM) na concentração de 100 µM, utilizando 30" de pré-irradiação e como fonte de luz um equipamento de LED de comprimento de onda 630 nm (100 mW; 2,93 cm²). Observou-se que a aPDT com densidade de energia a partir de 20 J/cm² reduziu a germinação do *T. rubrum*, levando a erradicação com uma densidade de energia 100 J/cm². Em relação ao *M. gypseum*, a influência na germinação foi proporcional a densidade de energia, atingindo melhores resultados com densidades de 100 J/cm². Esses resultados sugerem que a aPDT pode ser um tratamento alternativo possível para o combate à onicomicose, embora mais investigações sejam necessárias para determinar se tal eficácia poderia ser obtida *in vivo*.

Palavras – chave: Onicomicose; Terapia Fotodinâmica; LED; Tratamento; azul de metileno.

ABSTRACT

Onychomycosis is one of the most common diseases in the field of dermatology and refers to a fungal infection of the nail plate with a high incidence in the general population. The available treatment options for onychomycosis have limited use due to side effects, drug interactions, and contraindications, which requires the application of an alternative treatment for onychomycosis. In the last years, the antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) has been acknowledged as treatment options for several infectious diseases, including dermatological ones. However, the ideal parameters for a safe and effective therapy in the treatment of onychomycosis are still not fully elucidated. Therefore, this study aimed to evaluate the effectiveness of aPDT, *in vitro*, on the fungi *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) and *Microsporum gypseum* (*M. gypseum*), the main causes of onychomycosis. In the *in vitro* tests, the fungi *T. rubrum* (ATCC 28188) and *M. gypseum* (ATCC 24102) were used, divided into 13 experimental groups: Group C (control - no treatment); group MB (treated with methylene blue); group R100 (treated with LED at a dose of 100 J/cm²) and groups T10, T20, T30, T40, T50, T60, T70, T80, T90 and T100, treated with luz at doses of 10 J/cm², 20 J/cm², 30 J/cm², 40 J/cm², 50 J/cm², 60 J/cm², 70 J/cm², 80 J/cm², 90 J/cm², and 100 J/cm². For the treatment, a light-emitting diode (LED) equipment with a wavelength of 630 nm (100 mW; 2.93 cm²) associated with a photosensitizer was used, AM was used at a concentration of 100 µM, using 30' of pre-irradiation. It was observed that aPDT reduced germination on *T. rubrum* germination with an energy density from 20 J/cm², reaching achieving its eradication with an energy density of 100 J/cm². In relation to *M. gypseum*, the influence on germination was proportional to the energy density, in the energy density of 100 J/cm². These results suggest that aPDT may be a possible and attractive alternative treatment for combating onychomycosis, although further investigation is needed to determine whether such efficacy could be achieved *in vivo*.

Keywords: Onychomycosis; Photodynamic Therapy; LED; Treatment; methylene blue.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A onicomicose é doença infecciosa mais comum das unhas. Foi realizado um estudo, *in vitro*, com fungos, *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) e *Microsporum gypseum* (*M. gypseum*), principais causadores de onicomicoses. A proposta foi a aplicação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), em diferentes doses com a finalidade de observar se a terapia proporcionava a morte dos fungos. A aPDT mostrou ter eficácia na eliminação dos fungos, sendo que as doses de 100 J/cm² para *T. rubrum* e 100 J/cm² para *M. gypseum* podem ser consideradas como as de melhores potenciais para um tratamento de onicomicose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipamento de LED, modelo Antares, IBRAMED - Brasil.....	28
Figura 2 - Crescimento micelial do isolado <i>T. rubrum</i> (ATCC 28188) nos meios CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.	31
Figura 3 - Crescimento micelial do isolado <i>T. menta</i> (ATCC 9533) nos meios CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.	32
Figura 4 - Crescimento micelial do isolado <i>M. gypseum</i> (ATCC 24102) nos meios CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.	33
Figura 5 - Produção de conídios do fungo <i>T. rubrum</i> (ATCC 28188) nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.....	34
Figura 6 - Produção de conídios do fungo <i>T. menta</i> (ATCC 9533) crescido nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.....	35
Figura 7 - Produção de conídios do fungo <i>M. gypseum</i> (ATCC 24102) nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.....	35
Figura 8 - Produção de microconídio e macroconídio do fungo <i>M. gypseum</i> (ATCC 24102) nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.	36
Figura 9 - Relativo à germinação do fungo <i>T. rubrum</i> (ATCC 28188) após o tratamento fotodinâmico.	37
Figura 10 - Germinação de conídios de <i>T. rubrum</i> do grupo C (a), grupo MB (b) e grupo R100 (c).....	37
Figura 11 - Germinação de conídios de <i>T. rubrum</i> do grupo T10 (a), T 20 (b), T30 (c), T40 (d).....	39
Figura 12 - Germinação de conídios de <i>T. rubrum</i> do grupo T50 (a), T 60 (b), T 70 (c), T80 (d), T90 (e) e T100 (f).....	40
Figura 13 - Relativo à germinação do fungo <i>M. gypseum</i> (ATCC 24102) após o tratamento fotodinâmico.	41
Figura 14 - Germinação de conídios de <i>M. gypseum</i> do grupo C (a), grupo MB (b) e grupo R100 (c).....	42
Figura 15 - Germinação de conídios de <i>M. gypseum</i> do grupo T10 (a), T 20 (b), T30 (c), T40 (d), T50 (e) e T60 (f).....	43
Figura 16 - Germinação de conídios de <i>M. gypseum</i> do grupo T70 (a), T80 (b), T90 (c) e T100 (d).....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 ONICOMICOSSES	16
3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE DERMATÓFITOS	17
3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 ESPÉCIES DE FUNGOS UTILIZADOS	26
4.2 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS	26
4.3 INOCULAÇÃO DOS FUNGOS	26
4.4 MENSURAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL	27
4.5 MENSURAÇÃO DE MICROCONÍDIOS E MACROCONÍDIOS	27
4.6 TERAPIA FOTODINÂMICA	28
4.7 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA INOCULAÇÃO DOS FUNGOS PÓS TERAPIA FOTODINÂMICA	29
4.8 PREPARO DA SUSPENSÃO DOS FUNGOS PARA TRATAMENTO FOTODINÂMICO	30
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS	31
5.1 CRESCIMENTO MICELIAL	31
5.2 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS	33
5.3 PRODUÇÃO DE MICROCONÍDIOS E MACROCONÍDIOS	36
5.4 TRATAMENTO FOTODINÂMICO	36
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A onicomicose é a mais frequente das doenças ungueais, constituindo aproximadamente metade de todas as infecções (GUPTA et al., 2019). Pode ser causada por dermatófitos, leveduras e fungos não dermatófitos (FAERGWANN et al., 2003) (BARAN; DAWBER, 2000). Sabe-se que os fungos mais comuns causadores de onicomicoses são o *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), *Trichophyton mentagrophytes* (*T. menta*) e *Microsporum gypseum* (*M. gypseum*). Esses fungos danificam o filamentosos queratinofílicos, visto que utilizam a queratina como nutriente durante a infecção da unhas (FAERGEWANN, 2003).

As principais opções de tratamento atualmente disponíveis para onicomicoses são antifúngicos tópicos e sistêmicos, que em geral são eficazes e seguros. No entanto, as preocupações dos pacientes com a toxicidade hepática e renal geralmente limitam o uso de medicamentos orais (CHEN et al., 2019). Para agentes tópicos, falha no tratamento ou recorrência da infecção não é incomum devido ao longo prazo do tratamento, difícil adesão do paciente, e sua limitada eficácia penetrante, especialmente para onicomicoses com lesões cutâneas hiperkeratóticas. Em virtude das deficiências acima, existe um esforço para desenvolver alternativas de terapia não medicamentosa, o que é reforçada pelo fato de que a resistência dos fungos aos medicamentos vem aumentando ano a ano (CHEN et al., 2019).

Atualmente, o interesse na aplicação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) aumentou consideravelmente no campo da reabilitação de distúrbios dermatológicos por se tratar de um procedimento minimamente invasivo, bem tolerado e de baixo custo. A aPDT é uma modalidade terapêutica que combina um composto fotossensível associado a um laser (amplificação de luz por emissão estimulada de luz) ou LEDs (diodos emissores de luz) capazes de produzir fortes oxidantes o ocasionar morte às células-alvo. Essa terapia tem sido usada com sucesso há mais de 73 anos na medicina moderna para tratar infecções superficiais (INADA et al., 2012).

De acordo com Mello et al., (2011), os efeitos do aPDT baseiam-se na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) assim como de oxigênio singlete (1O_2) que reagem com lipídios insaturados, aminoácidos e ácidos nucleicos, ocasionando morte do tecido alvo via necrose ou apoptose (ZHU; FINLAY, 2008).

Desta forma, embora haja o uso difundido da aPDT na prática clínica comum, algumas questões referentes à sua utilização no tratamento das onicomicoses ainda não são bem compreendidas. Em particular, há uma carência de estudos na literatura investigando o efeito de diferentes doses da terapia em microrganismos prevalentes em dermatofitoses e que levam ao insucesso do tratamento. Diante disto, foi levantada a hipótese de a aPDT realizada com azul de metileno (AM) e LED poderia ter um potencial antimicrobiano promissor, constituindo-se um tratamento adequado e eficaz a ser utilizado na prática clínica. Nesse sentido, evidências microbiológicas perante esse cenário são de grande valia para compreender com exatidão os benefícios da abordagem terapêutica no tratamento de onicomicoses. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar a eficácia de diferentes doses de aPDT sobre os fungos *T. rubrum* e *M. gypseum*, causadores da onicomicose, através de um estudo *in vitro*.

2 OBJETIVOS

Avaliar e comparar a eficácia de diferentes dosimetrias da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), *in vitro*, nos fungos *T. rubrum* e *M. gypseum*, causadores da onicomicose.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o crescimento micelial dos fungos *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum* em meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA;
- Analisar a produção de conídios dos fungos *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum* em meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA;
- Avaliar os efeitos da aPDT em diferentes densidades de energia, na germinação dos conídios dos fungos *T. rubrum* e *M. gypseum*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ONICOMICOSSES

A onicomicose é a doença infecciosa mais comum das unhas (GUPTA, et al., 2019). O termo onicomicose é derivado do grego “onyx” (unha) e “mykes” (fungos), sendo usado para descrever a infecção fúngica das unidades ungueais (KAUR; BHALLA, 2008).

É causada principalmente por dermatófitos antropofílicos, em particular por *Trichopyton rubrum*, *Trichopyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum* (FAERGEMANN, 2003). Ainda, há os fungos não-dermatófitos, como *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Alternaria* spp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* spp., que também podem estar envolvidos na patogênese com estimativa de 10% de prevalência em todo o mundo (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017). Leveduras, como *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, representam a terceira causa de infecção fúngica ungueal, mas só ocorre quando fatores predisponentes estão presentes, principalmente imunossupressão e diabetes (GUPTA; VERSTEEG; SHEAR, 2017). A transmissão das onicomicoses ocorre pelo contato direto com animais e humanos infectados, ou indireto por objetos contaminados (RODRIGUES et al., 2012).

Com o aumento da população imunocomprometida e com o abuso do uso de antibióticos de amplo espectro, a incidência de dermatomicoses também tem aumentado nos últimos anos. Embora infecções fúngicas superficiais raramente são fatais, elas podem causar danos à aparência da pele e função normal e reduzir significativamente a qualidade de vida dos pacientes (CHAN, 2003). Pode ocorrer descolamento e espessamento das bordas da lesão, aparecimento de manchas brancas e até distrofia total das unhas. Embora as infecções causadas por dermatófitos sejam geralmente restritas às regiões superficiais da epiderme, esses fungos podem comportar-se de maneira invasiva, ocasionando infecção profunda e disseminada em pacientes imunocomprometidos, até mesmo com surgimento de granulomas dermatofíticos (PERES; MARANHÃO; ROSSI; MARTINEZ, 2010).

3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE DERMATÓFITOS

A infecção por fungos dermatófitos em seres humanos parece ser tão antiga quanto a história da humanidade. Assim, os dermatófitos pertencem aos grupos mais antigos de microrganismos que foram reconhecidos como agentes de doenças humanas (RUBIO; REZUSTA; RUESCA, 1999; HOOG et al., 2017), representando 90% de infecção fúngica das unhas (CHEN et al., 2019).

Historicamente, três gêneros anamórficos de fungos dermatófitos eram denominados: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, cujos teleomorfos conhecidos distribuíam-se nos gêneros *Arthroderma* e *Nannizzia* (LACAZ et al., 2002). Entretanto, com o advento da taxonomia polifásica, utilizando metodologias de filogenia e biologia molecular, nove gêneros holomórficos são hoje descritos: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Arthroderma*, *Ctenomyces* e *Guarromyces*, tendo as setes primeiras espécies capazes de causar infecção em humanos e/ou outros animais. Essa classificação baseia-se principalmente nas diferenças de morfologia microscópica e esporulação fúngica, ou seja, de acordo com a formação e morfologia de seus conídios (estruturas de reprodução assexuada) (HOOG et al, 2017).

Ecologicamente, os dermatófitos podem ser classificados como zoofílicos, espécies com transmissão de animais para o homem, como o *Microsporum canis*; antropofílicos quando são restritos a humanos e raramente causam doenças em animais, por exemplo, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*; e geofílicos, quando os fungos presentes no solo podem ocasionalmente ser encontrados parasitando o homem ou animais (CRUZ, 2010).

O solo é um reservatório natural de dermatófitos e as queratinas presentes no solo são utilizadas como nutrientes para esses microrganismos, por isso esses fungos são adaptados a diversos ambientes. Sabe-se que a queratina é uma proteína de alto peso molecular, relativamente insolúvel e presente na pele, cabelos, unhas e detritos depositados no solo (COSTA-ORLANDI et al., 2014). Desta forma, esses fungos podem invadir tecido queratinizado, como pele, cabelo e unhas de humanos e outros animais (MIMS et al, 1995).

O gênero *Trichophyton* representa o gênero com maior número de dermatófitos isolados a partir de seres humanos. Ele produz diferentes tipos de conídios durante seu ciclo assexuado. Conídios são estruturas especializadas responsáveis por reprodução, dispersão, persistência ambiental e infecção do

hospedeiro (BARROS et al., 2010). Caracterizado pela produção de microconídios e pouco ou nenhum macroconídio, estes quando formados, tem parede celular fina e lisa. Os macroconídios originam-se lateralmente nas hifas ou em pedículos curtos de paredes finas ou grossas e são em forma de bastão ou fusiformes, com tamanho que varia de 4-8 a 8-50 μm . Os microconídios são abundantes, esféricos, piriforme ou de formato irregular, com tamanhos variando de 2-3 a 2-4 μm (FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2020).

Além da presença de micro ou macroconídios, a produção de pigmentos, atividade urease, capacidade de invasão do pêlo e crescimento padrão diferencial em meios de cultura, com ou sem tiamina e niacina são utilizados para identificação das espécies. Dentro dos tecidos infectados, os dermatófitos produzem principalmente arthroconídios. O arthroconídio resulta da fragmentação de uma hifa após a formação de septo múltiplo e é responsável pela sobrevivência da infecção (BARROS et al., 2010).

Existem pelo menos quinze espécies pertencentes ao gênero *Trichophyton*. As espécies mais comumente relatadas como causadoras dessas infecções em humanos são: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* (var. *interdigitales*), *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*, destacando o *T. rubrum* e o *T. mentagrophytes* (atualmente conhecido como espécie *T. interdigitale*) são os mais frequentes em onicomicoses (LIU et al., 1997; REZENDE et al., 2008). Sendo o dermatófito mais comum no mundo todo, o *T. rubrum* é responsável pela maioria das dermatomicoses, incluindo *tinea* mão e pé, *tinea* perna, corpo de mariposa e *tinea unguin* (CHAN et al., 2003).

Atualmente, com base em resultados de biologia molecular, as variantes antropófilas de *T. mentagrophytes* bem como alguns isolados zoofílicos que foram classificados como variações de *T. mentagrophytes* não são geneticamente distinguíveis de *T. interdigitale* e, por isso, estão agrupados como espécies de *T. interdigitale*. (NENOFF; HERRMANN; GRÄSER, 2007; SUMMERBELL, KANE, 1997).

