

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

DENISE VIVIANNI FERREIRA DEL CASTILO

**USO DA OZONIOTERAPIA EM FUNGOS CAUSADORES DE
ONICOMICOSSES: ESTUDO *IN VITRO***

**USE OF OZONIOTHERAPY IN FUNGI CAUSING ONYCHOMYCOSIS:
IN VITRO STUDY**

São Paulo – SP

2024

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

DENISE VIVIANNI FERREIRA DEL CASTILO

**USO DA OZONIOTERAPIA EM FUNGOS CAUSADORES DE
ONICOMICOSSES: ESTUDO *IN VITRO***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como requisito necessário para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof(a). Dr(a). Lívia Assis
Orientador (a)

Prof(a). Dr(a). Carla Roberta Tim
Coorientador (a)

São Paulo – SP
2024

Ficha catalográfica

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

D383u DEL CASTILO, Denise Vivianni Ferreira.

Uso da Ozonioterapia em fungos causadores de Onicomicoses: estudo *in vitro* / Denise Vivianni Ferreira Del Castelo. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2024.

45 f. il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Lívía Assis Garcia.

Coorientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim.

1. Onicomicose. 2. Fungos. 3. Dermatofitos. 4. Ozônio. 5. Ozonioterapia.
I. Garcia, Lívía Assis. II. Tim, Carla Roberta. III. Título.

CDD 615.83


TERMO DE APROVAÇÃO

DENISE VIVIANNI FERREIRA DEL CASTILO

“USO DA OZONIOTERAPIA EM FUNGOS CAUSADORES DE
ONICOMICOSSES: ESTUDO IN VITRO”


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

Documento assinado digitalmente

 LÍVIA ASSIS GARCIA
Data: 16/04/2024 16:10:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof(a). Dr(a). Lívia Assis Gracia (Presidente-Orientadora)

Documento assinado digitalmente

 ADRIANA PAVINATTO DA COSTA
Data: 11/04/2024 14:14:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof(a). Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente

 CARLA ROBERTA TIM
Data: 11/04/2024 13:25:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof(a). Dr.(a) Carla Roberta Tim (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente

 DRAUZIO EDUARDO NARETTO RANGEL
Data: 16/04/2024 15:59:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel (Membro Externo)

Documento assinado digitalmente

 ELIANE MENDES RODRIGUES
Data: 11/04/2024 13:01:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.(a) Eliane Mendes Rodrigues (Membro Externo)

São Paulo, 28 de março de 2024.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Lívia Assis Gracia

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

Rua Carolina Fonseca, 584 - Itaquera - São Paulo - CEP: 08230-030

What's app (11) 4858-6272



TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWWdo 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 PortariaCAPES 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: **"USO DA OZONIOTERAPIA EM FUNGOS CAUSADORES DE ONICOMICOSSES: ESTUDO IN VITRO"**

Autor(es):

Discente: **Denise Vivianni Ferreira Del Castillo**

Assinatura: Denise Vivianni Ferreira Del Castillo

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Lívia Assis Gracia**

Assinatura: Livia Assis Gracia

Coorientador(a):

Assinatura: _____

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

Homenagem *in memoriam*

Dedico este trabalho à memória eterna da minha estimada mãe, MARIA DULCIMAR FERREIRA DEL CASTILO. Mulher de grande cultura, nobre, dedicada aos estudos, era calma, centrada e inteligentíssima. Foi minha grande fonte de inspiração e apoio inabalável ao longo de toda minha vida acadêmica. Sua paixão pelo conhecimento e sua busca incessante pela sabedoria moldaram não apenas minha trajetória acadêmica, mas também minha visão de mundo e meu caráter. Seu legado de intelectualidade e curiosidade permanece vivo em cada página deste trabalho, pois tudo que alcancei é um reflexo da sua influência constante em minha vida. Mesmo ausente fisicamente, sua presença espiritual continua a me guiar e motivar. Neste momento, meu coração fica dilacerado por não a ter aqui para me abraçar e me colocar em seu colo acolhedor. Tenho certeza de que minha mãe estaria festejando e com muito orgulho do que conquistei. Que sua memória seja uma fonte de inspiração para todos que tiveram o privilégio de conhecê-la. Obrigada, minha querida mãe, por todo seu amor, sabedoria e exemplo inspirador que você deixou enquanto esteve neste plano.

DEDICATÓRIA

Este título ofereço a minha amada família (Francisco de Assis Amaral Bastos, Deisiane Del Castilo Bastos e Daniel Del Castilo Bastos) cujo apoio incondicional foi o alicerce que sustentou minha trajetória. Agradeço profundamente pelo amor e compreensão que sempre demonstraram em cada etapa do processo de estudo, o apoio constante foi uma fonte de força e motivação a prosseguir, ajudando-me a superar os desafios e a alcançar meu objetivo, pois cada conquista neste trabalho é também uma celebração do apoio e dos sacrifícios que vocês fizeram por mim, desculpa pela ausência e por vezes envolver em situações de tensão. Que esta dedicatória sirva como expressão do profundo apreço que sinto por cada um. Obrigada por serem meu refúgio e alicerce durante esta jornada. Este trabalho é dedicado a vocês com amor e carinho eterno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço por este trabalho de Doutorado primeiramente a Deus, que me fortaleceu e me sustentou durante todo árduo processo de aprendizagem, minha eterna gratidão pelo privilégio de tê-Lo em todos os momentos da minha vida, vivendo debaixo de Sua graça todos os dias, porque eu creio piamente que se não fosse por intermédio Dele não teria chegado até aqui.

Gratidão por encerrar esse ciclo sem abrir mão dos meus princípios e carregando comigo o Evangelho de Cristo.

Em segundo, expresso minha sincera gratidão aos generosos apoiadores que tornaram possível a sua realização, como o Centro de Doenças Tropicais - CRDT, pelo suporte que viabilizou minha pesquisa. Também gostaria de agradecer à Enfermeira Magali Cristina Pereira da Silva e Antônio Sérgio Costa de Andrade por acreditar no projeto, apoiá-lo e defendê-lo quando muitos não o fizeram, aos membros da equipe e aos colegas do laboratório por sua orientação, incentivo e colaboração ao longo deste processo.

Quero agradecer imensamente à minha orientadora, LÍVIA ASSIS GARCIA, pois sua orientação, apoio e sabedoria foram fundamentais para o sucesso desta jornada acadêmica. Agradeço sinceramente por sua dedicação incansável, por compartilhar seu conhecimento e experiência, e por guiar-me com paciência e compreensão ao longo deste processo desafiador e por você existir na minha vida. Sua influência vai além das páginas deste trabalho, sou grata por aprender com uma mentora tão inspiradora e comprometida.

Gratidão eterna ao Dr. DRAUZIO EDUARDO NARETTO RANGEL, pelo acolhimento em seu laboratório com tanto cuidado, carinho e atenção. Obrigado por fazer parte dessa trajetória e ajudar-me a realizar um sonho de infância, fiquei encantada pela pesquisa e realizada fazendo a ciência acontecer. Você está lacrado na minha caixa de carinho.

Minha querida Dra. ELIANE MENDES RODRIGUES, me faltam palavras á você para agradecer por tudo; o apoio, companheirismo, cansaço, dificuldades, choro e risadas também que só nós sabemos os motivos. Tudo o que vivemos estão registrados em nossas lembranças. Mais uma vez reitero meu muito obrigado!

Por fim, dedico este trabalho aos meus queridos amigos, cujo apoio emocional e encorajamento foram essenciais durante os momentos desafiadores, a meus irmãos Fredson Gilderlan Ferreira Del Castilo, José Del Castio Neto e Fraderlan José Ferreira Del Castilo. Este trabalho é uma homenagem a todos os que acreditaram em mim e no meu potencial. Obrigado por fazerem parte desta jornada.

Eu abro o meu coração para minha nova história!

Ademais, agradeço a CAPES pelo auxílio financeiro.

“Em todas estas coisas, porém, somos mais que vencedores, por meio
d’Aquele que nos amou. Romanos 8: 37. ”

RESUMO

A onicomicose é uma infecção fúngica comum das unhas, predominantemente causada por dermatófitos, como o *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) e *Microsporum gypseum* (*M. gypseum*) e é uma condição notoriamente difícil de tratar. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar, *in vitro*, a eficácia de diferentes tempos de ozonioterapia nos principais fungos causadores de onicomicoses. Foram utilizados fungos dermatófitos *T. rubrum* (ATCC 28188) e *M. gypseum* (ATCC 24102) incubados a 28° C por 14 dias. Os fungos foram divididos em 8 grupos experimentais de acordo com o tempo experimental: Grupo Controle (CG): os fungos foram cultivados e não receberam nenhum tratamento; Fungos foram cultivados e receberam ozonioterapia por um tempo de 2 min (G2"); 4 min (G4"); 6 min (G6"); 8 min (G8"); 10 min (G10"); 12 min (G12"); 14 min (G14") e 16 min (G16"). A concentração de ozônio utilizada foi a de 2 µg/mL, fluxo de oxigênio de 1/4 L/min e dosagens aplicadas de 157, 314, 451, 628, 785, 943, 1100 e 1257 mg/m², respectivamente. Os principais resultados mostram que o uso da ozonioterapia tópica foi eficaz em reduzir a porcentagem de germinação de *T. rubrum* e *M. gypseum* em todos os períodos experimentais apresentando uma erradicação completa com o tempo de tratamento de 6 min para o *T. rubrum* e 14 min para o *M. gypseum*. Em conclusão, a ozonioterapia utilizada de maneira tópica com destaque para o tempo de tratamento de 8 min (628 mg/m²) para o *T. rubrum* e 16 min (1257 mg/m²) para *M. gypseum* promoveu ação antifúngica sobre os principais dermatófitos responsáveis por complicações críticas da onicomicose, podendo ser proposto como um coadjuvante em tratamentos dermatológicos.

Palavras-chave: Onicomicose; Fungos; Dermatófitos; Ozônio; Ozonioterapia.

