



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“ESTUDO *IN VITRO* DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DOS
MICROORGANISMOS CAUSADORES DA ESPOROTRICOSE”**

Amanda Regina Rocha

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

* bolsista EMBRAPPII

**São Carlos - SP
2023**

AMANDA REGINA ROCHA

“Estudo *in vitro* da Inativação Fotodinâmica dos microrganismos causadores da esporotricose”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Instituto de Física (IFSC) - Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) - UFSCar

Prof. Dra. Ana Paula da Silva

Instituto de Física (IFSC) - Universidade de São Paulo - USP

São Carlos
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de aprovação
(após a defesa)

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Mestrado da candidata Amanda Regina Rocha, realizada em 02/06/2023:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
Instituto de Física (IFSC) - Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) - UFSCar

Dra. Ana Paula da Silva
Instituto de Física (IFSC) - Universidade de São Paulo

A minha mãezinha, Marlene (*in memoriam*), por todo amor dado ao longo de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre, em primeiro lugar, a minha família por todo apoio dado ao longo dessa jornada que é a vida. Agradeço, especialmente, a minha mãe que nos deixou tão recentemente e não conseguiu estar presente nessa data.

Aos meus gatinhos, Rita, Rei, Neném e Brioche, pelos abraços e companhia madrugada adentro, escrevendo minha dissertação.

Um agradecimento muito mais que especial a profa. Hilde Harb Buzzá, que pegou na minha mão desde a graduação e apresentou esse lindo caminho da Ciência. Você é grande, uma inspiração. Palavras não conseguem expressar minha gratidão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, pela oportunidade e confiança e por tanto contribuir com a Ciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, assim como ao corpo docente por todo ensinamento e por tudo o que agregaram na minha formação.

Ao grupo de Biofotônica pela ajuda, dicas e apoio e pelas discussões de artigo, em especial a Natalia Mayumi Inada e todo o grupo da microbiologia e resistência microbiana.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem, prontamente, participar deste evento e por contribuírem com a minha formação.

A Embrapii pelo apoio financeiro nesses anos.

Rocha, Amanda Regina. **Estudo *in vitro* da Inativação Fotodinâmica dos microrganismos causadores da esporotricose**. 2023. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

RESUMO

A esporotricose é uma zoonose causada pelo *Sporothrix* spp., fungo causador de uma micose subcutânea que pode progredir e se tornar sistêmica em indivíduos imunocomprometidos. O tratamento convencional é baseado no uso prolongado de antifúngicos, o qual pode ocasionar muitos efeitos colaterais e, por essa razão, faz-se necessário o estudo de alternativas que sejam eficientes para o controle da doença. O presente estudo teve por objetivo mostrar a eficácia do uso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) usando a curcumina como fotossensibilizador (FS) no controle dos fungos *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, e a *Candida albicans* como parâmetro comparativo dos resultados. Além de mostrar os melhores parâmetros de combinação da TFDa com os antifúngicos tradicionais contra esses microrganismos. Os fungos foram iluminados em Biotable® (dispositivo de iluminação com 24 LEDs distribuídos uniformemente) em comprimento de onda de 450 nm e dose de luz de 31,5 J/cm² e concentrações de fotossensibilizador que variaram 0,75 a 150 µg/mL de curcumina. Após determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do itraconazol, cetoconazol e iodeto de potássio, a terapia antifúngica foi combinada com a TFDa para verificar se, mesmo doses subinibitórias dos fármacos utilizados seriam capazes de eliminar o *Sporothrix* spp. Foram utilizadas concentrações de 1,5 a 15 µg/mL de curcumina e as concentrações dos fármacos reduzindo a dose a partir da metade dos valores de CIM obtidos. Foi encontrado um protocolo eficiente de inativação de todos os microrganismos estudados com a TFDa como tratamento único e, em relação ao seu uso combinado com o tratamento convencional, os melhores resultados foram obtidos com a realização da TFDa antes dos antifúngicos, chegando à eliminação total da *C. albicans*, do *S. brasiliensis* e do *S. schenckii* mesmo com as subdoses tanto do fotossensibilizador como do antifúngico. Para entender o motivo pelo qual a ordem das terapias era tão importante, foram feitos estudos do espectro de absorção dos compostos individuais e de como a combinação poderia influenciar na dinâmica da fotodegradação desses compostos. O presente estudo sugere que a TFDa usando a curcumina como fotossensibilizador pode ser uma alternativa promissora no combate a esporotricose, principalmente na medicina veterinária aplicada em gatos, seja como terapia individual, seja como coadjuvante. Na associação das terapias, foram encontrados protocolos *in vitro* que resultaram em um efeito sinérgico na inativação dos microrganismos, podendo resultar em melhor resposta ao tratamento em relação a redução do tempo de cura e dosagem dos medicamentos usados, o que reflete em redução de custos, assim como redução de efeitos colaterais causados pelo prolongado dos antifúngicos.

Palavras-chave: *Sporothrix*, esporotricose, terapia fotodinâmica antimicrobiana, curcumina, zoonose, doenças tropicais negligenciadas.

Rocha, Amanda Regina. ***In vitro* study of the Photodynamic Inactivation of sporotrichosis microorganisms**. 2023. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a zoonosis caused by *Sporothrix* spp., a fungus that causes a subcutaneous mycosis which can become systemic in immunocompromised individuals. Conventional treatment is based on the prolonged use of antifungals, which can cause many side effects and, to improve on this, it is necessary to study efficient alternatives. The present study aims to show the effectiveness of Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) using curcumin as a photosensitizer in the control of *S. brasiliensis* and *S. schenckii*, and *Candida albicans* as a comparative parameter for results. In addition to showing the best parameters for combining aPDT with traditional antifungals against these microorganisms. The fungi were illuminated via a Biotable® (lighting device with 24 evenly distributed LEDs) at a wavelength of 450 nm and a light dose of 31.5 J/cm² with photosensitizer concentrations ranging from 0.75 to 150 µg/mL of curcumin. After determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the itraconazole, ketoconazole and potassium iodide, antifungal therapy was combined with aPDT to verify whether subinhibitory doses of these drugs would be able to eliminate *Sporothrix* spp. Concentrations of 1.5 to 15 µg/mL of curcumin were used, and the dosages of the drugs reducing the dose from half of the MIC values obtained. An efficient protocol for the inactivation of all microorganisms studied was found with a single application of aPDT and with aPDT combined with conventional treatment. The best results were obtained with aPDT application prior to antifungals, causing the total elimination of the *Sporothrix* spp. in addition to *C. albicans*, even with underdoses of both the photosensitizer and antifungal drugs. To better understand the impact of the order of therapies, studies were made of the absorption spectrum of individual compounds and how the combination could influence the dynamics of photobleaching of these compounds. The present study suggests that aPDT using curcumin as a photosensitizer may be a promising alternative to combat sporotrichosis. This treatment would be especially effective in veterinary medicine to be applied in cats as an individual therapy or as a coadjuvant. In the combination of therapies, *in vitro* protocols result in a synergistic effect in the inactivation of microorganisms. This could improve the treatment of the disease, with a reduction in both the recuperation time and dosage of drugs used, significant benefits of this approach are overall cost reductions and lessened side effects due to preventing the prolonged use of antifungals, while achieving an effective overall treatment.

Keywords: *Sporothrix*, sporotrichosis, antimicrobial photodynamic therapy, curcumin, zoonose, neglected tropical diseases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Macroscopia do fungo *Sporothrix brasiliensis* em sua forma filamentosa (A) e leveduriforme (B) e do *S. schenckii* em suas formas filamentosa (C) e leveduriforme (D) cultivados em placa de Petri em meio Sabouraud Dextrose Ágar. Elaborada pela autora. 17
- Figura 2.** Microscopia óptica das formas do *S. brasiliensis* em aumento de 40x. (A) forma filamentosa, com destaque para os conídios agrupados ao redor das hifas. (B) as leveduras do fungo. Elaborada pela autora. 17
- Figura 3.** *S. schenckii* com pigmentação enegrecida devido a presença da melanina como fator de virulência. Fonte: Elaborada pela autora. 18
- Figura 4.** Estados brasileiros onde a esporotricose está presente em (A) humanos e (B) gatos. Adaptado. Fonte: RODRIGUES, 2020. 19
- Figura 5.** Felino apresentando lesões nodulares em cabeça e lesão ulcerada em membro anterior esquerdo, compatíveis com lesões de esporotricose. Fonte: Elaborada pela autora. 21
- Figura 6.** Diagrama de Jablonski (adaptado). Fonte: SANTOS, 2018. 26
- Figura 7.** Espectro de absorção da curcumina com pico em 423 nm. Fonte: Elaborada pela autora. 28
- Figura 8.** Equipamento de luz chamado Biotable, desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico da USP (LAT – USP), emitindo luz em comprimento de onda equivalente a luz azul ($\lambda=450$ nm). Fonte: Elaborada pela autora. 33
- Figura 9.** Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada nos testes de determinação da CIM. A linha A foi reservada para o controle de esterilidade do teste e as linhas F, G e H, para o controle de crescimento fúngico, sendo F *C. albicans*, G *S. brasiliensis* e H *S. schenckii*. Nas linhas B, C e D foram testadas *C. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, respectivamente. Nas colunas de 1 a 10 foram realizadas as diluições dos antifúngicos testados. Fonte: Elaborada pela autora, 2023. 35
- Figura 10.** Terapia antifúngica aplicada antes da TFDa na associação das duas técnicas. 37
- Figura 11.** TFDa aplicada antes do medicamento antifúngico na associação das duas técnicas. 37
- Figura 12.** Dinâmica do crescimento microbiano, expresso em UFC/mL, em relação com os dias de cultivo dos fungos *S. brasiliensis* e *S. schenckii* para as formas

filamentosa (A) e leveduriforme (B), com destaque, em verde, para a região equivalente a dia de estabilização da curva de crescimento.....	39
Figura 13. Filamento de <i>S. brasiliensis</i> em microscopia confocal mostrando a capacidade da curcumina em penetrar na parede celular do fungo.....	42
Figura 14. Controle de toxicidade do agente fotossensibilizador em diferentes concentrações e da luz utilizados isoladamente na <i>C. albicans</i> , no <i>S. brasiliensis</i> e no <i>S. schenckii</i>	43
Figura 15. Inativação Fotodinâmica dos fungos <i>C. albicans</i> , <i>S. brasiliensis</i> e <i>S. schenckii</i> . A concentração de 0,75 µg/mL foi capaz de reduzir, em média, 1 log de todos os fungos estudados. A eliminação da <i>C. albicans</i> e do <i>S. brasiliensis</i> ocorreu com a concentração de 15 µg/mL de curcumina. O <i>S. schenckii</i> foi eliminado com a concentração de 7,5 µg/mL de curcumina.	44
Figura 16. Redução na população de <i>C. albicans</i> com o uso do itraconazol em associação com a TFDa em ordem de aplicação alternada.....	50
Figura 17. Redução na população de <i>C. albicans</i> com o uso do cetoconazol associado a TFDa em ordem de aplicação alternada.	51
Figura 18. Redução na população de <i>C. albicans</i> com o uso do iodeto de potássio em associação com a TFDa em ordem de aplicação alternada.....	51
Figura 19. Redução na população de <i>S. brasiliensis</i> com o uso do itraconazol em associação com a TFDa em ordem de aplicação alternada.....	52
Figura 20. Redução na população de <i>S. brasiliensis</i> com o uso do cetoconazol associado com a TFDa em ordem de aplicação alterada.	53
Figura 21. Redução na população de <i>S. brasiliensis</i> com o uso do iodeto de potássio em associação com a TFDa em ordem de aplicação alterada.	53
Figura 22. Redução na população de <i>S. schenckii</i> com o uso do itraconazol em associação com a TFDa em ordem de aplicação alternada.....	54
Figura 23. Redução na população população de <i>S. schenckii</i> com o uso do cetoconazol associado com a TFDa em ordem de aplicação alternada.	55
Figura 24. Redução na população de <i>S. schenckii</i> com o uso do iodeto de potássio e em associação com a TFDa em ordem de aplicação alternada.....	55
Figura 25. Espectro da curcumina, iodeto de potássio, cetoconazol e itraconazol, mostrando pico de absorção na região do azul e violeta para a curcumina e iodeto de potássio, respectivamente. O itraconazol e o cetoconazol não apresentam pico.	59

Figura 26. Espectro de absorção da curcumina ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A). Análise da fotodegradação da curcumina (B).	60
Figura 27. Espectro de absorção do iodeto de potássio ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A) e análise da sua fotodegradação (B).	60
Figura 28. Espectro de absorção da solução de curcumina e itraconazol ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A) e análise da sua fotodegradação (B).	61
Figura 29. Espectro de absorção da solução de curcumina e cetoconazol ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A) e análise da sua fotodegradação (B).	62
Figura 30. Espectro de absorção da solução de curcumina e iodeto de potássio ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A) e análise da sua fotodegradação (B).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica do fungo <i>Sporothrix</i>	16
Tabela 2. Principais fármacos utilizados no tratamento da esporotricose	22
Tabela 3. Relação da densidade óptica em relação aos dias de cultivo das formas de levedura e filamentosa para os fungos <i>S. brasiliensis</i> e <i>S. schenckii</i>	40
Tabela 4. CIM da <i>C. albicans</i> , <i>S. brasiliensis</i> e <i>S. schenckii</i> para os agentes antifúngicos itraconazol (ITZ), cetoconazol (KTZ) e iodeto de potássio (KI)	48

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução	16
1.1 Características gerais da esporotricose	16
1.1.2 Tratamentos convencionais.....	22
1.2 Terapia Fotodinâmica antimicrobiana.....	24
1.2.1 Mecanismo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.....	25
1.3 Fotossensibilizadores - Curcumina.....	27
1.4 Objetivos	29
1.4.1 Objetivos gerais.....	29
1.4.2 Objetivos específicos.....	29
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	31
2.1 Microrganismos	31
2.1.1 <i>Sporothrix</i> spp.	31
2.1.2 <i>Candida albicans</i>	31
2.2 <i>Curva de Crescimento</i>	32
2.3 Determinação do intervalo droga-luz.....	32
2.4 Parâmetros da TFDa	32
2.5 Grupos experimentais TFDa.....	33
2.6 Análise da eficácia da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana	34
2.7 Concentração inibitória mínima	34
2.7.1 Itraconazol e Cetoconazol	35
2.7.2 Iodeto de Potássio.....	36
2.8 Associação de terapias	36
2.9 Determinação da taxa de fotobranqueamento.....	38
2.10 Análise estatística	38
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	39
3.1 Curva de crescimento.....	39
3.2 Determinação intervalo droga-luz.....	41
3.3 Terapia Fotodinâmica antimicrobiana.....	43
3.4 Concentração inibitória mínima	47
3.5 Associação de terapias	49
3.6 Taxa de fotobranqueamento	58
Capítulo 4 – Conclusões	64

Referências	66
--------------------------	-----------

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Características gerais da esporotricose

O *Sporothrix* spp., microrganismo causador da esporotricose, é um fungo termodimórfico pertencente à Família *Ophiostomataceae* e que está presente em solos ricos em material orgânico e na vegetação (IVIDY, 2019). Sua classificação taxonômica é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonômica do fungo *Sporothrix*.

Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Ordem	<i>Ophiostomales</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Subclasse	<i>Euascimycetes</i>
Família	<i>Ophiostomatacea</i>
Gênero	<i>Sporothrix</i>

Fonte: LIMA, 2020.

Pode se apresentar na forma filamentosa, quando cultivado na faixa de temperatura de 25 a 30 °C, e em forma de levedura, quando cultivado na faixa de 35 a 37 °C ou presente no tecido animal, sendo esta última também conhecida como forma parasitária (IVIDY, 2019). A forma filamentosa é caracterizada por hifas hialinas septadas e grupos de conídios, podendo ser globosos ou ovais. Macroscopicamente, essa forma pode apresentar coloração branca, marrom ou enegrecida em razão da produção de melanina. As leveduras apresentam, microscopicamente, forma alongada de charuto ou ovais e globosas, já suas colônias, macroscopicamente, são lisas e apresentam coloração creme (LIMA, 2020). A Figura 1 mostra a macroscopia de leveduras e de filamentos de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* com coloração branca e a Figura 2 mostra as duas formas do *S. brasiliensis* ao microscópio óptico.

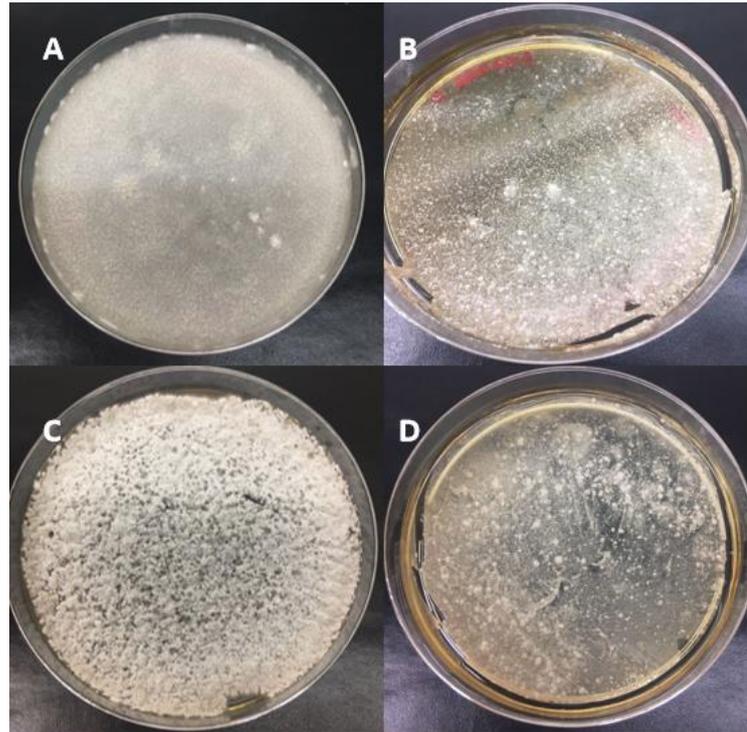


Figura 1. Macroscopia do fungo *Sporothrix brasiliensis* em sua forma filamentosa (A) e leveduriforme (B) e do *S. schenckii* em suas formas filamentosa (C) e leveduriforme (D) cultivados em placa de Petri em meio Sabouraud Dextrose Ágar. Elaborado pela autora, 2023.

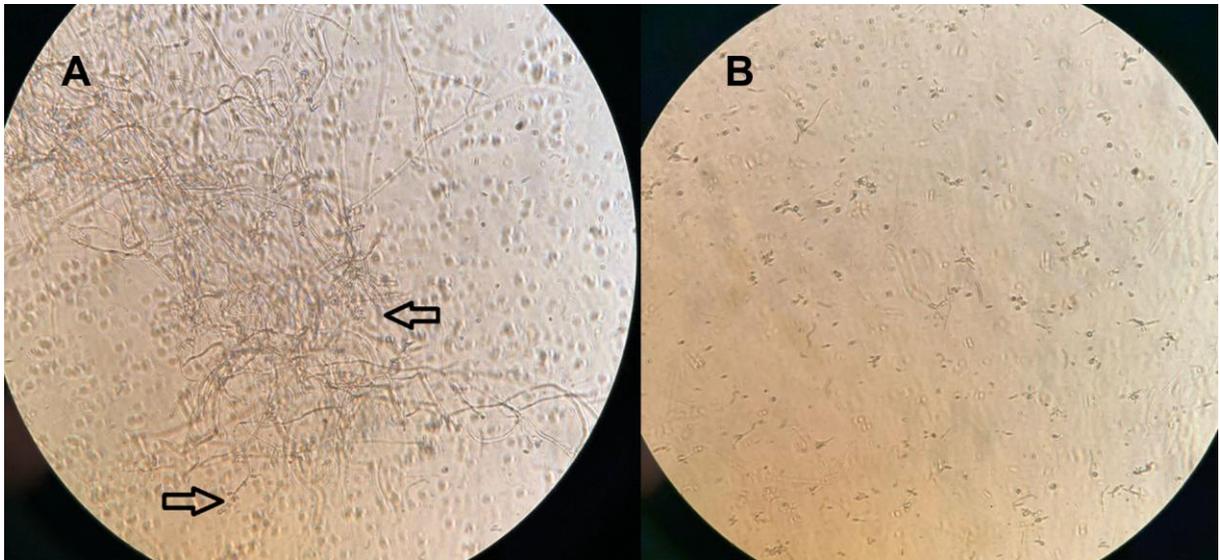


Figura 2. Microscopia óptica das formas do *S. brasiliensis* em aumento de 40x. (A) forma filamentosa, com destaque para os conídios agrupados ao redor das hifas. (B) as leveduras do fungo. Elaborado pela autora, 2023.

Estudos recentes propõem o agrupamento dos 53 gêneros encontrados em clados, justificado pela existência de diferentes características epidemiológicas e de virulência entre as espécies. O clado patogênico agrupa as espécies capazes de causar danos consideráveis a saúde. Neste clado estão inclusos o *S. brasiliensis*, *S.*

schenckii, *S. globosa* e o *S. luriei*, espécies mais relatadas em infecções humanas e animais. O clado ambiental, com maior número de exemplares, abrange espécies raramente associadas às infecções (RODRIGUES, 2020).