O *T. mentagrophytes* (var. *interdigitale*) é um patógeno fúngico comum e conhecido por causar as dermatofitoses animal e infecções cutâneas graves (ZHAO; EIDE, 1997; MIYAJIMA et al., 2013). Muitos estudos epidemiológicos têm mostrado que *Trichophyton mentagrophytes* é distribuído globalmente e é um dos patógenos mais frequentes ou comuns de doença fúngica na pele. (MARAKI; MAVROMANOLAKI, 2016).

Convencionalmente, o *T. mentagrophytes* é identificado por suas características macro e microscópicas e, algumas vezes, por suas características fisiológicas, principalmente no caso de isolados atípicos; no entanto, os resultados geralmente são incertos devido às variações fenotípicas entre os isolados, como a taxa de crescimento micelial, a cor (branca ou bege) e a aparência das colônias (pulverulentas ou aveludadas), o número de microconídios, a presença ou ausência de filamentos espirais (FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2020).

O gênero *Microsporum* é caracterizado pela produção de macroconídios, multicelulares, tem parede celular grossa e especulada. A identificação das espécies é baseada em suas diferenças morfológicas. Os microconídios são estruturas pequenas, hialinas podendo apresentar-se em forma de gota ou elípticas e nascem diretamente das hifas (WINN JUNIOR et al., 2006).

O gênero *Epidermophyton* é caracterizado pela produção de macroconídios em clave, com parede lisa, com duas a quatro células em cada e são originadas individualmente da hifa ou, mais caracteristicamente, ocorrem em cachos de duas ou três. A característica primária na identificação do gênero *Epidermophyton* é a ausência de microconídios (WINN JUNIOR et al., 2006).

Semelhantes as bactérias, os fungos são capazes de formar biofilmes, que são comunidades microbianas sésseis estruturadas e organizadas por microrganismos aderidos a uma superfície cercadas por uma matriz extracelular rica em polissacarídeos. Em virtude dessa capacidade, estima-se que os biofilmes tenham uma importância significativa de todas as infecções microbianas humanas. (CHANDRA et al., 2005) (RAMAGE et al., 2009).

A formação de biofilmes oferece uma série de vantagens aos microrganismos, incluindo proteção contra o meio ambiente, comunicação microbiana, aumento da virulência, melhor cooperação metabólica, capacidade pronunciada de resistência a agentes antimicrobianos e defesas do hospedeiro (PERCIVAL et al., 2012). Para Vlassova et al., (2011) a formação de biofilme está relacionada à resistência antifúngica, o que pode explicar a infecção persistente, a resistência e o tratamento a longo prazo necessário para as dermatofitoses, principalmente nas onicomicoses.

A capacidade dos dermatófitos, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes in vitro*, de formar biofilmes, foi descrita por Costa-Orlandi et al., (2014), onde foi demonstrado que ambas as espécies foram capazes de formar biofilmes, destacando uma massa mais densa em *T. rubrum* após 72 h.

A patogênese da micose está diretamente relacionada à interação e adesão de fungos patogênicos aos tecidos do hospedeiro (VERMOUT et al., 2018). Seus mecanismos podem variar de acordo as espécies de fungos e status do hospedeiro. Os fatores responsáveis pela adesão de dermatófitos a várias superfícies são pouco compreendidos, mas sabe-se que a capacidade do *T. rubrum* de aderir às células epiteliais se deve à ação de adesinas específicas de carboidratos que são expressas na superfície microconidial (VERMOUT et al., 2018).

A infecção pelos dermatófitos ocorre quando os artroconídios aderem à pele do hospedeiro, seguido de germinação e invasão de estruturas queratinizadas por hifas fúngicas. Durante a invasão, os tecidos queratinizados são digeridos pela secreção de múltiplas endoproteases, cuja presença pode determinar a sobrevivência do fungo no hospedeiro, bem como a evolução clínica da infecção, fornecendo nutrientes, desencadeando e modulando a resposta imune (VERMOUT et al., 2018). A gravidade da infecção está relacionada, em parte, à reação do hospedeiro ao organismo invasor, além de outros fatores, como espécie ou virulência da cepa infectante, reação do hospedeiro aos produtos metabólicos produzidos pelo fungo, sítio anatômico da infecção e fatores ambientais locais (SOARES et al., 2013). Outros fatores diretamente relacionados ao *T. rubrum* são os componentes da parede celular, como as galactomananas, que podem apresentar efeitos imunossupressores, e a proteínas de transporte de membranas que são importantes fatores de virulência que garantem uma colonização bem sucedida em ambientes propícios. No processo de infecção, a parede celular do dermatófito desempenha um papel essencial, sendo, portanto, alvo de antifúngicos (PERES et al., 2010).

Existem medicamentos disponíveis para infecções dermatofíticas usando principalmente formulações orais e/ou tópicas, como os azóis ou alilaminas, particularmente itraconazol e terbinafina, respectivamente. No entanto, o uso de medicamentos sistêmicos pode ser limitado por custo, interação de medicamentos e possíveis efeitos adversos (GUPTA; COOPER, 2008).

As falhas e recaídas do tratamento ocorrem com todos os agentes terapêuticos atualmente disponíveis. Certas formas de dermatofitose, especialmente aqueles causados por *T. rubrum*, são particularmente resistentes aos tratamentos quimioterápicos. Devido às limitações de opções terapêuticas atuais, o desenvolvimento de novas abordagens para tratar dermatofitoses é claramente necessário (NUNLEY; CORNELIUS, 2008).

Embora patógenos dermatofíticos sejam normalmente suscetíveis a agentes antifúngicos, estima-se que apenas 25–50% dos pacientes com onicomicose são curados após o tratamento padrão (SIGURGEIRSSON et al., 2010; GUPTA et al., 2019; BARAN et al., 2000).

Além disso, o surgimento de cepas resistentes ocorre concomitantemente com tratamentos de alto custo para longos períodos, com possíveis eventos adversos (RAMOS et al., 2016). A presença de biofilme é considerada um dos principais fatores que contribuem para a reincidência da infecção dermatofítica crônica (BURKHART et al., 2002; WARSHAW et al., 2005; NUSBAUM, KIRSNER, CHARLES, 2012; COSTA-ORLANDI et al., 2014). Além disso, há taxas crescentes de resistência antimicrobiana entre dermatófitos, especialmente para *T. rubrum*, o agente etiológico mais frequente para onicomicose (BALTAZAR et al., 2013).

Após a descoberta do desenvolvimento de microrganismos resistentes aos antibióticos e dificuldades no tratamento de onicomicoses pelos métodos convencionais, tem sido estimulado à busca de soluções mais seguras, terapia antifúngica eficiente, facilmente alcançável e econômica (BALTAZAR et al., 2013), como a exemplo da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT).

3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT)

A área da medicina que utiliza luz no tratamento de doenças é denominada Fotomedicina; no entanto, por razões históricas ou por diferentes mecanismos de ação, três tipos de tratamento com luz são definidos: a Fototerapia, onde se usa somente luz, a Fotoquimioterapia, uso da luz em associação com compostos químicos com excitação no Ultra Violeta (UV) e por fim, a aPDT, do inglês *Photodynamic Therapy* ou aPDT, do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*; neste caso, a terapia ocorre envolvendo um agente fotossensibilizante (FS) com excitação em comprimentos de onda do espectro visível. A fotomedicina, cada dia mais em evidência, teve início em civilizações antigas, no Egito, Grécia e Índia, porém, ficou adormecida e somente no início do século XX foi redescoberta pela civilização ocidental (ITRI; FERNANDES; BAPTISTA, 2019).

O uso da luz combinada com uma substância fotossensível é, na verdade, uma abordagem antiga para o tratamento de doenças de pele. Documentos de 1200 – 2000 aC mostraram que os egípcios e médicos chineses, bem como indianos hindus ayurvédicos usavam combinações de extratos de plantas com exposição à

luz solar para tratar distúrbios da pele (PATHAK; FITZPATRICK, 1992; CRAIG et al., 2014). Os egípcios usavam a aplicação de um extrato de *Ammi majus*, uma planta contendo furanocumarina associada à exposição solar para tratar topicamente vitiligo. Na medicina tradicional ayurvédica, um extrato de *Psoralea corylifolia*, que é uma furanocumarina, também foi usada para vitiligo (PATHAK, FITZPATRICK, 1992).

A terapia poder ser utilizada com fonte de luz constituída por um laser (amplificação de luz por emissão estimulada de luz) ou LED (diodos emissores de luz) de baixa intensidade. Nos últimos anos, o laser e o LED, de baixa intensidade, foram reconhecidos como opções alternativas de tratamento. Esses dispositivos apresentam são atérmicos e com banda relativamente estreita em torno de um comprimento de onda. O laser consiste na emissão estimulada de radiação e o LED são diodos que emitem luz quando conectados a um circuito e que predomina o mecanismo da emissão espontânea de radiação. Dessa distinção básica decorrem as diferenças estruturais entre os dois dispositivos. No caso do laser, a geração de luz é coerente e colimada, e possui uma maior especificidade quanto à sua monocromaticidade, que parecem conceder a ele um desempenho geralmente superior, porém de maior custo e, portanto, menor viabilidade. Já os LEDs apresentam um espectro de luz não coerente e não colimada, diferentemente dos lasers. Quando comparado a luz halógena, ambos apresentam um espectro de emissão bem mais estreito, sendo consideradas terapias monocromáticas (STHAL; BOURQUIN, 2000).

A aPDT foi recentemente proposta para combater os biofilmes observados em diversas situações clínicas. Como uma abordagem não antibiótica, aPDT emprega fotossensibilizadores não tóxicos (FSs) e luz visível em comprimento de onda específico para gerar espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERN), que são capazes de matar microrganismos (HAMBLIN; HASAN, 2004). Os processos fotofísicos se iniciam com a ação da luz sobre o FS. Essa interação ocasiona processos fotoquímicos em cadeia, que se propagam em presença de oxigênio e geram substâncias oxidantes com potenciais citotóxicos letais para as células (HAMBLIN; HASAN, 2004; DAI; HAMBLIN., 2009).

A aPDT representa uma modalidade segura e eficaz para tratar diversas condições clínicas; é capaz de agir em microrganismos e parece não induzir resistência a sua ação e tem sido usada no tratamento de patologias como infecções

cutâneas (psoríase e micoses fúngicas), degeneração macular da retina, verrugas, arteriosclerose e infecções bacterianas (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019).

Muitos dos processos físico-químicos que acontecem no mundo microscópico das moléculas só são explicados com base na mecânica quântica. Quando uma onda eletromagnética interage com uma molécula, ela pode ser espalhada (sua direção de propagação muda) ou pode ser absorvida (sua energia é transferida à molécula). A probabilidade relativa da ocorrência de cada processo é uma propriedade específica da molécula irradiada. Se a energia eletromagnética da luz é absorvida, a molécula passa a um estado excitado. A molécula capaz de ser excitada por absorção é chamada de cromóforo (HAMBLIN; HASAN, 2004; DAI; HUANG; HAMBLIM et al., 2009). Essa interação ocasiona processos fotoquímicos em cadeia, que se propagam em presença de oxigênio e geram substâncias oxidantes com potenciais citotóxicos letais para as células (HAMBLIM et al., 2009).

Os efeitos citotóxicos ocorrem devido à foto-oxidação do FS através da produção de EROS e oxigênio singleto (1O_2), produzidas *in situ*, que danifica estruturas celulares como ácidos nucleicos, proteínas e em membranas e ocasiona a morte celular (RAMOS, 2016).

Os mecanismos de ação da aPDT refere-se a 2 tipos de reações fotodinâmicas, transferência de elétrons (tipo I) e transferência de energia (tipo II). No mecanismo tipo I refere-se à interação do FS com constituintes do meio (exceto oxigênio molecular), ou seja, as moléculas reagem com o substrato, formando espécies ativas de oxigênio (EROs), por exemplo, o radical superóxido. Os principais responsáveis pelos danos são espécies tripletos. Já no mecanismo tipo II, as moléculas do FS transferem diretamente sua energia para o oxigênio molecular presente nas células ou no tecido, formando oxigênio singleto (1O_2), altamente reativo e citotóxico (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019). A produção *in situ* do oxigênio singleto (1O_2) e EROS não teriam tempo de se deslocarem pelo tecido biológico e causar efeito citotóxico. Os radicais gerados pela aPDT têm meias-vidas extremamente curtas e reagem apenas em seus locais de formação, o que reduz sua toxicidade aos tecidos normais adjacentes. Assim, comparada aos métodos tradicionais de tratamento, aPDT possui efeito mais efetivo e seletivo, atuando somente na célula-alvo, não causando efeitos sobre as demais células vizinhas (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

Um aspecto importante da geração de estresse oxidativo e nitrosativo pela terapia é a menor probabilidade de seleção de cepas resistentes, que é o principal

problema enfrentado pelas terapias antifúngicas atuais (CALZAVARA-PINTON et al., 2005).

De maneira geral, os radicais gerados alteram a estrutura da parede e membrana celular do fungo, o que proporciona a translocação adicional do FS para dentro da célula. Subsequentemente, essas EROS produzidos fora e dentro da célula fúngica causam um desequilíbrio na homeostase celular, incluindo danos às organelas citoplasmáticas e ácidos nucleicos, resultando em morte celular por apoptose, necrose ou autofagia. Curiosamente, o tratamento com altas doses de luz e altas concentrações de FS leva à morte celular por necrose, enquanto o tratamento com baixas doses tende a induzir a morte celular por apoptose (LENNON; MARTIN; COTTER, 1991; MROZ et al., 2011). Dependendo da quantidade de EROS produzidas e do grau de dano, a morte por autofagia também pode ocorrer. O princípio pode ser que o oxigênio singleto excitado produzido destrua a membrana celular do fungo e aumente sua permeabilidade, resultando na destruição da estrutura celular, acelerando assim a lise e morte celular (MROZ et al., 2011).

Com relação aos fotossensibilizadores, como citado anteriormente, esses são corantes com capacidade de absorver energia de uma fonte de luz e transferir essa energia para outra molécula (PLAETZER et al., 2009). Um FS efetivo é tipicamente caracterizado por solubilidade em água, ou outro solvente inofensivo para o organismo e não agregar em meio biológico, fato este que reduz a eficácia da aPDT, toxicidade escura mínima, um baixo potencial mutagênico, altamente estável quimicamente, deve ter a capacidade de se acumular preferencialmente no tecido/célula alvo específico e ser rapidamente eliminado após a administração para evitar fotossensibilização prolongada. Além disso, a banda de absorção do FS deve estar entre 600 e 800 nm para evitar fototoxicidade da pele (PLARTZER et al., 2009).

Os principais FSs usados em ensaios clínicos modernos são os sais de fenotiazina, azul de toluidina e azul de metileno (AM), com comprimentos de onda de absorção de 600-660 nm e ambos são clinicamente aprovados para uso humano e, notadamente, podem atuar efetivamente na membrana fúngica, causando danos estruturais. Outras substâncias, como porfirinas, ftalocianinas, ácido 5-aminolevulínico (ALA) e curcumina, também têm sido utilizadas como FSs (CALZAVARA-PINTON et al., 2005).

Corantes de porfirina (absorção na faixa de 400-650 nm), podem causar alterações nas membranas celulares, permitindo a penetração do FS na célula com

consequente dano aos alvos intracelulares (CORMICK et al., 2009; CALZAVARA-PINTON et al., 2005). As ftalocianinas (absorção na faixa de 630-720 nm) são semelhantes aos compostos de porfirinas (CALZAVARA-PINTON et al., 2005; SEKKAT et al., 2012); no entanto, são fortemente hidrofóbicos, característica que geralmente é balanceada por modificações em sua estrutura química para melhorar a solubilidade em água (SEKKAT et al., 2012). O ALA não é intrinsecamente fotodinamicamente ativo, mas a irradiação de células contendo ALA produz uma variedade de FS endógenos que geram EROS, que danificam as mitocôndrias e as membranas plasmáticas (HARRIS; PIERPOINT, 2012). A curcumina (absorção na faixa de 408-434 nm) é um corante amarelo (também conhecido como açafão) isolado de curcuma longa que é um FS bem conhecido (DOVIGO et al., 2011). A aPDT com curcumina gera altos níveis de EROS que causar morte celular por apoptose (SHARMA et al., 2010).