ABSTRACT

Keywords: Onychomycosis is a common fungal infection of the nails, predominantly caused by dermatophytes such as *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) and *Microsporum gypseum* (*M. gypseum*) and is a notoriously difficult condition to treat. Thus, the objective of the present study was to evaluate and compare, in vitro, the effectiveness of different times of ozone therapy on the main fungi that cause onychomycosis. Dermatophyte fungi *T. rubrum* (ATCC 28188) and *M. gypseum* (ATCC 24102) were incubated at 28° C for 14 days. Subsequently, the fungi were divided into 9 experimental groups according to the experimental time: Control Group (CG): the fungi were cultivated and did not receive any treatment; Cultivated fungi and received ozone therapy for a time of 2 min (G2"); 4 min (G4"); 6 min (G6"); 8 min (G8"); 10 min (G10"); 12 min (G12"); 14 min (G14") and 16 min (G16"). The ozone concentration used was 2 µg/mL, oxygen flow of 1/4 L/min and applied dosages of 157, 314, 451, 628, 785, 943, 1100 and 1257 mg/m², respectively. The main results show that the use of topical ozone therapy was effective in reducing the germination percentage of *T. rubrum* and *M. gypseum* in all experimental periods, presenting complete eradication with a treatment time of 6 min for *T. rubrum* and 14 min for *M. gypseum*. In conclusion, ozone therapy used topically, with emphasis on the treatment time of 6 min for *T. rubrum* (628 mg/m²) and 14 min (1257 mg/m²) for *M. gypseum*, promoted antifungal action on the main dermatophytes responsible for critical complications of onychomycosis, and may be proposed as a adjuvant in dermatological treatments.

Keywords: Onychomycosis; fungi; Dermatophytes; Ozone; Ozone therapy.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A onicomicose é a doença ungueal mais comum no mundo, representando cerca de 90% das infecções de unhas em todo o mundo. É uma condição que não se resolve sozinha e pode levar a uma doença mais grave. A intenção do presente estudo foi avaliar e comparar, *in vitro*, a eficácia de diferentes tempos de ozonioterapia (em uma dosagem baixa) nos principais fungos causadores de onicomicoses, ou seja, fungos dermatófitos *T. rubrum* (ATCC 28188) e *M. gypseum* (ATCC 24102). Os resultados do estudo demonstraram que o ozônio em um tempo de 8 min para o *T. rubrum* e 16 min para *M. gypseum* foi eficaz em promover ação antifúngica sobre os principais fungos responsáveis por complicações críticas da onicomicose, podendo ser proposta como um coadjuvante em tratamentos dermatológicos.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 OBJETIVOS..... | 16 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 16 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 3.1 ONICOMICOSSES..... | 17 |
| 3.2 OZONIOTERAPIA..... | 20 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 4.1 ESPÉCIE DE FUNGOS..... | 23 |
| 4.2 INOCULAÇÃO DOS FUNGOS..... | 23 |
| 4.3 PREPARO DA SUSPENSÃO..... | 23 |
| 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 4.5 PROTOCOLO DE OZONIOTERAPIA..... | 24 |
| 4.6 AVALIAÇÕES | 24 |
| 4.6.1 Avaliação morfoógica dos fungos..... | 24 |
| 4.6.2 Crescimento micelial..... | 25 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 25 |
| 5 RESULTADOS | 26 |
| 5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE <i>T. RUBRUM</i> | 26 |
| 5.2 ANÁLISE DE PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DO <i>T. RUBRUM</i> | 28 |
| 5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE <i>M.GYPSEUM</i> | 29 |
| 5.4 ANÁLISE DE PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DO | 31 |
| <i>M.GYPSEUM</i> | |
| 6 DISCUSSÃO..... | 32 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 36 |
| REFERÊNCIAS..... | 37 |

1 INTRODUÇÃO

A onicomicose, é a doença ungueal mais comum no mundo, representando cerca de 90% das infecções de unhas dos pés em todo o mundo (GUPTA et al., 2020). A doença é predominantemente causada por dermatófitos, com destaque para o *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) e o *Microsporum gypseum* (*M. gypseum*), e menos comumente causada por bolores e leveduras não dermatófitos e acomete mais frequentemente as unhas dos pés, principalmente o primeiro dedo (LIPNER 2019a; GUPTA et al., 2022; YOUSSEF et al., 2018; GUPTA et al., 2020).

Diversos fatores de risco aumentam a probabilidade do aparecimento da doença, como a idade, trauma, diabetes, obesidade, imunossupressão, psoríase (risco aumentado em 56%), infecção por *tinea pedis*, genética (associada a genes como mhc ou hla-dr8), transmissão direta de uma pessoa infectada ou hábitos de vida (esportes, tabagismo ou tipo de calçado) (LEHRER & RHEINSTEIN 2022; GUPTA et al., 2022; LIPNER et al., 2019a; LIPNER 2019b; RUBEN 2021).

Os sintomas clínicos desta doença são descoloração das unhas, descolamento das unhas do leito ungueal (onicólise) e hiperqueratose. Esses sintomas podem reduzir a qualidade de vida do paciente devido a dor local, parestesia, estresse, perda da autoestima e dificultar as relações sociais (LIPNER et al., 2019a; LIPNER 2019b).

A onicomicose é uma condição que não se resolve sozinha e pode levar a uma doença mais grave ou generalizada (NICKLES et al., 2022). Os tratamentos frequentemente disponíveis são os cirúrgicos e medicamentosos (antifúngicos tópicos ou orais), entretanto, com relação aos medicamentosos é observado efeitos adversos graves devido ao longo período de administração e baixa taxa de cura (GUPTA et al., 2018). De acordo com NICKLES et al., 2022a, a condição é notoriamente difícil de tratar devido à espessa barreira da placa ungueal, formação de biofilme, surgimento de cepas fúngicas resistentes a drogas e altas taxas de reinfecção (GUPTA et al., 2016; GUPTA et al., 2020).

Desta forma, torna-se importante a realização de mais pesquisas com objetivos voltados para o desenvolvimento e investigação de estratégias complementares de tratamento para essa condição clínica (GREGORIOUS et al., 2022; NICKLES et al. 2022). A literatura mostra que uma variedade de recursos terapêuticos vem sendo estudados para o manejo da onicomicose (MA et al., 2019; CHEN et al., 2019; KUSHWAHA et al., 2016). Nos últimos anos, o interesse na utilização da terapia com

ozônio (O₃), ozonioterapia, aumentou consideravelmente no campo da medicina por se tratar de um procedimento com propriedades antimicrobiano e regenerativo, minimamente invasivo, bem tolerado e de baixo custo (UGOZIO et al., 2020; MENÉNDEZ et al., 2011; FERNÁNDEZ et al., 2021).

A atividade antimicrobiana da terapia é amplamente demonstrada com base no estresse oxidativo produzido pela interação do O₃ com componentes biológicos dos micro-organismos (BOCCI et al., 2009). Estudos apontam seu potencial uso na dermatologia no tratamento de feridas altamente infectadas, como queimaduras, pés diabéticos, acne, eczemas, dermatites, herpes zoster, micoses e lesões infectadas por micro-organismos resistentes à maioria dos antibióticos (ZENG et al., 2018; MENÉNDEZ et al., 2011). Com relação à onicomicose, Menéndez et al., 2011 evidenciaram que a ozonioterapia administrada topicamente através de óleo de girassol ozonizado promoveu cura micológica de pacientes com onicomicose e ocasionou menor probabilidade de reinfecção da doença quando comparado ao grupo tratado com antifúngico tópico (cetoconazol). Os autores concluíram que o óleo de girassol ozonizado oferece uma alternativa segura e econômica para o tratamento da onicomicose.

Desta forma, embora haja trabalhos sugerindo o uso da ozonioterapia como uma terapia adjuvante e promissora no tratamento da onicomicose, há uma carência de estudos na literatura investigando o efeito deste recurso, especialmente o uso do gás O₃ administrado através da via tópica, na erradicação de dermatófitos patogênicos, assim como os melhores parâmetros a serem utilizadas no tratamento de onicomicose. Diante disto, foi levantada a hipótese de que o gás O₃ administrado por via tópica poderia inativar os fungos mais prevalentes na onicomicose, constituindo-se um tratamento adequado e eficaz a ser utilizado na prática clínica.

2 OBJETIVOS

Avaliar e comparar, *in vitro*, a eficácia de diferentes tempos de ozonioterapia nos principais fungos causadores de onicomicoses.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ação de diferentes tempos de gás ozônio na germinação de conídios do fungo *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188);
- Investigar os efeitos de diferentes tempos gás ozônio na germinação de conídios do fungo *Microsporum gypseum* (ATCC 24102).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ONICOMICOSE

A onicomicose é uma infecção de unhas das mãos e dos pés causada por fungos ou leveduras, é a doença ungueal mais comum observada na prática clínica (GUPTA et al., 2020).

Os organismos responsáveis por causar onicomicose incluem os dermatófitos como o *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e o *M. gypseum* sendo estes os responsáveis por aproximadamente 80% das onicomicoses das unhas (LIPNER 2019a). Os fungos não dermatófitos causam aproximadamente 20% das infecções ungueais, principalmente nas unhas dos pés e, geralmente após traumas ungueais anteriores. Esses patógenos pertencem a gêneros como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Scytalidium* e *Scopulariopsis* (GUPTA et al., 2022). Finalmente, as leveduras causam a menor porcentagem de todas as onicomicoses, sendo elas as principais espécies *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou com problemas vasculares (YOUSSEF et al., 2018; GUPTA et al., 2020).

A doença pode ocorrer em qualquer idade, embora a prevalência continua a aumentar com a idade, tornando-se cada vez mais comum em idosos (GUPTA et al., 2022). Traumas persistentes na unha, doenças como a psoríase e o diabetes, má circulação periférica, imunossupressão e fumantes também são especialmente suscetíveis (LIPNER 2019a). *Tinea pedis plantaris* e *tinea pedis interdigitalis* são fatores de risco para infecções nas unhas e comumente ocorrem concomitantemente com onicomicose (RUBEN 2021). Pode ser facilitada por ambientes úmidos, calçados oclusivos e predisposição genética (associada a genes como mhc ou hla-dr8) (LEHRER & RHEINSTEIN 2022). Esses mesmos fatores podem levar à recorrência da onicomicose após o tratamento, o que a torna uma doença crônica e desafiadora de tratar (LIPNER et al., 2019b).

A onicomicose apresenta-se clinicamente com descoloração das unhas (amarelo, branco ou marrom), onicólise, fragilidade e hiperqueratose (LIPNER et al., 2019a). Casos mais graves podem apresentar sulcos e onicocriptose (unha encravada). A onicomicose pode afetar negativamente a qualidade de vida das pessoas afetadas (LIPNER 2019b). Unhas infectadas podem causar dor local ou parestesia, que por sua vez podem causar dificuldades em atividades como caminhar

ou calçar sapatos, podem também ser uma fonte de constrangimento social. Devido à localização oculta da infecção, ocorrer mais frequentemente nos pés, sendo a unha do hálux mais frequentemente afetado, os pacientes podem não falar sobre o assunto com profissionais da saúde, pois acreditam que é uma questão trivial ou cosmética (GUPTA et al., 2020).

