

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANA PAULA DA SILVA

Inativação dos micro-organismos causadores da onicomicose por terapia  
fotodinâmica - estudo *in vitro* e clínico

São Carlos  
2013



ANA PAULA DA SILVA

Inativação dos micro-organismos causadores da onicomicose por  
terapia fotodinâmica - estudo *in vitro* e clínico

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Física do Instituto de  
Física de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada  
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Natalia Mayumi Inada

Versão Corrigida

(versão original na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos  
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Silva, Ana Paula

Inativação dos micro-organismos causadores da onicomicose por Terapia fotodinâmica estudo in vitro e clínico / Ana Paula da Silva; orientadora Natalia Mayumi Inada - versão corrigida -- São Carlos, 2013.  
121 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Inativação de micro-organismos. 3. Onicomicose. I. Mayumi Inada, Natalia, orient. II. Título.





Dedico este trabalho primeiramente à Deus,  
que é luz e sabedoria no meu caminho; sem Ele não estaríamos  
desfrutando deste momento tão importante.  
À minha família por toda ajuda,  
apoio incondicional e por acreditarem em mim,  
sempre me encorajando a nunca desistir dos meus propósitos.  
A todos meus amigos que me acompanharam durante esta trajetória  
e de uma forma ou de outra participaram da minha vida e  
estiveram presentes em todos os  
momentos fáceis ou difíceis.





## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, e em especial a:*

*À minha família, sempre presente em minha vida, pelo apoio e incentivo incondicional. Muito obrigada por todo o amor e carinho!*

*À Dra. Natalia M. Inada, por me aceitar como sua aluna e acreditar no meu trabalho. Muito obrigada pela chance de desenvolver este projeto e por me ensinar que ciência é construída com ética e dedicação. Agradeço também por sua amizade e carinho, dispondo-se em várias ocasiões a esclarecer as mais diversas dúvidas sempre com sabedoria e permanente boa vontade.*

*Ao Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato que me acolheu em seu laboratório de Biofotônica, apostando e acreditando em mim e com seu exemplo ensina como é fazer pesquisa.*

*À Profa. Dra. Cristina Kurachi, pelo apoio, amizade, sempre disposta a ajudar.*

*Ao Dr. José D. Vollet Filho Muito obrigada por me acompanhar desde a iniciação científica, por todos os ensinamentos de física e mais importante que tudo isso, muito obrigada pela compreensão, ajuda, paciência e amizade a mim dedicada.*

*À Layla Pires, por compartilhar comigo todo seu conhecimento em microbiologia de forma simples e objetiva! Obrigada pelo carinho, amizade e paciência!*

*À Hilde H. Buzzá, que é uma amiga especial, para todo o momento, e que alegra o dia de todos no laboratório!*

*Lilian T. Moyiama (Lili), as suas interpretações objetivas me fizeram desenvolver um raciocínio mais lógico das questões do dia-a-dia, contribuindo para meu desenvolvimento profissional e pessoal.*

*Ao Clóvis que está sempre disposto a ajudar, em especial, por sua bondade, carinho e principalmente sua amizade!*

*Aos amigos do Laboratório de Biofotônica que sempre estavam dispostos a me ajudarem a concluir este trabalho: Amanda, Sebastião, Cintia, Alessandro, Michelle, Larissa, Patrícia, Miriam, Thiago, Vitor, Wei e Éverton. A todos do Laboratório de Biofotônica, muito obrigada!*

*Ao apoio em todos os momentos e carinho das funcionárias da secretaria do Grupo de Óptica: Isabel de Cássia De Vitro Sertori (Bel), Maria Benedita S. G. da Silva (Benê) e Cristiane A. Cagnin (Cris).*

*À Clínica Bompropé (São Carlos-SP), Studio 1 (Ribeirão Preto-SP) e à universidade Anhembí Morumbi (São Paulo-SP) pela disponibilização do espaço e acompanhamento podológico dos voluntários.*

*Às podólogas Rosália Pimentel e Adriana Camillo Augusto por serem voluntárias a acompanhar cada paciente da pesquisa, agradeço pela paciência e pela amizade. Serei e ternamente grata!*

*A todos os voluntários que participaram deste projeto assiduamente! Muito obrigada por todos os ensinamentos de vida e amizade que construímos juntos!*

*Ao Instituto de Física de São Carlos (USP) que me acolheu e me proporcionou toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.*

*Ao CNPq, à Capes, à FAPESP (através do CePOF), entre outros apoios financeiros que deram suporte em várias etapas desse trabalho e no projeto temático em que estive envolvida, propiciando a efetivação e divulgação dos resultados obtidos.*

*E à todos que não estão citados nominalmente, mas que colaboraram de alguma maneira, meu sincero agradecimento!*

***Que Deus abençoe sempre vocês!***

*"Nada do que é feito com amor é pequeno."*

*Chiara Lubich*

*"...A vida não é rigorosa: ela propicia erros e acertos. Os erros podem ser transformados em acertos, quando, com eles, se aprende. Não existe a segurança do acerto eterno, a vida é a monotonia cromática perante o arco-íris. É a estagnação da vida. Para a vida, as portas não são obstáculos, mas diferentes passagens!"*

*Içami Tiba*



## RESUMO

SILVA, A.P. **Inativação fotodinâmica dos micro-organismos causadores da onicomicose** – estudo *in vitro* e clínico. 2012. 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A onicomicose é a mais frequente das doenças ungueais, pode ser causada por dermatófitos, leveduras e fungos não-dermatófitos. A infecção caracteriza-se por unhas quebradiças, espessadas e despigmentadas ou com excesso de pigmentação. O tratamento convencional consiste na administração sistêmica de antifúngicos e antibióticos por longos períodos, podendo ser o responsável pelo aumento de linhagens microbianas resistentes às drogas disponíveis. Esse fator associado a alta incidência deste tipo de infecção na população tornam importante o desenvolvimento de novas tecnologias e opções terapêuticas. Esta dissertação está composta por duas partes: pesquisa básica (estudos *in vitro*) e aplicada (estudo clínico), além do desenvolvimento de equipamento para o tratamento da onicomicose por Terapia Fotodinâmica (TFD). A TFD consiste no emprego do fotossensibilizador (FS) ativado por luz em comprimento de onda adequado que, na presença de oxigênio, produz espécies reativas de oxigênio tóxicas que inativam as células alvo (fungos e bactérias). Nos ensaios *in vitro*, utilizamos um dos principais fungos causadores da onicomicose, o *Trychophyton mentagrophytes* e dois fotossensibilizadores diferentes: Solução de curcuminóides (PDTPharma Ltda., Cravinhos-SP, Brasil) e Photogem® (Limited Liability Company Photogem, Moscou, Rússia), onde analisamos por microscopia confocal o tempo de incubação dos fotossensibilizadores nos fungos e a viabilidade celular dos micro-organismos para os diversos parâmetros avaliados. Para os estudos clínicos, foram desenvolvidos dois equipamentos emissores de luz em comprimentos de onda distintos: em 630 nm, para o Photogem®, e em 470 nm, para a curcumina. Estes foram desenvolvidos no IFSC (Grupo de Óptica, Laboratório de Apoio Tecnológico) e consiste em diodos emissores de luz (LED) acoplados em presilhas anatomicamente desenhadas para as unhas dos pés e das mãos. Foram tratados 90 pacientes divididos em dois grupos, diferenciados pelo fotossensibilizador tópico utilizado: Photogem® (1 mg/mL) ou curcumina (1.5 mg/mL). Após 1 hora a presença do fotossensibilizador foi confirmada por imagem de fluorescência e o local iluminado por 20 minutos (fluência