Além do dimorfismo e da produção de enzimas extracelulares que facilitam sua adesão a célula hospedeira, o *Sporothrix* spp. possui a melanina como fator de virulência. A melanina confere ao fungo a coloração enegrecida, como mostrado na Figura 3, o protege contra a fagocitose do sistema imune, contra a ação de fármacos e de raios ultravioletas. Esses mecanismos garantem a sua sobrevivência no ambiente e no tecido animal estando associados ao impacto que causam em um hospedeiro (MARIO, 2015).



Figura 3. *S. schenckii* com pigmentação enegrecida devido à presença da melanina como fator de virulência. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O *Sporothrix* spp. foi descrito pela primeira vez por Benjamin Schenck em 1898, nos Estados Unidos, após cultivo e isolamento do microrganismo coletado de lesões ulceradas de um paciente do Hospital John Hopkins, em Baltimore. Entretanto, em relação a distribuição mundial, o agente causador da esporotricose possui uma maior ocorrência em países de clima tropical e subtropical. O maior surto envolvendo humanos ocorreu entre os anos de 1938 e 1949, na África do Sul, no qual mais de 3 mil trabalhadores de uma mina foram infectados pelo microrganismo (RODRIGUES, 2020). Um grande aumento no número de casos foi relatado no

Japão entre as décadas de 40 e 80, com redução significativa na casuística depois desse período, após mudanças nas práticas agrícolas, as quais afastaram os trabalhadores do contato direto com o solo. Na China, são relatados inúmeros casos da esporotricose, principalmente no nordeste do país. Além do continente Africano e Asiático, a doença também foi relatada na Oceania e América Latina, tendo praticamente desaparecido da Europa após a Segunda Guerra Mundial. Nos EUA, o maior surto já registrado foi em 1988, com 84 casos relatados (CHAKRABARTI, 2015).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1907 por Adolfo Lutz e Alfonso Splendore em estudos com ratos e humano, a partir de infecções causadas naturalmente. Desde então, o número de casos da esporotricose humana e felina vem crescendo, e já é relatada em quase todos os estados brasileiros, principalmente no Rio de Janeiro, outros estados do Sudeste e do Sul, com aumento da casuística no Nordeste, especialmente no Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, segundo levantamentos recentes, como mostrado na Figura 4 (RODRIGUES, 2020).

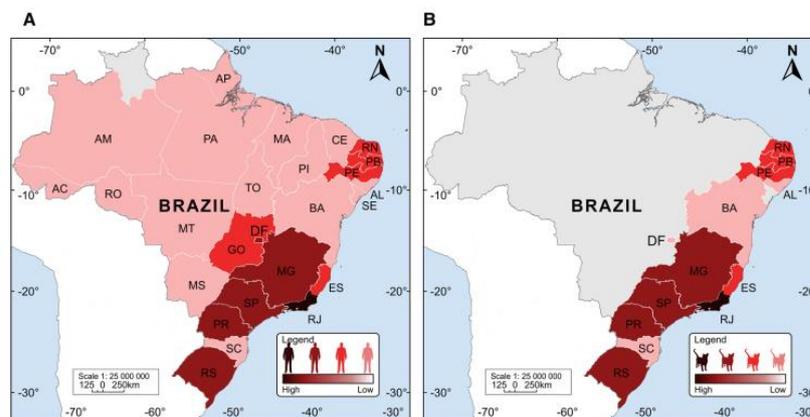


Figura 4. Estados brasileiros onde a esporotricose está presente em (A) humanos e (B) gatos. Adaptado. Fonte: RODRIGUES, 2020.

No estado do Rio de Janeiro a doença possui notificação compulsória, devido ao número exorbitante de casos relatados, o que faz a esporotricose ser considerada hiperendêmica na região. Nos anos de 1997 a 2015, foram registrados 4.517 casos de esporotricose em humanos e, de 1998 a 2018, 5.113 gatos, segundo a Fundação Osvaldo Cruz (GREMIÃO *et al.*, 2020). Nos casos acometendo humanos, a maioria dos infectados possuía nível socioeconômico mais baixo e se tratavam de mulheres acima de 40 anos, responsáveis pelos afazeres domésticos e

cuidados com os animais ou, ainda, crianças que costumavam brincar com animais infectados (VIANA, 2016).

Devido ao difícil acesso aos casos ocorridos nos estados onde a notificação não é compulsória, acredita-se que o número de animais e humanos infectados seja muito maior do que o estimado. Desde 2020, passaram a ter notificação obrigatória também o estado de Mato Grosso do Sul e Pernambuco, o município de São Paulo, Guarulhos (São Paulo), Camaçari (Bahia) e Conselheiro Lafaiete (Minas Gerais) (GOVERNO DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL, 2021; PREFEITURA DE SÃO PAULO, 2020)

O gato doméstico é o principal animal envolvido na transmissão da esporotricose, mas a doença já foi reportada em raposas, cães e cavalos. O gato adquire a doença naturalmente e inocula as leveduras, presentes em grande quantidade na sua cavidade oral e unhas, através da mordedura e arranhadura. Devido às características comportamentais inerentes à espécie felina, como marcação territorial através da arranhadura em tronco de árvores, brigas territoriais e durante o acasalamento, o ato do *grooming* e pelo hábito de cobrir seus dejetos com terra para despistar possíveis predadores, a incidência da esporotricose em gatos é maior. Portanto, gatos de vida livre ou semi-domiciliados, machos e não castrados possuem a maior probabilidade de contrair a doença (FIOCRUZ, 2018).

A infecção pelo *Sporothrix* spp. em humanos está relacionada a traumas na pele ocasionados por acidentes envolvendo matéria vegetal contaminada ou mordedura e arranhadura ocasionadas por animais infectados. A inoculação também pode ser realizada através do contato com o exsudato das lesões contaminadas e através do manuseio do fungo em laboratório (FIOCRUZ, 2018).

A esporotricose também é considerada uma doença ocupacional, pois profissionais que atuam com jardinagem, agricultura, laboratório e médicos veterinários são os mais predispostos a contrair a doença (FIOCRUZ, 2018). O tempo de incubação e aparecimento dos sintomas varia de acordo com a forma na qual o hospedeiro se infectou, sendo maior quando a contaminação se dá pelo contato com os filamentos, uma vez que eles sofrerão mudanças até se tornarem leveduras e colonizarem o tecido subcutâneo (hipoderme) do hospedeiro (BARR; BOWMAN, 2010; MARIO, 2015).

O diagnóstico da esporotricose se dá através da associação do histórico do paciente, dos dados epidemiológicos da região e do exame físico, no qual será

observada a presença de pústulas, lesões ulceradas e nodulares (BARR; BOWMAN, 2010; MARIO, 2015).

A esporotricose pode se manifestar na forma cutânea, linfocutânea e sistêmica. Na forma cutânea há o surgimento de feridas ou abscessos em tronco, cabeça ou membros e que, se não tratadas inicialmente, podem progredir para a formação de nódulos firmes, de aspecto semelhante ao um rosário, após sua disseminação pelos vasos linfáticos, caracterizando a forma linfocutânea da doença (IVIDY, 2019). A forma sistêmica é rara e costuma acometer indivíduos imunocomprometidos nos quais as lesões podem ser encontradas em ossos e articulações, pulmões e sistema nervoso e o hospedeiro pode apresentar mal-estar e febre (BARR; BOWMAN, 2010; FIOCRUZ, 2018; IVIDY, 2019). A Figura 5 mostra um paciente felino apresentando lesões nodulares e ulceradas na cabeça e uma lesão ulcerada no membro onde houve a inoculação inicial do fungo.



Figura 5. Felino apresentando lesões nodulares em cabeça e lesão ulcerada em membro anterior esquerdo, compatíveis com lesões de esporotricose. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A partir da observação das lesões, o clínico pode confirmar o diagnóstico, muitas vezes, através da citologia obtida a partir do exsudato das lesões, histologia do tecido comprometido e cultura do material coletado, sendo este último considerado o padrão ouro no diagnóstico da esporotricose. Exames sorológicos e PCR ainda são pouco utilizados na rotina por apresentarem alto custo (IVIDY, 2019).

1.1.2 Tratamentos convencionais

O tratamento da esporotricose deve ser precoce para evitar a progressão da doença, especialmente em imunossuprimidos, pois pode causar o óbito destes indivíduos (GOVERNO DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL, 2021). O tratamento mais utilizado é a administração de antifúngicos orais, porém, seu uso pode ocasionar muitos efeitos colaterais, como anorexia, vômito, náusea e danos hepáticos. A Tabela 2 mostra a variedade de drogas antifúngicas que podem ser empregadas no tratamento, mas, a escolha do fármaco depende da apresentação e extensão da lesão, agente etiológico e da condição imunológica no paciente. O fármaco de escolha é o itraconazol, que pode ser associado ao iodeto de potássio em casos irresponsivos. O cetoconazol pode ser utilizado, porém está mais associado a efeitos colaterais nos pacientes do que qualquer outro medicamento. Na medicina humana, podem ser empregados a terbinafina, o fluconazol e a anfotericina B, porém, são poucos os estudos destas drogas na Medicina Veterinária (ROCHA, 2014; GUIMARÃES; GÓRNIK, 2017; GREMIÃO *et al.*, 2020; RODRIGUES, 2020).

Tabela 2. Principais fármacos utilizados no tratamento da esporotricose

Grupo	Mecanismo de ação	Princípio ativo	Características	Efeitos colaterais
Triazóis	Inibição da síntese de ergosterol, causando alteração na permeabilidade da membrana.	Itraconazol	- Altamente lipofílico - Biotransformação hepática	Náuseas, dores abdominais, embriotoxicidade, teratogênico.
		Fluconazol	- Excreção renal	Náuseas, dores abdominais, vômito, diarréia, lesões cutâneas.
Imidazóis	Inibição da síntese de ergosterol, causando alteração na permeabilidade da membrana.	Cetoconazol	- Melhor absorvido em pH ácido - Biotransformação hepática	Êmese, náuseas, distúrbios em trato gastrointestinal, dores abdominais, inapetência, prurido, alopecia, elevação das enzimas hepáticas, inibição da síntese de

				testosterona, teratogênico.
Poliênicos	Comprometimento do metabolismo celular através de ligações irreversíveis ao ergosterol.	Anfotericina B	- Produzida pelo <i>Streptomyces nodosus</i> - Efeito fungostático	Nefrotóxicidade, alteração eletrolítica, calafrios, febre, flebite.
Alilaminas	Alteração na síntese do ergosterol, através da inibição da enzima esqualeno epoxidase.	Terbinafina	- Ceratinofílico - Altamente lipofílico - Atividade fungicida ou fungistática - Biotransformação hepática	Distúrbios em trato gastrointestinal
Outros	Modulação da resposta imune do hospedeiro	Iodeto de Potássio	- Baixo custo - Hidrossolúvel - Fotossensível	Secreção ocular e nasal, êmese, anorexia. Contraindicado em tireoideopatas.

Fonte: GUIMARÃES; GÓRNIAC, 2017.

A terapia realizada por antifúngicos é de longa duração, sendo utilizada em média, durante 3 a 12 meses. Após a cura clínica, que se dá após o desaparecimento das lesões, recomenda-se que o fármaco ainda seja administrado por mais 1 a 2 meses e, em caso de recidiva, recomenda-se que o medicamento seja utilizado em dosagem dobrada (GREMIÃO *et al.*, 2020).

Especialmente para casos veterinários, a longa duração do tratamento, o alto custo dos medicamentos e a dificuldade em administrar o fármaco nos pacientes felinos, assim como a dificuldade em manter os animais doentes isolados, a falta de guarda responsável e a grande incidência de efeitos colaterais, Todos esses fatores podem levar os proprietários dos animais doentes a recorrer a eutanásia ou, ainda, ao abandono dos animais, o que contribui para a disseminação da doença no ambiente (GREMIÃO *et al.*, 2020).

Todos esses problemas, somados ao surgimento de cepas resistentes impulsionam a busca por novas modalidades terapêuticas que sejam eficazes,

rápidas, tenham baixo custo e que sejam de fácil administração no tratamento da esporotricose.

Nesse campo, surgiram a termoterapia, a exérese cirúrgica e a criocirurgia que são modalidades recentes no tratamento da esporotricose e que só podem ser empregadas após análise criteriosa das lesões (GREMIÃO *et al.*, 2020; RODRIGUES, 2020). A Inativação Fotodinâmica surge como alternativa aos tratamentos existentes, pois vem mostrando eficácia na cura de infecções causadas por microrganismos em estudos recentes, principalmente para doenças de pele, inclusive contra o *Sporothrix* spp., utilizando diferentes fotossensibilizadores, como o complexo de rutênio (TIBURCIO *et al.*, 2022), metilaminolevulinato (GILABERT *et al.*, 2014) e o azul de Metileno (LI *et al.*, 2019).

1.2 Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

A Terapia Fotodinâmica (TFD), também conhecida como “PDT” (do inglês, *Photodynamic Therapy*) é uma técnica empregada no tratamento de tumores, infecções causadas por microrganismos, na agricultura e na descontaminação de alimentos. Essa técnica utiliza a interação simultânea da luz, de uma substância fotossensibilizadora (FS) e do oxigênio molecular que, juntos levam a reações fotoquímicas causadoras de morte celular de espécies-alvo. Quando utilizada no controle microbiológico de bactérias, fungo e vírus é denominada Inativação Fotodinâmica (IFD) ou Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) (VOLLET-FILHO; INADA, 2017).

O uso da luz como terapia não é recente e vem sendo relatado desde a Antiguidade, pelos egípcios, com o uso da luz solar para tratar enfermidades físicas e mentais (PRATAVIEIRA *et al.*, 2015). As primeiras observações sobre a interação de substâncias atóxicas e luz visível foram acidentais, realizadas pelo alemão Oscar Raab durante seus estudos sobre o agente causador da malária, no período de 1897 a 1898, ao incidir luz branca em culturas de *Paracecium caudatum* impregnadas com corante acridina, sendo, essa interação capaz de gerar um efeito citotóxico no parasita. Em 1975, foram tratados tumores em camundongos, pela primeira vez, utilizando a Terapia Fotodinâmica e, em 1976 foi iniciado um estudo sobre os efeitos da técnica em câncer de bexiga em humanos (SOARES, 2019). Os primeiros estudos no Brasil tiveram início no ano de 1998 em tumores humanos e, desde

então, grupos de pesquisas e hospitais vem trabalhando em parcerias para aprimoramento e divulgação da PDT (PRATAVIEIRA *et al.*, 2015; SOARES, 2019).

Na Medicina Veterinária, a PDT vem ganhando cada vez mais visibilidade, com diversas aplicações, indo de grandes relatos de caso no tratamento de tumores em cães e gatos (LUCROY, 2003) até em micoses profundas no tratamento da pitiose em cavalos (PIRES, 2012).

Trata-se, portanto, de uma técnica relativamente nova que vem sendo estudada mundialmente e possui efetividade comprovada. Suas vantagens de uso incluem baixo preço, possibilidade de execução em locais de infraestrutura simples, protocolo clínico não-invasivo e relato de poucos efeitos colaterais (BAGNATO, 2015; BAGNATO, 2017), além disso, ainda não foram encontrados relatos de resistência microbiana relacionada à TFDa, pois essa terapia age de maneira inespecífica (SOARES, 2019).

1.2.1 Mecanismo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A técnica é relativamente simples e é iniciada após a administração do agente fotossensibilizador (FS) no paciente, seja pela via intravenosa, oral ou pela via tópica. Em seguida, a droga precisa ser absorvida e acumulada pelas células-alvo e, para isso acontecer, é necessário um tempo de incubação do FS, chamado de “intervalo droga-luz”, o qual pode variar de minutos a horas, a depender da substância utilizada e da via de aplicação. O fotossensibilizador é absorvido por todas as células do organismo, mas é eliminado rapidamente pelas células saudáveis, devido a eficiência de seus mecanismos de proteção. Em contrapartida, células alteradas (como tumorais ou microrganismos) possuem metabolismo alterado, permitindo um maior e mais rápido acúmulo desse FS (GRECCO; MORIYAMA, 2015).

Após a incubação do fármaco, a lesão é iluminada por luz em comprimento de onda correspondente ao espectro de absorção do FS. Ao serem iluminadas, as moléculas do FS absorvem energia e saem de seu estado fundamental, para um estado energético mais elevado. Desse estado, elas podem voltar para o estado fundamental emitindo calor ou luz (em um processo chamado fluorescência). Por um processo chamado cruzamento intersistema, essas moléculas podem ir para um estado metaestável. Desse estado, existe a possibilidade de interagir com moléculas

que estão ao seu redor, produzindo radicais livres que, por sua vez, interagem com o oxigênio molecular e voltar para o estado fundamental emitindo calor ou luz (agora, chamado de fosforescência). Nessa interação, conhecida por reação tipo I, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de oxidar biomoléculas e causar a morte celular através de desequilíbrios fisiológico e bioquímico. Estas reações estão representadas através do diagrama de Jablonski contido na Figura 6. Outro tipo de reação que pode ocorrer é a do tipo II, com formação de oxigênio singleto. A molécula de FS em seu estado tripleto excitado, transfere energia para o oxigênio presente nas células, no estado tripleto, e depois volta para seu estado fundamental. O oxigênio tripleto excitado sofre cruzamento intersistema, resultando na formação de oxigênio singleto, o qual é altamente citotóxico, pois altera a permeabilidade da membrana celular e gera danos às organelas e membranas (GRECCO; MORIYAMA, 2015; PRATAVIEIRA *et al.* 2015; VOLLET-FILHO; INADA, 2017).

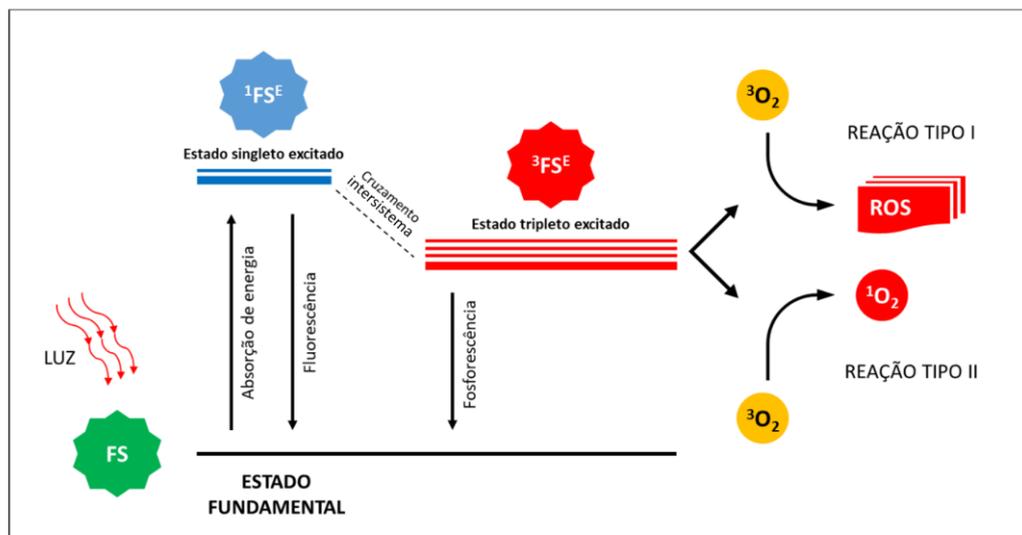


Figura 6. Diagrama de Jablonski (adaptado). Fonte: SANTOS, 2018.

Na Terapia Fotodinâmica as fontes de luz mais utilizadas são o laser e o LED. O Laser vem sendo utilizado desde a década de 60 e, na PDT, possui vantagens como alta monocromaticidade e a capacidade de permitir o acoplamento de fibras ópticas, possibilitando o acesso da luz a diferentes regiões. Porém, os equipamentos possuem um custo alto, gerando, conseqüentemente aumento do preço da aplicação terapêutica da TFD. LEDs são diodos emissores de luz que podem ser

construídos em diversos formatos, auxiliando os experimentos laboratoriais e aplicação clínica da TFD. São fontes mais baratas e muito eficazes em todo o espectro de luz visível e vem tornando a técnica cada vez mais acessível para o tratamento de diferentes doenças (BUZZÁ *et al.*, 2015; PANHOCA, 2017).

A escolha da fonte de luz a ser utilizada dependerá da profundidade da lesão a ser tratada, pois a luz precisa chegar até ela para que haja um efeito fotodinâmico. Além da profundidade, a molécula de FS determina o comprimento de onda a ser utilizado no tratamento (VOLLET-FILHO; INADA, 2017). Comprimentos de onda na região do azul são utilizados para tratamentos de lesões mais superficiais, enquanto comprimentos de onda na região vermelha são penetráveis nos tecidos mais profundos (SOARES, 2019). Portanto, no tratamento de lesões mais superficiais é possível utilizar comprimentos de onda mais baixos, como no caso de lesões iniciais da esporotricose, podendo ser usada a luz azul.

1.3 Fotossensibilizadores - Curcumina

Os fotossensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica são substâncias capazes de absorver energia luminosa e promover a fotoexcitação ou reações químicas em variados tipos de moléculas através de processos de transferência de energia (ULIANA *et al.*, 2017). São classificados como de primeira, segunda e terceira geração. Os FS de 1ª geração, representados pelos derivados da porfirina, foram muito utilizados no passado, mas por apresentarem uma gama de efeitos colaterais, foram deixados de lado com o surgimento dos fotossensibilizadores de 2ª geração que prometiam melhor capacidade de absorção e maior eficácia na produção de oxigênio singleto, além de diminuir o tempo de fotossensibilidade no paciente tratado. Nesse grupo estão inclusas as ftalocianinas, derivados de benzoporfirina, clorinas texafirinas e corantes. Os fotossensibilizadores de 3ª geração, também conhecidos como “fármacos inteligentes” correspondem à conjugação dos FS de 2ª geração com anticorpos, polímeros, lipossomas ou outras moléculas que permitam direcionar seletivamente o FS para o tecido tumoral, mas ainda não estão disponíveis comercialmente. Os FS podem, ainda, ser de origem sintética ou de origem natural como as clorinas, as bacterioclorinas e a curcumina (ULIANA *et al.*, 2017).