Os testes laboratoriais e a confirmação micológica constituem a maneira ideal de obter um diagnóstico preciso para a seleção do tratamento (GUPTA et al., 2020). Para um diagnóstico comum usa hidróxido de potássio (KOH) para dissolver a queratina da unha e verificar a amostra ao microscópio. Este teste permite discriminar entre os dermatófitos e saprófitos (GUPTA et al., 2018). Outro teste diagnóstico mais sensível é a biópsia de unha embebida em ácido-*Schiff* corante de prata metenamina de *Grocott*. Muitas vezes é necessário cultivar o fungo para conhecer o agente causal específico, embora esse processo também seja pouco sensível (GUPTA et al., 2018). Outro método é a técnica de PCR, que pode determinar o agente causal pela amplificação do 18S rRNA (BAO et al., 2018). Todas estas técnicas não são 100% eficazes e preconiza-se a utilização de metodologias combinadas pois, permite uma melhor identificação e diminui os falsos negativos (GUPTA et al., 2018).

O tratamento da onicomicose faz-se necessário, visto que a doença não se resolve sozinha e pode levar a uma alteração mais grave ou generalizada (NICKLES et al., 2022). Existem várias opções de tratamento disponíveis para onicomicose, incluindo os cirúrgicos e medicamentosos (antifúngicos orais ou tópicos). A avulsão cirúrgica ou química da unha afetada também é outro método que pode ser utilizado em casos resistentes ao tratamento tópico e sistêmico. A avulsão química com uréia a 40% aplicada sobre a placa ungueal e ocluída por 1 semana é uma opção fácil e indolor. A avulsão cirúrgica requer uso de anestesia local e permite a remoção parcial ou total da lâmina ungueal (GUPTA et al., 2020a).

Tradicionalmente, os tratamentos medicamentosos tópicos ou orais (sistêmicos) têm sido a primeira escolha dos médicos para tratamento devido à acessibilidade, custo relativamente baixo e eficácia. Os antifúngicos orais (sistêmicos) como o fluconazol, itraconazol e a terbinafina são os mais utilizados, sendo que novos antifúngicos orais estão sendo avaliados, como o fosravuconazol (GUPTA et al., 2018). No entanto, o uso por longo período, pode estar associado a limitações como doença hepática, insuficiência cardíaca congestiva e disfunção renal. Além disso, podem interferir com outros agentes farmacológicos de uso pessoal e ocasionalmente, causar efeitos adversos graves. Esses problemas têm estimulado a demanda por

tratamentos mais seguros, levando ao aumento do interesse por terapias tópicas (NICKLES et al., 2022).

As opções de antifúngicos tópicos como o efinaconazol, ciclopirox, tavaborol e amorolfina são formulações frequentemente utilizadas também. No entanto, esses tratamentos tópicos geralmente apresentam baixo teor de penetração na lâmina ungueal para chegar até o leito da unha (local onde o fungo reside) e também, é relatado que o tratamento tópico pode causar distúrbios locais, como esfoliação, eritema e dermatites (GREGORIOUS et al., 2022). Além disso, destaca-se que a adesão ao tratamento também é uma problemática pois, geralmente protocola-se um longo prazo de tratamento (de 3 a 9 meses ou mais) para que se obtenha um efeito satisfatório (GUPTA et al., 2022).

Desta forma, o manejo do tratamento da onicomicose requer meses e a recorrência é comum. Foram relatadas taxas de recaída ou reinfecção de 20 a 25% após o tratamento inicial bem-sucedido, enquanto as taxas gerais de recorrência variam de 10% a 53% (GUPTA et al., 2020). Gregorious et al., 2022 relata que a terapia tópica para onicomicose requer períodos de tratamento mais longos e tem taxas de sucesso mais baixas do que as terapias orais, em parte devido à natureza impenetrável da lâmina ungueal. A formação de biofilme pode contribuir para a recorrência da infecção e resistência ao tratamento, pois a matriz extracelular formada pelo fungo se liga às superfícies epiteliais, atuando como uma barreira para o micro-organismo dentro do biofilme, que contribui para a resistência antifúngica (GUPTA et al., 2016).

Dentro deste contexto, estudos buscam terapias complementares e alternativas e vem sendo encorajados (GREGORIOUS et al., 2022; NICKLES et al. 2022). Existem novos tratamentos por métodos físicos, como lasers, terapia fotodinâmica ou iontoforese que começam a ser utilizados nestes últimos anos, embora muitos deles ainda estejam em fase de pesquisa (MA et al., 2019; CHEN et al., 2019; KUSHWAHA et al., 2016). Ainda, a ozonioterapia vêm sendo empegada na prática clínica no tratamento de onicomicoses (MENÉNDEZ et al., 2011; FERNÁNDEZ et al., 2021).

3.3 OZONIOTERAPIA

O potencial terapêutico do uso do gás ozônio (O₃) aplicado topicamente em feridas infectadas vem sendo relatado desde o período da I Guerra Mundial de forma alternativa e empírica (DI PAOLO, BOCCI, GAGGIOTTI, 2004).

Martins Van Marum, médico e físico holandês, em 1785, mencionou os primeiros indícios da existência do O₃, constatando que as descargas elétricas advindas de tempestades expeliam um odor peculiar e diferenciado. Apenas em 1840, Friedrich Christian Schönbein, um químico-físico alemão, confirmou um gás de odor singular que proviam do contato das descargas elétricas com o O₂, dando ao gás o nome de “ozein”, palavra de origem grega que significa aquilo que cheira (BOCCI, 2009; BOCCI, 2011).

O ozônio é caracterizado quimicamente como uma molécula alotrópica triatômica do oxigênio (O₂) e é a terceira potência oxidante (BOCCI et al., 2011). Pode ser produzido a partir de moléculas de O₂ através da eletrólise química, radiação da luz ultravioleta (UV) e descargas elétricas, sendo a última conhecida como método corona, método mais utilizado pelos geradores de ozônio atuais (BOCCI et al., 2009).

Em meados do século XIX, a ozonioterapia (OT) que emprega uma mistura gasosa de O₂ medicinal/O₃, começou a ser utilizada pela comunidade médica de forma alternativa e empírica (BOCCI et al., 2009; ZENG et al., 2022).

Porém, na última década, houve um grande avanço da terapia devido a manufatura de novos geradores tecnológicos, com maior precisão da concentração do gás emitido e no melhor entendimento de seus possíveis mecanismos de ação. Desta forma, a ozonioterapia tornou-se um campo de pesquisa aberto, nos quais os estudos visam esclarecer sua eficácia e desempenho biológico, bem como identificar sua segurança e eficácia terapêutica (OLIVEIRA MODENA et al., 2022).

Existem três formas principais de aplicação tópica de ozônio: ozônio gasoso, água ozonizada e óleos vegetais ozonizados. O gás pode ser administrado através de um bolsa plástica contendo uma mistura de ozônio e oxigênio, que deve cobrir a área da pele afetada durante a sessão de tratamento. Já a água ozonizada pode ser usada para a lavagem da pele lesionada, enquanto os óleos vegetais ozonizados podem ser aplicados diretamente na pele ou por meio de curativos. Ademais, existem outras vias de administração do ozônio como a intramuscular, subcutânea, intradérmica, intra-articular e retal (WANG et al., 2018). Outra forma de aplicação é a auto-hemoterapia, que consiste na retirada e ozonização do sangue do paciente e posterior reintrodução por meio intravenoso ou intramuscular (MACHADO et al., 2022; OLIVERIA MODENA et al., 2022).

Atualmente, é crescente o número de pesquisa que investigam os efeitos da ozonioterapia no funcionamento biológico objetivando compreender melhor os mecanismos de ação básicos que sustentam seus efeitos terapêuticos (BOCCI, 2011;

SCHWARTZ & SÁNCHEZ, 2012). A literatura atual fundamenta que a terapia possui propriedades antimicrobianas (inativação de bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários) e promove ação analgésica e cicatrizante, o que sustenta suas várias e heterogêneas aplicações clínicas em cuidados de saúde que atualmente são vistas na prática clínica em diversos países (ZENG et al., 2018).

O exato mecanismo de ação da terapia ainda não é completamente elucidado, entretanto sabe-se que O₃ possui alta capacidade de oxidar componentes celulares, como os ácidos graxos insaturados e aminoácidos, e gerar subprodutos conhecidos como ozonídeos, com destaque para produtos de peroxidação lipídica (LOPs) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (SCHWARTZ & SÁNCHEZ, 2012). Sabe-se que os ozonídeos formados possuem fundamental importância pois irão sinalizar e desencadear mudanças metabólicas e estruturais capazes de produzir os efeitos terapêuticos do gás (DING et al., 2019). Estudos descrevem que o ozônio atua em glicolipídeos, glicoproteínas ou certos aminoácidos que estão presentes na membrana citoplasmática dos micro-organismos, tendo, portanto, eficácia antimicrobiana sem induzir resistência aos medicamentos (DING et al., 2019; BOCH et al., 2016).

Assim, a ozonioterapia tem sido sugerido como tratamento adjuvante em algumas condições dermatológicas como acne, dermatite atópica, herpes zoster, psoríase, micoses assim como no tratamento de feridas cutânea de difícil cicatrização como as úlceras de pé diabético e úlceras venosas crônicas de perna (HUANG et al., 2018; KADIR et al., 2020; WAINSTEIN et al., 2011; IZADI et al., 2019).

Di Mauro et al. 2019, utilizou a ozonioterapia tópica em pacientes com feridas infectadas crônicas resistentes à terapia antimicrobiana. Os resultados mostraram que a terapia foi capaz de inibir as infecções e otimizar o reparo de feridas da pele. Ademais, a ozonioterapia foi testada contra patógenos como *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *S. pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e diferentes espécies de *Mycobacterium T.*, e os resultados confirmaram o potencial antimicrobiano da terapia (SECHI et al., 2001).

No estudo de Lu et al., 2018, o uso da ozonioterapia no tratamento da *Tinea pedis* mostrou eficácia semelhante ao tratamento medicamentoso (naftina associado ao cetoconazol), sugerindo novamente a possibilidade de usar o ozônio como terapia alternativa no tratamento de infecções da pele (LU et al., 2018). Ainda, Menéndez et al., 2011, em um estudo controlado e randomizado investigaram o efeito da ozonioterapia administrada através de óleo de girassol ozonizado em comparação com a aplicação ao tratamento medicamentoso tópico (cetoconazol 2%). Os autores

concluíram que a cura micológica foi superior no tratamento com óleo ozonizado e o índice de reinfecção foi inferior quando comparado ao tratamento medicamentoso para onicomicoses.