de 120 J/cm<sup>2</sup>). Nova avaliação clínica foi realizada após sete dias e o acompanhamento do tratamento foi realizado tanto por imagens, quanto por exames laboratoriais. Observou-se a cura de 63 pacientes com uma média de seis meses de tratamento. Em comparação aos tratamentos convencionais, a TFD apresenta resultados mais rápidos, sem recidivas. Além disso, aspectos como o baixo custo da instrumentação envolvida, a possibilidade de tratamento local ao invés de sistêmico e a simplicidade de operação são fatores relevantes para a garantia da implantação dessa tecnologia no tratamento de um problema de saúde de ampla incidência. O protótipo utilizado durante o estudo resultou em patente que se tornou ainda alvo de interesse comercial por uma empresa nacional, juntamente com uma das medicações testadas. Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a TFD possui potencial para se tornar uma importante ferramenta no tratamento da onicomicose.

**Palavras - chave:** Onicomicose. Terapia fotodinâmica. Controle microbiano.

## ABSTRACT

SILVA, AP. **Photodynamic inactivation of micro-organisms causing onychomycosis - clinical and in vitro study.** 2012. 121p. Thesis (Master of Science) - Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2012.\

Onychomycosis is the most common nail diseases may be caused by dermatophytes, yeasts and non-dermatophyte fungi. The infection is characterized by brittle nails, thickened and pigmented or pigmented with excess. Conventional treatment consists of systemic administration of antifungals and antibiotics for long periods and may be responsible for the increased microbial strains resistant to available drugs. This factor associated with high incidence of this type of infection in the population become important to develop new technologies and treatment options. This dissertation is composed of two parts: basic research (*in vitro* studies) and applied (clinical study), and the development of equipment for the treatment of onychomycosis Photodynamic Therapy (PDT). The PDT is the use of photosensitizer (FS) activated by light at a wavelength appropriate that, in the presence of oxygen, produces reactive oxygen species that inactivate toxic target cells (fungi and bacteria). In vitro, we used one of the main causative fungi of onychomycosis, *Trichophyton mentagrophytes* and the two different photosensitizers: Solution of curcuminoids (PDTPharma Ltda., Cravinhos-SP, Brazil) and Photogem ® (Photogem Limited Liability Company, Moscow, Russia) where analyzed by confocal microscopy incubation time of photosensitizers in fungi and cell viability of micro-organisms for the various parameters. For clinical studies, we developed two light emitting devices in distinct wavelengths: 630 nm, for Photogem ®, and 470 nm for curcumin. These were developed in the IFSC (Optics Group, Laboratory Technology Support) and consists of light emitting diodes (LED) coupled cleats anatomically designed for toenails and hands. Were treated 90 patients divided into two groups differentiated by topical photosensitizer used: Photogem ® (1 mg / ml) or curcumin (1.5 mg / mL). After 1 hour the presence of the photosensitizer was confirmed by fluorescence image and bright place for 20 minutes (fluence of 120 J/cm<sup>2</sup>). New clinical evaluation was performed after seven days of treatment and follow-up was conducted by both images, as per laboratory. It was observed healing of 63 patients with an average of

six months of treatment. Compared to conventional treatments, PDT offers faster results without recurrence. Moreover, aspects such as the low cost of instrumentation involved, the possibility of local treatment rather than systemic and simplicity of operation are important factors for ensuring the implementation of this technology in the treatment of a health problem of widespread impact. The prototype used during the study resulted in patent that became even target of interest for a national company, along with one of the drugs tested. With these results, we concluded that PDT has the potential to become an important tool in the treatment of onychomycosis.