O AM tem sido usado clinicamente como antídoto clássico por muitos anos e é considerado seguro nas diversas modalidades terapêuticas em humanos. A descoberta da ação fotodinâmica dos compostos fenotiazínicos acarretou pesquisas sobre seu potencial em controles de infecções. A aplicação tópica direta do FS sobre a pele ou mucosas têm sido recomendada na área da medicina, pois possui baixa toxicidade em humanos, mesmo sujeito a metabolização quando administrados sistematicamente. Ainda, o AM e moléculas relacionadas são cátions hidrofílicos, solúveis em água, portanto, é rapidamente eliminado do organismo (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019). O AM é altamente absorvido na região do vermelho visível, 620-660 nm, faixa considerada como janela terapêutica por ocasionar eficiente penetração da luz no tecido e excelente rendimento quântico do oxigênio singleto, produzido pela aPDT (BUCK, 2009). Estudos recentes confirmaram que ele é um potente fotossensibilizador para aPDT e tem as vantagens de alta segurança e baixo preço (DOVIGO et al., 2011).

Assim, os estudos supracitados sugerem que aPDT possui um potencial terapêutico promissor no tratamento de onicomicoses. No entanto, é possível verificar que a técnica ainda tem sido utilizada empiricamente devido a uma grande variabilidade entre os protocolos de aplicação, FS, tempo e densidades de energia utilizada. Portanto, neste trabalho, pretender-se avaliar se o emprego do FS AM associado ao LED em diferentes doses poderiam inativar micro-organismos mais prevalentes e responsáveis pelas onicomicoses.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESPÉCIES DE FUNGOS UTILIZADOS

Utilizou-se no experimento os materiais que contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho: 03 isolados de fungos dermatófitos em suspensão: *T. rubrum* (ATCC 28188), *M. gypseum* (ATCC 24102) e o *T. menta* (ATCC 9533). Os meios de cultura PDA - Agar de Batata Dextrose, CZAPK – ágar de solução Czapk, EMERSON Agar e SDA - Sabouraud Dextrose Agar, ambos da DIFCO; NaOH – hidróxido de sódio, HCl – ácido clorídrico, água destilada e solução de Tween 0,01%.

4.2 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS.

O experimento envolveu várias etapas dentre elas a preparação dos meios de culturas que promoveram o crescimento das colônias de fungos. Foram preparadas 150 ml dos meios CZAPK, EMERSON, PDA e SDA. Para 150 ml de água destilada foram utilizados 8,75 g, 6,08 g, 5,85 g e 9,75 g de cada meio de cultura, respectivamente. Agitou-se bem a solução e em seguida o pH de cada meio de cultura foi ajustado para 6,9. Utilizou-se NaOH e HCl para fazer o ajuste do pH 6,9 dos meios. Após ajuste do pH, o meio de cultura foi autoclavado a 120 °C pelo tempo de vinte minutos.

4.3 INOCULAÇÃO DOS FUNGOS

Após serem retiradas da autoclave, as soluções em temperatura reduzida (suportável ao toque) foram depositadas em placas de Petri de poliestireno, identificadas e organizadas de acordo com o meio de cultura e os isolados utilizados. Foram utilizadas 24 placas de Petri de poliestireno (95 mm x 15 mm). Para cada meio de cultura foram preparadas 6 placas, com 25 ml de meio em cada placa. Na câmara de fluxo laminar, a coleta de 40 µl de fungos em suspensão se deu com auxílio de pipeta de precisão e posterior distribuição no centro de cada

placa de Petri. As placas inoculadas foram incubadas a 28° C por 14 dias. Cada inoculação foi repetida pelo menos três vezes em dias diferentes.

4.4 MENSURAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL

O crescimento micelial foi medido no sétimo e décimo quarto dia de crescimento, com auxílio de medidor de colônias, régua graduada em milímetros com posterior anotação das medidas considerando os diferentes tipos de meios e fungos. O diâmetro da colônia (mm) foi medido através de duas medições equidistantes entre si, a partir do centro do ponto de inoculação em direção à periferia da colônia em cada placa. Foram feitas duas medições de diâmetro em ângulos retos para cada placa e depois retirado a média.

4.5 MENSURAÇÃO DE MICROCONÍDIOS E MACROCONÍDIOS

Após 14 dias de crescimento dos isolados *T. rubrum* (ATCC 28188), *M. gypseum* (ATCC 24102) e o *T. menta* (ATCC 9533), nos meios CZAPEK, EMERSON, PDA e SDA, partimos para a mensuração de microconídios e macroconídios com o uso da Câmara de Neubauer. Primeiramente, após flambar o furador de rolha foi retirado três fragmentos de cada isolado, crescidos em diferentes meios de cultura e separadamente, foram colocados em microtubos de 2 ml, previamente identificados com o nome do isolado e o meio de cultura correspondente. Na sequência, com o uso de uma pipeta, foi acrescentado 500 µL de solução de Tween 80 e agitado com o uso de agitador de tubos vórtex durante 1 minuto, em seguida foi aspirado 40 µL da suspensão e colocado na Câmara de Neubauer para contagem de conídios. Esse experimento foi repetido três vezes em dias diferentes.

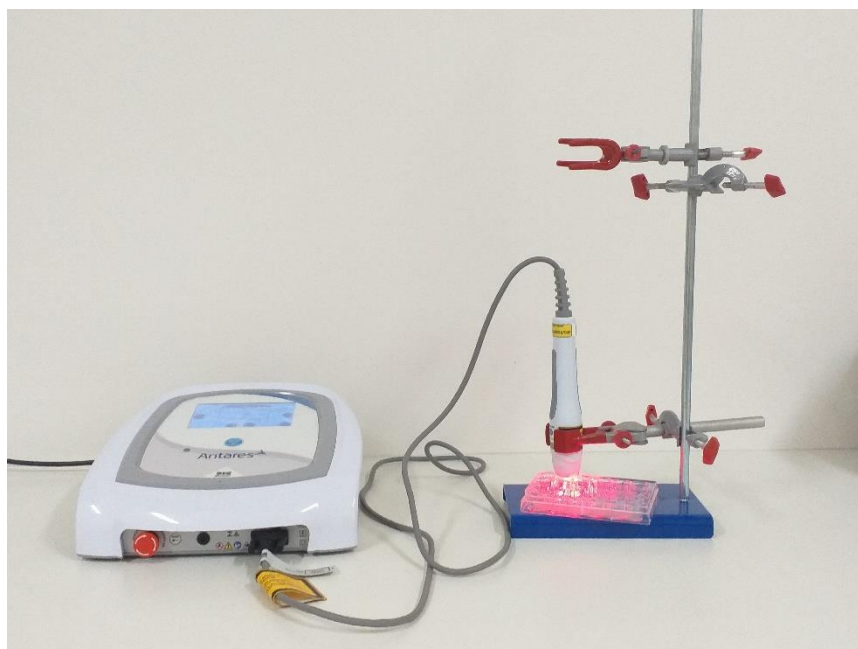
4.6 TRATAMENTO FOTODINÂMICO

Para a realização dos experimentos com a terapia fotodinâmica foram utilizadas 02 culturas de fungos dermatófitos, o *T. rubrum* (ATCC 28188) e *M. gypseum* (ATCC 24102) crescidos por 14 dias em placas de Petri de poliestireno (95 mm x 15 mm). Utilizou-se ainda o meio de cultura SDA (DIFCO); NaOH; HCl; água destilada, solução de Tween 0,01%, corante azul de metileno na concentração 100

μM , solução de Benomyl 0,001%, placas de Petri de poliestireno (35 x 10 mm) e placas de 24 poços.

Para a irradiação da luz foi utilizado o equipamento de LED com o uso do aplicador Probe P1 LED RGB, modelo Antares, IBRAMED - Brasil. Foi utilizado no experimento o Probe LED vermelho, com comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm} \pm 2\%$. O equipamento foi ajustado a uma potência de saída de 100 mW, densidade de potência $0,05 \text{ w/cm}^2$ e área de contato de saída da luz de $2,93 \text{ cm}^2$. A escolha da concentração do azul de metileno, a potência e comprimento de onda do equipamento, e densidade de energia empregada nos experimentos foi com base em estudos anteriores e uso clínico em onicomicoses.

Figura 1 - Equipamento de LED, modelo Antares, IBRAMED - Brasil



Fonte: A autoria própria.

Foram divididas em treze grupos: um grupo C (controle); um grupo MB (usado apenas o azul de metileno); um grupo R100 (usado apenas a luz vermelha 100 J/cm^2) e grupos T10, T20, T30, T40, T50, T60, T70, T80, T90 e T100 que foram submetidos à aPDT.

Os grupos submetidos à luz e a aPDT foram irradiados um de cada vez, separadamente na placa de 24 poços. A suspensão era colocada na placa de poços apenas no momento da irradiação da luz, e após a irradiação o poço era esvaziado e não mais utilizado no experimento. Após a irradiação foram aspirados $40 \mu\text{L}$ da suspensão e inoculado na placa de Petri correspondente, em seguida levadas para

a incubadora a 28° C por 24 horas. Após esse período foi adicionado 0,05 ml de azul de metileno para fixação e em seguida acondicionado sob refrigeração para posterior avaliação da germinação. As dosimetrias utilizadas segues descritas na tabela abaixo.

Tabela 1 - Dosimetrias utilizadas no tratamento fotodinâmico

N	Grupo	Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia (J)	Tempo de Exposição a luz
01	C	-	-	-
02	MB	-	-	-
03	R 100	100 J/cm ²	293	48 min 50 s
04	T 10	10 J/cm ²	29,3	04 min 53 s
05	T 20	20 J/cm ²	58,6	09 min 46 s
06	T 30	30 J/cm ²	87,8	14 min 38 s
07	T 40	40 J/cm ²	117,2	19 min 32 s
08	T 50	50 J/cm ²	146,5	24 min 25 s
09	T 60	60 J/cm ²	175,7	29 min 17 s
10	T 70	70 J/cm ²	205,1	34 min 11 s
11	T 80	80 J/cm ²	234,4	39 min 04 s
12	T 90	90 J/cm ²	263,7	43 min 57 s
13	T 100	100 J/cm ²	293	48 min 50 s

Fonte: Autoria própria.

4.7 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA INOCULAÇÃO DOS FUNGOS PÓS TERAPIA FOTODINÂMICA

Foram preparados 260 mL do meio SDA, sendo 260 ml de água destilada e 16,9 g do meio de cultura SDA. Foi acrescentada ao meio 2,6 mL de solução de Benomyl 0,001% e ajustado a solução a um pH 6,9, com o uso de NaOH e HCl.

Após ajuste do pH, o meio de cultura foi autoclavado a 120 °C pelo tempo de vinte minutos. Após ser retirada da autoclave, a solução em temperatura reduzida, o volume de 10 mL, foi depositada em placas de Petri de poliestireno (35 x 10 mm) identificadas e organizadas de acordo com a dosimetria aplicada e o fungo inoculado. Para cada experimento foram preparadas 26 placas, sendo 13 placas para cada fungo. Esse experimento foi repetido três vezes em dias diferentes.

4.8 PREPARO DA SUSPENSÃO DOS FUNGOS PARA TRATAMENTO FOTODINÂMICO

Após o crescimento das colônias, no meio SDA, em placa de Petri por 14 dias realizou-se a preparação de novas suspensões contendo fungos. Foram pipetados 12 ml de solução de Tween 0,01% esterilizado e colocado em um tubo de ensaio; na sequência esse conteúdo foi transferido para a placa de Petri e com a ajuda de uma espátula de vidro seguiu-se com um esfregaço superficial da colônia com o objetivo de desagregar os conídios dessa colônia. Na sequência essa suspensão foi devolvida para o tubo de ensaio, aspirado 40 µL e levado a Câmara de Neubauer para a contagem do número de conídios na amostra ajustando a uma concentração final de de 1×10^6 UFC.

Ajustando essa concentração foi adicionado em tubos de ensaio 9 mL de Tween 0,01% e 1 mL de azul de metileno, conforme a organização e distribuição dos grupos experimentais. O tempo de incubação do fotossensibilizador foi de 30 minutos para que o elemento fúngico fosse saturado. Na sequência com uso de uma pipeta foi aspirado 40 µL da suspensão na placa de 24 poços e submetido a irradiação da luz.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a partir de um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com número de repetições variadas. Os resultados foram submetidos a análise de variância por meio do programa AGROESTAT (Barbosa & Maldonado Júnior, 2015), seguido da comparação das médias pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Na apresentação dos resultados, acima das barras dos gráficos, as letras iguais indicam diferenças não significativas entre si e letras diferentes indicam diferenças significativas entre si, considerando $p < 0,05$.

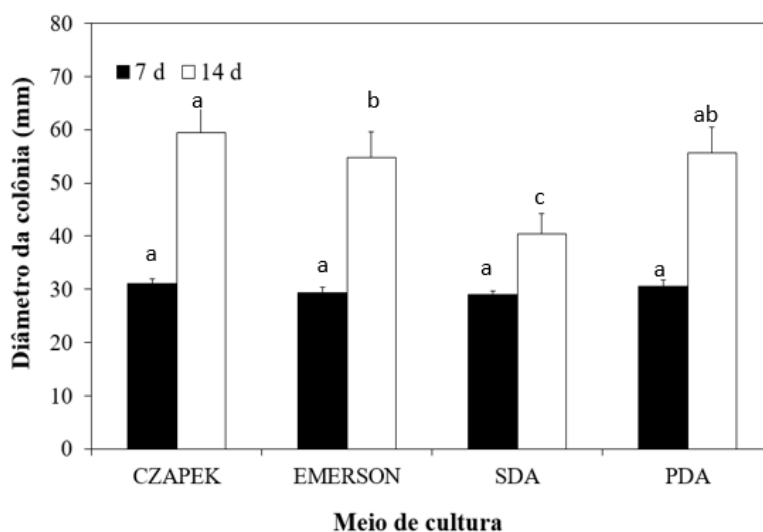
5 RESULTADOS

5.1 CRESCIMENTO MICELIAL

Neste estudo, o crescimento micelial de espécies de fungos foram analisados no sétimo e décimo quarto dia de incubação. Os isolados dos fungos foram crescidos nos meios CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.

Analisando o crescimento micelial do *T. rubrum* (ATCC 28188), com sete dias, percebeu-se que todos os meios de cultura utilizados favoreceram o crescimento da colônia: CZAPEK (31,00 mm), PDA (30,60 mm), EMERSON (29,30 mm) e SDA (29,00 mm). Considerando os sete dias de crescimento dos fungos, não houve diferenças significativas entre os meios cultura, considerando $p < 0,05$. Já, analisando o crescimento com quatorze dias, percebeu-se que todos os meios de cultura utilizados favoreceram o crescimento da colônia: CZAPEK (59,4 mm), PDA (55,70 mm), EMERSON (54,80 mm) e SDA (40,40 mm), apresentando um maior crescimento no meio CZAPEK e um menor crescimento no meio SDA. O meio PDA apresentou crescimento semelhante ao CZAPEK e ao EMERSON. Considerando os quatorze dias de crescimento dos fungos, houve diferenças significativas do meio SDA e os outros meios de cultura; já entre os meios cultura CZAPEK, EMERSON e PDA não houve diferenças significativas considerando $p < 0,05$ (Figura 2).

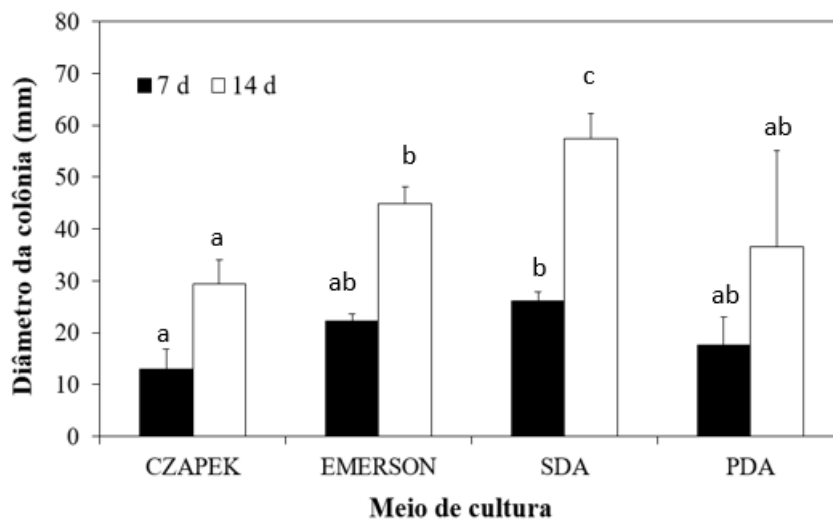
Figura 2 - Crescimento micelial do isolado *T. rubrum* (ATCC 28188) nos meios CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.