Nesse cenário, a ozonioterapia pode ser sugerida como uma intervenção terapêutica de baixo custo e promissora para o tratamento da onicomicose, entretanto ainda faltam evidências sobre o impacto do uso do gás O₃ administrado através da via tópica, na erradicação de dermatófitos patogênicos. Desta forma, estudos *in vitro* de alta qualidade são necessários para compreender os melhores parâmetros a serem utilizadas no tratamento de onicomicose

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESPÉCIE DE FUNGOS

Os isolados de fungos dermatófitos em suspensão: *T. rubrum* (ATCC 28188) e *M. gypseum* (ATCC 24102), foram disponibilizados pelo laboratório de Microbiologia coordenado pelo Prof. Drauzio Eduardo Naretto Rangel no Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Campus de São Paulo.

4.2 INOCULAÇÃO DOS FUNGOS

Para inoculação dos fungos foi utilizado placa de Petri de poliestireno (95 mm x 15 mm) em meio de cultura SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*). Na câmara de fluxo laminar, para cada fungo, um volume de 40 µl de fungo foi distribuído no centro de cada placa. As placas inoculadas foram incubadas a 28° C por 14 dias. Cada inoculação foi repetida pelo menos três vezes em dias diferentes.

4.3 PREPARO DA SUSPENSÃO

Após o crescimento das colônias dos fungos dermatófitos *T. rubrum* (ATCC 28188) e o *M. gypseum* (ATCC 24102) por 14 dias, realizou-se a preparação da suspensão. Foram colocados 6 mL da solução de Tween 80% na placa de Petri com o fungo em crescimento e com o auxílio de uma espátula foi realizado a retirada dos fungos presentes nas placas. Na sequência, essa suspensão foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução do Tween 80% e aspirado 40 µL para a câmara de Neubauer para a conferência do número de conídios presentes na suspensão. Após a contagem dos conídios a suspensão foi ajustada a 1×10^5 conídios/ml. Em seguida, com uso de uma pipeta foi adicionado 40 µL ml de suspensão do fungo no centro da placa de Petri contendo o meio SDA.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os fungos semeados em placa de Petri de poliestireno em meio de cultura SDA há uma concentração de 1×10^5 conídeos/mL foram divididos em 8 grupos experimentais de acordo com o tratamento, sendo eles:

o *Controle (CG)*: os fungos foram cultivados rotineiramente e não receberam nenhum tratamento.

o *Grupo 2 min (G2^m)*: os fungos foram cultivadas e receberam ozônio por um período de 2 min;

o *Grupo 4 min (G4^m)*: os fungos foram cultivadas e receberam ozônio por um período de 4 min;

o *Grupo 6 min (G6^m)*: os fungos foram cultivadas e receberam ozônio por um período de 6 min;

o *Grupo 8 min (G8^m)*: os fungos foram cultivadas e receberam ozônio por um período de 8 min;

o *Grupo 10 min (G10^m)*: os fungos foram cultivadas e receberam ozônio por um período de 10 min;

o *Grupo 12 min (G12^m)*: os fungos foram cultivadas e receberam ozônio por um período de 12 min;

o *Grupo 14 min (G14^m)*: os fungos foram cultivadas e receberam ozônio por um período de 14 min;

o *Grupo 16 min (G16^m)*: os fungos foram cultivadas e receberam ozônio por um período de 16 min.

4.5 PROTOCOLO DE OZONIOTERAPIA

A ozonioterapia foi realizado após a semeadura em placa, através do método de *Bag* (bolsa hermética onde foram colocadas as placas abertas já com os microrganismos recebendo o gás ozônio), nas concentrações de 2 µg/mL, com um fluxo de oxigênio de 1/4 L/min, por um período de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 min por placa e nas dosagens de 157, 314, 451, 628, 785, 943, 1100 e 1257 mg/m², respectivamente. As avaliações foram realizadas no período de 24, 48 e 72 horas após aplicação do ozônio.

4.6 AVALIAÇÕES

4.6.1 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS

A análise qualitativa dos fungos, foram analisados em três campos distintos com aumento de 200 X. Para tal análise, foi utilizado um microscópio de luz (Carl

Zeiss, Oberkochen, Germany) e foram observados os aspectos morfológicos dos fungos *T. rubrum* e o *M. gypseum* nos períodos de 24, 48 e 72 horas após os tratamentos.

4.6.1 GERMINAÇÃO DE CONÍDEOS

A germinação no escuro foi observada 24, 48 ou 72 horas após a inoculação das suspensões de conídios. A placa de ágar foi corada com uma gota de solução de azul de metila, coberta com uma lamela e examinada em microscópio de luz com aumento de 400x. Os conídios foram considerados germinados quando o tubo germinativo apresentava uma projeção branca do conídio. Foram avaliados pelo menos 300 conídios por placa e calculada a porcentagem de germinação. Todos os conídios germinados e não germinativos foram contados na mesma lamela. A margem da área de queda da suspensão de conídios foi utilizada por ser uma área comumente menos povoada por conídios. Cada tratamento foi repetido pelo menos três vezes com um novo lote de conídios produzidos para cada repetição.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estatísticos foram impostos por meio de técnicas descritivas, na forma de média e desvio-padrão. O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações entre os grupos foram feitas utilizando ANOVA One Way com *post hoc* de *Tukey*. Nos casos não paramétricos, o teste de *Kruskall-Wallis* com *post hoc* de *Dunn* foi adotado. As análises foram realizadas no *software GraphPad Prism*, versão 6.01 (*GraphPad Software*, San Diego CA, EUA). Para as estatísticas das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

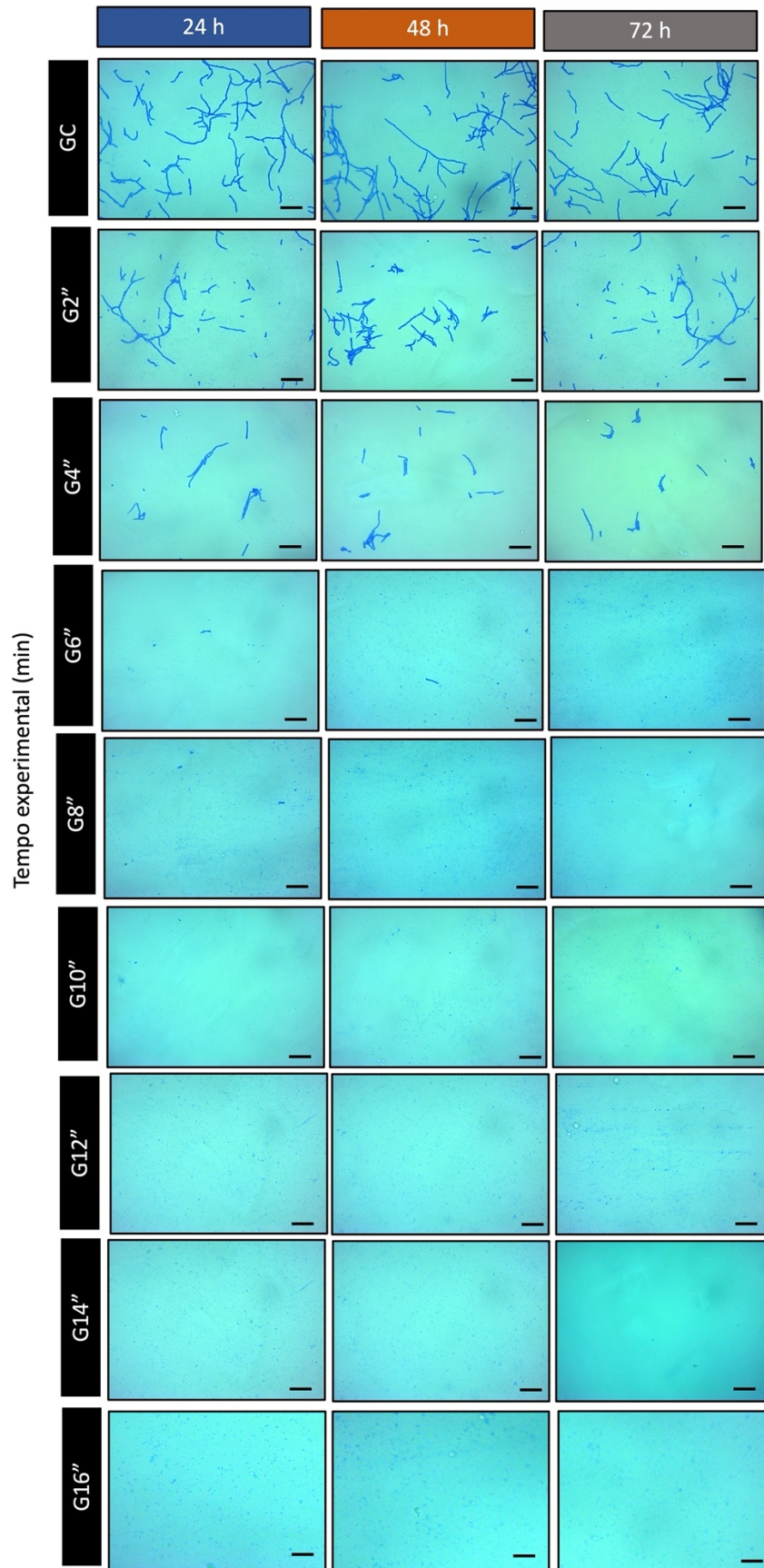
5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE *T. RUBRUM*

A figura 1 mostra as imagens representativas do ensaio microbiológico de *T. rubrum* nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

No grupo GC pode ser evidenciado fungos filamentosos com hifas hialinas septadas. Ainda foi possível verificar a presença de conídios micro e macro assim como artroconídios, ou seja, fragmentos de hifas em todos os períodos experimentais.

Em todos os períodos de avaliação, 24, 48 e 72 horas após tratamento, foi observado nos grupos experimentais G2, G4 e G6 uma menor quantidade de fungos e a presença de fragmentos celulares.

Já, nos grupos G8, G10, G12, G14 e G16 não foi possível identificar a presença dos fungos nesses períodos avaliados.