**Keywords:** Onychomycosis. Photodynamic therapy. Microbial control.



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 -</b>	CONJUNTO ANATÔMICO QUE FORMA UMA UNHA, CONSISTE EM QUATRO COMPONENTES EPIDÉRMICOS: A MATRIZ, QUE DÁ ORIGEM À PLACA UNGUEAL, O LEITO UNGUEAL, A PREGA UNGUEAL E O HIPONÍQUIO .....	27
<b>FIGURA 2 -</b>	A) EMBALAGEM COMERCIAL E B) ESPECTRO DE ABSORÇÃO ÓPTICA DO FOTOSSENSIBILIZADOR PHOTOGEN®.....	38
<b>FIGURA 3 -</b>	A) EMBALAGEM COMERCIAL E B) ESPECTRO DE ABSORÇÃO ÓPTICA DO FOTOSSENSIBILIZADOR CURCUMINA. ....	38
<b>FIGURA 4 -</b>	ESTRUTURA QUÍMICA DA CURCUMINA A) FORMA KETO E B) FORMA ENOL.....	39
<b>FIGURA 5 -</b>	<i>BIOTABLE</i> – EQUIPAMENTOS DE LEDS A) VERMELHO EMITINDO EM 630NM E B) AZUL EMITINDO EM 450 NM, DESENVOLVIDOS PELO LABORATÓRIO DE APOIO TECNOLÓGICO – IFSC/USP. ....	48
<b>FIGURA 6 -</b>	METODOLOGIA UTILIZADA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL: APÓS A RASPAGEM DA CULTURA, FEZ-SE A INCUBAÇÃO DO FUNGO COM O FOTOSSENSIBILIZADOR POR 5,10,15 E 20 MINUTOS, E APÓS ESTE PROCEDIMENTO, REALIZOU-SE A LAVAGEM DOS FUNGOS EM ÁGUA DESTILADA AUTOCLAVADA POR 5 VEZES NO VÓRTEX, ENTÃO, OS MICRO-ORGANISMOS FORAM DISPOSTOS EM LAMÍNULAS PARA POSTERIOR ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	49
<b>FIGURA 7 -</b>	DILUIÇÕES SERIADAS PIPETADAS EM TRIPLICATA, SENDO QUE 100 ML DA SOLUÇÃO DE TRYCHOPHYTON MENTAGROPHYTES NA CONCENTRAÇÃO CELULAR DE $10^6$ CÉLULAS /ML), FORAM TRANSFERIDAS PARA 900 ML DE ÁGUA DESTILADA AUTOCLAVADA, POSTERIORMENTE ALÍQUOTAS DE 25 ML DE CADA TRANSFERIDA PARA UM DOS QUADRANTES DE TRÊS PLACAS DE PETRI CONTENDO O MEIO DE CULTURA. ....	52
<b>FIGURA 8 -</b>	A) FLUORESCÊNCIA NATURAL DE <i>T. MENTAGROPHYTES</i> NA REGIÃO DO AZUL-VERDE. A ESCALA REFERE-SE A 20 MM E AUMENTO DE 40X COM ÁGUA DE IMERSÃO. B) <i>T. MENTAGROPHYTES</i> MARCADO COM SAFRANINA. OBSERVA-SE FLUORESCÊNCIA NA REGIÃO ENTRE O VERDE E O AMARELO DA PAREDE CELULAR E DA ESTRUTURA INTRACELULAR CORRESPONDENTE À QUITINA. A ESCALA REFERE-SE A 20 MM. ....	57
<b>FIGURA 9 -</b>	IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE <i>T. MENTAGROPHYTES</i> IMERSO POR 5, 10, 15 E 20 MINUTOS, A, B, C E D, RESPECTIVAMENTE, EM SOLUÇÃO DE PHOTOGEN® NA CONCENTRAÇÃO DE 150 MG/ML E EM SEGUIDA LAVADO POR CINCO VEZES COM AGITAÇÃO EM VORTEX. A FLUORESCÊNCIA EM AZUL-VERDE REPRESENTA A FLUORESCÊNCIA NATURAL DO PATÓGENO, E EM VERMELHO A FLUORESCÊNCIA DO PHOTOGEN®. É IMPORTANTE OBSERVAR A PRESENÇA DO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS PAREDES DAS HIFAS, SENDO DEPENDENTE DO TEMPO DE INCUBAÇÃO. QUANTO MAIOR O TEMPO DE INCUBAÇÃO, MAIOR A DISTRIBUIÇÃO DO COMPOSTO NO INTERIOR DA HIFA. A ESCALA REFERE-SE À 20 MM. ....	58

- FIGURA 10** - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FRAGMENTOS DE *T. MENTAGROPHYTES* IMERSOS EM SOLUÇÃO DE CURCUMINÓIDE NA CONCENTRAÇÃO DE 150 MG/ML POR 5, 10, 15 E 20 MINUTOS, A, B, C E D, RESPECTIVAMENTE. É NOTÁVEL A PRESENÇA DO FOTOSSENSIBILIZADOR EM TODOS OS TEMPOS DE INCUBAÇÃO AVALIADOS – QUANTO MAIOR O TEMPO DE INCUBAÇÃO, MAIOR A CONCENTRAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR NO PATÓGENO. A ESCALA REFERE-SE A 20 MM. .... 59
- FIGURA 11-** IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FRAGMENTOS DE *T. MENTAGROPHYTES* IMEDIATAMENTE APÓS TRATAMENTO COM TFD APÓS IMERSÃO POR 5, 10 15 E 20 MINUTOS A, B, C E D, RESPECTIVAMENTE EM SOLUÇÃO DE PHOTOGEM® NA CONCENTRAÇÃO DE 150 µG/ML. A ESCALA REFERE-SE A 20 MM. A SETA NA FIGURA A INDICA RESQUÍCIO DE FS APÓS A TFD, NA FIGURA B E C INDICA HIFAS ÍNTEGRAS APÓS A TFD E NA FIGURA D INDICA A PRESENÇA DE MATERIAL AMORFO. .... 61
- FIGURA 12** - IMAGENS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FRAGMENTOS DE *T. MENTAGROPHYTES* IMEDIATAMENTE APÓS TRATAMENTO COM TFD APÓS IMERSÃO POR 5, 10 15 E 20 MINUTOS A, B, C E D, RESPECTIVAMENTE EM SOLUÇÃO DE CURCUMINA NA CONCENTRAÇÃO DE 150 µG/ML. A ESCALA REFERE-SE A 20 MM. A ESCALA REFERE-SE A 20 MM. A SETA NA FIGURA A E B INDICA HIFAS ÍNTEGRAS APÓS A TFD, NA FIGURA C E D INDICA INDICA A PRESENÇA DE MATERIAL AMORFO. .... 62
- FIGURA 13** – VIABILIDADE CELULAR OBTIDAS PARA OS FRAGMENTOS DE *T. MENTAGROPHYTES* SUBMETIDOS À TFD UTILIZANDO PHOTOGEM® COMO AGENTE FOTOSSENSIBILIZADOR. O SÍMBOLO “\*” REPRESENTA GRUPOS QUE APRESENTARAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE, E O SÍMBOLO “+” OS GRUPOS QUE NÃO APRESENTARAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA ( $P > 0,05$ ). ONDE P= MÉDIA E DESVIO PADRÃO. .... 64
- FIGURA 14** - VIABILIDADE CELULAR OBTIDAS PARA OS *T. MENTAGROPHYTES* SUBMETIDOS À TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO O CURCUMINÓIDE COMO AGENTE FOTOSSENSIBILIZADOR. O SÍMBOLO “\*” REPRESENTA GRUPOS QUE APRESENTARAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA ( $P \leq 0,05$ ) EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE. ONDE P= MÉDIA E DESVIO PADRÃO. .... 66
- FIGURA 15** - EQUIPAMENTO PORTÁTIL A BASE DE LED PARA O TRATAMENTO DA ONICOMICOSE. O DISPOSITIVO É COMPOSTO DE UMA PRESILHA À QUAL FOI ACOPLADO UM LED PARA IRRADIAÇÃO DA LESÃO INQUAL. .... 76
- FIGURA 16** - COORDENADA UNGUEAL1 - PROJEÇÃO EM UNHA, MEDIDAS EM MILÍMETROS; (C) CÉFALO-CAUDAL X (L) LATERO-LATERAL. .... 77
- FIGURA 17** – MEDIDA DA UNHA COM PAQUÍMETRO DIGITAL (CARBON FIBER COMPOSITES, MARCA WESTERN® PRO). .... 78
- FIGURA 18** - DISPOSIÇÃO DOS EQUIPAMENTOS PARA ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA: A) CÂMERA FOTOGRÁFICA, B) ACOPLADOR, C) EVIDENCIADOR. .... 79