A curcumina (CUR) é um fotossensibilizador obtido a partir do Açafrão da Índia (rizomas de *Curcuma longa*), pertencente à família *Zingiberaceae*, planta originária da Índia. Possui coloração amarela intensa, é pouco solúvel em água e muito solúvel em solventes orgânicos como em dimetilsulfóxido (DMSO) e o álcool etílico. É muito utilizada na culinária e na medicina por possuir propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas. As principais substâncias envolvidas nas atividades fotobiológicas da *Curcuma longa* são a curcumina, a demetoxicurcumina e a bis-demetoxicurcumina (ULIANA *et al.*, 2017).

Possui pico de absorção de aproximadamente 430 nm, como mostrado na Figura 7, e, por ser uma região do espectro de luz visível, possui baixa penetração nos tecidos biológicos, podendo ser utilizado em infecções iniciais e superficiais. Estudos mostram que a curcumina pode ser um excelente fotossensibilizador a ser utilizado no tratamento de onicomicoses e afecções orais (SILVA, 2017). Assim, pode ser um fotossensibilizador acessível para o tratamento de esporotricose, especialmente no tratamento veterinário.

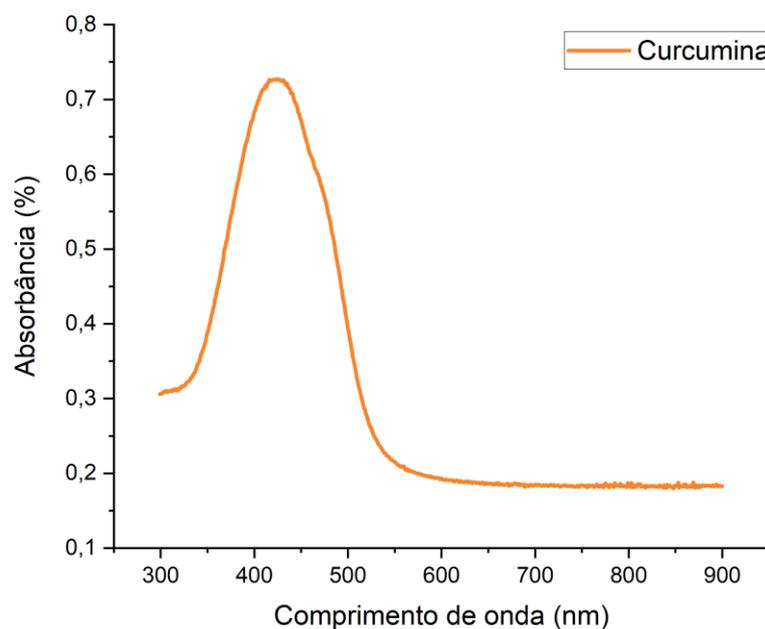


Figura 7. Espectro de absorção da curcumina com pico em 423 nm. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Até o momento, são poucos os estudos nos quais utilizam a TFD na inativação microbiana dos fungos *Sporothrix* spp. nos quais são relatados os

fotossensibilizadores complexo de rutênio (TIBURCIO *et al.*, 2022), metilaminolevulinato e o azul de Metileno (GILABERTE *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2019), sendo este último, tóxico para gatos por oxidar as hemoglobinas da espécie, causando hemólise intravascular e anemia (FOSSUM, 2015). Por ser de baixo custo e por não apresentar toxicidade, a curcumina pode se mostrar uma excelente alternativa como fotossensibilizador a ser utilizado no tratamento da esporotricose usando a TFDa como modalidade terapêutica, especialmente na medicina veterinária.

Na tentativa de otimizar os tratamentos existentes, também existe a possibilidade da associação da TFDa com a terapia antifúngica, como já vem sendo estudada em associação a antibióticos a outros FS não curcuminoides (PERÉZ-LAGUNA *et al.*, 2019). Esse tipo de associação deve ser analisada, primeiramente, em estudos *in vitro*, pois, se aplicada da forma incorreta, pode atrapalhar os resultados obtidos com a monoterapia, tanto antimicrobiana, quanto a TFDa.

O uso da TFDa, portanto, vem como opção de tratamento adjuvante em casos superficiais da esporotricose ou combinado com antifúngicos para reduzir dose e tempo de tratamento dessas medicações, sendo o objeto de estudo deste trabalho ambas as possibilidades em estudos *in vitro*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivos gerais

Comprovar a efetividade *in vitro* da curcumina como agente fotossensibilizador na morte dos fungos *S. brasiliensis* e *S. schenckii* com ação individual e em conjunto com os antifúngicos itraconazol, cetoconazol e iodeto de potássio.

1.4.2 Objetivos específicos

- Caracterização da curva de crescimento do *S. brasiliensis* e do *S. schenckii*.
- Determinação do intervalo droga-luz da curcumina nos fungos causadores da esporotricose.
- Avaliação da Inativação microbiana utilizando curcumina como fotossensibilizador.

- Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos itraconazol, cetoconazol e iodeto de potássio frente ao *Sporothrix* spp. e *C. albicans*.
- Avaliação do efeito *in vitro* na associação entre a terapia antifúngica com a Inativação Fotodinâmica.
- Avaliação do “fotobranqueamento” (*photobleaching*) da curcumina e dos antifúngicos itraconazol, cetoconazol e iodeto de potássio sob ação da luz azul.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 Microrganismos

Foram utilizados os microrganismos causadores da esporotricose (*S. brasiliensis* e o *S. schenckii*), e também a *Candida albicans*, que foi usada para a comparação dos resultados.

Os isolados *S. brasiliensis* (CFP 00551) e *S. schenckii* (CFP 00746), cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), foram cultivados nas formas filamentosas e leveduriforme em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA). Para os estudos foi pré-inoculado uma alíquota do fungo em meio Yeast Peptone Dextrose (YPD) mantendo-os em temperatura de 25 °C para a forma filamentosa e de 37 °C para as leveduras. O isolado *C. albicans* (ATCC 90028), também cedido pela FIOCRUZ, foi cultivado em meio Sabouraud Dextrose Ágar a 37 °C.

2.1.1 *Sporothrix* spp.

Após reidratação das amostras liofilizadas, para os estudos *in vitro* foi utilizada uma alíquota de 50 µL de solução contendo os fungos a partir do pré-inóculo e transferida para cultivo para um tubo falcon contendo 10 mL de meio YPD em condições de temperatura ajustadas para cada forma fúngica, ou seja, 25°C para a forma filamentosa e 37°C para a forma leveduriforme. Após crescimento, os microrganismos foram homogeneizados em vórtex por 30 segundos e, em seguida, centrifugado a 4.000 RPM por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado em seguida. O microrganismo foi ressuscitado em 10 mL de solução salina estéril. Esse procedimento foi repetido três vezes para lavagem do material. A densidade óptica (D.O.) foi ajustada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, resultando em uma solução de, aproximadamente, 10^4 - 10^5 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) de fungo em escala logarítmica.

2.1.2 *Candida albicans*

Após hidratar a amostra liofilizada, o fungo foi transferido para uma placa de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Ágar e foi cultivado a 37 °C durante 24 horas. Em seguida, uma alíquota de fungo foi transferida, com o auxílio de um *Swab* estéril, para um tubo falcon contendo 10 mL de solução salina estéril. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex durante 30 segundos e, em seguida, foi levado a

centrífuga por 10 minutos a 4.000 RPM para que todo o meio de cultivo fosse retirado da amostra. Esse procedimento foi realizado três vezes. A D.O da *C. albicans* foi ajustada para 10^5 UFC/mL, em comprimento de onda de 530 nm.

2.2 Curva de Crescimento

A curva de crescimento microbiano foi traçada para as espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii* para determinação das fases exponenciais e estacionárias destes fungos, uma vez que a curva da *C. albicans* já era bem estabelecida (MAIDAN *et al.*, 2008).

Sessenta tubos falcons contendo, cada um, 10 mL de meio YPD, receberam o volume de 50 µL de solução de microrganismo cada. Os tubos foram divididos igualmente em quatro grupos. O grupo 1 e 2 cultivaram, respectivamente, a forma filamentosa e leveduriforme do *S. brasiliensis* e o grupo 3 e 4, a forma filamentosa e leveduriforme do *S. schenckii*, respectivamente.

Diariamente, durante 15 dias, a densidade óptica (D.O.) do tubo referente ao dia de crescimento foi medida através do espectrofotômetro no comprimento de onda 530 nm e, em seguida, foram cultivados 33 µL do fungo em placa de Petri contendo meio SDA, em triplicata, para a contagem de UFC/mL. As placas foram armazenadas em temperaturas de 25°C para a forma filamentosa e de 37°C para a forma leveduriforme.

2.3 Determinação do intervalo droga-luz

Para avaliar se o fotossensibilizador escolhido poderia penetrar pela parede celular do *Sporothrix* spp. e em quanto tempo esse processo ocorreria, foi utilizada a microscopia de fluorescência confocal (LSM 780 - Zeiss, Alemanha) para análise de imagens. A coleta de fluorescência ocorreu na faixa de 400 a 700 nm e foram obtidas imagens com variação do intervalo droga-luz entre 0 e 60 minutos, com intervalos de 10 minutos entre as coletas.

2.4 Parâmetros da TFDa

O agente fotossensibilizador utilizado foi a curcumina sintética (PDT Pharma, Cravinhos, Brasil), solubilizada em 1% de DMSO e depois em 99% de etanol absoluto para a solução estoque em concentração de 1,5 mg/mL. A solução foi

diluída em água destilada estéril até atingir as concentrações de fotossensibilizador desejadas, que variaram de 0,75 – 7,5 - 15 - 75 e 150 µg/mL.

A *Biotable*, representada na Figura 8, foi a fonte de luz utilizada para o estudo. Desenvolvida pelo Laboratório de Apoio Tecnológico da USP (LAT - USP), a *Biotable* possui arranjo com 24 LEDs para iluminação homogênea de cada condição na placa multipoços. Também emite luz em comprimento de onda de 450 nm com irradiância de 35 mW/cm². A fluência entregue foi de 31,5 J/cm² em 15 minutos de iluminação para todos os grupos testados. Os fungos foram testados em sua forma leveduriforme, forma encontrada nas lesões de esporotricose.



Figura 8. Equipamento de luz chamado Biotable, desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico da USP (LAT – USP), emitindo luz em comprimento de onda equivalente a luz azul ($\lambda=450$ nm). Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

2.5 Grupos experimentais TFDa

Os tratamentos com TFDa *in vitro* foram realizados utilizando placas multipoços de 24 poços. Os grupos testados foram separados por grupo Controle (C), que não foi submetido a qualquer agente, grupo somente luz (L) e grupo somente fotossensibilizador (FS). No grupo Terapia Fotodinâmica (TFD) foi variada a concentração de FS. Em cada grupo havia uma alíquota de 500 µL de solução de microrganismo, com ajuste da D.O. para cada fungo trabalhado. Os grupos C e L receberam ainda, 500 uL de solução salina estéril e os grupos FS e TFD, 500 µL de solução fotossensibilizadora em concentrações que variaram de acordo com os testes. Em seguida, todos os grupos foram mantidos em ambiente protegido da incidência luminosa por 20 minutos e, em seguida, os grupos L e TFD foram iluminados pela *Biotable*.

2.6 Análise da eficácia da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

Foram cultivadas em meio SDA uma alíquota de 33 µL de cada poço da placa multipoços nas diluições de 1×10^0 , 1×10^{-1} e 1×10^{-2} , todos em triplicata. Após crescimento fúngico, as UFC foram contadas para que o melhor protocolo fosse determinado através da equação:

$$\text{UFC/mL} = \text{média} \times (1/\text{diluição}) \times (1/\text{volume da alíquota})$$

Esse método de contagem possui limite de detecção de 100 colônias/mL, portanto, se houver aparente redução total, significará que o valor obtido se encontrará abaixo do limite de detecção da técnica.

2.7 Concentração inibitória mínima

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das leveduras das três espécies de fungo, foi realizado o método de microdiluição em caldo, executado de acordo com os documentos M38-A2 e M27-A3 propostos pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com modificações (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b).

O meio utilizado para os estudos foi o Roswell Park Memorial Institute (RPMI) – 1640 com glutamina, sem bicarbonato de sódio e com vermelho de fenol e foi diluído conforme instruções do fabricante. Foi feita uma solução de 10,4 g de meio RPMI-1640 tamponada com 34,53 g/L de ácido 4-Morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0,165 M e água destilada suficiente para completar o volume de 1 litro. O pH da solução foi ajustado em 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH).

Os inóculos das leveduras de *C. albicans* e de *Sporothrix* spp. foram cultivados em meio SDA em temperatura de 37 °C durante 24 horas, para a *C. albicans* e 10 dias para o *S. schenckii* e para o *S. brasiliensis*. Colônias das placas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril e 0,1% de Tween 20. O conteúdo foi levado ao vórtex durante 30 segundos e, em seguida, a densidade óptica foi ajustada para uma concentração de 10^5 UFC/mL para as três espécies, em 530 nm. Na placa de 96 poços foram realizados grupos controles, testando a esterilidade do meio RPMI-1640 e o controle dos inóculos (sem qualquer concentração do antifúngico) e, também, as diluições dos antifúngicos. O teste foi esquematizado na Figura 9. As placas multipoços foram incubadas em

estufa a 37 °C durante 24 horas e por 5 dias para a *C. albicans* e para o *Sporothrix* spp., respectivamente, para leitura dos resultados, no qual a CIM foi considerada como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento dos fungos, com análise visual, ao ser feita a comparação de turbidez dos poços. A partir dos valores obtidos nos testes, realizados em triplicata, foi realizado o cálculo da moda.

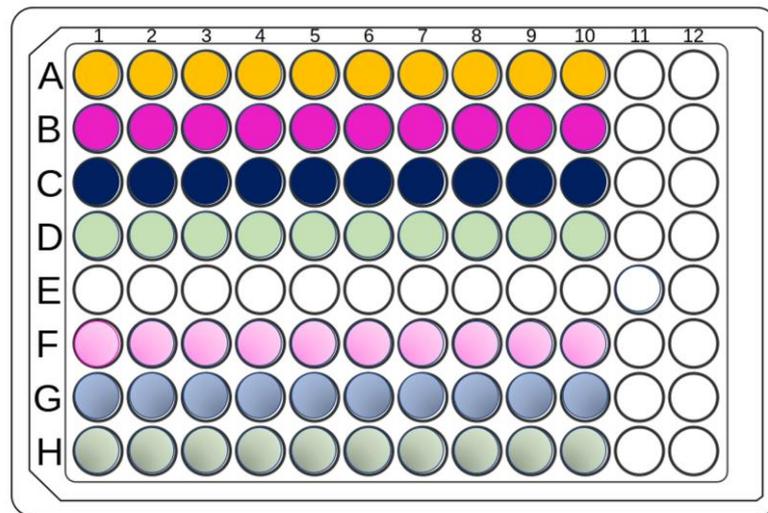


Figura 9. Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada nos testes de determinação da CIM. A linha A foi reservada para o controle de esterilidade do teste e as linhas F, G e H, para o controle de crescimento fúngico, sendo F *C. albicans*, G *S. brasiliensis* e H *S. schenckii*. Nas linhas B, C e D foram testadas *C. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, respectivamente. Nas colunas de 1 a 10 foram realizadas as diluições dos antifúngicos testados. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

2.7.1 Itraconazol e Cetoconazol

A solução estoque de itraconazol e cetoconazol foi trabalhada na concentração de 1,6 mg/mL, sendo o DMSO o excipiente utilizado na formulação. Em seguida, a solução foi diluída em meio RPMI-1640 até atingir a concentração de 32 µg/mL e foram realizadas diluições seriadas com meio RPMI-1640 tamponado nas concentrações de 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 e 0,0312 µg/mL distribuídos na própria placa multipoços, nas quais os inóculos foram adicionados em seguida, na quantidade de 100µL, totalizando o volume de 200 µL em cada poço.

2.7.2 Iodeto de Potássio

A solução estoque de iodeto de potássio foi obtida na concentração de 1 g/mL. Nessa solução, a água destilada estéril foi utilizada como excipiente. A solução foi diluída em meio RPMI-1640 até atingir a concentração de 500 mg/mL e foram realizadas diluições seriadas com meio RPMI-1640 tamponado nas concentrações de 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,8, 3,9, 1,95, 0,97 e 0,488 mg/mL distribuídos no volume de 100 µL na placa multipoços. Em seguida, 100 µL do inóculo foram somados ao volume.

2.8 Associação de terapias

Após os testes de CIM e TFDa para todos os fungos trabalhados, os melhores parâmetros foram analisados e utilizados em associação. Foram utilizadas subdoses de concentrações do fotossensibilizador que levaram à morte de parte dos microrganismos (redução de 2 a 3 logs) e as concentrações utilizadas dos antifúngicos foram as encontradas nos testes de CIM.

Os testes foram separados em grupos, de acordo com o tratamento realizado. O grupo Controle não recebeu qualquer tipo de tratamento. O grupo TFDa recebeu apenas o tratamento com a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em concentrações de 7,5 µg/mL de curcumina para a *C. albicans* e para o *S. brasiliensis* e de 0,75 µg/mL para o *S. schenckii*. O grupo Antifúngico recebeu apenas o tratamento com solução antifúngica, sendo plaqueado após 24 horas. O grupo Antifúngico + TFDa recebeu primeiro o tratamento com o antifúngico e, após 24 horas, foi aplicada a TFDa para, então, ser plaqueada. O grupo TFDa + antifúngico recebeu primeiro o tratamento com a TFDa e, em seguida, o tratamento com o antifúngico, sendo plaqueado 24 horas depois. A esquematização da ordem de aplicação das terapias é mostrada nas Figuras 10 e 11. Nos dois últimos grupos foram utilizadas as concentrações de curcumina e de antifúngico idênticas às utilizadas nos testes isolados dos grupos TFDa e AF, sendo que os antifúngicos testados foram os mesmos utilizados na determinação do valor de CIM.

Todos os grupos foram plaqueados em meio SDA em alíquotas de 33 µL nas diluições de 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} e as placas foram contadas após crescimento das colônias, que variou de 24 horas para a *C. albicans* e de 72 horas para o *Sporothrix* spp.

As concentrações testadas nesta fase, sempre foram as subdoses nos quais houve o mínimo de crescimento fúngico, tanto nos testes de inativação microbiana, quanto no teste de CIM. As concentrações de itraconazol variaram de 0,0625 - 1 $\mu\text{g/mL}$, a depender da espécie e seu resultado obtido nos testes de suscetibilidade antifúngica (CIM). As concentrações de cetoconazol variaram de 0,062 - 0,250 $\mu\text{g/mL}$ e as concentrações de iodeto de potássio foram de 0,488 - 62,5 mg/mL .

A densidade óptica do inóculo foi ajustada para $10^4 - 10^5$ UFC/mL de concentração fúngica.