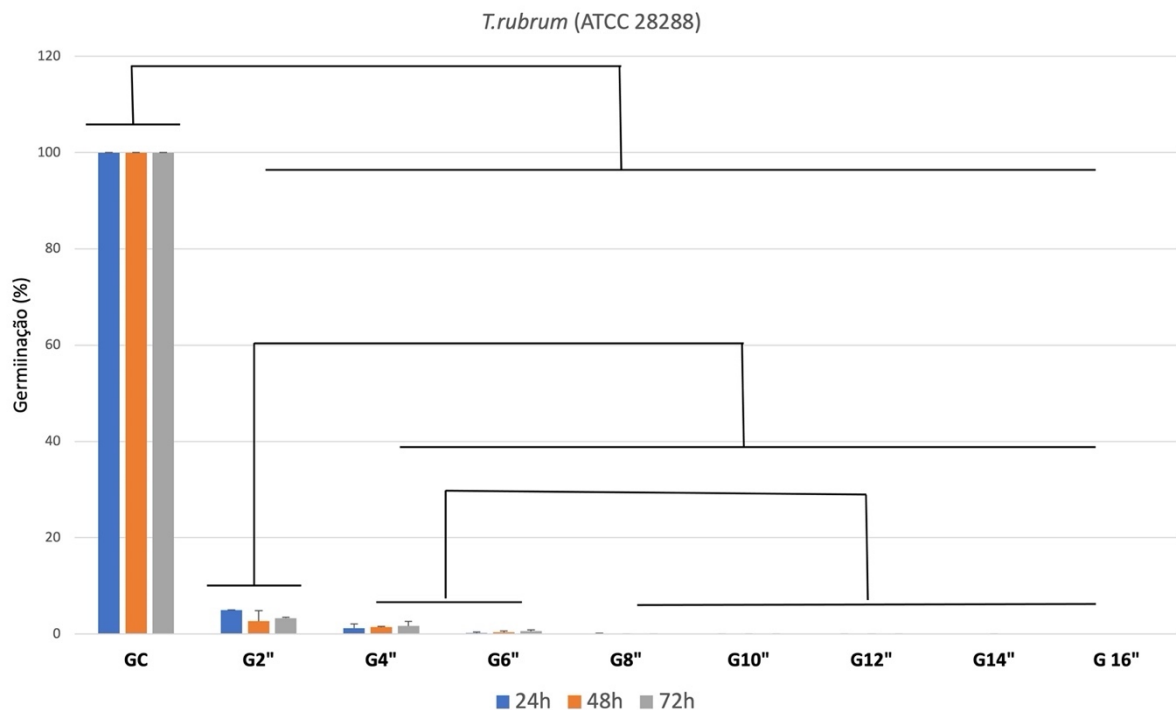
Figura 1: Imagens representativa da germinação de *T. rubrum*

Fonte: Autor, 2023.

5.2 ANÁLISE DE PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DO *T. RUBRUM*

Em relação a análise de porcentagem de germinação de *T. rubrum*, os resultados podem ser demonstrados na figura 2. Foi possível observar uma maior porcentagem de germinação no grupo GC quando comparado aos demais grupos experimentais em todos os períodos avaliados. Ainda, a porcentagem de germinação foi maior no grupo G2" quando comparado aos demais grupos experimentais. Os grupos G4" e G6" apresentaram porcentagem de germinação superior aos grupos G8", G10", G12", G14" e G16".

Figura 2: Figura representativa dos valores da avaliação da porcentagem de germinação de *T. rubrum*



Fonte: Autor, 2023.

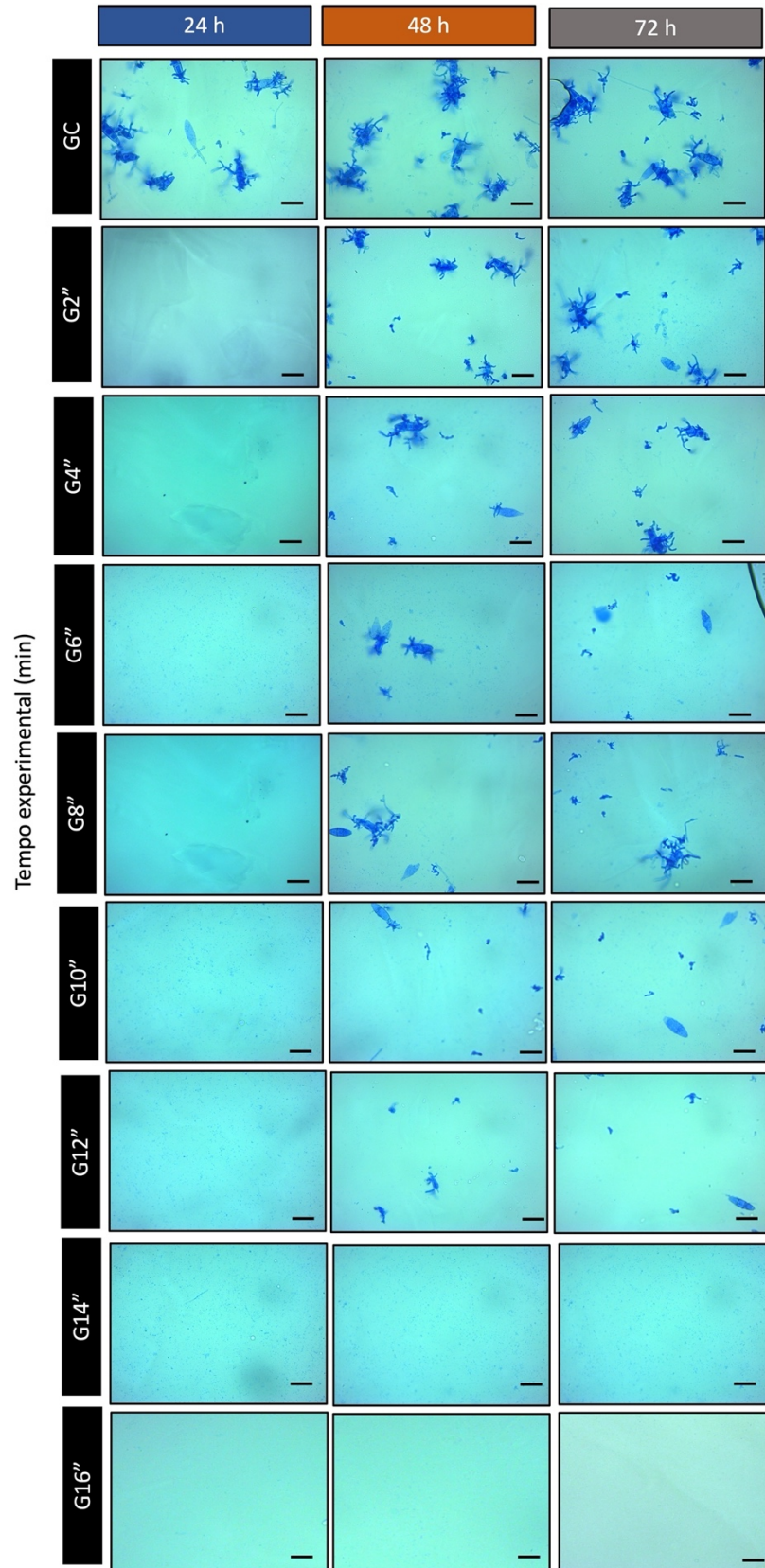
5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE *M. GYPSEUM*

As avaliações referentes a análise morfológica de *M. gypseum* estão demonstradas na figura 3 nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

No grupo GC pode ser evidenciado fungos com hifas hialinas, macroconídios fusiforme, multiseptado e microconídeos com conidióforos curtos de formato piriforme clavado em todos os períodos experimentais.

No período experimental de 24 horas não foi possível identificar a presença de fungos em todos os grupos que receberam o tratamento (G2", G4", G6", G8", G10", G12", G14" e G16").

Nos tempos experimentais de 48 e 72 horas, foi evidenciado uma menor quantidade de fungos em todos os grupos tratados quando comparados com o CG. Nos mesmos períodos o grupo G2" apresentou maior presença de fungos quando comparado aos grupos G4", G6", G8", G10", G12", G14" e G16"; o G4" apresentou maior que G6", G8", G10", G12", G14" e G16"; o G6" apresentou maior que G8", G10", G12", G14" e G16"; e ausência de fungos no grupo G16".

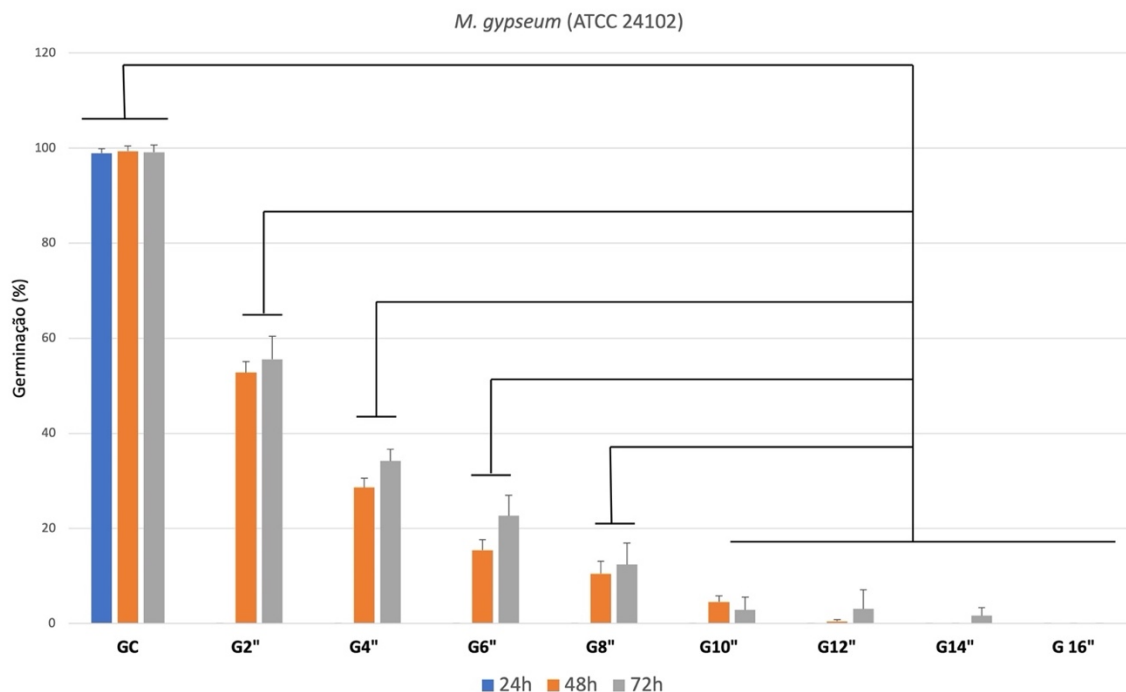
Figura 3: Imagens representativa da germinação de *M. gypseum*

Fonte: Autor, 2023.