Fonte: Autoria própria.

Analisando o crescimento micelial do *T. menta* (ATCC 9533), com sete dias, percebeu-se que todos os meios de cultura favoreceram o crescimento da colônia: SDA (26,14 mm), EMERSON (22,25 mm), PDA (17,50 mm) e CZAPEK (12,92 mm), apresentando um maior crescimento no meio SDA e menor no meio CZAPEK. O crescimento no meio PDA foi semelhante ao meio EMERSON. Com sete dias de crescimento micelial, percebeu-se que não houve diferenças significativas entre os meios cultura, considerando $p < 0,05$. Já analisando o crescimento com quatorze dias, percebeu-se que todos os meios de cultura favoreceram o crescimento da colônia: SDA (57,42 mm), EMERSON (44,85 mm), PDA (36,47 mm) e CZAPEK (29,35 mm), apresentando um maior crescimento no meio SDA e menor crescimento no meio CZAPEK. O meio PDA apresentou crescimento semelhante ao CZAPEK e ao EMERSON. Todos os meios apresentaram diferenças significativas entre si, considerando $p < 0,05$ (Figura 3).

Figura 3 - Crescimento micelial do isolado *T. menta* (ATCC 9533) nos meios CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA;

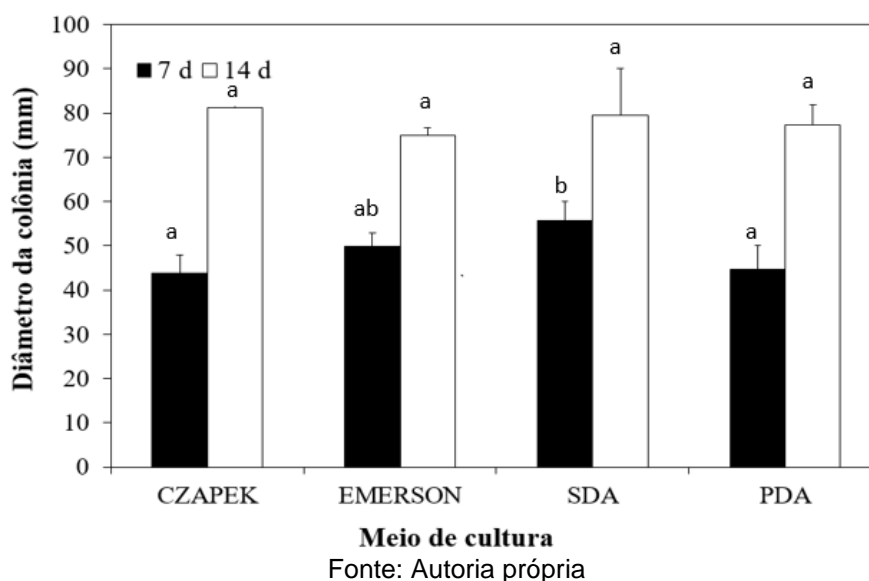


Fonte: Autoria própria.

Conforme a figura abaixo, observamos que o isolado *M. gypseum* (ATCC 24102), no sétimo dia, apresentou um maior crescimento micelial no meio de cultura SDA. e apresentou um crescimento similar nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON e PDA. Já no décimo quarto dia de crescimento, observou-se um crescimento micelial similar nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, PDA e SDA (Figura 4).

Analisando o crescimento micelial do *M. gypseum*, com sete dias, percebeu-se que todos os meios de cultura favoreceram o crescimento da colônia: SDA (55,71 mm), EMERSON (49,85 mm), PDA (44,57 mm) e CZAPEK (43,75 mm), apresentando um maior crescimento micelial no meio de cultura DAS e menor crescimento no meio PDA. O crescimento no meio PDA foi semelhante ao meio CZAPEK. O meio EMERSON semelhante aos demais. Considerando os sete dias de crescimento dos fungos, percebeu-se que não houve diferenças significativas entre os meios cultura, considerando $p < 0,05$. Analisando o crescimento com quatorze dias, percebeu-se que todos os meios de cultura favoreceram o crescimento da colônia: CZAPEK (81,21 mm), SDA (79,54 mm), PDA (77,21 mm) e EMERSON (74,92 mm). Aos 14 dias, o crescimento foi semelhante em todos os meios, não havendo diferenças significativas entre os meios de cultura, considerando $p < 0,05$ (Figura 4).

Figura 4 - Crescimento micelial do isolado *M. gypseum* (ATCC 24102) nos meios CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.

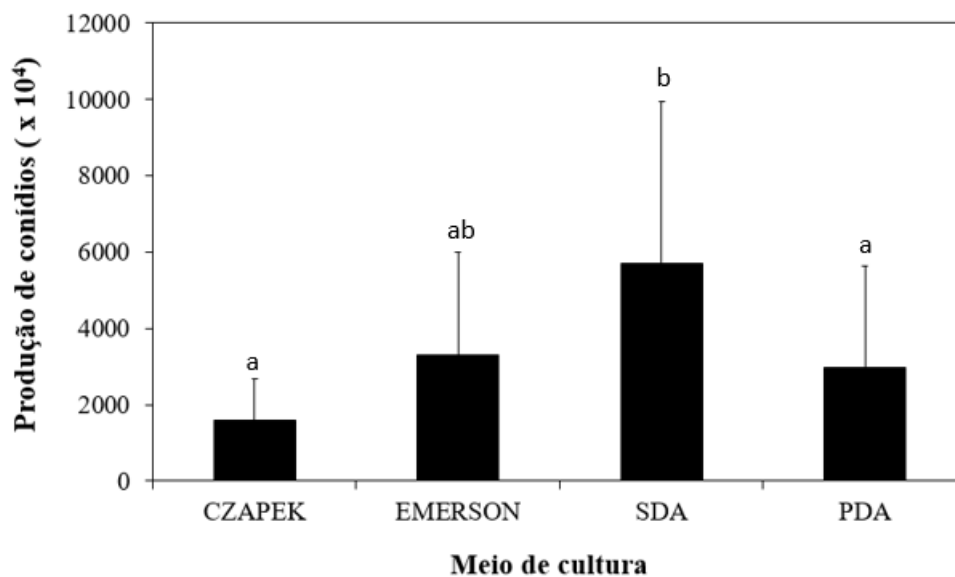


5.2 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

Em relação a produção de conídios do fungo *T. rubrum* (ATCC 28118) percebeu-se que no meio SDA ocorreu uma maior produção de conídios (5685×10^4); seguido do meio EMERSON (3314×10^4), PDA (2964×10^4) e CZAPEK (1590×10^6), respectivamente, sendo maior no meio de cultura SDA e menor no meio CZAPEK. A produção de conídios no meio de cultura SDA apresentou diferença

significativa em relação aos outros meios; os meios CZAPEK e PDA não apresentaram diferenças significativas entre si; já o meio EMERSON apresentou produção de conídios semelhante ao demais meios, considerando $p < 0,05$ (Figura 5).

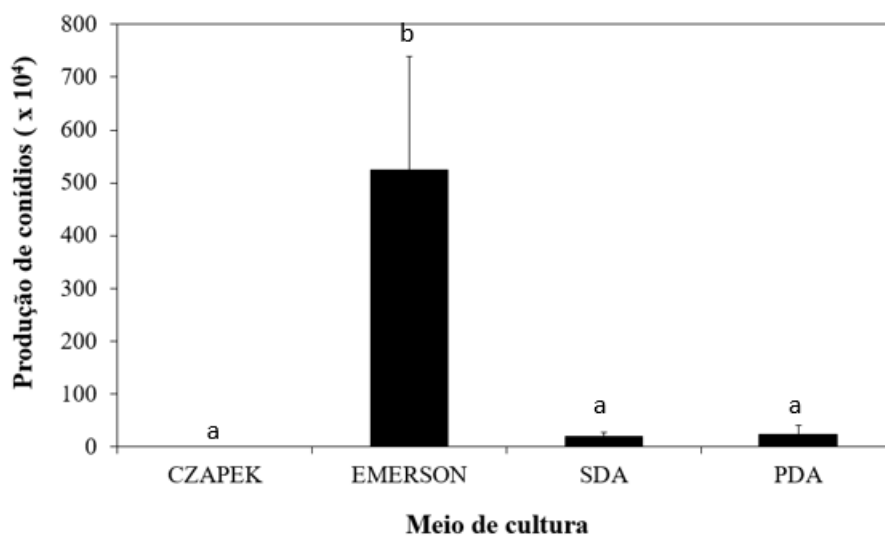
Figura 5 - Produção de conídios do fungo *T. rubrum* (ATCC 28188) nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA;



Fonte: Autoria própria.

Em relação a produção de conídios do fungo *T. menta* (ATCC 9533), percebeu-se que no meio EMERSON ocorreu uma maior produção de conídios ($524,16 \times 10^4$); seguido de PDA ($23,33 \times 10^4$), SDA ($19,5 \times 10^4$). O meio CZAPEK não favoreceu a produção de conídios ($0,00 \times 10^4$). A produção de conídios no meio de cultura EMERSON apresentou diferença significativa em relação aos outros meios; os meios de cultura SDA e PDA não apresentaram diferenças significativas, considerando $p < 0,05$ (Figura 6).

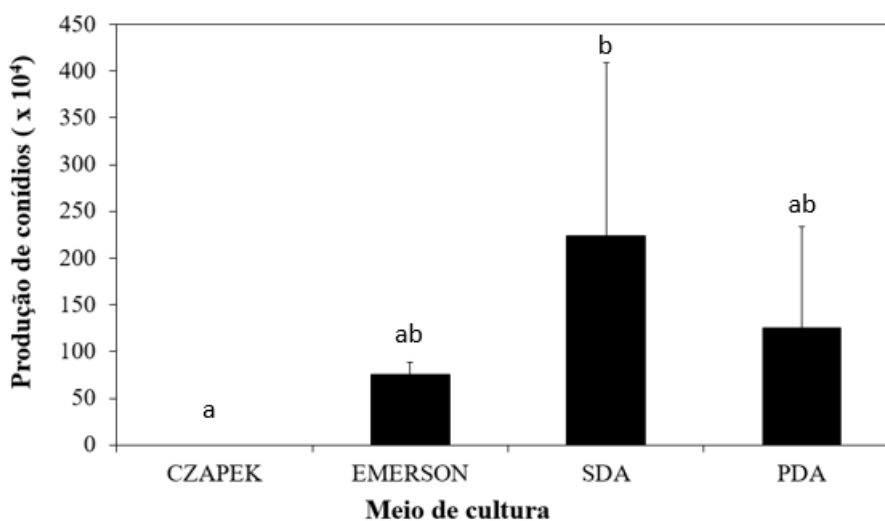
Figura 6 - Produção de conídios do fungo *T. menta* (ATCC 9533) crescido nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA;



Fonte: Autoria própria.

Em relação a produção de conídios do fungo *M. gypseum* (ATCC 24102), percebeu-se que no meio SDA ocorreu uma maior produção de conídios (224×10^4); seguido de PDA ($125,8 \times 10^4$), EMERSON ($75,3 \times 10^4$). O meio CZAPEK não favoreceu a produção de conídios ($0,00 \times 10^4$), respectivamente. A produção de conídios no meio de cultura SDA apresentou diferença significativa em relação aos outros meios; o meio EMERSON e PDA apresentaram resultados semelhantes, considerando $p < 0,05$ (Figura 7).

Figura 7 - Produção de conídios do fungo *M. gypseum* (ATCC 24102) nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.

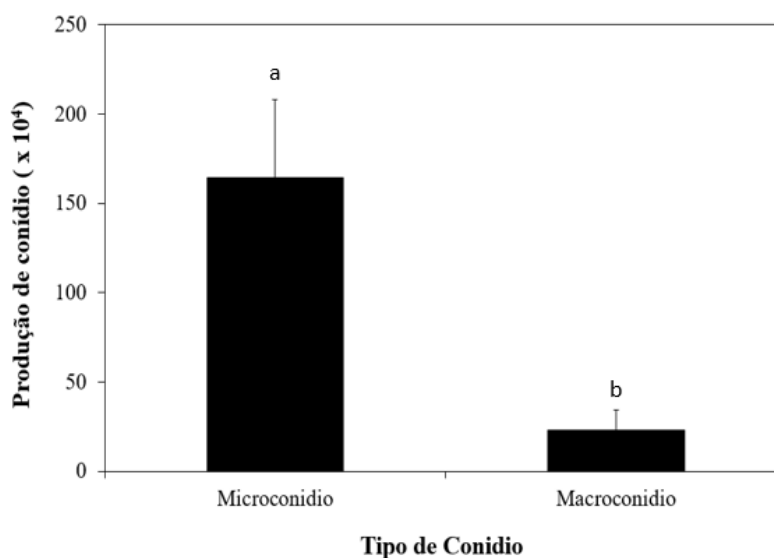


Fonte: Autoria própria.

5.3 PRODUÇÃO DE MICROCONÍDIOS E MACROCONÍDIOS

A presença de micro e macroconídios foram observados durante o processo reprodutivo do fungo *M. gypseum* (ATCC 24102), sendo mais perceptível a presença de microconídios ($164,5 \times 10^4$) e macronídios ($23,25 \times 10^4$), uma diferença significativa entre eles ($p < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8 - Produção de microconídio e macroconídio do fungo *M. gypseum* (ATCC 24102) nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.



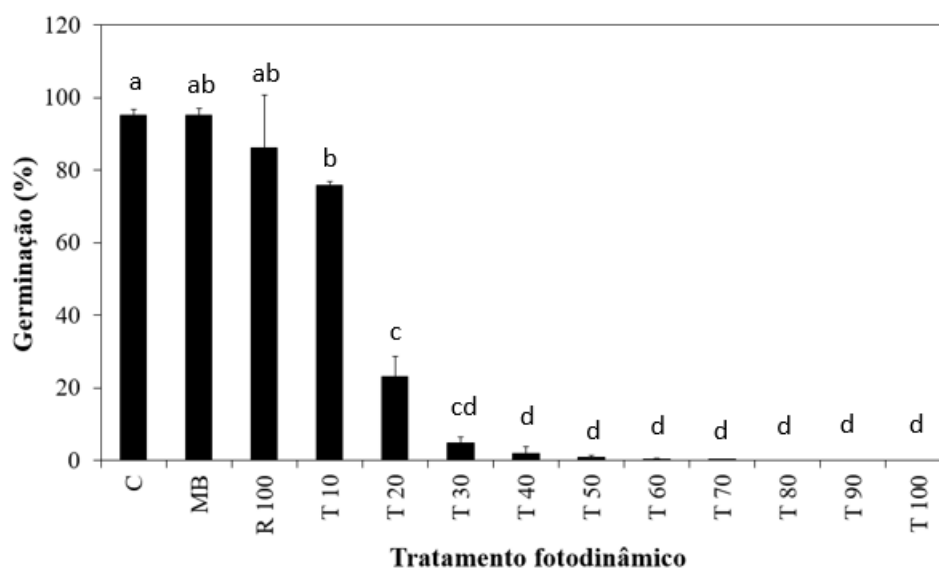
Fonte: Autoria própria.