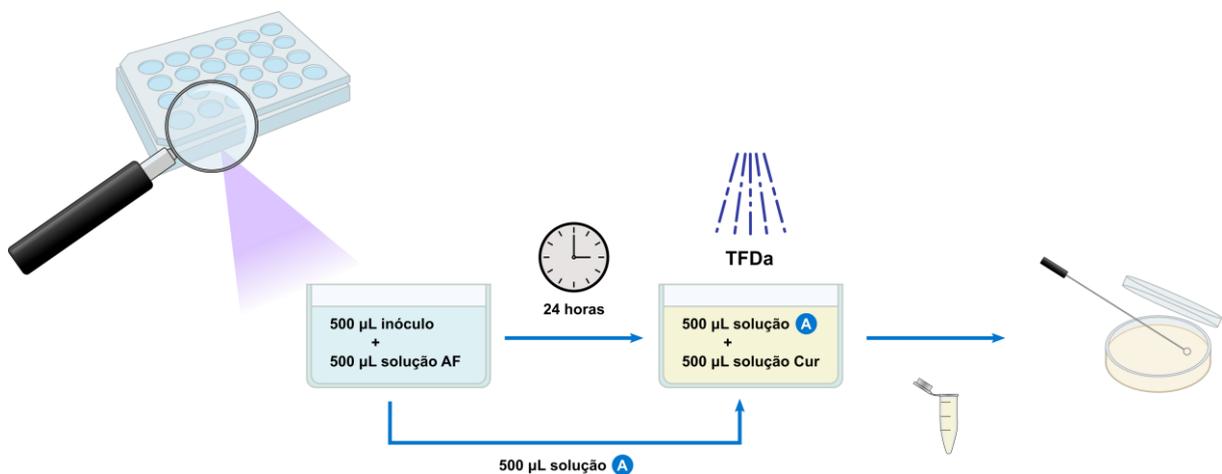


Figura 10. Terapia antifúngica aplicada antes da TFDa na associação das duas técnicas. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

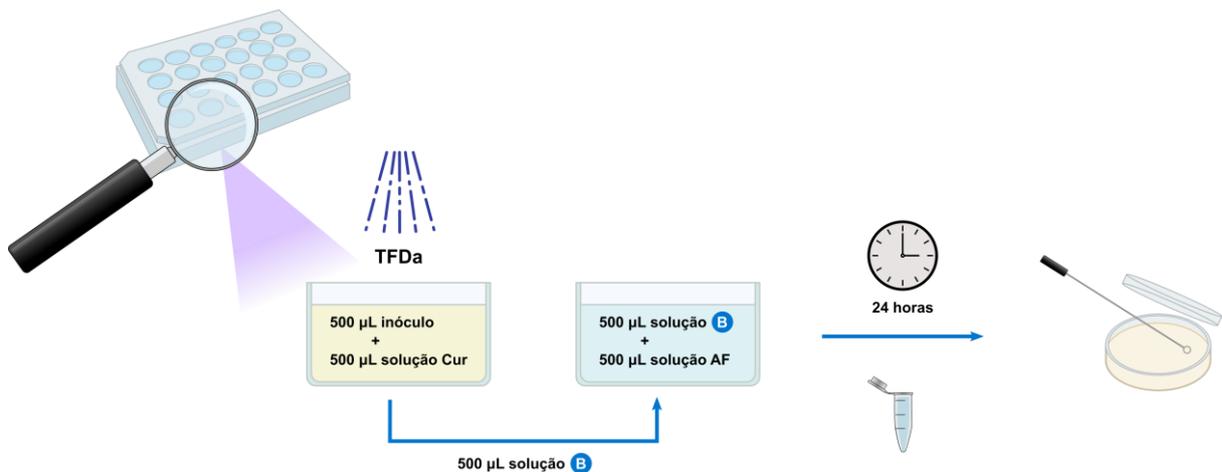


Figura 11. TFDa aplicada antes do medicamento antifúngico na associação das duas técnicas. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

2.9 Determinação da taxa de fotobranqueamento

Para saber se na associação da PDT com a terapia antifúngica há interação entre a curcumina e o itraconazol, foram analisados seus espectros de absorbância com o espectrofotômetro (Varian Cary 50 Bio). A taxa de fotobranqueamento (também chamada de “bleaching”, do inglês) também foi analisada, dos compostos individualmente, nas concentrações de 0,15 µg/mL de curcumina e 1,6 µg/mL do Itraconazol e 1,6 µg/mL do cetoconazol e de 100 mg/mL do iodeto de potássio.

As soluções foram iluminadas com comprimento de onda de 450 nm durante 30 minutos com intervalo a cada 2 minutos para medida de absorbância.

2.10 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e o desvio padrão é apresentado em forma de barra de erro. Os grupos testados foram avaliados por ANOVA e teste de Tukey, no qual um valor de $p > 0,05$ foi considerado significativo.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 Curva de crescimento

A partir do cultivo e correlação com a D.O. e valores de UFC/mL, foram traçadas as curvas de crescimento das duas formas fúngicas para o *S. brasiliensis* e para o *S. schenckii*, com o objetivo de determinar os dias nos quais a população microbiana atinge sua fase estacionária nas duas amostras, pois, na fase de decaimento os microrganismos têm uma alta taxa de morte, sendo difícil determinar se a morte está ocorrendo naturalmente ou por ação da terapia estudada.

Assim, o número de UFC/mL por dia de crescimento pode ser observado nos gráficos da Figura 12 para as formas de levedura (Figura 12-A) e filamentosa (Figura 12-B). Para ambos os microrganismos, há um comportamento semelhante de estabilização do crescimento em relação a forma de crescimento, onde está destacado em verde o intervalo no qual há uma clara estabilização do crescimento fúngico, antes de iniciar um processo de redução no número de UFC/mL.

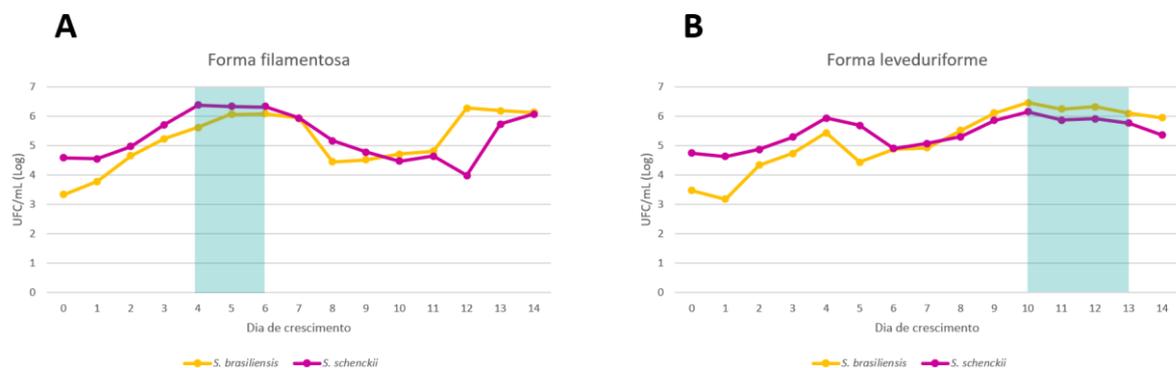


Figura 12. Dinâmica do crescimento microbiano, expresso em UFC/mL, em relação com os dias de cultivo dos fungos *S. brasiliensis* e *S. schenckii* para as formas filamentosa (A) e leveduriforme (B), com destaque, em verde, para a região equivalente a dia de estabilização da curva de crescimento. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Em sua forma leveduriforme, com crescimento mais lento, deve ser trabalhado entre os dias 10 e 13 de crescimento. Assim, a densidade óptica deve ser ajustada para um valor médio de 0,2 tanto para *S. brasiliensis* como para o *S. schenckii*. Em sua forma filamentosa, o *S. brasiliensis* deve ser trabalhado entre o 4° e 6° dia de cultivo, com D.O. ajustada em 0,16 e o *S. schenckii* deve ser trabalhada

entre os dias 5 e 7 de cultivo, com D.O. ajustada em 0,5. Estes resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação da densidade óptica em relação aos dias de cultivo das formas de levedura e filamentosa para os fungos *S. brasiliensis* e *S. schenckii*

Dia de Crescimento	Leveduriforme		Filamentosa	
	<i>S. brasiliensis</i> D.O.	<i>S. schenckii</i> D.O.	<i>S. brasiliensis</i> D.O.	<i>S. schenckii</i> D.O.
0	0,0072	0,0028	0,0031	0,0053
1	0,0933	0,0174	0,008	0,0062
2	0,0785	0,0483	0,0078	0,0268
3	0,0885	0,0939	0,03	0,0917
4	0,0741	0,1471	0,0553	0,1677
5	0,099	0,1956	0,0801	0,5454
6	0,0952	0,2716	0,0882	0,2126
7	0,0852	0,3088	0,1178	0,1408
8	0,1276	0,1276	0,094	0,1093
9	0,1874	0,2662	0,1136	0,1362
10	0,1787	0,2187	0,2611	0,1211
11	0,1563	0,2063	0,2867	0,1437
12	0,254	0,214	0,1465	0,1365
13	0,2384	0,1984	0,1616	0,1426
14	0,2152	0,2152	0,124	0,131

Datas posteriores às encontradas têm redução natural da população microbiana, o que atrapalha a interpretação dos resultados da TFDa, pois seria difícil determinar qual a influência da terapia nas mortes.

Não foi traçada a curva de crescimento da *C. albicans* neste estudo, porque ele é um fungo amplamente estudado, sendo necessário 24 horas de cultivo para que ela atinja essa mesma fase estacionária (PICCO et al., 2019).

Os testes foram realizados para a padronização do estudo, por haver uma grande divergência de dados sobre a curva de crescimento do *Sporothrix* spp., que pode estar relacionada às diferenças entre meio de cultivo e condições oferecidas (pH, temperatura) e cepa trabalhada (CATCHINGS; GUIDRY, 1973; MENDOZA et al., 2005; BAREJA et al., 2015; FREITAS et al., 2015). Um estudo realizado com cepas de *S. schenckii* cultivado em meio Yeast Nitrogen Base (YNB) mostrou que micélios atingem sua maior D.O., equivalente a 0,26, com 14 dias de cultivo (BAREJA et al., 2015). O YNB também foi utilizado em outro estudo, no qual foi realizada a curva de crescimento de leveduras e micélios de *S. schenckii*. A maior medida de D.O. obtida nessa curva foi de 0,12 para a forma leveduriforme, com 14

dias de cultivo e decaimento da medida a partir do 21º dia. Os micélios obtiveram D.O. de 0,26 a partir do 18º dia de cultivo e decréscimo da medida a partir do 24º. (SHAH *et al.* 2018).

Como a escolha do meio de cultura e as condições oferecidas para o fungo podem influenciar o crescimento e morfologia do microrganismo (SHAH *et al.*, 2018), trabalhar nas condições estabelecidas em dias e densidade ótica está de acordo com os outros estudos citados.

3.2 Determinação do intervalo droga-luz

Como é o primeiro estudo do uso da curcumina nesse fungo, foi necessário estudar se havia absorção da molécula pelas paredes do microrganismo. Através das imagens obtidas no microscópio confocal foi possível ver que o fotossensibilizador utilizado tem afinidade pelo *Sporothrix* spp. O tempo de incubação mínimo necessário para a absorção da curcumina pelo microrganismo foi de 20 minutos, como mostrado na Figura 13, no qual foi possível coletar sinal de fluorescência dentro da área delimitada pela parede celular do *Sporothrix* spp. Ainda que nos demais tempos analisados de 30, 40, 50 e 60 minutos a molécula permaneça no microrganismo, o menor tempo obtido com a maior fluorescência foi utilizado nos estudos *in vitro* a fim de encontrar um protocolo de TFDa no menor tempo possível, em futuros testes clínicos.

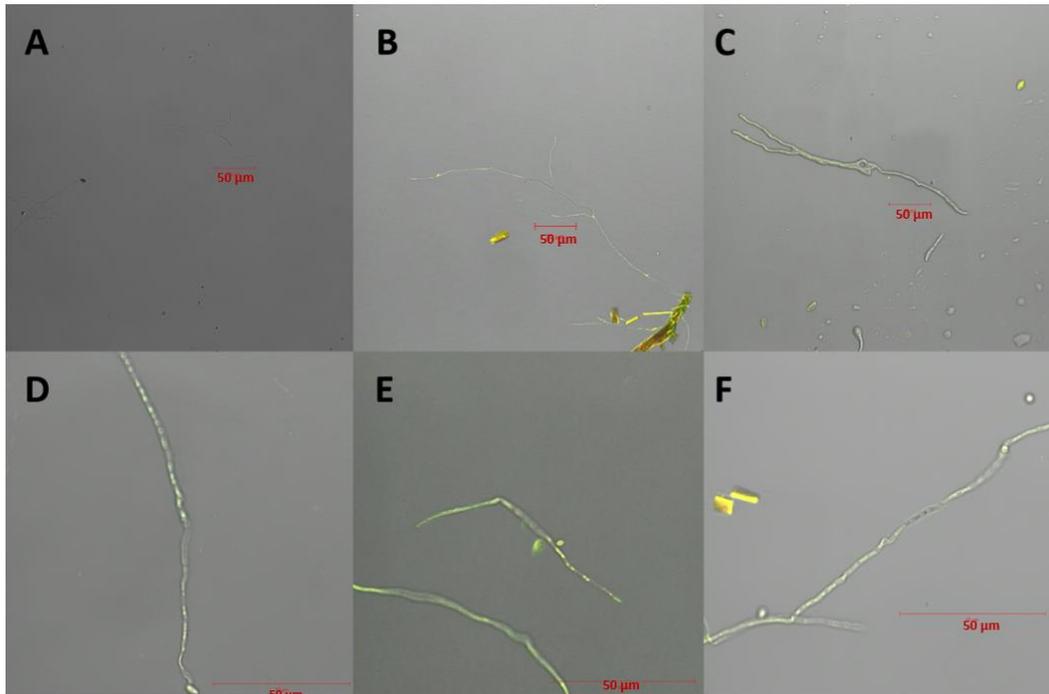


Figura 13. Filamento de *S. brasiliensis* em microscopia de fluorescência confocal mostrando a capacidade da curcumina de penetrar na parede celular do fungo ao longo do tempo. No tempo zero de incubação (A), 10 minutos (B), 20 minutos, quando a penetração é completa (C), 30 minutos (D), 40 minutos (E) e 60 minutos (F). Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Estudos com a forma planctônica da *Candida dubliniensis* mostraram que é possível observar fluorescência, em microscopia confocal, dentro do fungo entre 5 e 20 minutos de contato com a curcumina (SANITÁ *et al.*, 2017). Outro estudo avaliou o melhor tempo de incubação da curcumina em biofilmes de *Candida* spp. e mostrou que, a partir de 5 minutos de contato da curcumina com os fungos, já é possível observar alguma fluorescência sendo emitida, porém essa fluorescência se mostra mais forte após 20 minutos de incubação (ANDRADE *et al.*, 2013). No *Sporothrix brasiliensis*, o início da penetração da curcumina foi um pouco mais lenta se comparada com a *Candida* spp., porém, a máxima fluorescência também pode ser observada a partir de 20 minutos de incubação.

É necessário que o tempo de incubação de um fotossensibilizador seja bem estabelecido para os experimentos com a TFDa, pois a molécula precisa ser absorvida por toda a estrutura fúngica. Se limitada a parede celular, o fotossensibilizador ao ser ativado com a iluminação não será suficiente para destruir o microrganismo, podendo este recuperar seu crescimento através de estruturas que se mantiveram intactas (SILVA, 2013).

3.3 Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

Para a avaliação da toxicidade dos parâmetros utilizados na TFDa, cada elemento foi testado nos três fungos isoladamente, antes da realização da terapia. Os resultados mostraram que a curcumina, quando utilizada isoladamente, mesmo na sua concentração mais alta (150 µg/mL), não foi capaz de causar morte da *C. albicans*, do *S. brasiliensis* e do *S. schenckii*, como mostrado no gráfico da Figura 14, mantendo o número de UFC/mL sem alterações comparado ao grupo controle. O mesmo resultado foi obtido no grupo somente luz.

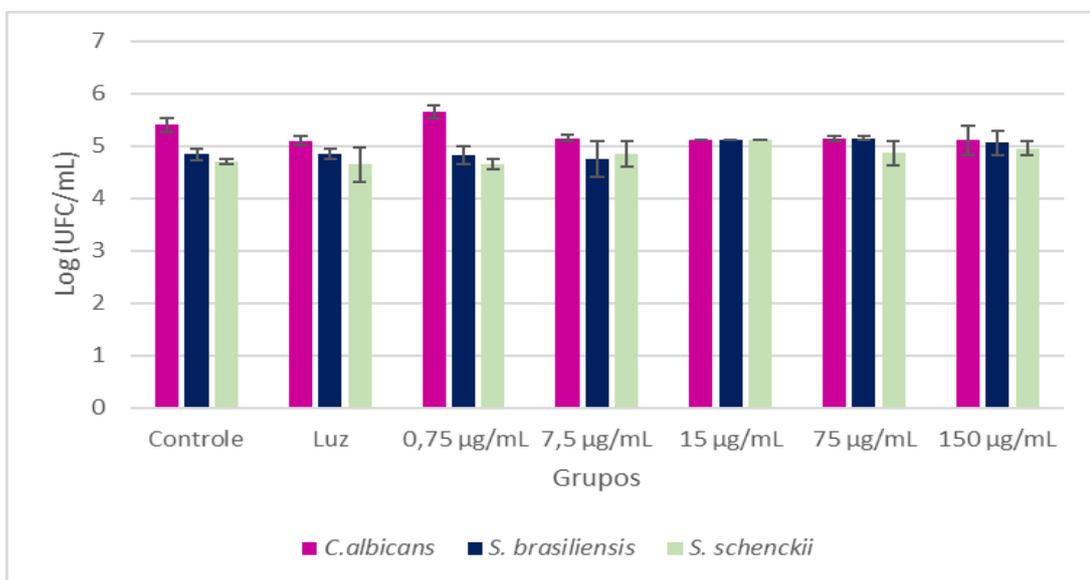


Figura 14. Controle de toxicidade do agente fotossensibilizador em diferentes concentrações e da luz utilizados isoladamente na *C. albicans*, no *S. brasiliensis* e no *S. schenckii*. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Após estes resultados, novos testes foram realizados, utilizando a combinação dos elementos FS e luz, no grupo TFD, para se encontrar o melhor protocolo de Inativação Fotodinâmica para os três fungos e seus resultados são mostrados no gráfico da Figura 15. Usando concentrações desde 0,75 a 150 µg/mL e 31,5 J/cm² de luz, a *C. albicans* mostrou redução de aproximadamente 1 log com a concentração de 0,75 µg/mL e de cerca de 3 logs na concentração de 7,5 µg/mL de curcumina. Foi encontrada uma inativação de 5 logs (total em relação ao controle) com a concentração a partir de 15 µg/mL de curcumina. Por não existir estudos sobre a ação da curcumina sobre as cepas de *Sporothrix* spp. na TFDa, a *C. albicans* foi utilizada como parâmetro de comparação e protocolo inicial e todas as

condições testadas com ela foram aplicadas no *Sporothrix* spp. Foi possível reduzir 1 log do *S. brasiliensis* na concentração de 0,75 µg/mL e aproximadamente 2,5 logs na concentração de 7,5 µg/mL. Concentrações a partir de 15 µg/mL de curcumina foram capazes de reduzir cerca de 4 logs, causando a eliminação total do microrganismo, como mostrado na Figura 15. Para a inativação do *S. schenckii*, com a concentração de 0,75 µg/mL de curcumina foi possível reduzir aproximadamente 1 log deste fungo e foi necessária uma concentração a partir de 7,5 µg/mL para a inativação total em relação ao controle.

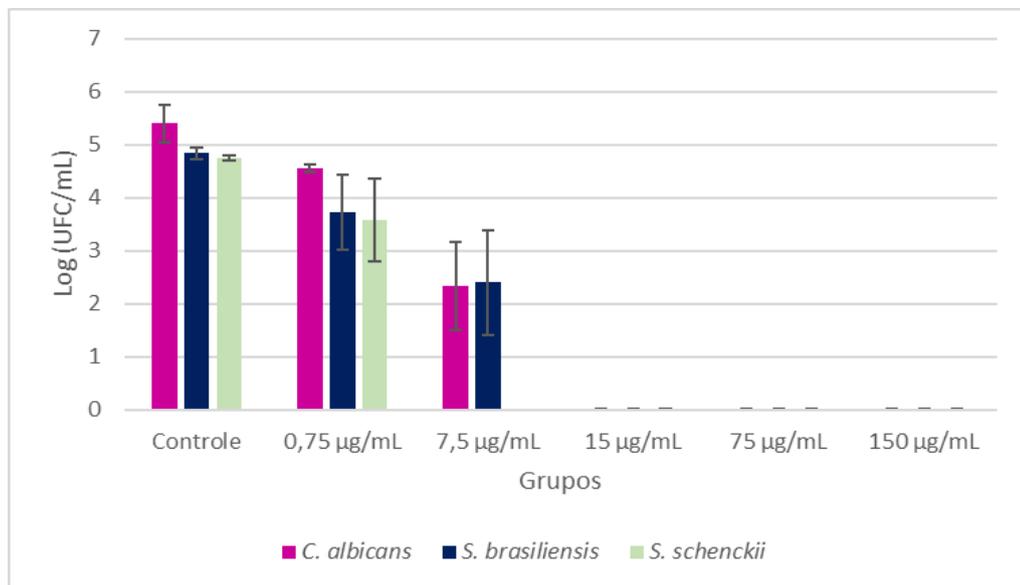


Figura 15. Inativação Fotodinâmica dos fungos *C. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*. A concentração de 0,75 µg/mL foi capaz de reduzir, em média, 1 log de todos os fungos estudados. A eliminação da *C. albicans* e do *S. brasiliensis* ocorreu com a concentração de 15 µg/mL de curcumina. O *S. schenckii* foi eliminado com a concentração de 7,5 µg/mL de curcumina. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A *Candida* spp. é o fungo que mais causa doença em humanos, podendo infectar desde indivíduos hígidos a indivíduos imunocomprometidos ou hospitalizados, causando infecções orais, gastrointestinais, vaginais e sanguíneas (MOYES; NAGLIK, 2011). Atualmente, infecções causadas por *Candida* spp. associadas ao COVID-19 causam preocupação, pois podem aumentar as chances de morte em pacientes hospitalizados, especialmente em casos nos quais ocorrem longa estadia na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) associada a nutrição parenteral, ventilação mecânica e uso de corticosteroides sistêmicos (HOENIGL *et al.*, 2022).

Estudos *in vitro* comprovaram a capacidade da curcumina em causar redução completa na quantidade de UFC/mL de *C. albicans* com Terapia Fotodinâmica, na concentração de 20 μM (7, 4 $\mu\text{g/mL}$) de curcumina e luz azul na dose de 5,28 J/cm^2 (DOVIGO *et al.* 2011). Um estudo avaliando a eficácia da curcumina no tratamento de candidíase oral em modelo animal conseguiu a redução de mais de 4 logs de *C. albicans* com concentração de 80 μM (29,6 $\mu\text{g/mL}$) de curcumina, emitindo em 455 nm e irradiância de 89,2 mW/cm^2 , com apenas uma aplicação da terapia (DOVIGO *et al.*, 2013). Sendo a *C. albicans* um microrganismo resistente as outras terapias, tal qual *Sporothrix* spp., os resultados aqui apresentados e toda a literatura em relação ao uso da curcumina levaram a acreditar que a TFDa poderia ser igualmente capaz de reduzir a população microbiana em infecções de esporotricose.