<b>FIGURA 19</b> - COLETA DAS IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA FOI REALIZADA EM TRÊS MOMENTOS: PREVIAMENTE À APLICAÇÃO DA MEDICAÇÃO, ANTES E DEPOIS DA IRRADIAÇÃO DA UNHA .....	81
<b>FIGURA 20</b> - A) AQUISIÇÃO DA IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA ANTES DO PROCEDIMENTO; B) CURETAGEM E COLETA DE MATERIAL. ....	82
<b>FIGURA 21</b> - A) ASSEPSIA COM ÁLCOOL 70%.; B) DESBASTAMENTO DO LOCAL; C) APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR .....	83
<b>FIGURA 22</b> - A) OCLUSÃO DO LOCAL; B) TERAPIA FOTODINÂMICA E C) IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA APÓS ILUMINAÇÃO. ....	83
<b>FIGURA 23</b> - PACIENTE D.L., 55 ANOS, COM LESÃO HÁ 3 ANOS, FOI TRATADO NO GRUPO “ B” COM CURCUMINA. A)LESÃO ANTES DO TRATAMENTO E B) APÓS 30 DIAS DE TRATAMENTO. ....	86
<b>FIGURA 24</b> - PACIENTE JLF., 61 ANOS, COM LESÃO HÁ 35 ANOS, FOI TRATADO NO GRUPO GRUPO “ A” COM PHOTOGEN®. A) LESÃO ANTES DO TRATAMENTO E B) 60 DIAS APÓS O TRATAMENTO. ....	86
<b>FIGURA 25</b> - PACIENTE M.E.F , 45 ANOS, COM LESÃO HÁ 4 ANOS, FOI TRATADO NO GRUPO “ A” PHOTOGEN® A) ANTES DO TRATAMENTO E B) 30 DIAS APÓS TRATAMENTO. ....	87
<b>FIGURA 26</b> - PACIENTE COM MÚLTIPLAS LESÕES REPRESENTA A MAIORIA DOS CASOS. ....	88
<b>FIGURA 27</b> - CORRELAÇÃO DA CLASSE DE MICRO-ORGANISMOS, POR TEMPO MÉDIO DE TRATAMENTO POR TFD. ....	89
<b>FIGURA 28</b> - PACIENTE M.C. 45 ANOS , COM LESÃO HÁ 5 ANOS,FOI TRATADO NO GRUPO, “ A” COM PHOTOGEN® A) ANTES DO TRATAMENTO; B) APÓS 30 DIAS DE TRATAMENTO E C) APÓS 45 DIAS DE TRATAMENTO.....	90
<b>FIGURA 29</b> - GRÁFICO COMPARATIVO DA REGENERAÇÃO DAS UNHAS EM MM/MÊS DOS 90 PACIENTES TRATADOS COM TERAPIA FOTODINÂMICA EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS CONVENCIONAIS E UNHAS LESIONADAS, POR SEMANA DECORRIDA. ....	91
<b>FIGURA 30</b> - GRÁFICO COMPARATIVO DOS RESULTADOS DOS GRUPOS “A” E “B” POR SEMANA DECORRIDA.....	92
<b>FIGURA 31</b> - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA NO PRIMEIRO DIA DE TRATAMENTO A) ANTES DA APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR, B)1 HORA APÓS DA APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR E C) DEPOIS DA IRRADIAÇÃO. ....	93
<b>FIGURA 32</b> - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA NO PRIMEIRO DIA DE TRATAMENTO A) ANTES DA APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR, B) 1 HORA APÓS DA APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR E C) DEPOIS DA IRRADIAÇÃO. ....	93
<b>FIGURA 33</b> - ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA NA SEGUNDA SEMANA DE TRATAMENTO. A) ANTES DA APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR,	

	B) 1 HORA APÓS DA APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR E C) DEPOIS DA IRRADIAÇÃO. ....	94
<b>FIGURA 34</b>	- ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA NA SEGUNDA SEMANA DE TRATAMENTO. A) ANTES DA APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR, B) 1 HORA APÓS DA APLICAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR E C) DEPOIS DA IRRADIAÇÃO. ....	94
<b>FIGURA 35</b>	- VERSÃO FINAL DO EQUIPAMENTO (COMERCIAL). ....	102

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> PARÂMETROS DE TERAPIA FOTODINÂMICA AVALIADOS NA INATIVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO <i>TRYCHOPHYTON MENTAGROPHYTES</i> .....	53~
<b>TABELA 2 -</b> REGRA DE PONTUAÇÃO DE ACORDO COM O PERCENTUAL DE REDUÇÃO DA ÁREA MICÓTICA NA UNHA.....	81
<b>TABELA 3-</b> VARIÁVEIS DO ESTUDO CLÍNICOS DOS PACIENTES EM FUNÇÃO DO TEMPO DE LESÃO.....	85



## SUMÁRIO

Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TERAPIA FOTODINÂMICA E ONICOMICOSE ..	25
1.1 INTRODUÇÃO .....	25
1.2 REVISÃO DA LITERATURA .....	27
1.2.1 Características gerais das unhas .....	27
1.2.2 Aspectos clínicos e diagnósticos da onicomicose .....	28
1.2.3 Tratamentos convencionais da Onicomicose .....	30
1.2.4 Terapia Fotodinâmica.....	31
1.2.5 Fotossensibilizadores .....	37
1.3 JUSTIFICATIVA .....	40
1.4 OBJETIVOS .....	40
1.4.1 Geral.....	40
1.4.2 Específicos .....	41
Capítulo 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Trycophyton Mentagrophytes</i> .....	43
2.1 JUSTIFICATIVA .....	45
OBJETIVOS .....	45
2.1.1 Específicos .....	45
2.1.2 In vitro:.....	45
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.2.1 MATERIAL.....	46
2.2.2 Fotossensibilizadores.....	46
2.2.3 Microscópio Confocal .....	47
2.2.4 Fonte Luminosa.....	47
2.2.5 MÉTODOS .....	48
2.2.6 Avaliação da Eficácia do tratamento <i>in vitro</i> depois dos experimentos .....	56
2.3 RESULTADOS .....	57
2.3.1 Cinética em microscopia confocal.....	57
2.3.2 Incubação em solução de Photogem® .....	57
2.3.3 2.3.5 Incubação em solução de Curcuminóide .....	58
2.3.4 Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica em microscopia confocal .....	60
2.3.5 Avaliação da efetividade da TFD na inativação de <i>Trycophyton mentagrophytes</i> (ATCC)...	63
2.4 DISCUSSÃO .....	67
Capítulo 3 – TERAPIA FOTODINÂMICA – Aplicação Clínica .....	71
3.1 Justificativa .....	73
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73