5.4 ANÁLISE DE PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DO *M. GYPSEUM*

Na figura 4 pode-se observar a análise de porcentagem de germinação de *M. gypseum*. Foi possível observar um aumento na porcentagem de germinação no grupo GC quando comparado aos demais grupos experimentais em todos os períodos avaliados. Nos períodos experimentais de 48 e 72 h a porcentagem de germinação foi maior no grupo G2" quando comparado aos demais grupos tratados; G4" apresentou aumento da porcentagem de germinação quando comparado com G6" a G16"; G6" apresentou aumento da porcentagem de germinação quando comparado com G8" a G16"; G8" apresentou aumento da porcentagem de germinação quando comparado com G10" a G16". Ainda o grupo G16 apresentou o menor valor de porcentagem quando comparado a todos os grupos experimentais.

Figura 4: Figura representativa dos valores da avaliação da porcentagem de germinação de *M.gypseum*



Fonte: Autor, 2023

6 DISCUSSÃO

Considerando o grande interesse de muitos profissionais que buscam a fundamentação que norteia o uso da ozonioterapia na eliminação de fungos patogênicos, o presente estudo teve o intuito de avaliar a influência do gás ozônio tópico utilizado em diferentes tempos de aplicação nos dermatófitos mais predominantes na onicomicose. Os principais resultados mostram que o uso da ozonioterapia tópica foi eficaz em reduzir a porcentagem de germinação de *T. rubrum* e *M. gypseum* em todos os períodos experimentais e proporcionou uma erradicação completa com o tempo de tratamento de 8 minutos para o *T. rubrum* e 16 minutos para o *M. gypseum*.

O tratamento efetivo e seguro de unhas com onicomicose continua sendo um desafio clínico prevalente na dermatologia e os antifúngicos tópicos ou sistêmicos utilizados no tratamento, muitas vezes ainda permanece insuficientemente compreendidos, principalmente com relação aos efeitos adversos significativos causado pelo uso prolongado, baixa capacidade de permeação e a formação de cepas fúngicas resistentes a drogas (NICKLES et al. 2022; GUPTA et al., 2020; NICKLES et al., 2022).

Assim, para investigar os complexos mecanismos de eliminação de micro-organismos presentes na onicomicose, modelos *in vitro*, com fungos dermatófitos como o *T. rubrum* e o *M. gypseum* tem sido utilizado (FERNÁNDEZ et al., 2021). Sabe-se que a patogênese da onicomicose, está diretamente relacionada a interação e adesão de fungos patogênicos aos tecidos do hospedeiro (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. No modelo utilizado no presente estudo, a inoculação dos fungos *T. rubrum* e *M. gypseum*, origina biofilmes após o período experimental de 72 horas (COSTA-ORLANDI et al., 2014). De acordo com Percival et al., 2012, a formação de biofilmes oferece uma série de vantagens aos micro-organismos, incluindo proteção contra o meio ambiente, comunicação microbiana, melhor cooperação metabólica, capacidade pronunciada de resistência a agentes antimicrobianos e defesas do hospedeiro. Todas essas características podem explicar a infecção persistente, resistência e o tratamento a longo prazo necessário para as dermatofitoses, principalmente na onicomicose (VLASSOVA et al., 2011). Ainda, a presença de biofilme é considerada um dos principais fatores que contribuem para a reincidência da infecção dermatofítica crônica

(NUSBAUM, KIRSNER, CHARLES, 2012; COSTA-ORLANDI et al., 2014). Além disso, a literatura mostra altas taxas de resistência antimicrobiana entre dermatófitos, especialmente para *T. rubrum*, o agente etiológico mais frequente para onicomicose (BALTAZAR et al., 2013), utilizado no presente estudo.

Devido às limitações de opções terapêuticas atuais, é claro a necessidade de estudos que objetivam investigar novas abordagens para tratar dermatofitoses na prática dermatológica (NUNLEY; CORNELIUS, 2008).

Como citado anteriormente, é possível evidenciar os efeitos antimicrobianos do ozônio na inativação de bactérias (GIULIANI et al., 2018), fungos (GEWEELY, 2006) protozoários (HERNÁNDEZ et al., 2008) e vírus (PETRY et al., 2014) relatados por vários autores em diferentes situações clínicas, assim como na desinfecção de ambientes e superfícies (SECHI et al., 2001). No estudo de Gupta et al., 2012, os autores utilizaram um dispositivo comercial de geração de gás ozônio com objetivo de avaliar, *in vitro*, os efeitos do ozônio em cepas *T. rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os resultados demonstram que o ozônio foi eficaz em matar 99% dos fungos viáveis, entretanto, os autores não descrevem os parâmetros de tratamento com ozônio utilizado no estudo. A falta de informações sobre as formas de administração e parâmetros de ozônio dificultam a avaliação da eficácia do recurso e os esforços para padronizar seu uso (BOCCI, 2006). Sabe-se que devido à alta dissociação do O₃ e diferentes formas de administração da técnica, existe uma dificuldade de estabelecer uma padronização de parâmetros de tratamento a ser utilizado de maneira segura e efetiva. Assim, estudos que utilizaram a ozonioterapia, cujos métodos de determinação de concentração e tempo de ozonização não são claros, produzem resultados dúbios e passíveis de questionamentos, dificultando a desmistificação e consolidação da ozonioterapia, como uma terapia integrativa na prática clínica. Assim, a temática ozonioterapia tornou-se um campo de pesquisa aberto, onde busca-se esclarecer o desempenho biológico e a eficácia da prática clínica terapêutica, em especial na área de dermatologia (OLIVEIRA MODENA et al., 2022). Ainda, é ressaltado a importância da utilização de um gerador adequado que permita medições precisas e reprodutíveis das concentrações da mistura O₂/O₃ (ELVIS; EKTA, 2011). De acordo com Bocci, 2006, a falta de um gerador de ozônio preciso leva à ausência de dados científicos e clínicos sólidos publicados em condições metodológicas adequadas, favorecendo o ceticismo em relação às possíveis recomendações para a ozonioterapia. Cabe destacar que o gerador de ozônio utilizado no estudo atual, possui ajustes automático de concentrações e

volumes do gás emitido, o que garante maior segurança da técnica visto que o ozônio pode ser prejudicial quando configurado de maneira errônea.

Além disso, os efeitos biológicos do ozônio podem ser duvidosos, dependendo de sua concentração e forma de aplicação. No presente estudo, o gás de ozônio aplicado através de *Bag* e com dose baixa e em todos os tempos experimentais foi capaz de reduzir a porcentagem de germinação de ambos dermatófitos, inferindo que mesmo em baixas concentrações, o ozônio foi capaz de desempenhar um importante papel contra agentes específicos causadores de onicomicoses, evitando o uso de concentrações alta que pode ser tóxico e causar irritações na pele humana (BOCCI 2009).

Com relação ao tempo experimental avaliado no presente estudo, cabe enfatizar que o tempo de ozonização de 8 minutos e 16 minutos foram os que proporcionaram erradicação completa dos *T. rubrum* e *M. gypseum*, respectivamente, mostrando um potencial papel no tratamento da onicomicose. A variabilidade entre os tempos de ozonização para se obter o efeito fungicida nas duas espécies avaliadas (8 min para o *T. rubrum* e 16 min para o *M. gypseum*) pode ser devido as características de crescimento/cinética entre espécies individuais. De maneira similar, o estudo de Fernandez et al. (2011), avaliou o potencial do gás ozônio em diferentes tempos experimentais em diversos fungos causadores de onicomicose e observaram que a eficácia do tempo de ozonização dependeu principalmente da espécie fúngica, mostrando redução significativa do crescimento durante uma exposição de 10 min e um tempo mais longo de ozonização (20 e 30 min) para que outras espécies mostrassem níveis semelhantes de inibição. Embora os menores tempos proporcionaram apenas uma redução do crescimento de ambos os fungos no estudo atual, os tempos maiores ocasionaram inibição total do crescimento desses patógenos, permitindo indicar que a ozonioterapia tópica apresenta ser uma excelente escolha como coadjuvante no tratamento de onicomicoses.

Com base no exposto, acredita-se que a redução da germinação e/ou erradicação dos fungos patogênicos após o uso da ozonioterapia tópica esteja baseada no princípio da pró-oxidação ocasionado pelo gás ozônio, ou seja, quando o gás interage com a parede da estrutura fúngica como os lipídios de membrana lipídica, resultou na formação de espécies reativas de oxigênio e produtos de peroxidação lipídica altamente reativos e capazes de depletar importantes enzimas citosólicas dos micélios fúngicos e gerar citotoxicidade das celular, inibindo a germinação de esporos e a formação de biomassa.

Ademais, neste trabalho a análise morfológica permitiu identificar a presença de esfacelos celulares principalmente nos tempos mais elevados de ozonização em ambos os fungos, sugerindo que o gás foi capaz de proporcionar altos níveis de peroxidação lipídica capazes de ocasionar morte celular por necrose (lise).

Desta forma, em comparação aos tratamentos atuais para onicomicose, que requerem a administração tópica ou oral do fármaco durante meses ou mesmo anos e apresentam efeitos colaterais potenciais, este estudo fornece importantes informações práticas e econômicas com relação ao uso da ozonioterapia tópica no tratamento de onicomicoses. Ainda, como parte do esforço contínuo de obter ferramentas clínicas com potencial antimicrobiano, otimizando a eliminação fúngica e minimizando complicações adjacentes, esse estudo oferece razões convincentes para explorar os efeitos potenciais da ozonioterapia tópica em doenças fúngicas encontrada na dermatologia. Certamente estudos com outros micro-organismos presente na onicomicose, o estabelecimento de protocolos como concentração específica do ozônio, tempo de ozonização, estado físico, tempo de aplicação e comparação entre vários métodos simultâneos, serão oportunos para delineamento de um padrão de comportamento do O₃, a fim de estabelecer protocolos mais seguros e efetivo para a prática clínica.

7 CONCLUSÃO

Baseado nas evidências demonstradas, é plausível concluir que a ozonioterapia utilizada de maneira tópica em todos os tempos experimentais promoveu ação antifúngica sobre *T. rubrum* e *M. gypseum*, principais dermatófitos responsáveis por complicações críticas da onicomicose, podendo ser proposto como um coadjuvante em tratamentos dermatológicos. Cabe enfatizar que os maiores tempos experimentais apresentaram erradicação completa dos fungos avaliados. Este tipo de evidência experimental é necessário para o desenho de outros ensaios clínicos envolvendo o uso da ozonioterapia em complicações dermatológicas semelhantes às complicações associadas às infecções por dermatófitos e outras cepas.