Há poucos relatos do uso da TFDa no tratamento da esporotricose, com o primeiro trabalho publicado em 2014. Uma mulher, com lesões crônicas e irresponsivas ao tratamento com itraconazol e terbinafina, foi submetida a sessões de TFDa a cada 2 semanas. O fotossensibilizador utilizado foi o azul de metileno (AM) a 1% pela via intralesional, o qual foi iluminado com luz vermelha emitindo em 639 nm com irradiância de 19 mW/cm^2 e fluência de 37 J/cm^2 . Após 3 sessões, iniciou-se a cura das lesões menores, até que, no decorrer de 4 sessões, as lesões maiores cicatrizaram. Neste mesmo caso, anteriormente, foi usado o metilaminolevulinato em creme a 16% como fotossensibilizador, porém sem sucesso após inúmeras sessões de TFDa (GILABERTE *et al.*, 2014).

Os estudos existentes, em sua maioria, usam o AM como fotossensibilizador. Diferentes cepas de *Sporothrix* spp. na forma filamentosa foram testadas *in vitro*. As cepas *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. albicans* e *S. mexicana* tiveram redução de aproximadamente 2 logs de seu crescimento, independentemente das concentrações de azul de metileno testadas, de 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, de luz em comprimento de onda de 685 nm e dose de energia de 28 J/cm^2 (MARIO *et al.*, 2014). Um outro estudo conseguiu, com a concentração de 0,1 mg/mL de azul de metileno, iluminado com fonte de luz emitindo a 660 nm, irradiância de 35 mW/cm^2 e dose de luz de 26,31 J/cm^2 , reduzir em 3 logs a UFC/mL da população de filamentos de *S. schenckii* (GUIRADO *et al.*, 2017).

Contudo, é conhecido que o azul de Metileno é uma substância tóxica para os gatos por causar oxidação das hemoglobinas da espécie, resultando em hemólise intravascular e anemia (FOSSUM, 2015). Dado que o gato é o agente transmissor

mais importante na disseminação da esporotricose, faz-se necessária a exploração de outras substâncias fotossensibilizadoras que possam ser utilizadas com segurança na espécie mais importante na perpetuação e transmissão da doença.

O complexo de rutênio também foi utilizado como fotossensibilizador em nosso grupo de pesquisa para um estudo para inativação fotodinâmica do *S. brasiliensis*. Neste estudo, obteve-se redução total de UFC/mL, equivalente a 6 log, quando testadas em diferentes doses de luz e comprimentos de onda. No comprimento de onda de 450 nm foi possível eliminar leveduras e micélios do fungo com concentrações de fotossensibilizador de 5 μM (1,8 $\mu\text{g/mL}$) e 10 μM (3,7 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente, e dose de luz de 36 J/cm^2 para as duas formas fúngicas. Já no comprimento de onda de 525 nm (luz verde), foram testadas as doses de luz de 25 e 6,3 J/cm^2 . A maior dose de luz conseguiu inibir o crescimento das leveduras e dos micélios a partir da concentração de 0.5 μM (0,75 $\mu\text{g/mL}$) do complexo de rutênio e com a dose de 6,3 J/cm^2 foi possível inibir o crescimento das duas formas fúngicas com uma maior concentração de fotossensibilizador, equivalente a 5 μM (7,5 $\mu\text{g/mL}$) (TIBURCIO *et al.*, 2022). Apesar dos bons resultados, o complexo de rutênio ainda possui alto custo, podendo limitar o seu uso em tratamentos veterinários.

Cepas de *S. globosa* foram inativadas com TFDa usando a molécula de ALA que dá origem ao fotossensibilizador endógeno Protoporfirina IX na concentração de 1,19 M, LED em comprimento de onda de 633 nm e dose de luz de 162 J/cm^2 . Ambas as formas estudadas, micelial e leveduriforme, mostraram-se dose-dependentes, havendo uma taxa de sobrevivência fúngica menor (84,23%) quando a dose de luz era elevada, mesmo com concentrações de fotossensibilizador altas com menores doses de luz (CHEN *et al.* 2020).

Os resultados do presente estudo mostram que menores concentrações de curcumina foram necessárias para inativar o *S. schenckii* comparado com as concentrações utilizadas para a inativação do *S. brasiliensis*. Estudos revelaram uma maior resistência e patogenicidade do *S. brasiliensis* em relação ao *S. schenckii* (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018). O *S. brasiliensis*, ao ser comparado morfológicamente com o *S. schenckii*, mostrou ser uma espécie mais virulenta, devido a sua parede celular cerca de 20 a 40% mais espessa e com maior teor de rammnose e quitina e, além disso, por possuir microfibrilas mais longas capazes de conectar leveduras às células, formando biofilmes. Essas diferenças arquitetônicas nas paredes celulares e na composição dos fungos influenciam diretamente na

resposta imune do hospedeiro (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018). Além disso, modelos experimentais realizados com camundongos sugerem que as lesões causadas pelo *S. brasiliensis* são mais extensas e invasivas se comparadas às lesões causadas pelo *S. schenckii* (GREMIÃO *et al.*, 2017).

Um dos fatores de virulência no *Sporothrix* spp. é a presença da melanina na sua composição. Apesar disso, foi possível causar a inativação desses fungos com a TFDa. A melanina protege o fungo contra a ação da radiação UV, da fagocitose pelo sistema imune e tem ação antioxidante. Além disso, por seu poder absorvente, ela pode alterar o pico de absorbância do fotossensibilizador, limitando a produção de ROS, interferindo, assim, na efetividade da TFDa (GILABERTE *et al.*, 2014; CHEN 2020).

Os resultados obtidos com a TFDa *in vitro* usando a curcumina como FS são animadores, pois houve eliminação de todos os microrganismos estudados com as concentrações aplicadas, mais baixas que as normalmente usadas contra fungos. O *S. brasiliensis*, espécie com maior virulência, também mostrou redução total com o uso da curcumina, o que mostra que a TFDa pode ser uma excelente modalidade de tratamento para a esporotricose em modelos *in vivo* e a curcumina, um excelente fotossensibilizador.

3.4 Concentração inibitória mínima

Para avaliar se um fungo é resistente as drogas disponíveis, é realizado o teste de suscetibilidade fúngica, no qual é determinada a concentração inibitória mínima (CIM) capaz de inibir o crescimento do microrganismo (LIMA, 2020). O presente estudo avaliou a CIM dos fungos *C. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii* diante dos antifúngicos mais utilizados no tratamento da esporotricose, sendo eles o itraconazol (ITZ), cetoconazol (KTZ) e iodeto de potássio (KI). Os valores de CIM, encontrados a partir do cálculo da moda, para os microrganismos testados são encontrados na tabela 4.

Tabela 4. CIM da *C. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii* para os agentes antifúngicos itraconazol (ITZ), cetoconazol (KTZ) e iodeto de potássio (KI)

Microrganismo	Fármaco		
	ITZ (µg/mL)	KTZ (µg/mL)	KI (mg/mL)
<i>C. albicans</i>	0,125	0,250	31,25
<i>S. brasiliensis</i>	2,0	0,250	250,0
<i>S. schenckii</i>	0,250	0,125	62,5

Um estudo avaliando a suscetibilidade fúngica do *S. brasiliensis* obteve CIM de 1 e 0,25 µg/mL para o itraconazol e cetoconazol, respectivamente e de 125 mg/mL de iodeto de potássio. Neste estudo foram avaliados 128 isolados do fungo (LIMA, 2020). Os resultados do presente trabalho são parecidos com os obtidos em um estudo de identificação molecular e avaliação de suscetibilidade de 23 cepas do fungo *S. schenckii*, no qual se obteve CIM de 0,25 µg/mL para o itraconazol e para o cetoconazol (CÓRDOBA *et al.*, 2018). O *S. schenckii* avaliado no presente estudo se mostrou mais suscetível ao iodeto de potássio que a cepa estudada no trabalho que avaliou a sensibilidade de biofilmes da espécie ao fármaco, o qual apresentou CIM de 125 mg/mL (SILVA, 2017). Em um trabalho avaliando a sensibilidade de 3.895 cepas de *Candida* spp. foi visto que mais de 90% das cepas estudadas foram inibidas com doses menores que 1 µg/mL de itraconazol (PFALLER, 2005). Em outro trabalho, no qual foi comparada a atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos, foram obtidos valores de CIM para a *C. albicans* de 0,01 µg/mL frente ao itraconazol e de 0,03 µg/mL frente ao cetoconazol (CASTRO, 2016). No presente estudo, o itraconazol e o iodeto de potássio se mostraram menos ativos contra o *S. brasiliensis*, em relação ao *S. schenckii* e *C. albicans*, pois foram necessárias doses maiores do fármaco para causar a morte deste fungo, mas, ainda sim, estes fármacos mostraram alta eficácia contra todos os microrganismos testados. Já o cetoconazol mostrou ter eficácia parecida com os três microrganismos.

São recentes os estudos que tentam classificar os isolados de *Sporothrix* spp. em isolados sensíveis e isolados resistentes a partir de um ponto de corte de CIM. Valores de corte epidemiológicos (VCEs) tentam identificar isolados que podem não responder adequadamente a determinadas drogas (ESPINEL, 2017). A menor sensibilidade ao fármaco pode estar relacionada com mecanismos de resistência (ESPINEL, 2017), como bombas de efluxo e mudanças na afinidade do

microrganismo com os antifúngicos (NANDO, SANTIAGO, 2020). Os estudos relacionados a VCEs do *S. brasiliensis* propõem valores de 2 µg/mL frente ao itraconazol e ao cetoconazol e, do *S. schenckii*, 2 µg/mL frente ao itraconazol (ESPINEL, 2017), portanto os microrganismos trabalhados neste estudo podem ser classificados como suscetíveis (ALMEIDA-PAES, 2017). Ainda não se tem dados suficientes sobre os VCEs do *S. schenckii* frente ao cetoconazol (ESPINEL, 2017) e, até o momento, não foram encontrados estudos avaliando esse parâmetro no iodeto de potássio. Os pontos de corte que determinam se uma cepa de *C. albicans* é sensível ou resistente ao itraconazol, encontram-se no documento CLSI M27, que aponta que doses menores ou iguais a 0,125 µg/mL classificam o fungo como suscetível e, doses acima de 1 µg/mL, caracterizam o fungo como resistente (CLSI, 2008b), sendo, portanto, utilizado neste estudo um microrganismo suscetível. Ainda não estão determinados os pontos de corte contra isolados de *Candida* spp. frente ao cetoconazol e ao iodeto de potássio (ANVISA, s.d.).

3.5 Associação de terapias

Apesar de a luz azul não possuir profunda penetração nos tecidos, devido a um maior espalhamento da luz (D'ALMEIDA; PRATAVIEIRA; GARCIA, 2019), resultado no tratamento de lesões superficiais, a curcumina pode ser utilizada em associação ao tratamento convencional, e o estudo dessa associação permite encontrar o melhor protocolo para potencializar o seu efeito.

Especialmente para a esporotricose, um estudo mostrou que a combinação de terapias foi efetiva quando combinada com azul de metileno e sem qualquer resultado clínico quando a combinação foi feita com ALA (GILABERTE *et al.*, 2014). Portanto, entender as interações entre drogas antifúngicas e fotossensibilizador permite um planejamento de protocolo mais efetivo.

A dinâmica de redução da *C. albicans* frente ao uso isolado do itraconazol foi analisada com o uso do antifúngico antes da aplicação a TFDa (antifúngico + TFDa) e depois (TFDa + antifúngico). Dado que a CIM para o itraconazol foi de 0,125 µg/mL, foi escolhida a concentração antifúngica de 0,0625 µg/mL para o ensaio e a concentração de 7,5 µg/mL valores que não causavam a inativação completa do microrganismo. Foram escolhidos os valores de subdose de cada terapia individual para analisar se o efeito combinado era aditivo, sinérgico ou destrutivo.

De fato, no grupo no qual o antifúngico foi usado como monoterapia, na concentração de 0,0625 $\mu\text{g/mL}$, nota-se uma redução de apenas 1 log comparado ao controle, porém maior crescimento microbiano se comparado ao grupo TFDA isolado com concentração de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ de curcumina. Quando o antifúngico foi utilizado antes da TFDA, a efetividade da combinação foi 1 log de quando comparado somente ao antifúngico e redução insignificante se comparada com o efeito do grupo TFDA, mostrando que essa combinação teve um baixo efeito aditivo. O contrário, entretanto, foi observado no grupo no qual a TFDA foi realizada antes da aplicação do antifúngico, onde a combinação terapêutica resultou em um efeito sinérgico, com a redução de mais de 5 logs de UFC/mL da *C. albicans* quando comparada ao grupo controle. Os resultados das terapias individuais e combinadas estão apresentados na Figura 16.

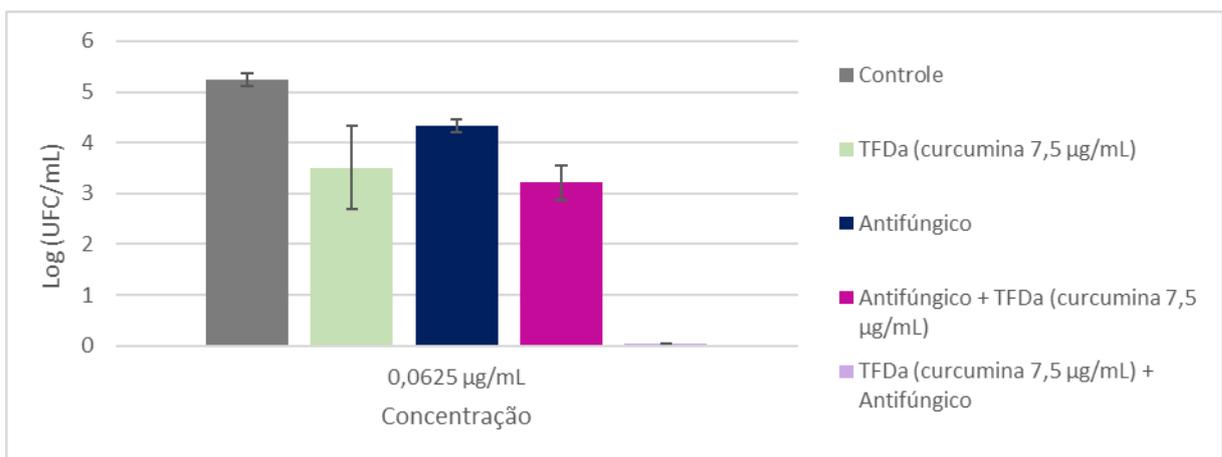


Figura 16. Redução na população de *C. albicans* com o uso do itraconazol em associação com a TFDA em ordem de aplicação alternada. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Esse comportamento mostra que a ordem de aplicação da TFDA importa para obter o melhor efeito. Se, concentrações que sozinhas não foram capazes de causar redução total na quantidade de microrganismos, quando a TFDA foi aplicada antes do antifúngico ocorreu uma ação sinérgica dos efeitos antimicrobianos. Entretanto, quando a TFDA foi aplicada depois do antifúngico, não houve resposta significativa em relação às terapias individuais.

O mesmo comportamento foi observado quando o cetoconazol foi usado em associação a TFDA, ainda nos testes com a *C. albicans*. Dado que o CIM do cetoconazol foi 0,25 $\mu\text{g/mL}$, foram usadas as concentrações de 0,125 e 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ como valores de subdose. O gráfico da Figura 17 mostra que a maior redução

na população de *C. albicans* ocorre com a aplicação da TFDa antes da administração do cetoconazol e, na concentração de 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, chega a redução de 5 logs de UFC/mL em relação ao grupo controle.

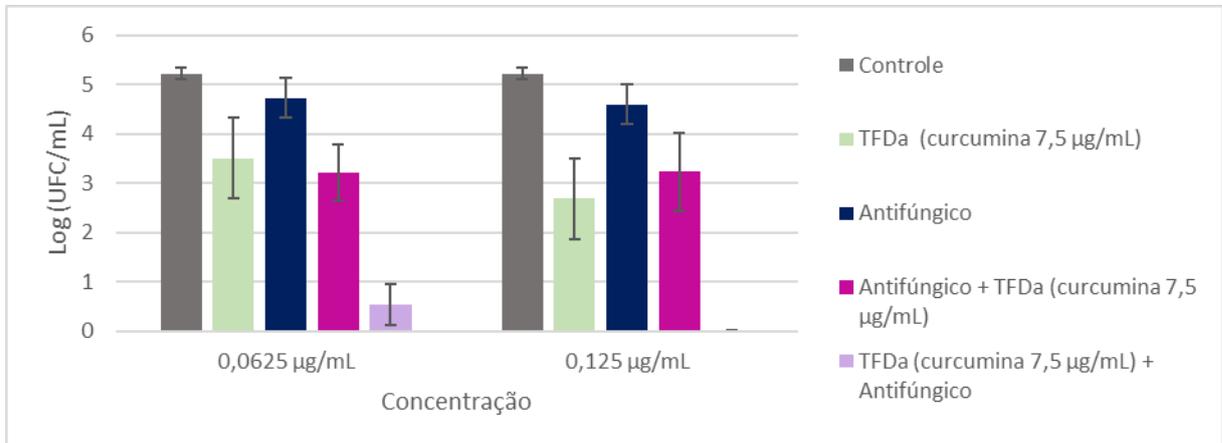


Figura 17. Redução na população de *C. albicans* com o uso do cetoconazol associado a TFDa em ordem de aplicação alternada. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

No gráfico da Figura 18, é possível ver os resultados para a combinação do iodeto de potássio e TFDa para *C. albicans*. Quando o antifúngico é usado na subdose de 7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, há redução de, aproximadamente, 4 logs em comparação com o grupo controle quando a TFDa foi aplicada antes do iodeto de potássio enquanto não há redução significativa em relação aos tratamentos individuais quando a TFDa foi aplicada depois. Com o aumento da concentração do antifúngico para 15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não há diferença significativa comparado apenas com o antifúngico a 7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Entretanto, a combinação TFDa + antifúngico na maior concentração de subdose mostrou uma redução de 5 logs em relação ao grupo controle.

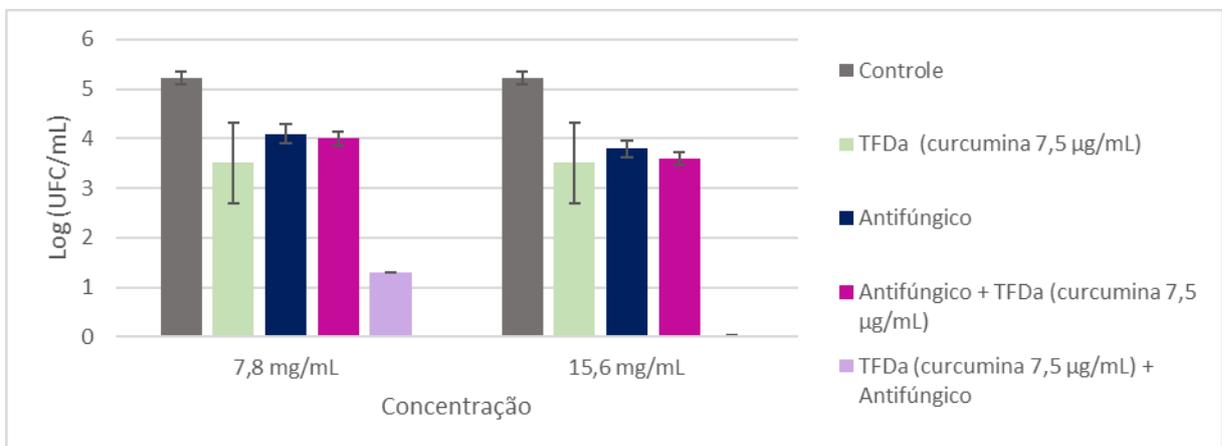


Figura 18. Redução na população de *C. albicans* com o uso do iodeto de potássio em associação com a TFDa em ordem de aplicação alternada. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A partir dos dados com *C. albicans*, foi possível repetir o teste de combinação terapêutica para os microrganismos causadores da esporotricose. Ao aplicar os testes no *S. brasiliensis* é possível ver, no gráfico da Figura 19, a redução total da população fúngica estudada quando a TFDa, com concentração de 7,5 µg/mL de curcumina, foi aplicada antes do itraconazol, em todas as concentrações antifúngicas testadas de subdose. Quando o antifúngico foi usado isoladamente ou antes da TFDa, houve, no máximo, a redução de 2,5 logs de UFC/mL do *S. brasiliensis* em relação ao grupo controle. Em quase todas as concentrações testadas, os grupos só antifúngico ou só TFDa tiveram mais efeito contra o *S. brasiliensis* individualmente que o comparado ao grupo de combinação quando o antifúngico é colocado antes da TFDa, mostrando que a combinação de terapias não só pode não ter efeito aditivo como pode ter um efeito contrário ao desejado.