3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	74
3.2.1	Materiais: .....	74
3.3.2	Métodos .....	79
3.4	RESULTADOS .....	84
3.4.1	Testes Clínicos .....	84
3.4.2	Análise do crescimento ungueal.....	89
3.4.3	Evolução clínica das lesões de acordo com o fotossensibilizador utilizado .....	91
3.4.4	Imagem de fluorescência .....	93
3.5	DISCUSSÃO.....	95
	Capítulo 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	99
4.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	101
4.2	CONCLUSÕES.....	103
	Anexo 1 – Comitê de ética.....	113
	Anexo 2 - TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	114
	Anexo 3 –Tabela com os dados dos testes <i>in vitro</i> .....	116
	Anexo 4 – Modelo ficha anamnese .....	117
	Anexo 5 – Patente .....	118
	Anexo 6 – Número do manuscrito .....	119



---

## **Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TERAPIA FOTODINÂMICA E ONICOMICOSE**



## 1.1 INTRODUÇÃO

A invasão da unidade ungueal por fungo é denominada onicomicose.<sup>1</sup> O termo onicomicose é derivado do grego “onyx” (unha) e “mykes” (fungo), sendo usado para descrever a infecção fúngica das unidades ungueais.<sup>2</sup>

A onicomicose é a mais frequente das doenças ungueais, constituindo aproximadamente metade de todas as infecções.<sup>3</sup> Pode ser causada por dermatófitos (90%), leveduras (7%) e fungos não dermatófitos (3%).<sup>4, 5</sup> Os dermatófitos pertencem a três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, com base principalmente nas diferenças de morfologia microscópica e esporulação fúngica.

O gênero *Trichophyton* é caracterizado pela produção de muitas microconídias e pouca ou nenhuma macroconídia. As macronídias, quando formadas, tem parede celular fina e lisa. O tamanho e arranjo das microconídias são importantes na identificação das espécies. A produção de pigmentos, atividade urease, capacidade de invasão do pêlo e crescimento padrão diferencial em meios de cultura, com ou sem tiamina e niacina são também utilizados para identificação das espécies.<sup>6</sup>

O gênero *Microsporum* é caracterizado pela produção de macronídias elas são multiceluladas, tem parede celular grossa, espiculada. A identificação das espécies é baseada em suas diferenças morfológicas. As microconídias são pequenas, hialinas podendo apresentar-se em forma de gota ou elípticas e nascem diretamente das hifas.<sup>6</sup>

O gênero *Epidermophyton* é caracterizado pela produção de macronídias em clave, com parede lisa, com duas a quatro células em cada e são originadas individualmente da hifa ou, mais caracteristicamente, ocorrem em cachos de duas ou três. A característica primaria na identificação do gênero *Epidermophyton* é a ausência de microconídias.<sup>6</sup>

Quando causada por dermatófitos a onicomicose, denomina-se *tinea unguim*<sup>7</sup> porém, infecções mistas (leveduras + bactérias) também podem ocorrer mas no entanto, são relatadas raramente.

Os dermatófitos que acometem as unhas com maior frequência são : o *Trichopyton rubrum*, o *Trichopyton mentagrophytes* e o *Trichopyton interdigitale* estes colonizam preferivelmente os tecidos queratinizados e apresentam enorme variação epidemiológica,<sup>8</sup> sendo influenciados pelas características individuais do paciente.<sup>4, 5, 8, 9</sup> No Brasil, as espécies mais frequentes que colonizam a pele e os fâneros são os dermatófitos: *Trychophyton rubrum* e o *Trychophyton mentagrophytes*, eles caracterizam-se por hifas hialinas artrosporadas, as quais penetram no extrato córneo da pele e das unhas devido a produção de proteases queratinolíticas conforme indicam estudos realizados em Porto Alegre (2007) e Maringá (2003).<sup>10-12</sup>

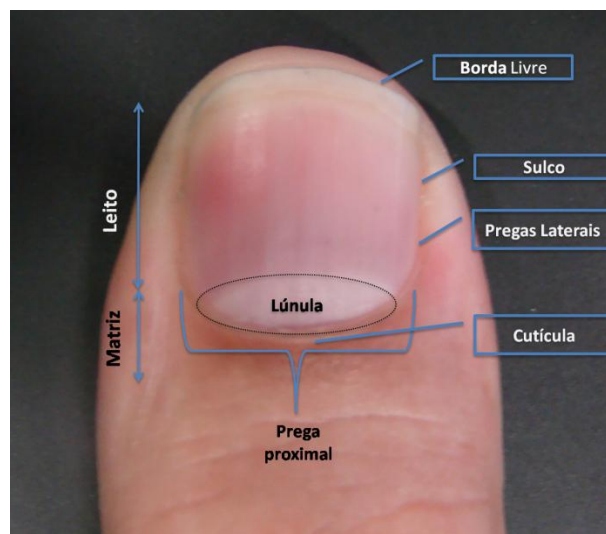
Além de fungos, é preciso também pensar na possibilidade das bactérias produzirem processos onicodistróficos, bem como das infecções periungueais. Assim, os índices de colonização bacteriana se apresentam mais elevados do que aqueles observados em lesões ungueais, pode-se pensar em onicobacteriose<sup>13, 14</sup>.