REFERÊNCIAS

- BAO, F. FAN, Y. SUN, L. YU, Y. WANG, Z. PAN, Q. YU, C. LIU, H. ZHANG, F. Comparison of fungal fluorescent staining and ITS rDNA PCR-based sequencing with conventional methods for the diagnosis of onychomycosis. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 32(6):1017-1021. Jun, 2018. doi: 10.1111/jdv.14843. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29405481; PMCID: PMC6001524.
- BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. **Med Res Rev.** 29(4):646-82, Jul, 2009. doi: 10.1002/med.20150. PMID: 19260079.
- BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Med Gas Res.** 28;1(1):6. Apr, 2011. doi: 10.1186/2045-9912-1-6. PMID: 22146387; PMCID: PMC3231820.
- BOCH, T.; TENNERT, C.; VACH, K.; AL-AHMAD, A.; HELLWIG, E; POLYDOROU, O. Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm-an in vitro study. **Clinical Oral Investigations.** Berlin, 20(7):1733-9. Sep, 2016.
- CHEN, B.; SUN, Y.; ZHANG, J.; CHEN, R.; ZHONG, X.; WU, X.; ZHENG, L.; ZHAO J. In vitro Evaluation of Photodynamic Effects Against Biofilms of Dermatophytes Involved in Onychomycosis. **Front Microbiol.** 7;10:1228. Jun, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01228. PMID: 31231330; PMCID: PMC6568038.
- 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.** 30: 719–727, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856309>. Acesso em: 25 jan. 2020.
- DI MAURO R.; CANTARELLA, G.; BERNARDINI, R.; DI ROSA, M.; BARBAGALLO, I.; DISTEFANO, A.; LONGHITANO, L.; VICARIO, N.; NICOLOSI, D.; LAZZARINO, G.; TIBULLO, D.; GULINO, ME.; SPAMPINATO, M.; AVOLA, R.; LI VOLTI G. The Biochemical and Pharmacological Properties of Ozone: The Smell of Protection in Acute and Chronic Diseases. **Int J Mol Sci.** 1;20(3):634. Feb, 2019. doi: 10.3390/ijms20030634. PMID: 30717203; PMCID: PMC6387239.
- DI PAOLO, N.; BOCCI, V.; GAGGIOTTI, E. Ozone therapy. **Int J Artif Organs.** Milano, 27(3):168-75. Mar, 2004. DOI:10.1177/039139880402700303. Acesso em 08 de out. 2021.
- DING, W.; JIN, W.; CAO, S.; ZHOU, X.; WANG, C.; JIANG, Q.; HUANG, H.; TU, R. S. F. ; WANG, Q. Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water. **Water Research.** Oxford, 160: 339-349, 2019.
- ELVIS, A.M.; EKTA, J.S. Ozone therapy: A clinical review. **J. Nat. Sci. Biol. Med.** 2: 66–70, 2011.
- FERNÁNDEZ, J.; DEL VALLE FERNÁNDEZ, I.; VILLAR, C.J.; LOMBÓ F. Combined laser and ozone therapy for onychomycosis in an in vitro and ex vivo model. **PLoS**

One. 30;16(6):e0253979, Jun, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0253979. PMID: 34191858; PMCID: PMC8244860.

FLOARE, A.D.; DUMITRESCU, R. ALEXA, V.T.; BALEAN, O.; SZUHANEC, C.; OBISTIOIU, D.; COCAN, I.; NEACSU, A.G.; POPESCU, I.; FRATILA, A.D.; GALUSCAN, A. Enhancing the Antimicrobial Effect of Ozone with Mentha piperita Essential Oil. **Molecules.** 21;28(5):2032. Feb, 2023. doi: 10.3390/molecules28052032. PMID: 36903277; PMCID: PMC10004731.

GEWEELY, N.S.I. Antifungal activity of ozonized olive oil (Oleozone). **Int J Agri Biol.** 8(5):671-8, 2006.

GIULIANI, G.; RICEVUTI, G.; GALOFORO, A.; FRANZINI, M. Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone. **Ozone Therapy**, [S. l.] 3(3), 2018. DOI: 10.4081/ozone.2018.7971. Disponível em: <https://www.pagepressjournals.org/index.php/ozone/article/view/7971>. Acesso em: 17 jul. 2023.

GREGORIOU, S.; KYRIAZOPOULOU, M.; TSIOGKA, A.; RIGOPOULOS, D. Novel and Investigational Treatments for Onychomycosis. **J Fungi** (Basel). 14;8(10):1079. Oct, 2022. doi: 10.3390/jof8101079. PMID: 36294644; PMCID: PMC9604567.

GUPTA, A.K.; DAIGLE, D.; CARVIEL, J.L. The role of biofilms in onychomycosis. **J Am Acad Dermatol.** 74(6):1241-6. Jun, 2016. doi: 10.1016/j.jaad.2016.01.008. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27012826.

GUPTA, A.K.; MAYS, R.R.; VERSTEEG, S.G.; SHEAR, N.H.; PIGUET V. Update on current approaches to diagnosis and treatment of onychomycosis. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 16(12):929-938. Dec, 2018. doi: 10.1080/14787210.2018.1544891. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30411650.

GUPTA, A.K.; STEC, N.; SUMMERBELL, R.C.; SHEAR, N.H.; PIGUET, V.; TOSTI, A.; PIRACCINI, B.M. Onychomycosis: a review. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 34(9):1972-1990. Sep, 2020. doi: 10.1111/jdv.16394. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32239567.

GUPTA, AK.; VENKATARAMAN, M.; TALUKDER, M. Onychomycosis in Older Adults: Prevalence, Diagnosis, and Management. **Drugs Aging.** 39(3):191-198. Mar, 2022. doi: 10.1007/s40266-021-00917-8. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35102533.

HERNÁNDEZ, F.; HERNÁNDEZ, D.; ZAMORA, Z.; DÍAZ, M.; ANCHETA, O.; RODRIGUEZ, S.; TORRES D. Giardia duodenalis: effects of an ozonized sunflower oil product (Oleozone) on in vitro trophozoites. **Exp Parasitol.** 121(3):208-12. Mar, 2009. doi: 10.1016/j.exppara.2008.10.009. Epub 2008 Nov 5. PMID: 19010325.

HUANG, J.; HUANG, J.; XIANG, Y.; GAO, L.; PAN, Y.; LU, J. Topical ozone therapy: An innovative solution to patients with herpes zoster]. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.** 28;43(2):168-172. Feb, 2018. Chinese. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.011. PMID: 29559601.

IZADI, M.; KHEIRJOU, R.; MOHAMMADPOUR, R.; ALIYOLDASHI, M.H.; MOGHADAM, S. J.; KHORVASH, F.; JAFARI, N.J.; SHIRVANI, S.; KHALILI, N. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. **Diabetes Metab Syndr.** 13(1):822-825. Jan-Feb, 2019. doi: 10.1016/j.dsx.2018.11.060. Epub 2018 Dec 1. PMID: 30641815.

KADIR, K.; SYAM, Y.; YUSUF, S.; ZAINUDDIN, M. Ozone Therapy on Reduction of Bacterial Colonies and Acceleration of Diabetic Foot Ulcer Healing. **Home Healthc Now.** 38(4):215-220. Jul/Aug, 2020. doi: 10.1097/NHH.0000000000000889. PMID: 32618780.

KUSHWAHA, A.; SHIVAKUMAR, H.N.; MURTHY, S.N. Iontophoresis for drug delivery into the nail apparatus: exploring hyponychium as the site of delivery. **Drug Dev Ind Pharm.** 42(10):1678-82. Oct, 2016. doi: 10.3109/03639045.2016.1165690. Epub 2016 Apr 19. PMID: 26981643.

LEHRER, S.; RHEINSTEIN, P.H. Genome-wide association study of dermatophytosis in the UK Biobank cohort. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 36(12):2482-2487. Dec, 2022. doi: 10.1111/jdv.18413. Epub 2022 Jul 13. PMID: 35796184; PMCID: PMC9669130.

LIPNER, S. R.; SCHER, R.K. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. **J Am Acad Dermatol.** 80(4):835-851. Apr, 2019. doi: 10.1016/j.jaad.2018.03.062. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29959961.

LIPNER, S.R.; SCHER R,K. Onychomycosis: Treatment and prevention of recurrence. **J Am Acad Dermatol.** 80(4):853-867. Apr, 2019. doi: 10.1016/j.jaad.2018.05.1260. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29959962.

LU, J.; GUO, M.; LIGUI, H.; WU, K.; XIANG, Y.; HUANG, J.; GAO, L. Efficacy of combination of ozonated water with oil for treatment of tinea pedis. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.** 28;43(2):147-151. Feb, 2018. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.007. PMID: 29559597.

MA, W, SI C.,; KASYANJU CARRERO LM.; LIU, HF.; YIN, XF.; LIU, J.; XU, Y.; ZHOU, B. Laser treatment for onychomycosis: A systematic review and meta-analysis. **Medicine** (Baltimore). 98(48):e17948. Nov, 2019. doi: 10.1097/MD.00000000000017948. PMID: 31770202; PMCID: PMC6890331.

MACHADO, AU.; CONTRI, R.V. Effectiveness and Safety of Ozone Therapy for Dermatological Disorders: A Literature Review of Clinical Trials. **Indian J Dermatol.** 67(4):479. Jul-Aug, 2022. doi: 10.4103/ijd.ijd_152_22. PMID: 36578725; PMCID: PMC9792021.

MENÉNDEZ, S. FALCÓN, L.; MAQUEIRA, Y. Therapeutic efficacy of topical OLEOZON® in patients suffering from onychomycosis. **Mycoses.** 54(5):e272-7. Sep, 2011. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01898.x. Epub 2010 May 17. PMID: 20492527.

NICKLES, MA.; LIO, PA.; MERVAK, J.E. Complementary and Alternative Therapies for Onychomycosis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. **Skin Appendage Disord.** 8(4):269-279. Jul, 2022. doi: 10.1159/000521703. Epub 2022 Feb 9. PMID: 35983465; PMCID: PMC9274952.

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

OLIVEIRA MODENA D.A.; DE CASTRO FERREIRA R.; FROES, P.M.; ROCHA, K.C. Ozone Therapy for Dermatological Conditions: A Systematic Review. **J Clin Aesthet Dermatol.** 15(5):65-73. May, 2022. PMID: 35642231; PMCID: PMC9122276.

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**, 9(1):14–32, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21973162>. Acesso em: 25 set. 2020.

PETRY, GREICI ET AL. In vitro inactivation of herpes virus by ozone. **Ozone: Science & Engineering**, 36(3):249-252, 2014.