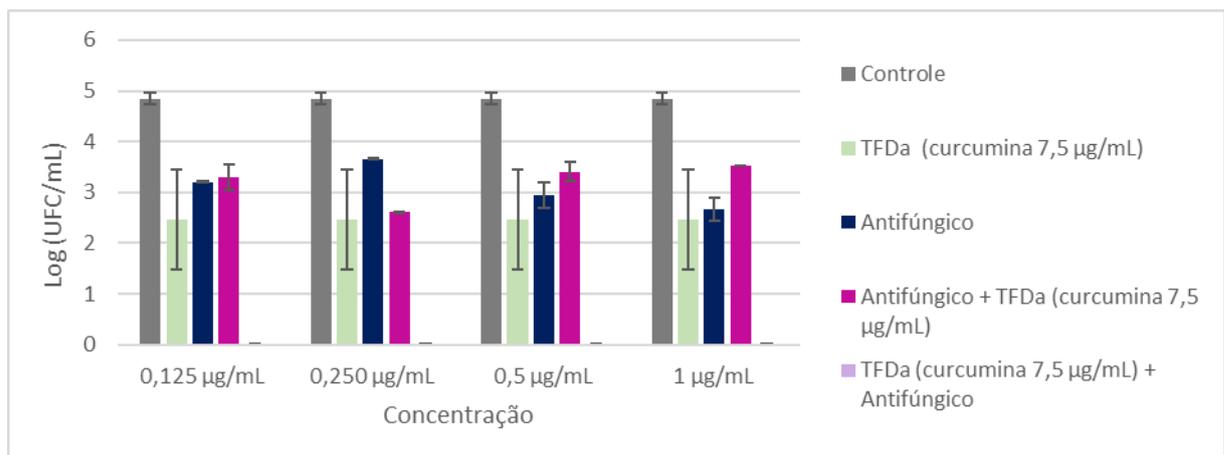


Figura 19. Redução na população de *S. brasiliensis* com o uso do itraconazol em associação com a TFDa em ordem de aplicação alternada. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Quando o teste foi realizado com a combinação da TFDa com o cetoconazol, o *S. brasiliensis* também teve uma maior suscetibilidade ao tratamento quando a sessão de TFDa foi utilizada antes do antifúngico, como redução completa de UFC/mL na concentração de 0,125 µg/mL de cetoconazol, enquanto nas concentrações de subdose testadas, o antifúngico como monoterapia causou redução de menos de 1 UFC/mL em relação ao controle. Quando o antifúngico foi aplicado antes da TFDa, houve a redução de até 2,5 logs de UFC/mL na população microbiana em relação ao controle, sem diferença estatística quando comparada somente ao uso da TFDa nas mesmas concentrações, como mostrado na Figura 20.

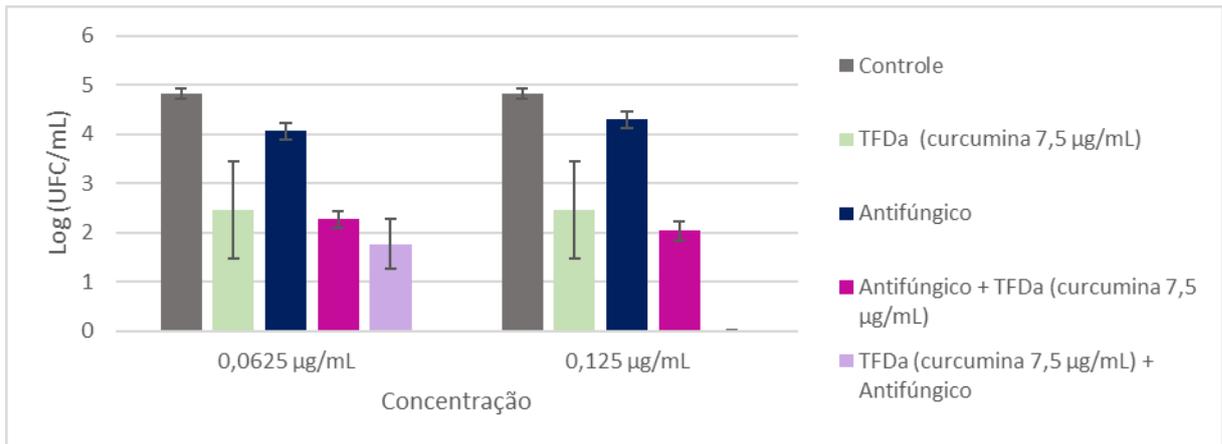


Figura 20. Redução na população de *S. brasiliensis* com o uso do cetoconazol associado com a TFDa em ordem de aplicação alterada. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A Figura 21 mostra que o iodeto de potássio usado isoladamente causou redução de até 1 log na UFC/mL do *S. brasiliensis* em relação ao grupo controle. Quando o antifúngico foi utilizado antes da TFDa, houve redução de até 2 logs de UFC/mL em relação com controle, que é menor que a redução causada somente pelo uso da TFDa, também mostrando um efeito destrutivo na combinação quando feita nessa ordem. Entretanto, quando a TFDa foi feita antes, foi possível observar um efeito aditivo para as concentrações até 62 mg/mL do iodeto de potássio e a inativação completa do fungo para a concentração de 125 mg/mL.

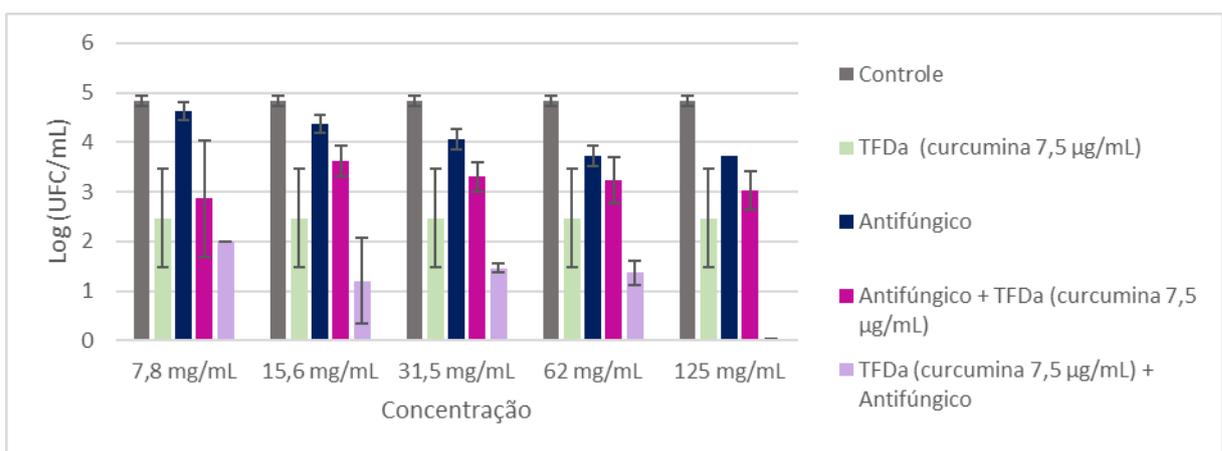


Figura 21. Redução na população de *S. brasiliensis* com o uso do iodeto de potássio em associação com a TFDa em ordem de aplicação alterada. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O *S. schenckii*, apresentando maior suscetibilidade às terapias, foi completamente inativado com menores concentrações de curcumina (7,5 µg/mL). Portanto, para os ensaios de associação de terapias, foi utilizada a concentração subinibitória de 0,75 µg/mL do agente fotossensibilizador. Com o mesmo

comportamento observado para os outros microrganismos testados, quando a TFDa foi realizada antes da utilização do itraconazol, como mostra a Figura 22, houve redução total no número de UFC/mL deste microrganismo em ambas as concentrações antifúngicas testadas (0,0625 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$). O itraconazol aplicado antes da TFDa foi capaz de reduzir menos que 1 log de UFC/mL em relação ao grupo controle, apresentando resultados semelhantes aos grupos de TFDa e itraconazol como monoterapia.

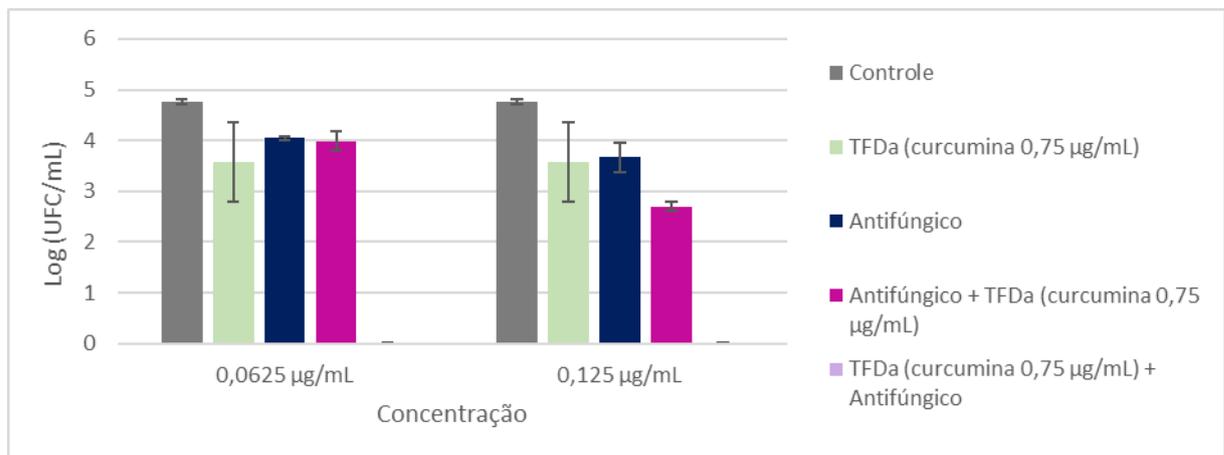


Figura 22. Redução na população de *S. schenckii* com o uso do itraconazol em associação com a TFDa em ordem de aplicação alternada. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A Figura 23 mostra que, na associação da TFDa seguida da administração do cetoconazol, houve eliminação total do *S. schenckii* na concentração de 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ do fármaco. Entretanto, quando o cetoconazol foi utilizado antes da TFDa houve redução de aproximadamente 2,5 logs de UFC/mL na população microbiana, em relação ao grupo controle, ainda superior ao do grupo apenas antifúngico (1 log de redução), e apenas TFDa (cerca de 1,5 log de redução).

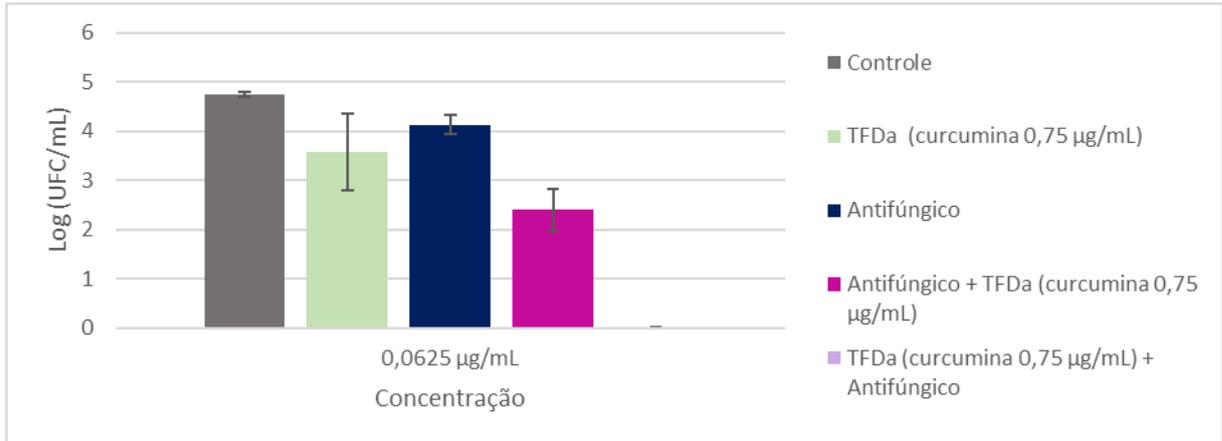


Figura 23. Redução na população de *S. schenckii* com o uso do cetoconazol associado com a TFDA em ordem de aplicação alternada. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Por último, os testes envolvendo o iodeto de potássio isolado em suas concentrações subinibitórias, mostrou redução inferiores a 1 log de UFC/mL do *S. schenckii*. Seu uso associado antes da TFDA causou redução máxima de 2,5 logs de UFC/mL do fungo em relação ao grupo controle, não resultando em efeitos aditivos para essa ordem terapêutica, quando comparada às monoterapias. Quando a TFDA foi aplicada antes do iodeto não houve diferença significativa para as concentrações de 7,8 e 15,6 µg/mL, em relação à ordem inversa. Entretanto, na concentração de 31,2 µg/mL do antifúngico, o efeito sinérgico se mostra mais claro, com a inativação total do microrganismo *S. schenckii*, nessa combinação. Esses resultados são mostrados na Figura 24.

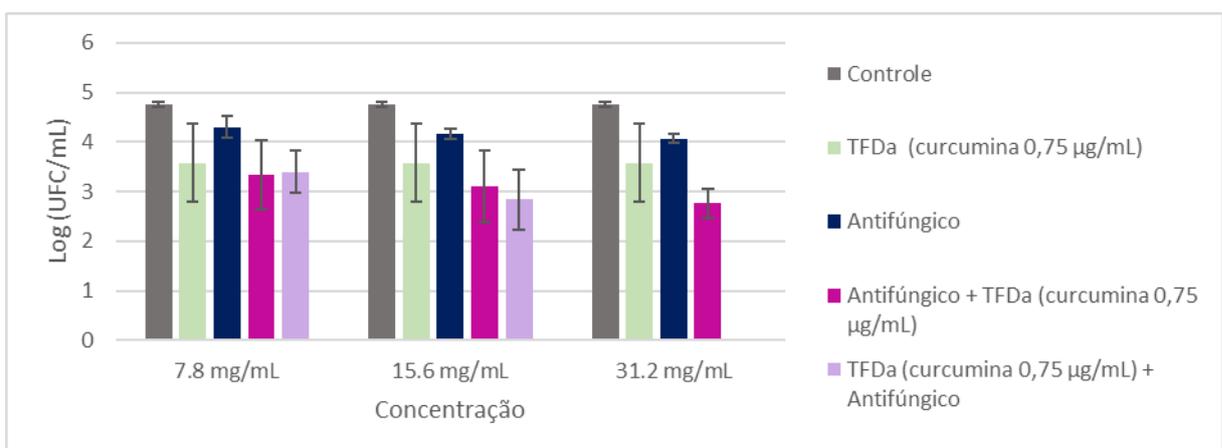


Figura 24. Redução na população de *S. schenckii* com o uso do iodeto de potássio e em associação com a TFDA em ordem de aplicação alternada. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Hoje é crescente o desafio em tratar infecções causadas por microrganismos, especialmente aqueles considerados resistentes aos fármacos disponíveis. Portanto,

se faz necessária a busca por alternativas que possam contornar esse problema (VECCHIO, 2015). A associação de terapias é uma abordagem estratégica que visa uma melhor resposta do indivíduo em relação à cura da enfermidade, pois, a partir da combinação de técnicas, é possível aumentar a sensibilidade de um microrganismo, levando-o à morte mais facilmente. Como vantagem, é possível citar a redução de doses de fármacos, diminuindo os efeitos colaterais causados quando usados em doses mais altas (RONQUI *et al.*, 2016).

A associação da TFDa com agentes antimicrobianos também vem sendo amplamente estudada. Ao associar as duas terapias, é possível reduzir a concentração desses medicamentos. Além disso, é relatada uma menor ocorrência de resistência microbiana (RONQUI *et al.*, 2016). Entretanto, a combinação de terapias também pode gerar resultados insignificantes (GILABERTE *et al.*, 2014) ou piorar o resultado das terapias, o que reforça a importância de entender os efeitos individuais de cada modalidade terapêutica para determinar quais protocolos de combinação podem resultar em efeito aditivo ou sinérgico.

O sinergismo observado apenas quando a TFDa foi aplicada anteriormente aos antifúngicos pode ser explicado por alterações morfológicas que a TFDa pode causar nos microrganismos tratados (RONQUI *et al.*, 2016). Em outros estudos, a TFDa associada ao uso de gentamicina se mostrou mais eficiente em causar a morte de cepas resistentes de *S. aureus* se comparadas com o uso das terapias isoladas (LIU *et al.*, 2020). Neste estudo, o azul de toluidina foi utilizado como fotossensibilizador e a fonte de luz utilizada foi o laser emitindo em 630 nm. Foi relatada a permeabilização da membrana bacteriana, além de acúmulo da gentamicina nas células e maior produção de ROS, culminando em maior eficiência das terapias quando usadas em associação. Em outro estudo com *S. aureus*, foi relatado que a TFDa usando o azul de metileno como fotossensibilizador e com luz em comprimento de onda de 660 nm, associados ao uso concomitante de ciprofloxacino, causou mudanças morfológicas em biofilmes de bactérias gram-positivas e gram-negativas devido à quebra da matriz extracelular destes microrganismos (RONQUI *et al.*, 2016).

Quando a suscetibilidade da *C. albicans* foi estudada após sucessivas sessões de TFDa, utilizando a fotoditazina como fotossensibilizador e LED a 660 nm como fonte de luz, o uso do meio acrescido de fluconazol obteve uma maior redução na população fúngica ao ser comparado com os microrganismos cultivados em meio

sem o antifúngico após terapia, tanto nas formas planctônicas, quanto nos biofilmes de *C. albicans* (DIAS *et al.*, 2020). Em estudos de TFDa com cepas resistentes de *C. albicans*, doses de luz mais elevadas e alta concentração de azul de toluidina, combinadas com fluconazol e posaconazol foram capazes de causar a morte completa dos microrganismos (HUANG, 2018). Neste mesmo estudo, quando a TFDa foi usada como monoterapia nas formas planctônicas, só houve a redução de 1 – 2 logs na população de *C. albicans*. Assim, estes resultados reforçam que a associação das duas terapias pode apresentar melhores resultados devido aos danos que a TFDa causa no microrganismo (HUANG, 2018).

Recentemente, foi relatado o caso de um paciente felino apresentando lesões ulceradas e nodulares em região peniana, diagnosticado, a partir de cultura, com esporotricose. Após 5 sessões de TFDa associadas ao uso de itraconazol oral, houve remissão da lesão ulcerada e redução em 50% do tamanho dos nódulos presentes. O fotossensibilizador utilizado foi o azul de metileno em solução aquosa na concentração de 500 μM , a fonte de luz utilizada foi o laser emitindo a 660 nm de comprimento de onda, dose de luz de 128 J/cm^2 e irradiância de 1,4 W/cm^2 (CABRAL *et al.*, 2022).

O azul de metileno é considerado uma substância capaz de causar toxicidade em gatos. Ao entrar nas hemácias é logo convertido em leucometileno e, em seguida, transforma a hemoglobina em metemoglobina. A metemoglobina, além de ser ineficiente em transportar o oxigênio nas células, causa a oxidação irreversível das hemoglobinas, resultando na formação de corpúsculos de Heinz (COSTA *et al.*, 2016). Por sua vez, os corpúsculos de Heinz causam fragilidade das hemácias, levando à hemólise na espécie felina, geneticamente mais suscetível à oxidação eritrocitária (SILVA; BORGES, 2018). Por essa razão, a curcumina pode ser uma opção vantajosa quando utilizada como fotossensibilizador na espécie felina, pois, somando-se a esse fato, não há relato de resistência microbiana ou intoxicação na espécie. Além disso, trata-se de uma substância com menores custos de aquisição

Os resultados mostraram que ao associar a curcumina com o agente antifúngico, ambos em concentrações subinibitórias encontradas nos testes de Inativação Fotodinâmica e no de CIM, foi possível eliminar os fungos estudados e foi observado que a ordem na qual as terapias são aplicadas exerce influência nos resultados obtidos, sendo que melhores os resultados são encontrados quando a TFDa é aplicada antes da terapia antifúngica. Assim, foi preciso investigar se havia

mudanças moleculares na curcumina que justificasse a falta de efeito na combinação quando o antifúngico era administrado antes.

3.6 Taxa de fotobranqueamento

As moléculas possuem propriedades específicas relacionadas a sua disponibilidade em soluções. Biomoléculas podem ser caracterizadas através de ferramentas distintas, inclusive a partir da interação da luz. A espectrometria é uma ferramenta que pode indicar mudanças nos agregados moleculares a partir do formato do espectro de absorção, portanto o espectro formado é resultante da presença de todas as moléculas presentes em uma solução (OLIVEIRA, 2021). Além disso, a intensidade do espectro está diretamente relacionada com a quantidade de molécula presente no meio e, por isso, pode ser usada para indicar quando há degradação (NASCIMENTO, 2016).

Assim, todas as substâncias, curcumina, itraconazol, cetoconazol e iodeto de potássio, foram analisadas a partir de seus espectros de absorção em espectrofotômetro UV-VIS, como ilustrado no gráfico da Figura 25. O itraconazol e o cetoconazol não possuem picos e bandas de absorção específicas e relevantes, ao contrário da curcumina e do iodeto de potássio, que possuem suas bandas na região azul e violeta do espectro eletromagnético, centradas em 423 nm e 350 nm, respectivamente.