Nas infecções mistas, a *Candida albicans* é a levedura mais comumente relacionada com a onicomíase, contaminando geralmente unhas já danificadas e, em pacientes com imunossupressão. Ela causa acometimento ungueal extenso, principalmente dos quirodáctilos.<sup>12</sup> A presença de células leveduriformes somente, mesmo que em abundância, pode significar mera colonização.<sup>15</sup> Segundo Elewsik, o resultado da cultura deve ser interpretado com cautela, porque as unhas não são estéreis e portanto, fungos contaminantes podem obscurecer o verdadeiro patógeno ungueal.<sup>16</sup> A maioria das infecções ungueais por espécies de *Candida* ocorrem em pacientes com candidíase mucocutânea crônica ou então como um evento secundário na paroníquia.<sup>17</sup> É relevante ressaltar que a presença de *Candida* nem sempre está associada com o desenvolvimento de onicomíase, já que está presente na microbiota normal. Cabe ao médico fazer a avaliação clínica adequada bem como a investigação dos fatores predisponentes.<sup>12</sup> Os fungos filamentosos implicados na onicomíase incluem membros do gênero *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Acremonium* e *Fusarium*. A maioria dessas espécies é oportunista e invade a queratina alterada geralmente em conjunto com infecções por dermatófitos.<sup>16, 18</sup>

## 1.2 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.2.1 Características gerais das unhas

A unidade ungueal, conjunto anatômico que forma uma unha, consiste em quatro componentes epidérmicos: a matriz, que dá origem à placa ungueal, o leito ungueal, a prega ungueal e o hiponíquio.<sup>19</sup> A maior parte da matriz não é visível, com exceção da lúnula, sua porção visível, que possui forma de meia lua, é opaca e de coloração esbranquiçada. A dobra ungueal proximal é composta de uma superfície dorsal e outra ventral. A superfície dorsal é denominada eponíquio. A junção das duas superfícies, que se projeta distalmente sobre a placa ungueal é a cutícula. A prega ungueal distal inclui a pele que circunda ambas as faces, lateral e proximal, da placa ungueal (Figura 1).



**Figura 1 -** Conjunto anatômico que forma uma unha, consiste em quatro componentes epidérmicos: a matriz, que dá origem à placa ungueal, o leito ungueal, a prega ungueal e o hiponíquio

A placa ungueal é composta de queratina morta, dura e translúcida. O epitélio da matriz sintetiza 90% da placa ungueal, que cresce 0,1 mm/dia nos dedos das mãos e o equivalente a um terço disso nos dedos dos pés. A espessura média das unhas das mãos, em condições normais, é de 0,5 a 0,75 mm e a das unhas dos pés é de 1 mm. As primeiras levam de 4 a 6 meses para crescer totalmente enquanto as

últimas levam de 11 a 18 meses. Alterações no crescimento das unhas variam de acordo com fisiologia, o ritmo circadiano, o clima e os fatores individuais.<sup>20</sup>

A lúnula é a face distal da matriz ungueal e tem como continuidade o leito ungueal, que se estende da matriz ungueal distal ao hiponíquio. À medida que a unha flui distalmente, o material é adicionado à sua superfície inferior, espessando-a e tornando-a densamente aderente ao leito ungueal. O leito ungueal consiste de cristas longitudinais paralelas com pequenos vasos sanguíneos em sua base. O hiponíquio é um segmento curto de pele que não apresenta adesão da unha; ele se inicia no leito ungueal distal e termina na depressão distal.<sup>1, 21</sup>

As unhas desempenham as funções de proteção, sensibilidade tátil, manipulação fina e capacidade de arranhar, elas podem ser acometidas por infecções (bacterianas, virais e fúngicas) e alteradas por doenças sistêmicas.<sup>8, 20</sup>

### **1.2.2 Aspectos clínicos e diagnósticos da onicomicose**

A infecção fúngica ocorre por meio de algumas etapas. Inicialmente, o patógeno desvia-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro, similar ao processo de queratinização (renovação do estrato-córneo), que provoca descamação e eliminação do fungo. Quando se instala na epiderme, o fungo adere à superfície do tecido, o artroconídio germina e a hifa penetra na camada córnea rapidamente para evitar a eliminação com a descamação. Para se alimentar e manter sua sobrevivência e seu desenvolvimento, o fungo secreta várias enzimas, como proteases, lipases, elastases, collagenases, fosfatases e esterases, as quais degradam macromoléculas presentes no tecido hospedeiro. A produção dessas enzimas constitui o principal fator de virulência dos dermatófitos e possibilita que eles se tornem invasivos.<sup>22</sup>

A onicomicose pode comprometer substancialmente a qualidade de vida dos indivíduos afetados.<sup>23</sup> Sendo esta uma doença multifatorial, a faixa etária do paciente, por exemplo, tem exercido importante efeito em sua ocorrência assim, como o aumento da idade e da infecção estão diretamente correlacionados. Como qualquer doença infecciosa, um diagnóstico correto e precoce é imprescindível para a escolha do tratamento adequado.<sup>5, 24</sup> Fatores que contribuem para o aumento da onicomicose mundial incluem maior fluxo de migração de pessoas e uso

indiscriminando de medicações como: antibióticos, corticóides e antineoplásicos<sup>8</sup>, além dos fatores predisponentes, que incluem idade avançada, *tinea pedis*, trauma ungueal repetitivo e algumas comorbidades como diabetes, imunodeficiência e doença arterial periférica.<sup>3</sup>

A apresentação clínica da onicomicose causada por uma determinada espécie fúngica é indistinguível daquela causada por outras espécies. Há porém, alguns sinais clínicos que sugerem a espécie fúngica, embora definitivamente, o agente etiológico só possa ser determinado, após a identificação laboratorial por meio de cultivo de fungos.<sup>1, 25</sup>

Existem quatro principais apresentações clínicas das onicomicoses: subungueal distal (lateral e endomix), subungueal proximal (superficial e distrófica total).<sup>20</sup> Estes são definidos pelo modo como o fungo invade a unidade ungueal.<sup>1</sup> Classicamente, quatro tipos de onicomicoses são aceitos:<sup>26</sup>

(A) Subungueal distal/lateral (mais comum). Nesta forma, o fungo invade a camada cornea do hiponíquio e leito ungueal, causa espessamento da camada córnea, eleva a borda livre e, conseqüentemente, causa onicólise. A princípio, ocorre onicólise com um mínimo de ceratose subungueal e as unhas podem ter coloração amarelo acastanhada. É causada principalmente pelo *Trichophyton rubrum* em que o acometimento do leito ungueal comumente resulta da infecção plantar.

(B) Leuconíquia superficial – Em 90% dos casos o agente etiológico é o *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*. Clinicamente, observam-se pequenas placas brancas na região dorsal da placa ungueal. Estas podem coalescer e gradualmente, cobrir toda a superfície da unha.

(C) Leuconíquia subungueal proximal - Ocorre invasão fúngica Na parte ventral da prega ungueal proximal gerando áreas brancas além da cutícula, que avançam distalmente. É causada principalmente pelo *T. rubrum*.