5.4 TRATAMENTO FOTODINÂMICO

Em relação ao tratamento fotodinâmico, a figura 9 nos mostra a influência da luz vermelha ($630 \text{ nm} \pm 2\%$) no *T. rubrum* (ATCC 28188) em diferentes densidades de energia. O grupo MB manteve-se semelhante ao grupo C, não havendo influência no processo germinativo do *T. rubrum* com a exposição apenas ao azul de metileno. O grupo R100 apenas com a irradiação de luz, com densidade de energia de 100 J/cm^2 , apresentou uma redução na germinação do *T. rubrum* (13,79%). Os grupos submetidos a aPDT (T10, T20, T30, T40, T50, T60, T70, T80, T90 e T100) apresentaram uma redução na germinação dos conídios. Observou-se que essa redução foi proporcional a densidade de energia utilizada: 10 J/cm^2 (24,14%); 20 J/cm^2 (76,85%); 30 J/cm^2 (95,08%); 40 J/cm^2 (98,06%); 50 J/cm^2 (99,25%); 60 J/cm^2

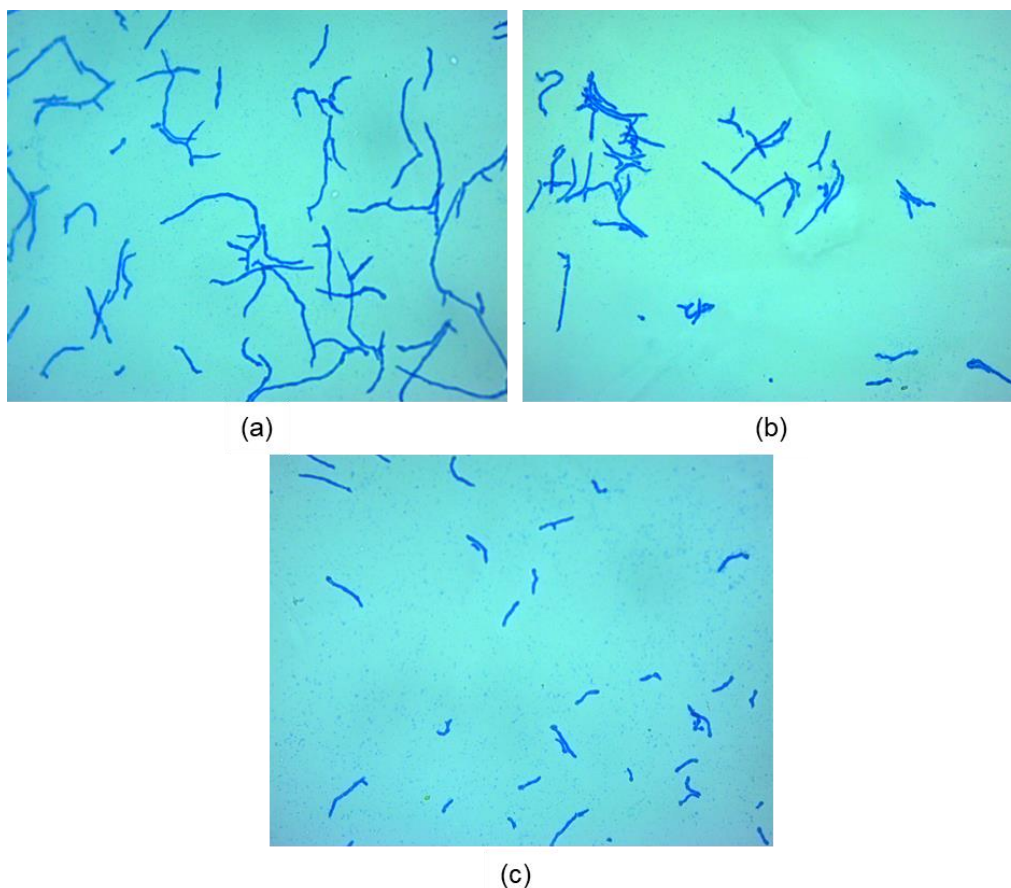
(99,67%) e 70 J/cm² (99,89%). A densidade de energia de 80 J/cm² levou a necrose dos conídios (Figura 9). Percebeu-se que houve diferenças significativas da aPDT em relação ao grupo C ($p < 0,05$). O grupo MB e R100 não apresentaram diferenças significativas entre si; o grupo T30 teve resultados semelhantes ao T20 e T40; os grupos T40 ao T100 não apresentaram diferenças significativas entre si, considerando $p < 0,05$.

Figura 9 - Relativo à germinação do fungo *T. rubrum* (ATCC 28188) após o tratamento fotodinâmico.



Fonte: Autoria própria

Figura - 10 - Germinação de conídios de *T. rubrum* do grupo C (a), grupo MB (b) e grupo R100 (c)



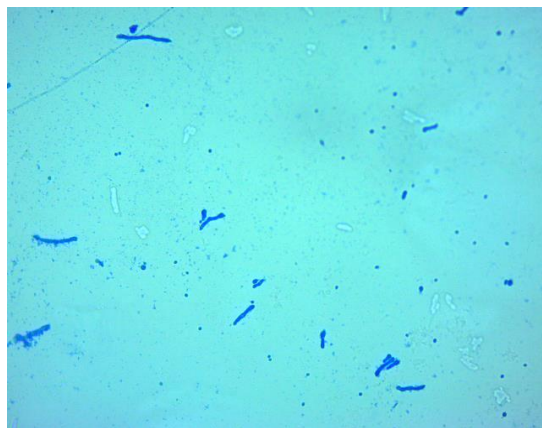
Fonte: Autoria própria.

Os resultados mostraram que existem diferenças entre o grupo C e os grupos submetidos à aPDT. O efeito fotodinâmico foi mais eficaz em grupos onde utilizou-se uma maior densidade de energia. (Figura 11). Nas dosagens a partir de 20 J/cm^2 , observou-se que alguns conídios sofreram lise celular, sendo desintegrados pela aPDT (Figura 11 (b)). Esse fato se torna mais evidente nas dosagens mais altas, de 50 J/cm^2 , 60 J/cm^2 , 70 J/cm^2 e 80 J/cm^2 (Figura 12 (a)(b)(c) e (d)).

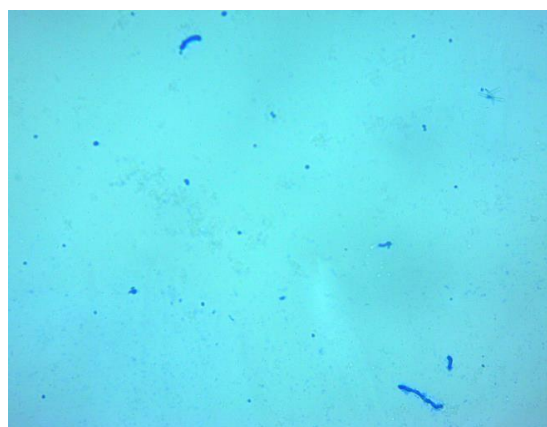
Figura 11 - Germinação de conídios de *T. rubrum* do grupo T10 (a), T 20 (b), T30 (c), T40 (d).



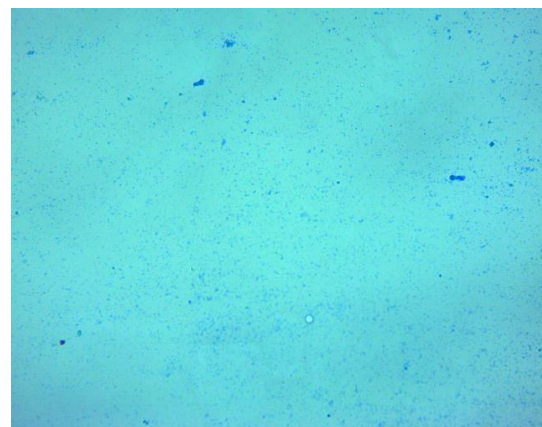
(a)



(b)



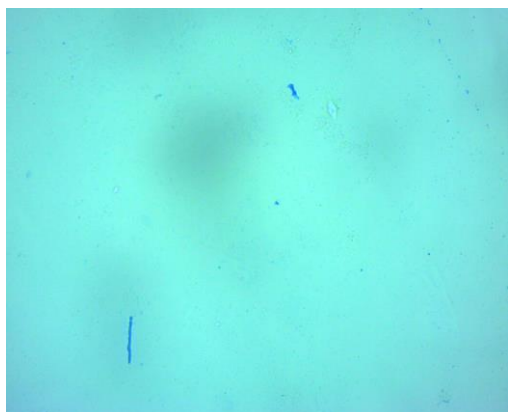
(c)



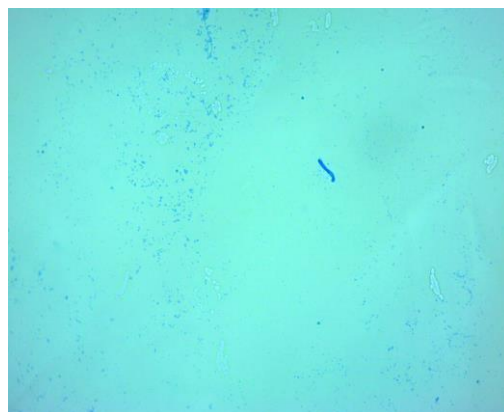
(d)

Fonte: Autoria própria.

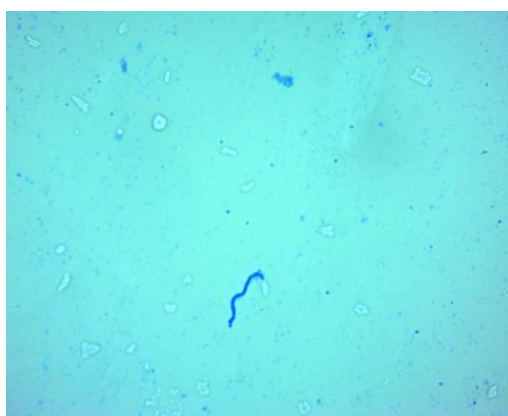
Figura 12 - Germinação de conídios de *T. rubrum* do grupo T50 (a), T 60 (b), T 70 (c), T80 (d), T90 (e) e T100 (f).



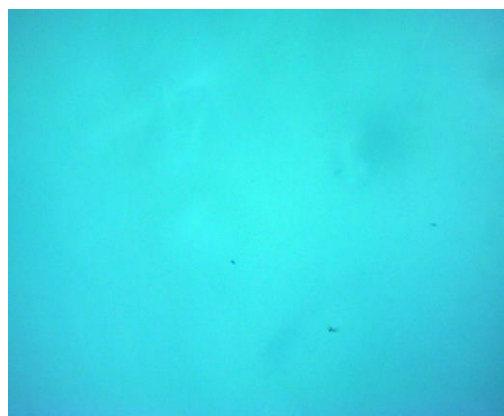
(a)



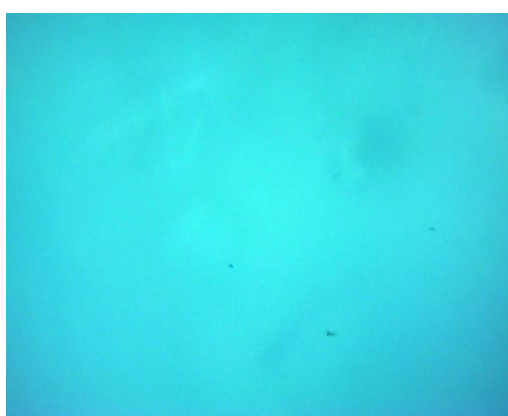
(b)



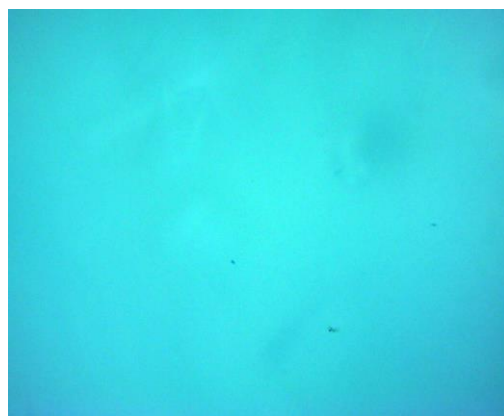
(c)



(d)



(e)



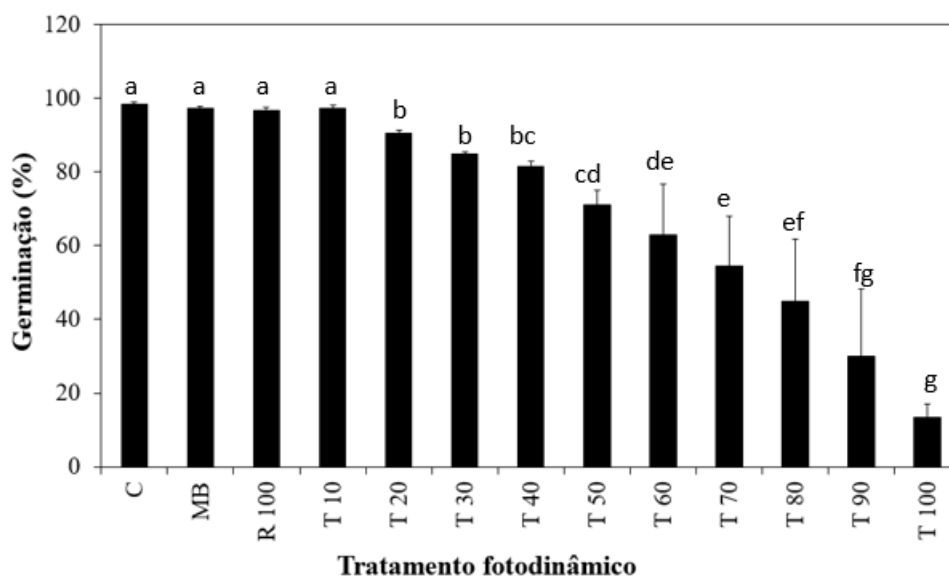
(f)

Fonte: Autoria própria.

Em relação aos experimentos com *M. gypseum*, não houve redução na germinação dos conídios nos grupos C, grupo MB e grupo R100. Em relação aos grupos submetidos a aPDT, percebeu-se uma redução na germinação dos conídios, conforme a densidade de energia empregada: 10 J/cm² (3,27%), 20 J/cm² (9,37%); 30 J/cm² (15%); 40 J/cm² (18,62%); 50 J/cm² (29,03%); 60 J/cm² (36,97%); 70 J/cm² (45,45%), 80 J/cm² (54,99%), 90 J/cm² (70,13%) e 100 J/cm² (86,48%) (Figura 13).

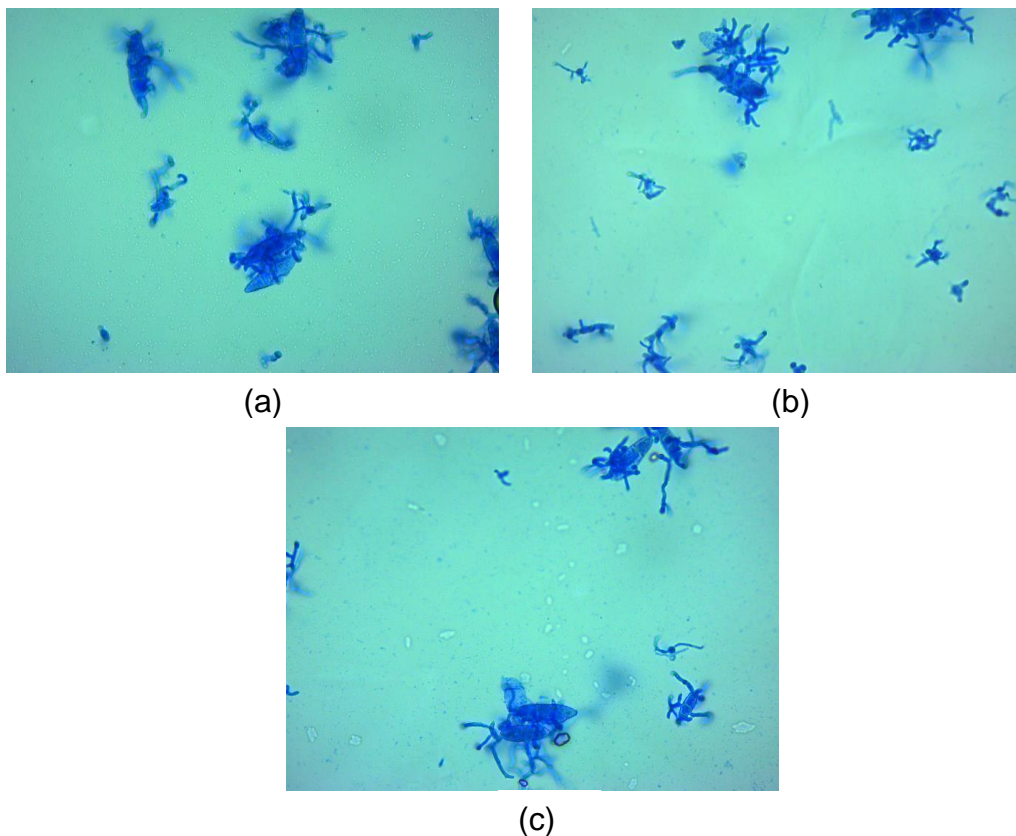
Analisando os resultados da ação da aPDT no *M. gypseum* (ATCC 24102), percebeu-se que não houve diferenças significativas entre os grupos C, MB, R100 e T10. O grupo T20 e T30 não apresentaram diferenças significativas entre si; o grupo T40 apresentou resultado semelhante ao T30 e T50; o grupo T40 apresentou resultado semelhante ao T30 e T50; o grupo T50 apresentou resultado semelhante ao T40 e T60; o grupo T 60 apresentou resultado semelhante ao T50 e T70; o grupo T 80 apresentou resultado semelhante ao T70 e T90, considerando $p < 0,05$.