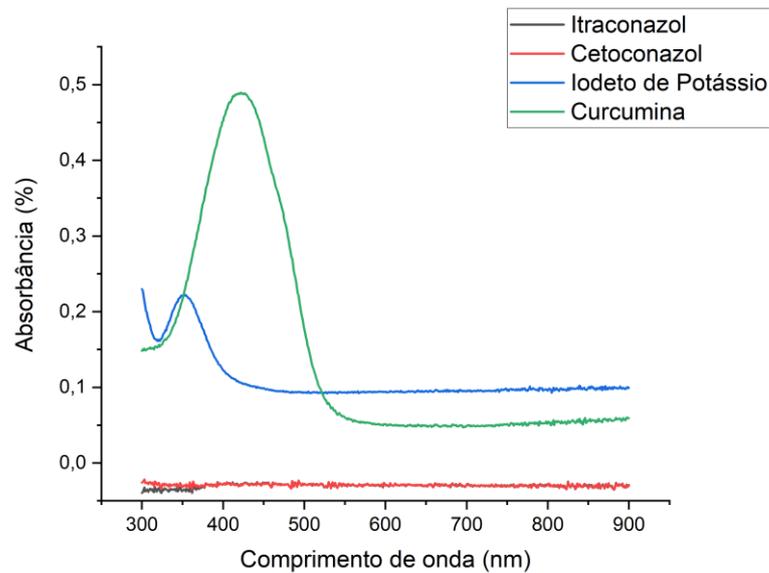


Figura 25. Espectro da curcumina, iodeto de potássio, cetoconazol e itraconazol, mostrando pico de absorção na região do azul e violeta para a curcumina e iodeto de potássio, respectivamente. O itraconazol e o cetoconazol não apresentam pico. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A partir dos espectros de absorção, antes da interação com a luz para comparação, cada uma das soluções foi iluminada em comprimento de onda de 450 nm (luz azul) por 15 minutos ($31,5 \text{ J/cm}^2$). Amostras foram tomadas com intervalos de 2 minutos para estudar as mudanças no espectro a partir da iluminação, como mostrado na figura 26-A. É possível ver que o espectro de absorção da curcumina pura decai à medida que recebe mais luz, indicando fotodegradação da substância (*photobleaching*) (NASCIMENTO, 2016). Além disso, seu pico de absorção é deslocado de 423 nm para regiões do violeta, chegando, ao final dos 15 minutos de luz, com o pico centrado em 362 nm. Esse deslocamento do pico indica alterações moleculares, mostrando que a degradação pode resultar em outros subprodutos (NASCIMENTO, 2016). A partir do pico inicial, os valores de absorção foram normalizados e o comportamento de decaimento está mostrado na Figura 26-B.

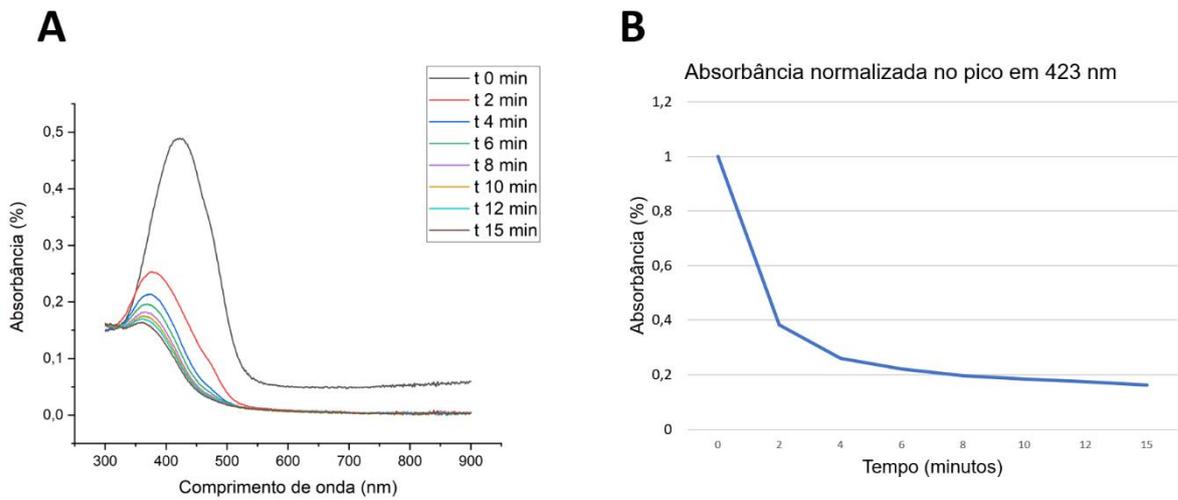


Figura 26. Espectro de absorção da curcumina ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A). Análise da fotodegradação da curcumina (B). Elaborado pela autora, 2023.

Para entender como a luz interagia com os antifúngicos, foi feito o mesmo experimento com o único composto que apresentava bandas de absorção característica, o iodeto de potássio. A solução manteve seu pico de absorção em 354 nm, sem deslocamentos, como visto na figura 27-A, porém, observa-se que também há crescimento durante a iluminação. O itraconazol e o cetoconazol não foram estudados, pois não apresentaram pico de absorção em espectrofotometria.

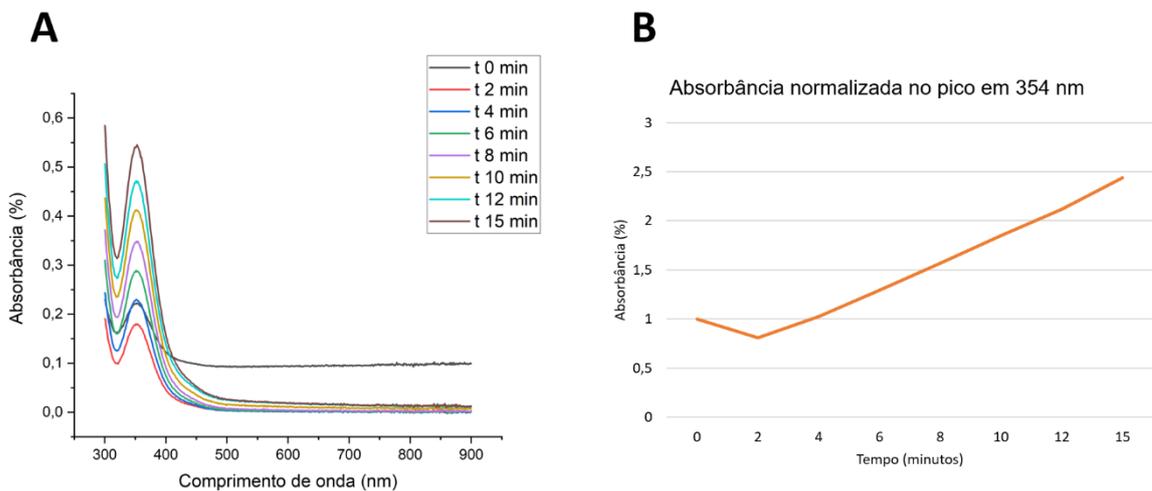


Figura 27. Espectro de absorção do iodeto de potássio ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A) e análise da sua fotodegradação (B). Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A partir da determinação do comportamento dos compostos individuais, o experimento foi realizado, também, com a associação dos fármacos com a

curcumina, para saber se, ao misturá-los durante o tratamento, haveria alguma alteração molecular ou na taxa de fotodegradação.

Na figura 28-A estão mostrados os espectros da solução de curcumina e itraconazol após 15 minutos de luz. É possível observar que a presença do itraconazol não foi responsável por qualquer alteração no pico de absorção, que se manteve em 423 nm. Além disso, durante sua iluminação, os espectros mostraram o mesmo deslocamento de pico, terminando sua iluminação com o pico centrado em 360 nm. Ao, finalmente, analisar a taxa de fotobranqueamento das soluções (Figura 28-B), o comportamento de *bleaching* continua similar, sem alteração na velocidade de degradação. Isso indica, de maneira geral, que a alteração da efetividade da combinação das técnicas não tem relação direta com uma mudança molecular, para o caso do itraconazol.

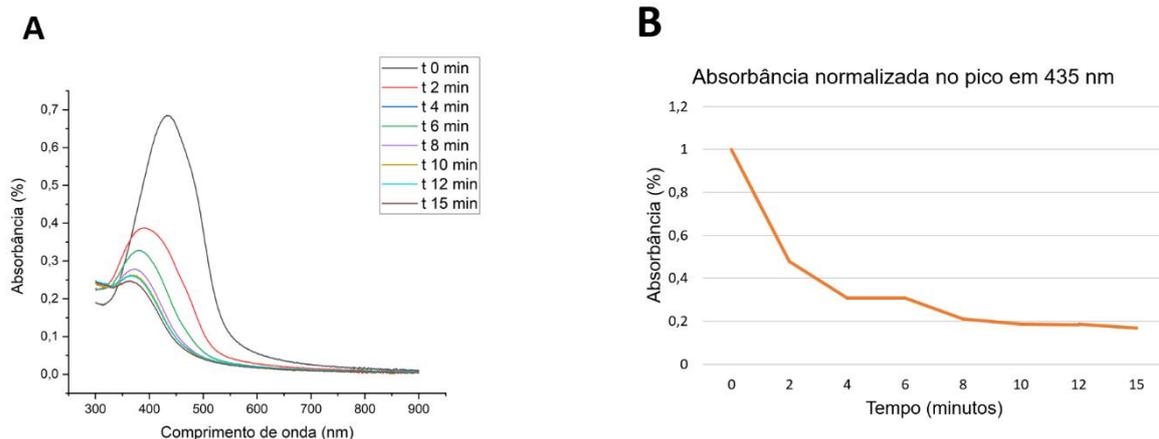


Figura 28. Espectro de absorção da solução de curcumina e itraconazol ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A) e análise da sua fotodegradação (B). Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A solução de curcumina com cetoconazol também se manteve semelhante a solução de curcumina pura iluminada, como mostrado na figura 29-A. Em ambas as misturas, vemos que o pico de absorção da solução esteve em 423 nm, com deslocamento para a esquerda (região do violeta), durante as aferições. Também foi possível notar o decaimento do espectro de absorção em ambas, como ocorrido na solução de curcumina pura. Entretanto, quando analisado a velocidade de decaimento do pico, a solução curcumina e cetoconazol mostra um atraso na degradação, comparado à solução de curcumina sozinha (Figura 29-B).

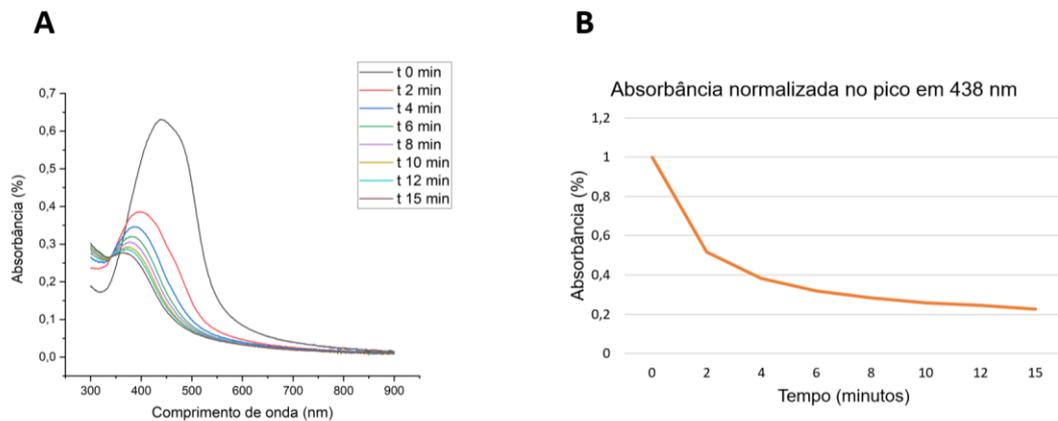


Figura 29. Espectro de absorção da solução de curcumina e cetoconazol ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A) e análise da sua fotodegradação (B). Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O comportamento da solução de curcumina e iodeto de potássio é mostrado na Figura 30, na qual, além de não se ver decaimento no espectro de absorção durante a iluminação, notamos o deslocamento do pico da curcumina, tendendo para a esquerda do gráfico, região correspondente a luz violeta em 354 nm de comprimento de onda.

Em relação à combinação do iodeto de potássio com a curcumina, há uma clara alteração nos espectros de absorção inicial, dado que ambos apresentam picos na mesma região e esses picos se somam. Assim, como eles possuem comportamentos contrários para as moléculas individuais, o comportamento durante a iluminação mostra uma estabilidade no pico (Figura 30-A). Como resultado global, há um atraso na fotodegradação comparada à solução de curcumina pura, mostrado na figura 30-B.

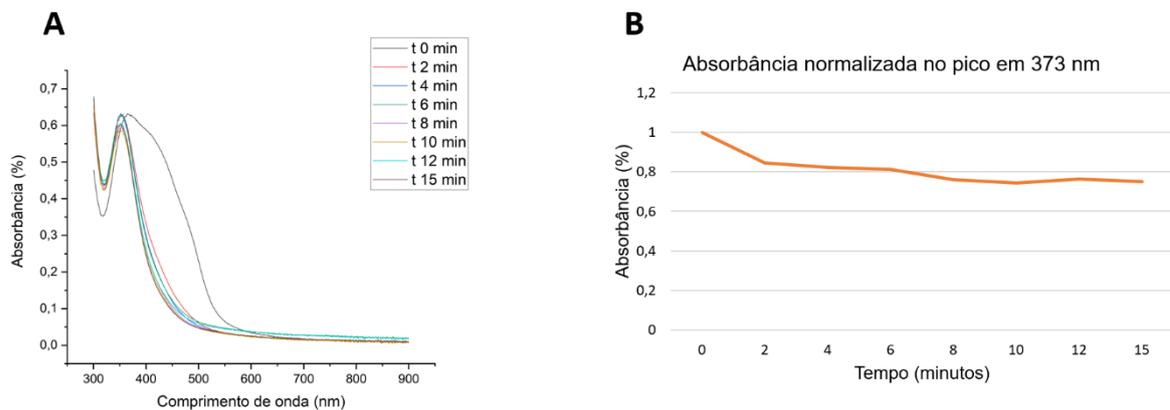


Figura 30. Espectro de absorção da solução de curcumina e iodeto de potássio ao longo de 15 minutos de iluminação com luz azul, com aferição a cada 2 minutos (A) e análise da sua fotodegradação (B). Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O comportamento encontrado para o itraconazol e cetoconazol indica que a alteração na efetividade fotodinâmica não, necessariamente, tem relação com mudanças moleculares, devido a manutenção da banda de absorção obtida com a curcumina pura. O iodeto de potássio, por apresentar picos bem característicos, mostra uma alteração espectral e de comportamento, mostrando uma possível alteração entre as moléculas. Uma hipótese para essa redução de efetividade é que a presença de outras moléculas funcionam como um sequestrador de oxigênio singleto, disponibilizando menos no sistema para a morte do microrganismo, quando comparada com a TFDa sozinha (PEREIRA, 2020). Por isso, há uma redução do efeito quando o antifúngico é colocado antes do fotossensibilizador.

Também, a partir da fotodegradação, além de radicais livres e radiação UV, são formadas espécies reativas (NASCIMENTO, 2016). Ao associar o iodeto de potássio a curcumina e incidir radiação, observou-se o atraso na fotodegradação da solução, podendo, portanto, levar a acreditar que a menor eficiência se deve ao fato de haver uma menor disponibilidade de espécies reativas de oxigênio causando o efeito fotodinâmico esperado.

Entretanto, quando aplicada antes, a TFDa funciona normalmente e causa uma determinada destruição na parede do microrganismo, permitindo ainda mais permeabilidade para a entrada do antifúngico, o que justificaria sua maior efetividade (SOARES, 2019). Em um estudo analisando os efeitos da TFDa em associação ao uso de antifúngico oral, foi possível a quase completa inativação de cepas de *Trichosporon asahii* em ensaios com biofilmes desta espécie, mostrando melhores resultados quando a TFDa foi realizada antes da terapia antifúngica em comparação

com a TFDa usada isoladamente (LAN et al., 2020). Este mesmo estudo aplicou a TFDa em uma paciente com lesões crônicas causadas pelo patógeno há mais de um ano, em associação ao uso de itraconazol oral. Após 4 meses, sendo um deles realizada a TFDa com intervalos de 1 semana entre as sessões (quatro sessões no total), foi possível ver a cura clínica das lesões. Os parâmetros utilizados para o estudo foi o ALA como fotossensibilizador e luz vermelha a 635 nm e fluência de 60 mW/cm². Este estudo atribuiu a quebra da resistência fúngica a alterações morfológicas ao microrganismo causadas pela TFDa (LAN et al., 2020).

Em um estudo avaliando o sinergismo da TFDa contra *S. aureus* e *E. coli* quando acrescida de iodeto de potássio, concluiu que essa associação pode gerar iodo molecular biocida e ácido hipoiódico, além de radicais reativos de iodeto, resultando em maior morte bacteriana devido a danos na parede celular das espécies estudadas (VECCHIO et al., 2015).

O entendimento destes processos ajudam a planejar o melhor protocolo de tratamento, seja para o uso da TFDa como monoterapia, seja combinada com o uso de medicamentos antifúngicos e sua ordem de aplicação, buscando oferecer soluções terapêuticas eficazes e seguras e que possam ter maior adesão por parte do proprietário ou do paciente atendido, resultando em redução de abandono de tratamento e de animais e na redução de tempo, custos, efeitos colaterais e resistência microbiana que possa ser gerada durante o processo de cura.

Capítulo 4 – Conclusões

Considerando que a TFDa ainda não é uma terapia tão explorada no tratamento da esporotricose e que não há relatos do uso da curcumina contra esse microrganismo, foi necessário usar a *C. albicans*, fungo amplamente estudado em testes usando a curcumina como FS, como parâmetro para avaliar as concentrações a serem aplicadas contra o *S. brasiliensis* e o *S. schenckii*. Foi estabelecida a curva de crescimento que determinou que a fase estacionária dos filamentos de *S. brasiliensis* ocorre entre o 5° e o 7° dia de crescimento com D.O. de 0,11 e as suas leveduras entre o 9° e o 10° dia de crescimento com D.O. de 0,18. A curva de crescimento do *S. schenckii* indicou que a fase estacionária dos seus filamentos

ocorre de 4 a 6 dias de crescimento com D.O. de 0,5 e de 4 a 5 dias de crescimento para as leveduras com D.O. estabelecida em 0,2.

Para saber se a curcumina tinha poder de penetração no *Sporothrix* spp. foi realizada microscopia confocal na qual foi possível visualizar o FS dentro dos limites celulares do fungo. Ainda, foi possível determinar qual o melhor tempo de incubação da curcumina que foi definido em 20 minutos.

Após a determinação do melhor intervalo droga-luz, a TFDa foi realizada e se mostrou eficaz em eliminar totalmente a *C. albicans*, o *S. brasiliensis* e o *S. schenckii* com concentrações de curcumina de 15 µg/mL, 15 µg/mL e 7,5 µg/mL, respectivamente e dose de luz de 31,5 J/cm². Além da eliminação total do fungo, foi possível redução de até 3 logs dos microrganismos estudados com menores concentrações do FS. Como os grupos controle nos quais avaliaram a ação da luz e das diferentes concentrações de FS individualmente não mostraram redução na população fúngica, a redução da população microbiana pode ser relacionada ao efeito fotodinâmico da terapia.

Para a associação da TFDa com a terapia convencional, visando a redução da dose de antifúngico, foi necessário conhecer a CIM do itraconazol, cetoconazol e do iodeto de potássio nos fungos estudados, que foi estipulada em 0,125 µg/mL para a *C. albicans*, 2 µg/mL para o *S. brasiliensis* e 0,25 µg/mL para o *S. schenckii*, frente ao itraconazol, 0,25, 0,25 e 0,125 µg/mL para a *C. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, respectivamente, frente ao cetoconazol e 31,5 mg/L para a *C. albicans*, 250 mg/mL para o *S. brasiliensis* e 62,5 mg/mL para o *S. schenckii* frente ao iodeto de potássio.

Ao associar a terapia antifúngica com a TFDa também foi possível eliminar totalmente os microrganismos estudados, desde que a TFDa fosse aplicada antes da terapia antifúngica, com concentrações subinibitórias tanto da curcumina quanto dos antifúngicos. A *C. albicans* foi eliminada com concentração de 7,5 µg/mL de curcumina e concentrações a partir de 0,0625 µg/mL de itraconazol, 0,125 µg/mL de cetoconazol e de 15,6 mg/mL de iodeto de potássio; o *S. brasiliensis* com 7,5 µg/mL de curcumina e concentrações superiores a 0,125 µg/mL de itraconazol e cetoconazol e de 125 mg/mL de iodeto de potássio e o *S. schenckii* com 0,75 µg/mL de curcumina e concentrações acima de 0,0625 µg/mL de itraconazol e cetoconazol e de 31,2 mg/mL de iodeto de potássio.

A taxa de fotobranqueamento da curcumina associada ao itraconazol e ao cetoconazol não indicou mudanças no pico de absorção da molécula, ao contrário do observado quando analisada a solução de curcumina com iodeto de potássio. Houve alteração na velocidade da taxa de degradação na solução cetoconazol e curcumina e na solução iodeto de potássio e curcumina, tornando-a mais lenta e reduzindo, possivelmente, a formação de ROS.

Portanto, o presente estudo mostrou que a TFDa pode ser uma aliada importante no combate à esporotricose. Os estudos *in vitro* mostraram resultados promissores, com morte de todos os microrganismos trabalhados, tanto como monoterapia, quanto associada ao tratamento convencional, porém, a ordem na qual as terapias são aplicadas durante a combinação deve ser escolhida criteriosamente, de modo que se obtenha uma maximização dos resultados, provavelmente ligados à destruição da parede celular fúngica causada pela TFDa antes do fármaco, potencializando o efeito do antifúngico.