(D) Distrófica Total - Todas estas apresentações clínicas podem evoluir para uma forma avançada chamada de distrófica total. Na onicomicose distrófica total ocorre destruição total da lâmina ungueal. Este processo patológico pode ser decorrente de um longo período de infecção fúngica ou onicomicose crônica, mais associado à candidíase mucocutânea crônica

Há uma tendência a rotular qualquer processo envolvendo a placa ungueal como uma infecção fúngica, mas muitas outras doenças cutâneas podem alterar a estrutura da unha.<sup>3</sup> O diagnóstico diferencial da onicomicose deve ser feito com

afecções que atingem as unhas como psoríase, líquen plano, infecções bacterianas, dermatite de contato, tumores ungueais, síndrome das unhas amarelas, onicólise idiopática, paquioníquia congênita e onicodistrofias traumáticas.<sup>16</sup>

Tradicionalmente, o exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) e a cultura para fungos são os métodos preferencialmente utilizados para o diagnóstico de onicomicose. O exame histológico de espécimes de lâmina ungueal com coloração pelo ácido periódico Schiff (PAS) é considerado um método de diagnóstico complementar nos casos em que há forte suspeita clínica de onicomicose.<sup>27</sup>

O diagnóstico é realizado através de exame clínico dermatológico e de exames laboratoriais que consistem na retirada, por meio de curetagem, de amostras subungueais. Na onicomicose, o exame micológico direto (EMD) é a técnica mais eficiente de rastreamento.<sup>16</sup> Nesse exame, são visualizadas hifas hialinas artrosporadas típicas dos dermatófitos, blastoconídeos globosos ou ovais com ou sem brotamento, hifas e pseudo-hifas com constrições junto ao septo características das *Candida spp* e hifas hialinas septadas que sugerem fungos não dermatófitos.<sup>13</sup>

Também exames de culturas são apropriadas. Os fungos, o *T. rubrum* caracteriza-se pelo verso algodinoso e reverso avermelhado; o *T. Mentagrophytes* pelo verso de aspecto pulverulento de coloração branca a creme e reverso amarronzado e o *T. Interdigitale* pelo verso algodinoso e reverso amarronzado. As colônias de *Candida spp* se caracterizam por ter uma coloração que vai de branca a creme, além de serem lisas e brilhantes.<sup>13</sup>

### 1.2.3 Tratamentos convencionais da Onicomicose

O tratamento para onicomicose consiste em medidas de higiene, medicações tópicas e sistêmicas. O tratamento tópico produz poucos efeitos adversos sistêmicos e não faz interação com outras drogas sistêmicas utilizadas pelo paciente. Em monoterapia, porém, está indicada apenas para onicomicoses com comprometimento inferior a 50% da lâmina ungueal e para pacientes nos quais a medicação sistêmica está contra-indicada.<sup>28</sup> Na maioria das vezes o uso de



isoladamente de antifúngicos tópicos é ineficaz, pois essas medicações não penetram por toda a unidade ungueal e não eliminam a infecção.

Os antifúngicos classicamente empregados no tratamento das onicomicoses são a griseofulvina e o cetoconazol, que apresentam efeitos adversos como: cefaléia, hipersensibilidade e eritema, interagindo também com outras drogas (anticoagulantes orais e fenobarbital), acelerando seu metabolismo e diminuindo sua biodisponibilidade.<sup>28</sup> Por volta de 1990, estes antifúngicos foram substituídos por itraconazol, fluconazol e terbinafina, que apresentam melhores resultados em menor tempo e maior segurança para o paciente, embora ainda apresentem efeitos colaterais eles têm maior afinidade pela queratina e atingem o extrato córneo em um período de 8 a 24 horas, persistindo nas unhas por até 9 meses após o término do tratamento.<sup>16, 29</sup>

O tratamento das onicomicoses representa uma das principais dificuldades terapêuticas encontradas na prática clínica, em razão de algumas particularidades: as unhas são estruturas não-vascularizadas, o que explica a pequena penetração dos medicamentos utilizados por via sistêmica e o crescimento das unhas se faz de maneira lenta (5 a 6 meses nas unhas das mãos e 12 a 18 meses nas unhas dos pés para cobrir todo leito ungueal). Portanto, as dermatofitoses das unhas dos pés são mais rebeldes ao tratamento que as das mãos e, quando tratados com antifúngicos, crescem 2 mm ao mês.<sup>30</sup>

Por isso, é importante o desenvolvimento de novas tecnologias e opções terapêuticas para o tratamento de onicomicoses.

#### **1.2.4 Terapia Fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que combina o uso de luz, oxigênio (O<sub>2</sub>) e compostos fotossensíveis para causar morte às células-alvo.<sup>31</sup> As primeiras experiências com o tratamento fotodinâmico datam de aproximadamente em 1900, são relatadas por Raab e Von Tappeiner, que observaram que a exposição ao corante alaranjado de acridina associado à luz pode ser letal para protozoários como o paramécio. Nem a luz nem o corante, isoladamente, tiveram qualquer efeito aparente sobre os paramécios, mas, associados, foram altamente citotóxicos. Outros pesquisadores tentaram destruir

células tumorais pela exposição à radiação X, associada ao corante hematoporfirina. Entretanto, esse procedimento não obteve sucesso, demonstrando que a fonte de luz deve interagir com o corante.<sup>32</sup>

Em 1903 ocorreu a primeira aplicação clínica da técnica com a utilização de eosina e luz para o tratamento de lúpus vulgaris, sífilis, psoríase e câncer de pele superficial.<sup>32</sup>

A TFD requer a presença de três fatores que interagem concomitantemente: agente fotossensibilizador (FS), fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente o FS, nem a luz têm a capacidade de produzir efeito deletério ao sistema biológico alvo. O mecanismo de ação se dá por dois tipos de reações físico-químicas: reações tipo I e tipo II.<sup>33</sup>

A reação do tipo I ocorre através da geração de radicais livres extremamente reativos, sendo que o fotossensibilizador no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas (preferencialmente  $O_2$ ), produzindo radicais ou íons radicais.<sup>34</sup> A maioria destes radicais reage instantaneamente com o  $O_2$ , gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS, do inglês *reactive oxygen species*), como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxila ( $\cdot OH$ ), os quais podem oxidar uma variedade de biomoléculas.<sup>34, 35</sup> Já nas reações do tipo II, ocorre formação de oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), altamente reativo, através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental do oxigênio.<sup>35</sup> O  $^1O_2$  pode reagir com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácidos nucleicos. Como lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, as reações fotooxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido alvo via necrose ou apoptose.<sup>34, 35</sup>