RUBEN, B.S. Pathology of the Nail Unit. **Dermatol Clin.** 39(2):319-336. Apr, 2021. doi: 10.1016/j.det.2020.12.009. PMID: 33745643.

SCHWARTZ, A.; SÁNCHEZ, G. M. Ozone therapy and its scientific foundations. **Ozone Therapy Global Journal.** Madri, 2(1):199-232, 2012. Acesso em 08 de out. 2021.

SECHI L.A. AND OTHERS, Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon), **Journal of Applied Microbiology**, 90: 279-284, Issue 2, 5 Feb, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01235.x>

UGAZIO, E.; TULLIO, V.; BINELLO, A.; TAGLIAPIETRA, S.; DOSIO, F. Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their Characterization, Current Applications, and Advances in Improved Delivery Techniques. **Molecules.** 14;25(2):334. Jan, 2020. doi: 10.3390/molecules25020334. PMID: 31947580; PMCID: PMC7024311.

VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A.; MATHY, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Pathogenesis. **Mycopathologia**, 166: 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**, 165:751–759, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21668434>. Acesso em: 10 jan. 2019.

WAINSTEIN, J. FELDBRIN, Z.; BOAZ, M.; HARMAN-BOEHM I. Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. **Diabetes Technol Ther.** 13(12):1255-60. Dec, 2011. doi: 10.1089/dia.2011.0018. Epub 2011 Jul 13. PMID: 21751891.

WANG, X. Emerging roles of ozone in skin diseases. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.** 28;43(2):114-123. Feb, 2018. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.002. PMID: 29559592.

YOUSSEF, AB.; KALLEL, A.; AZAIZ, Z.; JEMEL, S.; BADA, N.; CHOUCHEM, A.; BELHADJ-SALAH, N.; FAKHFAKH, N.; BELHADJ, S.; KALLEL, K. Onychomycosis: Which fungal species are involved? Experience of the Laboratory of Parasitology-Mycology of the Rabta Hospital of Tunis. **J Mycol Med.** 28(4):651-654. Dec,2018. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.07.005. Epub 2018 Aug 11. PMID: 30107987.

ZENG, J. LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **Int Immunopharmacol.** 56:235-241. Mar, 2018. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.040. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29414657.

ANEXO A – Artigo publicado

OZONE: SCIENCE & ENGINEERING
<https://doi.org/10.1080/01919512.2024.2325944>



Ozone Therapy on Fungi that Cause Onychomycosis

Denise Del Castillo^a, Eliane Mendes Rodrigues^a, Drauzio Rangel^b, Carla Tim^a, Jynani Pichara Morais^a, Ana vitória de Souza Bezerra^a, and Lívia Assis^a 

^aInstituto Científico e Tecnológico, Engenharia Biomédica, Universidade Brasil, São Paulo, 08230-030, Brazil; ^bUniversidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Dois Vizinhos, 85660-000, Brazil

ABSTRACT

Onychomycosis is a common fungal infection of the nails, predominantly caused by dermatophytes and is a notoriously difficult condition to treat. Thus, the objective of the present study was to evaluate and compare, *in vitro*, the efficacy of different applied ozone dosages against the main fungi that cause onychomycosis. Dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum* (ATCC 28,188) and *Microsporium gypseum* (ATCC 24,102) were incubated at 28 °C for 14 days. Treatments were divided into nine experimental groups according to applied ozone dosages: Control Group 0 mg/m²: fungi were cultured but received no treatment; cultured fungi that received ozone therapy for 157, 314, 471, 628, 785 943, 1100 and 1257 mg/m². The main results indicate that topical ozone therapy effectively reduced the germination percentage of *T. rubrum* and *M. gypseum* in all experimental periods, achieving a complete eradication with a treatment time of 628 and 1257 mg/m², respectively. In conclusion, ozone therapy used topically with an applied ozone dosage of 628 mg/m² for *T. rubrum* and 1257 mg/m² for *M. gypseum* promoted antifungal action on the main dermatophytes responsible for critical complications of onychomycosis. Therefore, ozone therapy can be proposed as an adjuvant for dermatological treatments

ARTICLE HISTORY

Received 5 December 2023
 Accepted 26 February 2024

KEYWORDS

Dermatophyte fungi; Fungal stress; Onychomycosis; Ozone; Ozone therapy

Introduction

Onychomycosis is the most common nail disease globally, accounting for about 90% of toenail infections worldwide (Gupta et al. 2020). The disease is predominantly caused by dermatophytes, especially *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), *Trichophyton mentagrophytes*, and occasionally caused by *Microsporium gypseum*, non-dermatophyte molds and yeasts. It most frequently affects the toenails, especially the big toe (Lipner and Scher 2019a; Gupta et al. 2020; Gupta, Venkataraman and Talukder 2022; Youssef et al. 2018).

The risk factors that increase the likelihood of suffering from this disease include age; trauma; diseases, such as diabetes and obesity; immunosuppression; psoriasis (risk increased by 56%); *tinea pedis* infection; genetics (associated with genes such as mhc or hla-dr8); direct transmission from an infected person; and lifestyle habits (sports, smoking, or type of footwear) (Gupta, Venkataraman and Talukder 2022; Lipner and Scher, 2019a; Lipner and Scher 2019b; Lehrer and Rheinstein 2022; Ruben 2021).

The clinical symptoms of this disease are nail discoloration, nail detachment from the nail bed

(onycholysis), and hyperkeratosis. These symptoms can reduce the patient's quality of life due to local pain, paresthesia, stress, loss of self-esteem, and hindered social relationships (Lipner and Scher 2019a; Lipner and Scher 2019b).

Onychomycosis is a condition that does not resolve on its own and can lead to a more severe or widespread disease (Nickles, Lio and Mervak 2022). Treatments usually available for onychomycosis include surgery and medicine (topical or oral anti-fungal). However, serious adverse effects are still observed due to the long administration period and low cure rates (Gupta et al. 2018). According to Nickles et al. (2022), the condition is notoriously difficult to treat due to the thick barrier of the nail plate, biofilm formation, emergence of drug-resistant fungi, and high rates of reinfection (Gupta et al. 2020; Gupta, Daigle and Carviel 2016).

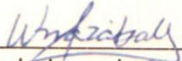
Therefore, more research is important to develop and investigate complementary treatment strategies for this clinical condition (Gregoriou et al. 2022; Nickles, Lio and Mervak 2022). The literature shows that various therapeutic resources have been studied to manage onychomycosis (Chen et al. 2019; Kushwaha, Shivakumar and Murthy 2016; Ma et al. 2019). In recent years,

CONTACT Lívia Assis  livinha_fisio@yahoo.com.br  Instituto Científico e Tecnológico, Engenharia Biomédica, Universidade Brasil, São Paulo, Itaquera SP 08230-030, Brazil

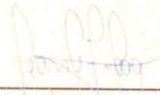
© 2024 International Ozone Association

ANEXO B – Certificado de Excelência acadêmica**CERTIFICADO DE EXCELÊNCIA ACADÊMICA**

Certificamos que o trabalho intitulado **“Eficácia da ozonioterapia em fungos causadores de onicomicoses: estudo in vitro”** tendo como autores **Denise Vivianni Ferreira Del Castelo, Eliane M. Rodrigues, Drauzio E. N. Rangel, Carla Roberta Tim, Jynani Pichara e Lívia Assis**, foi apresentado e premiado como o melhor trabalho na categoria **Enfermagem e Pesquisa** durante o **V Encontro Científico Internacional de Ozonioterapia e VII Simpósio Internacional de Ozonioterapia na Medicina Veterinária**, promovido pelo Instituto Brasileiro de Ozônio e suas Aplicações, realizado em **Campinas-SP** nos dias **30 de junho e 01 e 02 de julho de 2023**.



Wilfredo Irrazabal Urruchi
Coordenador Geral



Jean G. Fernandes Joaquim
Coordenador Científico

ANEXO C – Apresentação de trabalho em Congressos Internacionais

14/10/2022 17:26

Certificado

Verify the authenticity code 839165.5387198.882646.0.0472660817488852329 at <https://www.even3.com.br/documentos>

XIII
International
Fungal
Biology
Conference

FAPESP

ISFUS

IFBC

IV
International
Symposium
on Fungal
Stress

CAPES

Certificate of Presentation

Effect of ozone on conidial survival of the fungi *Trichopyton rubrum* and *Microsporium gypseum*

*Denise Vivianni Ferreira Del Castelo, ELIANE MENDES RODRIGUES,
DRAUZIO EDUARDO NARETTO RANGEL, Livia. Assis, Carla Roberta
Tim and Jynani Pichara Morais*

Dr. Jesus Aruirre
Chair – IFBC

September 25 – 29, 2022
São José dos Campos, SP, Brazil

Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel
Chair – ISFUS

<https://www.even3.com.br/documentos/imprimir?i=839165.5387198.882646.0.0472660817488852329&cc=64FD39AB-D7FE-4935-B0F9-08A996EA0EB3>

ANEXO C – Apresentação de trabalho em Congressos Nacionais



Certificado

Certificamos que o trabalho "Eficácia da ozonioterapia em fungos causadores de onicomicoses: Estudo in vitro" de autoria de Denise Viviani Ferreira Del Castillo, Eliane M. Rodrigues, Drauzio E. N. Rangel, Carla Roberta Tim, Jynani Pichara e Lívia Assis, foi apresentado no V Encontro Científico Internacional de Ozonioterapia e VII Simpósio Internacional de Ozonioterapia na Medicina Veterinária, promovido pelo Instituto Brasileiro de Ozônio e suas Aplicações, realizado em Campinas-SP nos dias 30 de junho e 01 e 02 de julho de 2023.

Wilfredo Irazabal Urruchi
Coordenador Geral

Jean G. Fernandes Joaquim
Coordenador Científico



III CONTEC BRASIL

III Congresso Acadêmico e Tecnológico da Universidade Brasil

XVI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
IV SIMPÓSIO CIENTÍFICO DA ÁREA DA SAÚDE

CERTIFICAMOS QUE

Denise Viviani Ferreira Del Castillo

participou como ouvinte no III CONGRESSO ACADÊMICO E TECNOLÓGICO DA UNIVERSIDADE BRASIL – III CONTEC BRASIL, realizado em formato remoto, via canal do YouTube, organizado pela Pró-Reitoria de Pós-graduação da UNIVERSIDADE BRASIL, nos dias 29 e 30 de novembro de 2022, com carga horária de 20 horas.

Prof.ª Dr.ª Talita dos Santos Molina
Presidente do III CONTEC