Figura 13 - Relativo à germinação do fungo *M. gypseum* (ATCC 24102) após o tratamento fotodinâmico.



Fonte: Autoria própria.

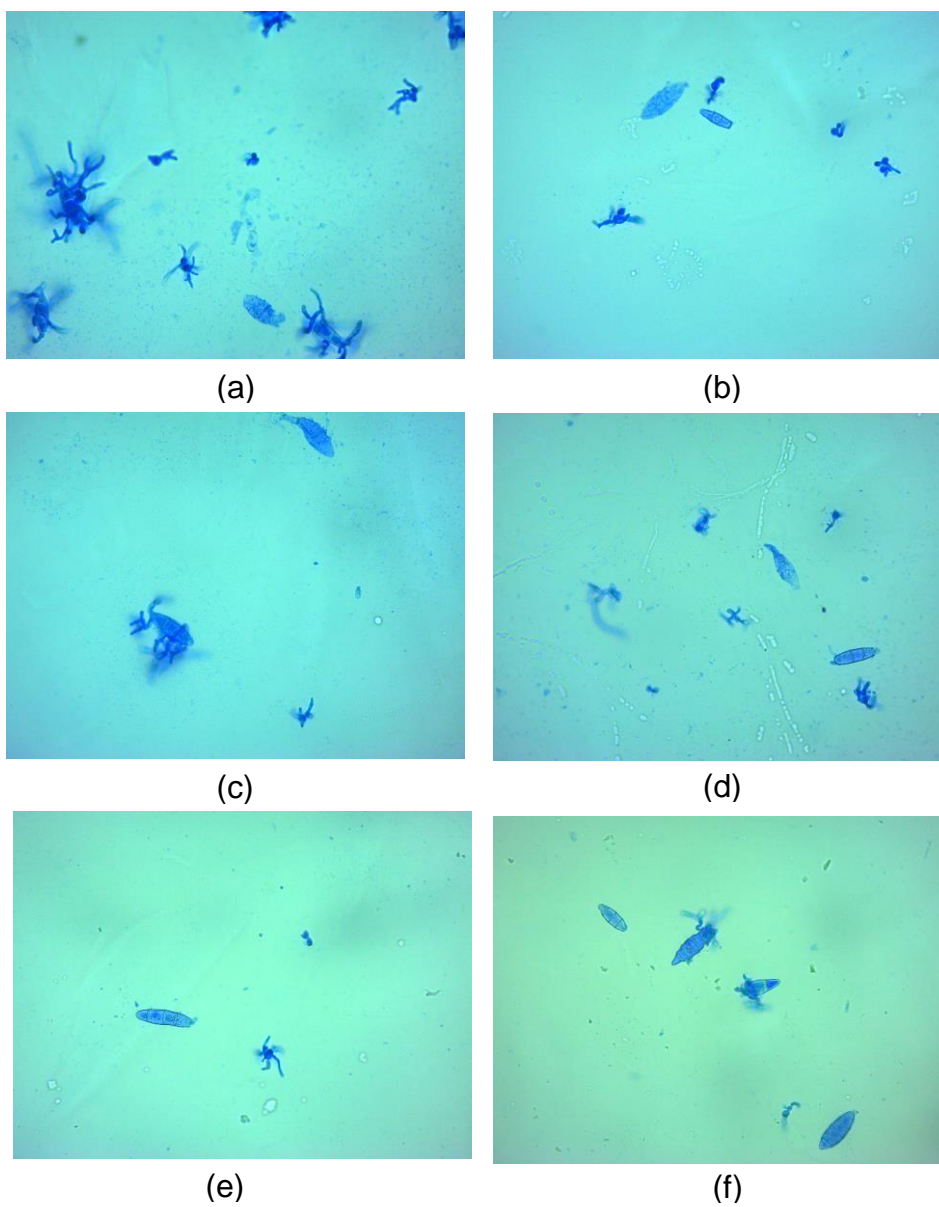
Figura 14 - Germinação de conídios de *M. gypseum* do grupo C (a), grupo MB (b) e grupo R100 (c)



Fonte: Autoria própria.

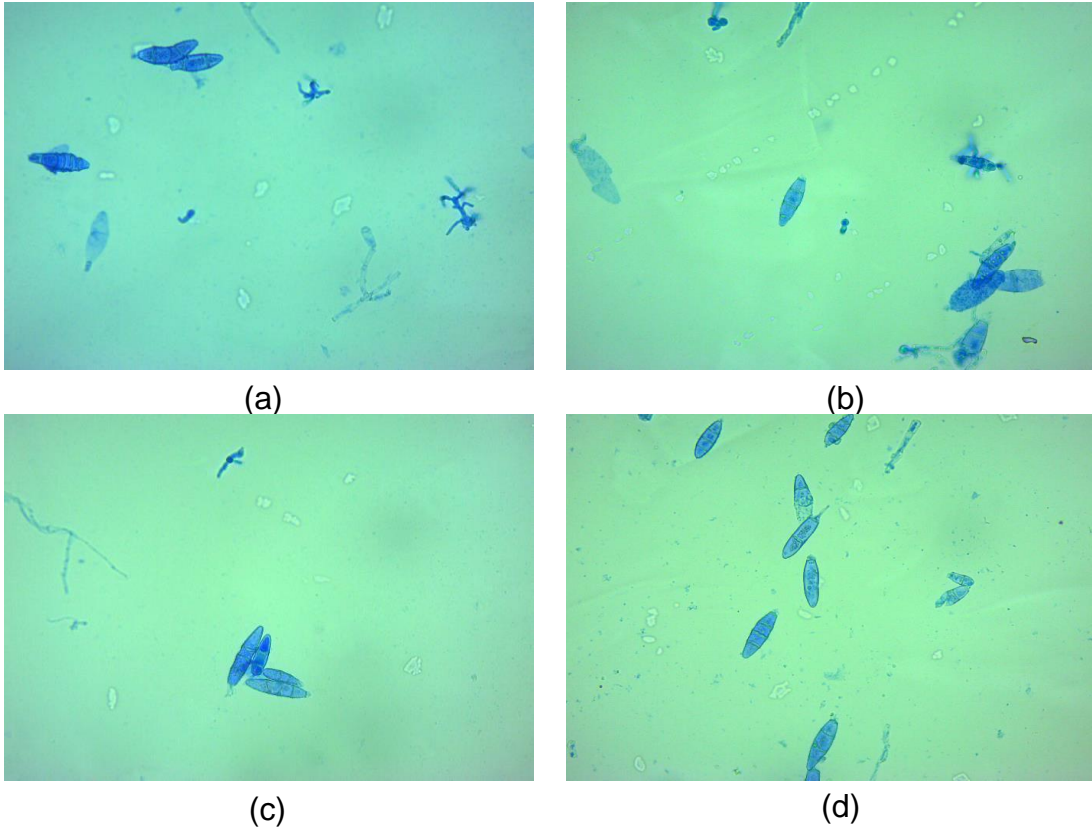
Em relação aos grupos submetidos a aPDT, percebeu-se uma redução na germinação dos conídios, conforme a densidade de energia empregada. Observa-se que a aPDT foi mais eficaz em densidades de energia mais altas (Figura 14 e 15).

Figura 15 - Germinação de conídios de *M. gypseum* do grupo T10 (a), T 20 (b), T30 (c), T40 (d), T50 (e) e T60 (f).



Fonte: Autoria própria.

Figura 16 - Germinação de conídios de *M. gypseum* do grupo T70 (a), T80 (b), T90 (c) e T100 (d)



Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

O crescimento micelial dos fungos *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum* foram analisados após um período de incubação de sete e quatorze dias, sob a temperatura de 28°C, nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA e PDA.

Em relação ao *T. rubrum*, todos os meios de cultura utilizados favoreceram o crescimento da colônia, embora essas diferenças não tenham sido significativas. Com 14 dias de crescimento, percebeu-se que todos os meios de cultura utilizados favoreceram o crescimento da colônia; o meio PDA apresentou crescimento semelhante ao CZAPEK e ao EMERSON. Apesar de uma menor quantidade, o SDA também favoreceu o crescimento micelial do *T. rubrum*; já com quatorze dias de crescimento não houve diferenças significativas entre os meios de cultura ($p < 0,05$) (Figura 2).

Observou-se que o isolado *T. menta*, no sétimo e décimo quarto dia, teve um crescimento micelial semelhante nos meios de cultura EMERSON e SDA, apresentando um crescimento maior no meio SDA. O fungo apresentou um menor crescimento no meio de cultura CZAPEK (Figura 3).

Analisando o isolado *T. menta*, com sete dias de crescimento, todos os meios de cultura favoreceram o crescimento da colônia. Aos sete dias, o crescimento no meio PDA foi semelhante ao meio EMERSON. Não houve diferenças significativas entre os meios de cultura. Já analisando o crescimento com quatorze dias de crescimento, todos os meios de cultura favoreceram o crescimento da colônia. Aos 14 dias, o crescimento no meio PDA foi semelhante ao meio CZAPEK e EMERSON, $p < 0,05$. Analisando os quatorze dias de crescimento dos fungos, percebeu-se que houve diferenças significativas entre os meios de cultura, considerando $p < 0,05$. O fungo apresentou um menor crescimento no meio de cultura CZAPEK (Figura 3).

Quanto ao crescimento dos fungos *T. rubrum* e *T. menta*, nossos dados confirmam o que foi expresso por Luo et al., (2021), quando estes afirmam que as espécies do gênero *Trichophyton* pode ocorrer em diversos tipos de meio, e o mais utilizado é o Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), crescendo bem à temperatura ambiente (28°C), com crescimento entre sete e quatorze dias de incubação.

Em relação ao *M. gypseum*, foi identificado que no sétimo dia de crescimento, todos os meios de cultura favoreceram o crescimento da colônia, sendo o crescimento no meio PDA semelhante ao meio CZAPEK. O meio EMERSON

semelhante ao CZAPEK e SDA, apresentando diferenças significativas entre os meios cultura, considerando $p < 0,05$. Analisando o crescimento com quatorze dias, percebeu-se que todos os meios de cultura favoreceram o crescimento da colônia, apresentando um crescimento semelhante em todos os meios, não havendo diferenças significativas entre os meios de cultura, considerando $p < 0,05$. (Figura 4).

Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Silva et al., (2015) onde em seus experimentos o fungo *M. gypseum* foi cultivado em meio SDA, a 28° C por sete dias. Diante dos resultados considera-se que o meio de cultura SDA é ideal para o crescimento micelial dos fungos *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum*.

A produção de conídios dos fungos *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum* foram analisados após um período de incubação de quatorze dias, sob temperatura de 28° nos meios de cultura CZAPEK, EMERSON, SDA, PDA.

Em relação a produção de conídios do *T. rubrum*, o meio SDA proporcionou uma maior produção de conídios, se destacando em comparação aos meios EMERSON, PDA e CZAPEK. A produção de conídios no meio de cultura SDA apresentou diferença significativa em relação aos outros meios, considerando ($p < 0,05$) (figura 5).

Resultados semelhantes foram observados por Rodrigues et al., (2012), onde a produção dos conídios foi mais evidente em meio SDA no escuro a 28° C por quatorze dias. Ramos et al., (2016) também identificou a produção de conídios a 28°C por um período de incubação de sete dias.

A produção de conídios do fungo *T. menta* foi maior no meio de cultura EMERSON; seguido de PDA e SDA. O meio CZAPEK não favoreceu a produção de conídios. A produção de conídios no meio de cultura EMERSON apresentou diferença significativa em relação aos outros meios, considerando ($p < 0,05$) (Figura 6).

Resultados semelhantes foram observados por Maness e Zubov (2019), quando identificaram a produção de conídios do *T. menta* em meio SDA, a 30° C por quatorze dias. Ainda sobre a produção de conídios de *T. menta*, Lima et al., (2021) identificaram que eles produziram conídios no meio PDA, em temperatura de 28° por quatorze dias, resultados contrários ao nosso, assim como os resultados de Ramos et al., (2016), onde o meio SDA favoreceu o crescimento do *T. menta*.

Em relação a produção de conídios do fungo *M. gypseum* percebeu-se que no meio SDA ocorreu uma maior produção de conídios; seguido de PDA, EMERSON. O meio CZAPEK não favoreceu a produção de conídios. A produção de conídios no

meio de cultura SDA apresentou diferença significativa em relação aos outros meios, considerando ($p < 0,05$) (Figura 7).

Foi observado durante o processo germinativo do *M. gypseum* que ele produziu microconídios e macronídios, apresentando uma diferença significativa entre eles ($p < 0,05$) (Figura 8).

Em relação a presença de micro e macroconídios, resultados diferentes foram encontrados por Fike et al., (2018) onde uma cultura fúngica de *M. gypseum*, *in vitro*, da amostra da unha, cresceram rapidamente e a cultura de lâminas mostrou numerosos macroconídios elipsoidais de paredes finas com pontas arredondadas.

Quanto aos meios de cultura utilizados neste estudo, observou-se que o meio SDA favoreceu a produção de conídios dos fungos *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum*.

Em relação a aPDT, este estudo demonstrou que o fotossensibilizador azul de metileno na concentração utilizada e o LED vermelho (630 nm), em todas as densidades de energia utilizadas houve interferência no ciclo reprodutivo dos fungos *T. rubrum* e *M. gypseum*, assim como levou à desintegração dos conídios e até a necrose em alguns grupos, mostrando que a aPDT é uma possível alternativa em diversos tratamentos e protocolos para onicomicose.

Com o aparecimento de microrganismos multirresistentes vem se tornando crescente a procura por métodos que exerçam efeitos antimicrobianos sem o risco de resistência antimicrobiana. A aPDT pode ser usada no tratamento de várias doenças, incluindo processos infecciosos que não respondem ao tratamento com antifúngicos convencionais. A redução de microrganismos por irradiação é amplamente conhecida (RAMOS et al., 2016), podendo ser eliminada por irradiação ultravioleta e método clássico de desinfecção, desde que a irradiação nesses níveis de energia leve à destruição de biomoléculas por ruptura de ligações químicas (FARIAS et al., 2011).

Os resultados da aPDT aplicada ao *T. rubrum* (Figura 9) nos mostra que essa terapia é eficaz sobre a germinação do *T. rubrum*, uma vez que ela inibiu a produção dos conídios. Conforme a Figura 9, o grupo MB (apenas FS) e R100 (apenas luz – 100 J/cm²), comportaram-se de forma semelhante ao grupo C, não havendo diferenças significativas entre eles. O uso apenas do FS não teve influência na produção de conídios. No grupo R100, embora tenha levado a uma redução na produção dos conídios, essa diferença não foi significativa em relação ao grupo C, considerando $p < 0,05$.

Os grupos que foram submetidos à aPDT (T10, T20, T30, T40, T50, T60, T80, T90 e T100), se mostraram sensíveis a essa terapia, uma vez que apresentaram redução na produção de conídios. Observou-se que essa redução foi proporcional a densidade de energia utilizada, sendo esse resultado mais perceptível nas dosagens a partir de 20 J/cm² (76,85%). Analisando os resultados, percebeu-se que houve diferenças significativas dos grupos submetidos a aPDT em relação ao grupo C ($p < 0,05$). O grupo T30 teve resultados semelhantes ao T20 e T40; os grupos T40 ao T100 não apresentaram diferenças significativas entre si, considerando $p < 0,05$.