Ao associar os tratamentos, espera-se que a dose de antifúngico necessária para a cura da esporotricose seja reduzida, assim como o tempo de uso dos medicamentos, com isso, espera-se também a redução no surgimento de efeitos colaterais ocasionados pelo uso prolongado dos fármacos associado com suas doses mais elevadas. O resultado esperado é que haja uma maior taxa de sucesso do tratamento e redução da disseminação da esporotricose, ocasionados pela maior adesão dos pacientes ao tratamento.

Referências

ALMEIDA-PAES, Rodrigo, BRITO-SANTOS, Fábio, FIGUEIREDO CARVALHO, Maria Helena Galdino, MACHADO, Ana Caroline Sá, OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista, PEREIRA, Sandro Antonio, GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara, ZANCOPÉ-OLIVEIRA, Rosely Maria. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, may 2017, v. 112(5), p. 376-381.

ANDRADE, M. C. et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 2, 2013, p. 200–210. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/74465> > . Acesso em: 04 mai. 2023.

ANVISA. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma**

Aprovada – Segunda Edição. v. 22, n. 15, S.d. Disponível em: < https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo2.pdf >. Acesso em: 04 mai. 2023.

BAGNATO, Vanderlei Salvador. Introdução. In: BAGNATO, Vanderlei Salvador. **Controle microbiológico com ação fotodinâmica.** São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. cap. 1, 11–20.

BAREJA, Rajesh., GROVER, Prem Singh, MEHRA, Sadhir Kumar. Determination of growth curve of *Sporothrix schenckii* in mycelial phase. **Journal of dental and medical Science**, v. 14, n. 4, abr. 2015, p. 121-123. Disponível em: <<https://www.iosrjournals.org/iosr-jdms/papers/Vol14-issue4/Version-6/Y01446121123.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

BARR, Stephen, BOWMAN, Dwight. Esporotricose. In: BARR, Stephen, BOWMAN, Dwight. **Doenças infecciosas e parasitárias em cães e gatos - Consulta em 5 minutos.** Rio de Janeiro: Revinter, 2010. cap. 47, p. 229 – 232.

CABRAL, Fernanda V., SELLERA, Fábio P., RIBEIRO, Martha. Feline sporotrichosis successfully treated with methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy and low doses of itraconazole. **Photodiagnosis Photodyn Therapy**, v. 40, dec. 2022. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36272192/> >. Acesso em: 04 mai. 2023.

CASTRO, Iسس Maria Nogueira de et al. Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans*. **Revista brasileira de análises clínicas**. 2016. Disponível em: < <https://www.rbac.org.br/artigos/comparacao-da-atividade-de-antifungicos-imidazolicos-e-triazolicos-frente-a-candida-albicans-48n-3/> >. Acesso em: 04 mai. 2023.

CATCHINGS, Bettie M., GUIDRY, D. J. Effects of pH and temperature on the in vitro growth of *Sporothrix schenckii*. **Sabouraudia**, v. 11, jul. 2009, p. 70- 76. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/ref/10.1080/00362177385190151?scroll=top>>. Acesso em: 11 jul. 2022.

CHAKRABARTI, Arunaloke, BONIFAZ, Alejandro, GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara, MOCHIZUKI, Takashi, LI, Shanshan. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, dez. 2014, p. 3-14. Disponível em: < <https://academic.oup.com/mmy/article/53/1/3/992886?login=false> >. Acesso em: 15 jul. 2022.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a. Disponível em: < https://clsi.org/media/1455/m38a2_sample.pdf >. Acesso em: 10 jul. 2022.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b. Disponível em:< https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf >. Acesso em: 10 jul. 2022.

CHEN, Ruilli, SONG, Yang, ZHEN, Yu, YAO, Lei, SHI, Ying, CUI, Yan, LI, Shanshan. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy has effective antifungal activity against *Sporothrix globosa* in vitro. **Mycoses**, v. 63, n. 12, sep. 2020, p. 1311-1320. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32816371/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

CÓRDOBA, Susana, ISLA, Guillermina, SZUSZ, Wanda, VIVOT, Walter, HEVIA, Alejandra, DAVEL, Graciela, CANTEROS, Cristina E. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. **Mycoses**, v. 61, n.7, mar. 2018, p. 441-44. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29500853/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

COSTA, Kely Raiany Araujo da, SANTIAGO, Silvana Barbosa. **Mecanismos de resistência da *Candida albicans***. Faculdade Alfredo Nasser. 2020. Disponível em: < <http://www.unifan.edu.br/unifan/aparecida/wp-content/uploads/sites/2/2019/09/MECANISMOS-DE-RESIST%C3%80NCIA-DA-CANDIDA-ALBICANS.pdf>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

COSTA, Samay Zillmann Rocha, CID, Gabriela de Carvalho, D'AVILA, Mariana Sequeira, FRANÇA, Ticiane, Nascimento, SANTOS, Bartolomeu Benedito Neves dos, NOGUEIRA, Vivian de Assunção, SANTOS, André Marandola, PEIXOTO, Tiago da Cunha. Intoxicação por azul de metileno (cloreto de metiltionínio) em gato. **Rev. Bras. Med. Vet.**, 38(Supl.2), nov. 2016, p.145-148. Disponível em: < <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/24166> >. Acesso em: 04 mai. 2023.

D'ALMEIDA, Camila de Paula, PRATAVIEIRA, Sebastião, GARCIA, Marlon. Interação das fontes de luz com tecido biológico. In: AQUINO JUNIOR, Antonio Eduardo de, CARBINATTO, Fernanda Mansano, COELHO, Vitória Helena Maciel, BAGNATO, Vanderlei Salvador. Feridas: um desafio para a saúde pública. São Carlos: Edição do Autor, p. 33-41.

DIAS, Luana Mendonça, KLEIN, Marlise Inêz, JORDÃO, Cláudia Carolina, CARMELLO, Juliana Cabrini, BELLINI, Amanda, PAVARINA, Ana Cláudia. Successive applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy effects the susceptibility of *Candida albicans* grown in medium with or without fluconazole. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, v. 32, dec. 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33022418/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

DOVIGO, Livia Nordi 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 Mai. 2023.

DOVIGO, Livia Nordi et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, apr. 2013, p. 51, 243-251. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/51/3/243/1048400>. Acesso em: 04 mai. 2023.

ESPINEL, Ingroff A., Cantón E. Antifungal susceptibility testing of yeasts. In: SCHWALBE, R., STEELE-MOORE, L., GOODWIN, A. C. **Antimicrobial susceptibility testing**. Boca Raton: Flórida: 2007, Cap. 9, p. 173-208.

FIOCRUZ. **Esporotricose**. 2018 Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/esporotricose>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

FOSSUM, Theresa Welch. Cirurgia do sistema endócrino. In: FOSSUM, Theresa Welch. **Cirurgia de pequenos animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 22, p. 633-684.

FREITAS, Deyvison F. S., SANTOS, Suelen S., ALMEIDA-PAES, Rodrigo, OLIVEIRA, Manoel M. E. de, VALLE, Antonio C. F. do, GUTIERREZ-GALHARDO, Maria Clara, ZANCOPE-OLIVEIRA, Rosely M., NOSANCHUK, Joshua. Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a paciente with chronic disseminated sporotrichosis. **Virulence**, v. 6, fev. 2015, p. 112- 120. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4601271/pdf/kvir-06-02-1014274.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

GILABERTE, Yolanda, ASPIROZ, Carmen, ALEJANDRE, M. Carmen, ANDRES-CIRIANO, Elena, FORTUÑO, Blanca, CHARLEZ, Luis, REVILHO, Maria José, HAMBLIN, Michael R., REZUSTA, Aantonio. Cutaneous sporotrichosis treated with photodynamic therapy: an in vitro and *in vivo* study. **Photomed Laser Surgery**, v. 32, jan. 2014, p. 54-57. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887415/pdf/pho.2013.3590.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2022.

GOVERNO NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL. Nota técnica. 2021. Disponível em: < <https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2021/08/Nota-tecnica-esporotricose.pdf>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

GRECCO, Clóvis, TORIYAMA, Lilian Tan. Princípios básicos em terapia fotodinâmica. In: BAGNATO, Vanderlei Salvador. **Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015. cap. 3, p. 39 – 49.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira, ROCHA, Elisabeth Martins da Silva da Rocha, MONTENEGRO, Hildebrando Montenegro, CARNEIRO, Aroldo José Borges, XAVIER, Melissa Orzechowski, FARIAS, Marconi Rodrigues de, MONTI, Fabiana, MANSHO, Wilson, PEREIRA, Romeika Herminia de Macedo Assunção, PEREIRA, Sandro Antonio Pereira, LOPES-BEZERRA, Leila Maria. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. Brazilian journal of microbiology, v. 52, n. 1, sep. 2020, p. 107-124. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32990922/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira, MIRANDA, Luisa Helena Monteiro, REIS, Erica Guerino, RODRIGUES, Anderson Messias, PEREIRA, Sandro Antônio. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, jan. 2017. Disponível em: <

<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006077>>. Acesso em: 10 jul. 2022.

GUIMARÃES, E.O. da C.; GÓRNIAC, Silavana Lima. Agentes antifúngicos e antivirais. In: SPINOSA, Helenice de Souza; GÓRNIAC, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Martha. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap.10, p. 513 – 527.

GUIRADO, Gunther Monteiro de Paula et. al. In vitro reduction of pathogenic *sporotherix schenckii* fungus by photodynamic therapy. **Mundo da Saúde**, São Paulo - 2017;41(2), p. 138-14. Disponível em: < https://bvsm.sau.gov.br/bvs/periodicos/mundo_saude_artigos/in_vitro_reduction_pathogenic.pdf>. Acesso em 04 mai. 2023.

HOENIGL, Martin, SEIDEL, Danila, SPRUTE, Rosanne, CUNHA, Cristina, OLIVERIO, Matteo, GOLDMAN, Gustavo H., IBRAHIM, Ashraf S., CARVALHO, Agostinho. COVID-19-associated fungal infections. *Nature microbiology*, v. 7, n. 8, aug. 2022, p. 1127-1140. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35918423/>> . Acesso em: 04 mai. 2023.

HUANG, Mu-Ching, SHEN, Mandy, HUANG, Yi-Jhen, LIN, Hsiao-Chi, CHEN, Chin-Tin. 2018. Photodynamic Inactivation Potentiates the Susceptibility of Antifungal Agents against the Planktonic and Biofilm Cells of *Candida albicans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2: 434. 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5855656/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

IVIDY, Byson. **Esporotricose felina: revisão bibliográfica**. 2019. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Rondônia. Rolim de Moura, 2019.

LAN, Yu, LU, Sha, ZHENG, Bowen, TANG, Zengqu, LI, Jiahao, ZHANG. Combinatory Effect of ALA-PDT and Itraconazole Treatment for *Trichosporon asahii*. **Lasers Surg Med**, v. 53, nov. 2021. Disponível em: < [Combinatory Effect of ALA-PDT and Itraconazole Treatment for Trichosporon asahii - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35918423/)>. Acesso em: 04 mai. 2023.

LI, Jinran, ZHU, Mingji, AN, Lin, CHEN, Fen, ZHANG, Xu. Fungicidal efficacy of photodynamic therapy using methylene blue against *Sporothrix globosa* *in vitro* and *in vivo*. **Eur J Dermatol**. v. 29, n. 2, abr. 2019, p. 160-166. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31106759/>>. Acesso em: 02 ago. 2022.

LIMA, Maschio de. **Estudo clínico e epidemiológico da esporotricose felina: caracterização fenotípica, molecular e suscetibilidade antifúngica *in vitro* de isolados**. 2020. 99f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas, Unesp, São José do Rio Preto, 2020.

LIU, Shupe, MAI, Bingjie, JIA, Mengqi, LIN, Dewu, ZHANG, Jingdan, LIU, Quanhong, WANG, Pan. Synergistic antimicrobial effects of photodynamic

antimicrobial chemotherapy and gentamicin on *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Photodiagnosis Photodyn Therapy**, v. 30, jun. 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32151763/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

LOPES-BEZERRA, Leila Maria, WALTER, Louise A., NIÑO-VIEGA, Gustavo, MORA-MONTES, Hector M., NEVES, Gabriela W.P., VILLALOBOS-DUNNO, Hector, BARRETO, Laura, GARCIA, Karina, FRANCO, Bernardo, ALVAREZ, José A. Martinez, MUNRO, Carol A., GOW, Neil A. R. Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminate structures and sloughing of extensive and intact layers. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 9, n.12, mar. 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006169>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

LUCROY, Michael, LONG, Kevin R., BLAIK, Margaret A., HIGBEE, Russell G., RIGDWAY, Tisha D. Photodynamic Therapy for the Treatment of Intranasal Tumors in 3 Dogs and 1 Cat. **J Vet Intern Med** v. 17, 2003, p. 727–729. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14529144/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

MAIDAN, Mykola, ROP, Larissa De, RELLOSO, MigueL, DIEZ-OREJAS, Rosalia, THEVELEIN, Johan M., DIJCK, Patrick Van. Combined Inactivation of the *Candida albicans* GPR1 and TPS2 Genes Results in Avirulence in a Mouse Model for Systemic Infection. **Infeccion and immunity**, v.76, apr. 2008, p. 686–1694.

MARIO, D. A. N. **Complexo *Sporothrix schenckii*: inativação fotodinâmica, influência da melanina na atividade dos antifúngicos e combinação de fármacos**. 2015. 91f. Tese – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Santa Maria. Santa Maria, 2015.

MOYES, David L, NAGLIK, Julian R. Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, jun. 2011. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21776285/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

NASCIMENTO, Carolina Evangelista. **Degradação fotoquímica de compostos orgânicos**. 2014. 73 f. Monografia - (Bacharel em Química). Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2014.

OLIVEIRA, Matheus Guimarães de. **Caracterização da *Vitex Gardneriana* Schauer através da espectroscopia UV-Visível e TDDFT**. 2021. 68 f. Dissertação – (Mestre em Física). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2021.

PEREIRA, Pedro Alencar Gomes. Detecção e caracterização por ressonância paramagnética eletrônica de espécies reativas de oxigênio produzidas por terapia fotodinâmica. 2020. 75 f. Dissertação (Mestrado em Física)—Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

PFALLER, Michael A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1A, jan.

2012, p. S3-13. Disponível em: <
<https://www.amjmed.com/action/showPdf?pii=S0002-9343%2811%2900913-2>>.
 Acesso em: 04 mai 2023.

PIRES, LAYLA. **Terapia fotodinâmica para inativação do *Pythium insidiosum* – estudo *in vitro* e *in vivo***. 146 f. Dissertação (Pós-graduação em Física Aplicada Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2012. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-23102012-165427/publico/LaylaPires_ME_corrigida.pdf> . Acesso em: 04 mai. 2023.

PEREZ-LAGUNA, Vanessa, GILABERTE, Yolanda, MILLÁN-LOU, María, MONTSERRAT, Agut, NONELL, Santi, REZUSTA, Antonia, HAMBLIN, Michael. A combination of photodynamic therapy and antimicrobial compounds to treat skin and mucosal infection: a systematic review. **Photochemical & photobiological sciences. Photochemical & Photobiological sciences**, fev. 2019. Disponível em: <https://zaguan.unizar.es/record/96020/files/texto_completo.pdf?version=1>. Acesso em: 30 jul. 2022.

PICCO, Daniele de Cassia Rodrigues, CAVALCANTE, Leonardo Lobo Ribeiro, TREVISAN, Rayana Longo Brighetti, SOUZA-GABRIEL, Aline Evangelista, Maria Cristina Borgatto, CORONA, Silvana Aparecida Milori. Effect of curcumin – Mediated Photodynamic on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*: a systematic review of in vitro studies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, set. 2019, p. 455-461. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100019302297?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

PRATAVIEIRA, Sebastião, CORRÊA, T. Q., ONO, B., KURACHI, Cristina. História da terapia fotodinâmica. In: BAGNATO, V. S. **Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015. p. 23 – 38.

PREFEITURA DE SÃO PAULO. PORTARIA Nº 470/2020-SMS.G. Disponível em: <<http://legislacao.prefeitura.sp.gov.br/leis/portaria-secretaria-municipal-da-saude-sms-470-de-30-de-novembro-de-2020>>. Acesso em 04 mai. 2023.

ROCHA, Raphael Francisco Dutra Barbosa da. **Tratamento da esporotricose felina refratária com a associação de Iodeto de Potássio e Itraconazol oral**. 2014. 73f. Dissertação (Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Rio de Janeiro, 2014.

RODRIGUES, Anderson Messias, DELLA TERRA, Paula Portella, GREMIÃO, Isabella Dib, PEREIRA, Sandro Antonio, OROFINO-COSTA, Rosane, CAMARGO, Zoilo Pires. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, v. 185, n. 5, out. 2020, p. 813-842. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32052359>>. Acesso em: 12 jul. 2022.

RONQUI, Maria Rita, COLETTI, Tatiana Maria Starck Fogaça de Aguiar, FREITAS, Laura Marise de, MIRANDA, Elaine Toscano, FONTANA, Carla Raquel. Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. **Journal of**

Photochemistry & Photobiology, B: Biology, v. 158, may 2016, p.122–129. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26971277/>>. Acesso em 04 mai. 2023.

SANITÁ, Paula Volpato, DOVIGO, Livia Nordi, RIBEIRO, Ana Paula Dias, ANDRADE, Mariana Carvalho, MIMA, Ewerton Garcia de Oliveira. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. **Lasers in Medical Science**, v. 33, nov. 2017, p. 709–717. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10103-017-2382-8>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

SHAH, Rajesh Kuma, GADEKAR, Hemant B., JAIN, Vikas, KUMARI, Sweta, TRIPATHI, Apoorva, GUPTA, Sanjo Gupta. Morphological Transformation and Estimation of Normal Growth Curve of Both Morphological Forms of *Sporothrix schenckii*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 7, n. 11, oct. 2018, p. 1078-1084. Disponível em: <https://www.ijcmas.com/7-11-2018/Rajesh%20Kumar%20Shah,%20et%20al.pdf>. Acesso em: mai. 2023.

SILVA, Ana Paula da. **Inativação dos microrganismos causadores da onicomicose por terapia fotodinâmica – estudo *in vitro* e clínico**. 2013. 121f. Dissertação - (Mestre em Ciências). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

SILVA, A. P. da. **Novas estratégias para diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica**. 2017. 197 f. Tese – (Doutora em Ciências). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

SILVA, Francielma Rezende, BORGES, Karla Irigaray Nogueira. **Anemia hemolítica por corpúsculo de Heinz em felinos – Revisão de literatura**. 2018. Disponível em: < https://www.unifimes.edu.br/filemanager_uploads/files/documentos/semana_universitaria/xiii_semana/trabalhos_aprovados/biologia_saude/resumos/ANEMIA_HEMOLÍTICA_POR_CORPÚSCULO_DE_HEINZ_EM_FELINOS_REVISÃO_DE_LITERATURA.pdf>. Acesso em: 04 mai. 2023.

SILVA, Maria Lucilene Queiroz da. **Efeito inibitório, *in vitro*, do iodeto de potássio e da miltefosina frente a cepas do complexo *Sporothrix schenckii* em biofilmes nas formas filamentosas e leveduriforme**. 2017. 103 f. Dissertação – (Mestre em Microbiologia Médica). Universidade Federal do Ceará, 2017.

SOARES, J. M. **Estudo de parâmetros microbianos em múltiplas sessões de terapia fotodinâmica antimicrobiana**. 2019. 87f. Dissertação (Pós-graduação em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2019.

ULIANA, Marciana Pierina, SILVA, Ana Paula da, INADA, Natalia Mayumi, SERRA, Osvaldo Antonio, NERI, Cláudio Roberto, COSTA, Rodrigo, OLIVEIRA, Kleber Thiago de. Fotossensibilizadores. In: BAGNATO, V. S. **Controle microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. cap. 3, p. 45 – 63.

TIBURCIO, Marco Antonio, ROCHA, Amanda Regina, ROMANO, Renan, INADA, Natalia Mayumi, BAGNATO, Vanderlei Salvador, CARLOS, Rose Maria, BUZZÁ, Hilde Harb, *In vitro* evaluation of the cis-[Ru(phen) 2(pPDIp)] 2+** complex for antimicrobial photodynamic therapy against *Sporothrix brasiliensis* and *Candida albicans*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 229, abr. 2022, p. 112414. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134422000288?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 jul. 2022.

VECHIO, Daniela, GRUPTA, Asheesh, HUANG, Liyi, LANDI, Giacomo Landi, AVCI, Pinar, RODAS, Andrea, HAMBLIN, Michael R. Bacterial Photodynamic Inactivation Mediated by Methylene Blue and Red Light Is Enhanced by Synergistic Effect of Potassium Iodide. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 9, sep. 2015, p. 5203-12. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26077247/>>. Acesso em: 04 mai. 2023.

VIANA, P.G. **Esporotricose canina: estudo epidemiológico, clínico e terapêutico na região metropolitana do Rio de Janeiro (2004-2014)**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

VOLLET-FILHO, José Dirceu, INADA, Natalia Mayumi. Fundamentos da ação fotodinâmica. In: BAGNATO, Vanderlei Salvador. **Controle microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. cap. 2, p. 21 - 44.