Percebe-se que quando o *T. rubrum* foi submetido a uma densidade de energia ≥ 20 J/cm² alguns conídios se desintegraram, sendo que esse fato tornou-se mais evidente nos grupos que foram submetidos à densidades de energia de 30 J/cm², 40 J/cm², 50 J/cm², 60 J/cm², 70 J/cm², 80 J/cm², 90 J/cm² e 100 J/cm² (Figura 11 (c) e (d); figura 12 (a), (b), (c), (d), (e) e (f)). A densidade de energia a partir de 80 J/cm² levou a necrose celular (Figura 12 (d), (e) e (f)).

Em relação ao fungo *M. gypseum* não houve redução significativa na germinação dos conídios do grupo MB e grupo R100, em relação ao grupo C, considerando $p < 0,05$. Aos grupos submetidos a aPDT, percebeu-se uma redução na germinação dos conídios, conforme a densidade de energia empregada. Percebeu-se que não houve diferenças significativas entre o grupo T10 e os grupos C, MB, R100. O grupo T20 e T30 não apresentaram diferenças significativas entre si; o grupo T40 apresentou resultado semelhante ao T30 e T50; o grupo T40 apresentou resultado semelhante ao T30 e T50; o grupo T50 apresentou resultado semelhante ao T40 e T60; o grupo T 60 apresentou resultado semelhante ao T50 e T70; o grupo T 80 apresentou resultado semelhante ao T70 e T90, considerando $p < 0,05$ (Figura 10).

Em relação ao *T. rubrum*, esses resultados demonstram a susceptibilidade deste fungo a aPDT através da interação dos cromóforos presentes no FS com a luz vermelha, levando a produção de radicais livres nocivos à célula fúngica; estes radicais tóxicos podem reagir com a membrana celular e componentes citosólicos, levando a danos celulares. A aPDT gerou um estresse oxidativo nos fungos levando a foto-oxidação da matéria orgânica. Acredita-se que os mecanismos de ação da aPDT nesses fungos pode ter sido multifatorial, através da transferência de elétrons (com produção de radicais livres) ou por transferência de energia (formando espécies excitadas), desencadeamento a perda do controle homeostático e desequilíbrio iônico levando a mudanças intoleráveis na pressão osmótica e pH,

diminuição rápida da produção de ATP, levando ao inchamento e rompimento da membrana plasmática (Figura 12 (d)). Já em relação aos efeitos da aPDT no *M. gypseum*, a hipótese é que ocorreu a quebra do DNA nuclear e fagocitose dos restos celulares, levando a morte dos fungos (Figura 16 (d)).

Segundo Hamblin e Hasan (2004) e Hamblin (2019), os efeitos da aPDT dependem da absorção de fótons por cromóforos dentro das células. Estes efeitos podem ser influenciados por parâmetros de utilização nesta terapia, tais como comprimento de onda, potência, energia, densidade de energia, modo de irradiação, dentre outras. Sabe-se que a aPDT tem a capacidade de estimular ou inibir, ou seja, modular vários processos biológicos tais como a inflamação, expressão de genes e proteínas, fatores de crescimento e atividades metabólicas celulares.

Resultados semelhantes foram encontrados por Chen et al., (2019), onde ele analisou o efeito da aPDT em *T. rubrum* na forma de hifas e esporos; usou AM em diferentes concentrações e em diferentes densidades de energia. Os seus resultados mostraram que para as hifas, foi necessário o azul de metileno numa concentração de 5 µg/mL com uma densidade de energia de 100 J/cm² ou 10 µg/mL de azul de metileno com uma densidade de energia de 60 J/cm². Já para o *T. rubrum* na forma de esporos, foram necessários o azul de metileno numa concentração de 1,25 µg/mL com uma densidade de energia de 40 J/cm² ou 5 µg/mL de azul de metileno com uma densidade de energia de 20 J/cm², observando assim que não apenas a densidade de energia influencia no processo do crescimento do *T. rubrum*, mas também a concentração do azul de metileno e a forma de apresentação do *T. rubrum*, se hifa ou esporo, sendo nesse caso, os esporos mais sensíveis a esta terapia.

Silva et al., (2015) apresentaram um relato de caso de onicomicose que foi completamente curado pela aPDT com uso de FS fotogema, com tempo de pré irradiação de uma hora e uma fonte de luz baseado em diodos emissores de luz (LEDs) no comprimento de onda vermelho de 630 nm, na dose total de 54 J/cm². O tratamento foi realizado uma vez por semana por um período de seis meses.

Em outro estudo desenvolvido por Silva et al., (2013), foi alcançado a cura da onicomicose com aPDT, com uso do FS derivado da hematoporfirina e um aparelho de LED de 630 nm; assim como foi alcançado a cura de outro paciente com sessões de aPDT com uso de curcuminóides e LED de 470 nm.

Dornnelly et al., (2005) mostraram num estudo, *in vitro*, que a aPDT com uso de ALA em forma de bioadesivo com concentrações de 10,0 mM, aderido à unha,

por 30 minutos e 6 horas, respectivamente, e luz vermelha, causaram reduções na viabilidade de 87% e 42%, respectivamente, em onicomicoses causados por *Candida albicans* e por *T. menta*; já com o ALA 0,1 mM por 30 min e 6 h, respectivamente causou reduções na viabilidade de 6% para *T. menta*.

Figueiredo et al., (2014) conduziu um estudo clínico comparativo para avaliar a eficácia da aPDT em comparação com o fluconazol em pacientes com onicomicose; nesse caso a aPDT com o azul de metileno (2%) e a luz vermelha (LED 630 nm, 18 J/ cm²) em sessões a cada 15 dias por um período de 6 meses, mostrou uma cura clínica de 90% em comparação com aqueles tratados com fluconazol. Paz-Cristobal, et al., (2014), observaram, *in vitro*, que a aPDT usando hipericina e uma lâmpada de LED com 602 +/- 10 nm teve um efeito fungicida em dermatófito *T. rubrum* e *T. menta*.

Resultados semelhantes aos nossos foram observados por Chen et. al., (2019), onde a aPDT teve efeito sobre as viabilidades do biofilme de dermatófitos *in vitro*. Neste caso, AM na concentração de 8, 16 e 32 µg /ml foi usado como FS e LED (635 ± 10 nm, 60 J/cm²) como fonte de luz. A aPDT foi empregada contra seis cepas de *T. rubrum*, dez cepas de *T. menta* e três cepas de *M. gypseum* isoladas de espécimes clínicas. Os resultados indicaram uma inibição fotodinâmica altamente eficiente, exibindo redução de UFC de até 4,6 log, 4,3 log e 4,7 log contra os biofilmes formados por *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum*, respectivamente. Nesse caso de *T. rubrum* e *T. menta*, a inativação fotodinâmica foi dependente da concentração do FS, sendo a concentração de 32 µg /mL de azul de metileno mais eficaz que 8 µg/ml. Curiosamente, em contraste com *T. rubrum* e *T. menta*, a redução de CFU de *M. gypsem* foi mais evidente na concentração de 8, 16 e 32 µg/ml do azul de metileno, com redução de CFU de 4,7 log 10, 4,25 log 10 e 4,26 log 10, respectivamente, evidenciando assim, uma maior suscetibilidade de *M. gypseum* a aPDT. Esses resultados nos mostram que a inativação fotodinâmica está relacionada a concentração do FS e dosimetria empregada.

Ainda no estudo desenvolvido por Chen et al., (2019), foram testados os antifúngicos convencionais como a terbinafina (TRB), itraconazol (ITC), ciclopirox (CLO) e fluconazol (FLU) contra biofilmes, associados ou não ao uso da aPDT. As suscetibilidades dos biofilmes de *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum* a esses antifúngicos foram variáveis, mas a TRB foi consistentemente mais eficiente contra o crescimento fúngico em comparação com ITC, CLO e FLE nas três espécies testadas. Os biofilmes que foram submetidos a aPDT exibiram reduções

significativas quando comparados com grupos não tratados, indicando que o tratamento de aPDT efetivamente aumentou as suscetibilidades de *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum* a esses medicamentos antimicrobianos convencionais. Além disso, aPDT exerceu efeitos comparáveis no aumento da suscetibilidade de *T. rubrum* e *T. menta* a TRB, ITC, CLO e FLU; em contrapartida, a suscetibilidade de *M. gypseum* ao TRB após a aPDT foi menos afetado.

Além da luz vermelha, o uso da luz azul na aPDT também tem sido objeto de pesquisas. Ramos et. al., (2016) verificaram em seus resultados que após as amostras de *T. rubrum* serem submetidas a 12 ciclos de 10 minutos (os ciclos foram intercalados com um período de 5 minutos) de irradiação com LED de 470 ± 20 nm e potência de 21 mW foi observado uma redução dos fungos. A ação fotodinâmica apresentou-se como efetiva já no primeiro ciclo de irradiação, verificado ainda uma redução com eliminação total das UFCs a partir do segundo ciclo de irradiação. Nos grupos que foram submetidos a aPDT usando FSs derivados da Protoporfirina IX, ocorreu uma redução superior a 96% de UFC para todos os FSs testados.

Baltazar et al., (2013) mostraram recentemente que a curcumina, em condições ótimas de $10 \mu\text{g/mL}$, com 10 J/cm^2 de luz azul (417 ± 5 nm), inibiram completamente o *T. rubrum*. A ação da aPDT está relacionada com o tipo de FS, a intensidade da radiação incidente e quando aplicado em condições adequadas, pode proporcionar fotooxidação de hifas e conídios e eliminação total desses patógenos.

As limitações do presente estudo é identificar os mecanismos moleculares pelos quais os fungos foram mortos. Sabendo que a formação de biofilme é responsável por mais de 60% de todas as infecções fúngicas e bacterianas em humanos (CIEPLIK et. al., 2018), outra limitação do nosso estudo é identificar, se o efeito da aPDT, nas mesmas concentrações do AM e densidades de energia, teria a mesma eficácia em biofilmes de *T. rubrum* e *M. gypseum*, considerando que em comparação com as células de flutuação livre da mesma espécie, os patógenos do biofilme podem tolerar níveis até 1000 vezes maiores de agentes antimicrobianos (DONLAN; COSTERTON, 2002), sendo portanto mais resistentes a uma variedade de agressões ambientais, como dessecação, irradiação UV, antibióticos e sistema imunológico do hospedeiro (CERI et. al., 2001; RAMAGE et al., 2012; COSTA - ORLANDI et al., 2014).

Outras pesquisas com microrganismos causadores de onicomicoses devem ser realizadas para verificar a eficácia da aPDT. Sugere-se então novos estudos, *in*

vivo, para viabilizar a terapia fotodinâmica e para que a mesma possa ser utilizada nos pacientes com onicomicoses.

7 CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os parâmetros experimentais e da aPDT usados neste estudo, pode-se concluir que:

- O meio de cultura SDA foi ideal para o crescimento micelial dos fungos *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum*;
- O meio de cultura SDA foi ideal para a produção de conídios dos fungos *T. rubrum*, *T. menta* e *M. gypseum*;
- A aPDT possui efeito fotossensibilizante *in vitro* frente as culturas de *T. rubrum* e *M. gypseum*;
- O *T. rubrum* mostrou-se mais sensível a aPDT a uma densidade de energia a partir de 40 J/cm²;
- O *M. gypseum* mostrou-se mais tolerante a aPDT em relação ao *T. rubrum*, onde o melhor efeito da aPDT se deu com a densidade de energia de 100J/cm².

REFERÊNCIAS

- AURELIJA E.; AUKSTIKALNYTE, E. Q.; CIBIEN, E.; PAMELA DE DEMO, P. D.; EISENDLE, K. Pharmacology and therapeutics Combination of a triple wavelength (650 nm, 810 nm, and 915 nm) class IV laser system and local mechanical abrasion in the treatment of chronic toenail onychomycosis: an uncontrolled prospective pilot study. **International Journal of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 367 – 371, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34449880>, Acesso em: 05 jul. 2022.
- BALTAZAR, L. de M. et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: in vitro activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 354–361, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/68/2/354/676413>. Acesso em: 06 mar. 2019.
- BARAN, R.; DAWBER, D. **Doenças de unhas: tratamento clínico e cirúrgico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- BARROS, B.H.R., DA SILVA, S.H., MARQUES E.R., ROSA, J.C., YATSUDA, A.P., ROBERTS, D.W., BRAGA, G.U.L., A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*, **Fungal Biol.** 114, 572–579, 2010.
- BHATTA, A.K.; HUANG, X., KEYAL, U.; ZHAO, J. J. Laser treatment for onychomycosis: a review. **Mycoses**, v. 57, p. 734-740, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Anil-Bhatta/publication/264547023_Laser_treatment_for_onychomycosis_A_review/links/5d281f06299bf1547cadd9a3/Laser-treatment-for-onychomycosis-A-review.pdf. Acesso em: 20 set. 2021.
- BRAGA, G.U.L., DESTÉFANO, R.H.R., MESSIAS, C.L. Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources, **J. Invertebr. Pathol**, v. 74, p. 112–119, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10486222>. Acesso em: 20 set. 2021.
- BUCK, S. T. G. **Relação entre a eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências (Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-25082009-103801/publico/SuelenTGBuck.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- BURKHART, C. N., BURKHART, C. G., AND GUPTA, A. K. Dermatophytoma: recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 47, p. 629–631, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12271316>. Acesso em: 05 jan. 2019.
- CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **J. Photochem. Photobiol. Biol**, v. 78, p. 1–6, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15629243>. Acesso em: 26 jan. 2019.

- CERI, H.; OLSON, M.; MORCK, D.; STOREY, D.; READ, R.; BURET, A. et al. The MBEC assay system: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. **Methods Enzymology**, v. 337, p. 377–385, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S007668790137026X?via%3Di> hub. Acesso em: 25 set. 2021.
- CHAN, W. M. et al. Photodynamic therapy with verteporfin for subfoveal idiopathic choroidal neovascularization – One-year results from a prospective case series. **Ophthalmology**, v. 110, p. 2395-2402, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14644724>. Acesso em: 26 jan. 2020.
- CHANDRA, J.; PATEL, J. D.; LI, J.; ZHOU, G.; MUKHERJEE, P. K.; MCCORMICK, T. S.; ANDERSON, J. M.; GHANNOUM, M. A. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 8795–8801, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16332875>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- CHEN, B., SUN, Y.; ZHANG, J.; CHEN, R.; ZHONG, X.; WU, X. Dermatophytes Involved in Onychomycosis. In vitro Evaluation of Photodynamic Effects Against Biofilms of Dermatophytes Involved in Onychomycosis. **Frontiers**, v. 10, p. 1-9, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01228/full>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy e what we know and what we don't. **Crit. Rev. Microbiol**, v. 44, p. 571-589, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29749263>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- CORMICK, M. P.; ALVAREZ, M. G.; ROVERA, M.; DURANTINI, E. N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetracationic porphyrin derivatives. **Eur. J. Med. Chem**, v. 44, n. 4, p.1592–1599, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18762356>. Acesso em: 26 mar. 2019.
- COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C.; SANTOS, C. T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. AND MENDES GIANNINI, M. J. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, p. 719–727, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856309>. Acesso em: 25 jan. 2020.
- CRAIG, R. A.; MCCOY, C. P.; GORMAN, S. P; JONES, D. S. Photosensitisers – the progression from photodynamic therapy to anti-infective surfaces. **Expert. Opin. Drug. Deli**, v. 12, p. 85–101, 2014. Disponível em: Acesso em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25247277>. Acesso em: 20 set. 2020.
- CRUZ, L. C. H.; **Micologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010.
- DAI T, HUANG Y-Y, HAMBLIN MR. Photodynamic therapy for localized infections— State of the art. **Photodiagn Photodyn Ther** 2009; 6: 170–188. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19932449>. Acesso em: 10 fev. 2019.

- DONNELLYA, R. F.; MCCARRONA, P. A.; LIGHTOWLERB, J. M.; WOOLFSON, D. Bioadhesive patch-based delivery of 5 – aminolevulínic acid to the nail for photodynamic therapy of onychomycosis. **J. Control. Release**, v. 103, p. 381-392, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15763621/>. Acesso em: 6 jun 2022.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms Of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932229>. Acesso em: 15 fev. 2020.
- DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895-903, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21517888>. Acesso em: 04 jan. 2020.
- FAERGWANN, J. B. et al. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 149, p. 1-4, 2003. Disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2133.149.s65.4.x>. Acesso em: 16 jan. 2019.
- FARIAS, M. R.; CONDAS, L. A. Z.; RAMALHO, F.; BIER, D.; MURO, M. D.; PIMPÃO, C.T. Avaliação do estado de carreador assintomático de fungos dermatofíticos em felinos (*Felis catus*- Linnaeus, 1793) destinados à doação em centros de controle de zoonoses e sociedades protetoras de animais. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 18, p. 306-12, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/232612317>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- FIGUEIREDO, S. L. W.; SOUZA, S. V. T.; BOTELHO, A. C. Randomized controlled trial comparing photodynamic therapy based on methylene blue dye and fluconazole for toenail onychomycosis. **Dermatol. Ther**, v. 27, p. 43-47, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24502311/>. Acesso em 31 jun 2022.
- FIKE, J. F.; KOLLIPARA, R.; ALKUL, S.; STETSON, C. L.; Case Report of Onychomycosis and Tinea Corporis Due to *Microsporum gypseum*. **Cutan Med Surg**, v. 22, n. 1, p. 94-96, 2018.
- FRÍAS-DE-LEÓN, M. G.; ERICK MARTÍNEZ-HERRERA, E. M.; ATOCHE-DIÉGUEZ, C. H.; GONZÁLEZ- CESPÓN, J. L.; URIBE, B.; ARENAS, R.; RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. Molecular identification of isolates of the Trichophyton mentagrophytes complex. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 45-52, 2020. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.7150/ijms.35173>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- GUPTA, A.K.; COOPER, E.A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis, **Mycopathologia**, v. 166, p. 353–367, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11046-008-9109-0>. Acesso em: 10 ago. 2020.
- GUPTA, A. K.; VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H. Onychomycosis in the 21st century: an update on diagnosis, epidemiology, and treatment. **J. Cutan. Med. Surg**,

v. 21, p. 525–539, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28639462>. Acesso em: 10 jan. 2019.

GUPTA, A. K.; G. VERSTEEG, S. G.; SHEAR, N. H.; PIGUET, V.; TOSTI, A.; PIRACCINI, B. M. A Practical Guide to Curing Onychomycosis: How to Maximize Cure at the Patient, Organism, Treatment, and Environmental. **Am J Clin Dermatol**, v. 20, n. 1, p. 123 – 133, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30456537>. Acesso em: 20 fev. 2020.

HAMBLIN, M. R. How to write a good photobiomodulation article. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 37, n. 6, p. 325-326, 2019. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/photob.2019.4648>. Acesso em 15 jan. 2021.

HAMBLIN, M. R.; HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci**, v. 3, p. 436-50, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15122361>. Acesso em: 15 jan. 2019.

HARRIS, F.; PIERPOINT, L. Photodynamic therapy based on 5- aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial agent. **Med. Res. Rev.**, v. 32, p. 1292–1327, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21793017>. Acesso em: 15 jan. 2020.

HEAD, C. S.; LUU, J.; SERCARZ, S.; SAXTON, J. Photodynamic therapy and tumor imaging of hypericin-treated esquamous cell carcinoma, *World J. Surh. Oncol*, v. 4, p. 87-97, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1762016/>. Acesso em: 7 ago 2022.

HEES, H.; RAULIN, C.; BÄUMLER, W. Laser treatment of onychomycosis: an in vitro pilot study. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 10, n. 12, p. 913 – 8, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22897199>. Acesso em: 10 jan 2022.

HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p. 5-31, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27783317/>. Acesso em 14 jan. 2022.

INADA, N. M. et al. Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, p. 60-68, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22369730>. Acesso em 09 fev. 2019.

ITRI, R.; FERMANDES, U, A.; BAPTISTA, M, S. Principios e mecanismos da terapia fotodinâmica. In: NUNEZ. S. C.; RIBEIRO, M. S.; GRACEZ, A. S. (org.) **Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019, p. 1.

KAUR, R. K.; BHALLA, P. Onychomycosis – epidemiology, diagnosis and managment. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 26, n. 2, p. 108 – 116, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18445944>. Acesso em: 15 jan. 2019.

KOZAREV, J.; VIŽINTIN, Z. Novel Laser Therapy in Treatment of Onychomycosis. **Journal of the Laser and Health Academy**, v. 1, 2010. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/267679421_Novel_Laser_Therapy_in_Treatment_of_Onychomycosis. Acesso: 25 jan. 2020.

LACAZ, C.S; PORTO, E; MARTINS, J.E.C; HEINS-VACCARI, E.M; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, LACAZ. In:_____.Micoses Superficiais. 9 ed. São Paulo: Savier, 2002, p. 270 – 285.

LENNON, S.V.; MARTIN, S.J. and COTTER, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Prolif**, v. 24, p. 203–214, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2009322/>. Acesso em: 05 jan. 2019.

LIMA, P. G.; SOUZA, P. F. N.; FREITAS, C. D. T.; BEZERRA, L. P.; NETO, N. A. S.; SILVA, A. s F. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; SOUSA, O. D. Synthetic peptides against *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*: Mechanisms of action and efficiency compared to griseofulvin and itraconazole. **Life Sciences**, v. 265, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320520315563>. Acesso em: 5 jul 2022.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R.; PEDERSEN, J. P. C. R. Identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer. **J Med Microbiol**, v. 46, p. 1043-46, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9402927>. Acesso em: 8 jan. 2019.

LUO, N.; JIN, L.; YANG, C.; ZHU, Y.; YE, X.; LI., X.; ZHANG, B. Antifungal activity and potential mechanism of magnoflorine against *trichophyton rubrum*, **J. antibiot**, v. 74, p. 206-214, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33082529/>. Acesso em: 20 jul 2022.

MANESS, L. R.; ZUBOV, T. The Inhibitory Effect of Essential Oils on *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Microsporum gypseum*. **Lab Med**, v. 50, n. 2, p. e18 – e22, 2019.

MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, V.E. Epidemiology of Dermatophytoses in Crete, Greece. **Med. Mycol. J**, v. 57, p. E69–E75, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27904054>. Acesso em: 05 mar. 2019.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.A., ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes, **Mycopathologia**, v. 166, p. 369–383, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18478356/>. Acesso em 04 fev. 2022.

MELLO, R. et al. Reactions at Interfaces: Oxygenation of n-Butyl Ligands Anchored on Silica Surfaces with Methyl (trifluoromethyl) dioxane. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 10129 – 10139, 2011. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo2019703>. Acesso em: 10 jan. 2020.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. 1.ed. São Paulo: Ed. Manole LTDA., 1995. p. 28.14.

MIYAJIMA, Y.; SATOH, K.; UCHIDA, T.; YAMADA, T.; ABE, M.; WATANABE, S.-I.; MAKIMURA, M.; MAKIMURA, K. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton*

rubrum and Trichophyton mentagrophytes in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. **J. Dermatol. Sci**, v. 69, p. 229–235, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23287391>. Acesso em: 05 jan. 2019.

MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G.B.; HAMBLIN, M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, p. 2516–2539, 2011. doi: 10.3390/cancers3022516. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.3390/cancers3022516>. Acesso em: 05 jan. 2019.

NANXUAN LUO, N.; JIN, L.; YANG, C.; ZHU, Y.; YE, X.; LI, X.; ZHANG, B. Antifungal activity and potential mechanism of magnoflorine against Trichophyton rubrum. **The Journal of Antibiotics**, v. 74, p. 206–214, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41429-020-00380-4>. Acesso em: 25 fev. 2022.

NENOFF, P.; HERRMANN, J.; GRÄSER, Y. Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale? **A dermatophyte in the course of time. JDDG**, v. 5, p. 198-202, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17338794>. Acesso em: 05 jan. 2019.

NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. (org) PDT – **Terapia Fotodinâmica antimicrobiana da odontologia**. Elsevier, RJ, 2019.

NUNLEY, K. S; CORNELIUS, L. Current management of onychomycosis, **J. Hand Surg**, v. 33A, p. 1211–1214; 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18762123/>. Acesso em 06 ago. 2019.

NUSBAUM, A. G.; KIRSNER, R. S.; AND CHARLES, C. A. **Biofilms in dermatology. Skin Ther. Lett**, v. 17, p. 1–5, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22825648>. Acesso em: 16 jan. 2019.

NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B Biol**, v. 73, p. 1–28, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14732247>. Acesso em: 20 jan. 2021.

PACKEU, A.; STUBBE, D.; ROESEMS, S.; GOENS, K.; PASCALE VAN ROOIJ, P. V.; HOOG, S.; HENDRICKX, M. Lineages Within the Trichophyton rubrum Complex. **Mycopathologia**, v. 185, n. 1, p. 123-136, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31605251>. Acesso em: 15 jan. 2021.

PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. **J. Photochem. Photobiol. B Biol**, v. 14, p. 3–22, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1432383/> Acesso em: 08 jan. 2021.

PAZ-CRISTOBAL, M. P.; GILABERTE, Y.; ALEJANDRE, C.; PARDO, J.; REVILLO, M. J.; REZUSTA, A. In vitro Fungicidal Photodynamic effect of hypericin on Trichophyton spp. **Mycopathologia**, v. 178, p. 221-225, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25129421/>. Acesso em 6 jul 2022.

PERCIVAL, S. L.; EMANUEL, C.; CUTTING, K. F.; WILLIAMS, D. W. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **Int Wound J**, v. 9, n. 1, p. 14–32, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21973162>. Acesso em: 25 set. 2020.

PERES, N. T.; MARANHÃO, F. C.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatophytes: hostpathogen interaction and antifungal resistance. **An Bras Dermatol**, v. 85, p. 657-67, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/XVx7bC8GtQ7LcQGc6w3Dw7k/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 06 mar. 2021.

PIRACCINI, B. M.; ALESSANDRINI, A. Onychomycosis: a review. **Journal of Fungi**, v.1, n. 1, 30-43, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5770011>. Acesso em: 04 set. 2019.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med. Sci**, v. 24, p. 259–268, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18247081>. Acesso em: 10 jan. 2019.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Crit Rev Microbiol**, v. 35, n. 4, p. 340–355, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19863383>. Acesso em: 06 mar. 2021.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L. AND WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int. J. Microbiol**. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22518145>. Acesso em: 20 jan. 2020.

RAMOS, R. R.; FERNANDES, A. U. F.; ANDREAM, D. I. K.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic action of protoporphyrin IX derivatives on *Trichophyton rubrum**. **An Bras Dermatol**, v. 91, p. 135-140, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/wZfLXRkMHFMJvHR4xpQ7XPy/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 20 jan. 2019.

REZENDE, C.; BORSARI, G.P.; DA SILVA, A. C.; CAVALCANTI, F. R. Dermatophytosis epidemiologic study in public institution of Barretos city, São Paulo, Brazil. **Rev Bras Na Clin**, v. 40, p. 6 - 13, 2008. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-510669>. Acesso em: 05 mar. 2019.

RODRIGUES, G. B.; FERREIRA, L. K. S.; WAINWRIGHT, M.; BRAGA, G. U. L.. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. **Journal of photochemistry and photobiology biology**, v. 116, p. 89-94, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22982210>. Acesso em: 20 jan. 2019.

RUBIO, M. A.; REZUSTA, A.; TOMÁS, J. G.; RUESCA, R. B. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. **Rev Ibero am Micol**, v.16, p. 16-22, 1999. Disponível em: <https://www.yumpu.com/es/document/view/15843887/perspectiva-micologica-de-los-dermatofitos-en-el-ser-humano>. Acesso em: 05 jan. 2019.

SEKKAT, N.; VAN DEN BERGH, H.; NYOKONG, T.; LANGE, N. Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 98–144, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22198535>. Acesso em: 15 jan. 2019.

SHARMA, M.; MANOHARLAL, R.; PURI, N.; PRASAD, R. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. **Biosci. Rep.**, v. 30, n. 6, p. 391–404. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20017731>. Acesso em: 15 jan. 2020.

SIGURGEIRSSON, B. Prognostic factors for cure following treatment of onychomycosis. **J. Eur. Acad. Dermatol and Venereol**, v. 24, 679–684, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19929941>. Acesso em: 20. Jan. 2020.

SILVA, A. P.; CHIANDRONE, D. J.; TINTA, R. J. W.; KURACHI, C.; INADA, N. M. I.; BAGNATO, V. S. Development and comparison of two devices for treatment of onychomycosis by photodynamic therapy. **J. Biomed. Opt**, v. 20, 2015. Disponível em: Acesso em 10 fev 2022.

SILVA, A. P.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S.; INADA, N. M. I. Fast elimination of onychomycosis by hematoporphyrin derivate – photodynamic therapy, photodiagn. **Photodyn**, v. 10, p. 328-330, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23993860/>. Acesso em: 9 jun 2022.

SILVA, K. V.S; LIMA, M. I. O.; CARDOSO, G. N. C.; SANTOS, A. S.; SILVA, G. S.; PEREIRA, F. O. P. Inibitory effects of linalool on fungal pathogenicity of clinical isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, v. 60, p. 387-393, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Fillipe-Pereira-2/publication/313788666_Inibitory_effects_of_linalool_on_fungal_pathogenicity_of_clinical_isolates_of_Microsporum_canis_and_Microsporum_gypseum/links/5f577d2c458515e96d395a72/Inibitory-effects-of-linalool-on-fungal-pathogenicity-of-clinical-isolates-of-Microsporum-canis-and-Microsporum-gypseum.pdf. Acesso em 25 jul 2022.

SOARES, L. A.; SARDI, J. C. O.; GULLO, F.P.; PITANGUI, N. S.; SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antidermatophytic therapy: Prospects for the discovery of new drugs from natural products. **Braz J Microbiol**, v. 4, n. 4, p. 1035–1041, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/W9vM7XGqTLrrb3ZVbWcybgQ/?lang=en>. Acesso em: 20 jan. 2021.

STHAL, F.; BOURQUIN, R. Characterizing mechanical resonators by means of a scanning acoustic force microscope. **Applied Letters**, v. 77, n. 12, p. 1792-1794, 2000. Disponível em: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1311317>. Acesso em: 15 jan. 2020.

SUMMERBELL, R.C.; KANE, J. The genera *Trichophyton* and *Epidermophyton*. In: Kane J, Summerbell RC, Sigler L, Krajden S, Land G. Laboratory handbook of dermatophytes. **Star Publishing Company**, Belmont, USA, p. 131-191, 1997.

VERMOUT S.; TABART J.; BALDO A.; MATHY A.; LOSSON B.; MIGNON B. Pathogenesis. **Mycopathologia**, v. 166, p. 267-275, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18478361>. Acesso em: 20 mar. 2020.

VLASSOVA, N.; HAN, A.; ZENILMAN, J. M.; JAMES, G.; LAZARUS, G. S. New horizons for cutaneous microbiology: the role of biofilms in dermatological disease. **Br J Dermatol**, v. 165, p. 751–759, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21668434>. Acesso em: 10 jan. 2019.

WAINWRIGHT, M., MAISCH, T., NONELL, S., PLAETZER, K., ALMEIDA, A., TEGOS, G.P., HAMBLIN, M.R., 2017. Photoantimicrobials-are we afraid of the light? **Lancet Infect. Dis**, v. 17, p. e49-e55, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27884621>. Acesso em: 20 jan. 2019.

WARSHAW, E. M.; FETT, D. D.; BLOOMFIELD, H. E.; GRILL, J. P.; NELSON, D. B.; QUINTERO, V. et al. Pulse versus continuous terbinafine for onychomycosis: a randomized, double-blind, controlled trial. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 53, p. 578–584, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16198776>. Acesso em: 09 jan. 2019.

WINN JUNIOR.; W. K. et al. (ed). **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, 2006.

ZAIAS, N. Onychomycosis. *Archives and Dermatology*, v. 105, n. 2, p. 236 – 274, 1972. Disponível em: Acesso em: https://www.researchgate.net/publication/8499416_Onychomycosis_classification_and_diagnosis. Acesso em: 15 mar. 2020.

ZHAO, H.; EIDE, D.J. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p. 5044–5052, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9271382>. Acesso em: 05 fev. 2019.

ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**, v. 35, n. 7, p. 3127-3136, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2673560>. Acesso em: 15 jan. 2020.