Ao selecionar-se um determinado fotossensibilizador para uso em TFD, o espectro de absorção óptica, ou seja, os comprimentos de onda nos quais este fotossensibilizador é capaz de absorver, é uma das primeiras características que devem ser analisadas pois, conforme mencionado anteriormente, é necessário que o cromóforo (qualquer substância capaz de absorver luz) absorva a energia da fonte de luz para então, poder passar pelo processo de transição eletrônica que possibilita sua ação fotodinâmica. Sendo assim, conhecendo-se a faixa do espectro

eletromagnético na qual este composto absorve luz, é possível escolher a fonte de ativação adequada para obtenção do efeito fotodinâmico.<sup>34,36</sup>

Allison et al. (2004) através de estudos com animais, formularam as diretrizes e características ideais que o fotossensibilizador deve apresentar para maximizar o efeito fotodinâmico da terapia. Deve apresentar eficiência fotoquímica, ser biologicamente estável, provocar toxicidade mínima aos tecidos no escuro, ser de fácil eliminação, não provocar mutagenicidade, ser de fácil ativação e administração e ter ação localizada.<sup>35</sup> Para isso, estudos de farmacocinética são necessários, pois permitem aumentar a eficiência da captação, distribuição e localização dos fotossensibilizadores em modelos *in vitro* e *in vivo*.

A susceptibilidade à reação fotodinâmica pode ser maior ou menor devido a diferentes células-alvo variando, portanto, para células tumorais ou de tipos distintos de micro-organismos. Desta forma, os protocolos de tratamento, considerando o fotossensibilizador, o tempo de incubação e os parâmetros de iluminação, devem ser padronizados para cada aplicação da terapia fotodinâmica.

Sendo assim, para a definição do protocolo para o fotossensibilizador alguns parâmetros como as concentrações e vias de administração utilizadas devem ser analisadas. A concentração, é um fator de relevância para o sucesso da reação fotodinâmica, devem ser utilizadas em concentrações minimamente tóxicas, uma vez que a concentração escolhida não deverá produzir danos ao alvo antes da ativação pela fonte de luz (baixa toxicidade no escuro). A via de administração do fotossensibilizador pode ser intravenosa ou tópica – o fato da fotossensibilização poder ser localizada é vantajoso, pois pode especificamente atingir o microorganismo patogênico sem provocar qualquer efeito colateral no tecido do hospedeiro, além de ser possível inativar bactérias e fungos presentes em infecção mista.<sup>37</sup>

O tempo de incubação também tem grande relevância para a terapia, visto que no intervalo entre a administração e a iluminação espera-se que o fotossensibilizador esteja presente no micro-organismo chegando inclusive, à ultrapassar a barreira da membrana celular.<sup>38</sup>

A TFD apresenta ação duplamente localizada, uma vez que o fotossensibilizador é preferencialmente absorvido pelas células-alvo e a iluminação é planejada para ativar apenas na região a ser tratada. Assim, evitam-se as super

dosagens e também os efeitos colaterais associados à administração sistêmica de fármacos, como ocorre com os antifúngicos sistêmicos.<sup>39</sup>

Para a iluminação, o comprimento de onda, a irradiância, o uso da modalidade intersticial ou superficial e a fluência entregue são parâmetros a serem bem avaliados. Estes fatores são importantes para a eficácia da TFD, uma vez que o  $^1\text{O}_2$  possui tempo de meia-vida curto.<sup>40</sup> Os efeitos bioquímicos e funcionais da TFD incluem a inativação de enzimas e outras proteínas e a peroxidação lipídica, ocasionando lise da membrana celular, lisossomos e mitocôndria.<sup>41</sup> Além disso, o oxigênio singleto gerado através da fotoexcitação do fotossensibilizador é um agente oxidante não-específico, e por isso a célula não possui um mecanismo de defesa contra esta molécula. Isto explica porque, teoricamente, não deve haver resistência inerente dos micro-organismos, mesmo daqueles resistentes às drogas antimicrobianas.<sup>42</sup>

Uma fonte de luz importante para a TFD é constituída por LED (*light-emitting diodes*). Esses dispositivos apresentam um reduzido componente térmico e com banda relativamente estreita em torno de um comprimento de onda<sup>43</sup>. LED são diodos que emitem luz quando conectados a um circuito. A diferença básica entre a luz LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e a de um LED é que neste último predomina o mecanismo da emissão espontânea de radiação e nos LASERs, a emissão é estimulada. Dessa distinção básica decorrem as diferenças estruturais entre os dois dispositivos. A luz LASER apresenta características especiais com relação à dos LED (a geração de luz coerente e colimada, e uma maior especificidade quanto à sua monocromaticidade), que parecem conceder aos dispositivos LASER um desempenho geralmente superior, porém de maior custo e, portanto, menor viabilidade. Dispositivo LASER necessita de grande quantidade de energia para geração de luz, enquanto dispositivos LED necessitam de muito pouca energia. Além disso, os LED apresentam um largo espectro de luz não-coerente e não-colimada, diferentemente dos lasers. Embora, nesse aspecto, assemelhem-se às fontes de luz halógena, apresentam um espectro de emissão bem mais estreito que qualquer uma delas, apresentando um aproveitamento bem melhor que a luz halógena. Por poderem emitir bandas razoavelmente estreitas de comprimentos de onda, os LED também apresentam uma monocromaticidade relativa muito maior que a destas lâmpadas.<sup>44</sup>

O aumento no número de linhagens microbianas resistentes aos fármacos antimicrobianos impulsiona o desenvolvimento de novas técnicas para a inativação de micro-organismos. Estudos demonstram que, aproximadamente, dois anos após o início do uso disseminado de cada novo fármaco antimicrobiano, surgem as primeiras linhagens resistentes. Isso decorre da seleção de espécies com mecanismos de resistência ao fármaco e o intervalo de tempo para a observação clínica da infecção por essa população.<sup>45, 46</sup> Essa situação ressalta ainda mais a importância do desenvolvimento de alternativas terapêuticas para controle microbiano à antibioticoterapia. Portanto, é importante desenvolver um tratamento que possa atingir especificamente o micro-organismo patogênico sem provocar qualquer efeito colateral no tecido do hospedeiro.<sup>47</sup>

A terapia fotodinâmica vem se mostrando eficiente na inativação de bactérias, fungos e vírus. Uma das vantagens da técnica é a baixa probabilidade de seleção de micro-organismos resistentes, uma vez que a resistência às espécies reativas de oxigênio é praticamente impossível de ocorrer. Diversas biomoléculas são alvos da oxidação induzida, causadora da morte celular, como lipídios, lisossomos, mitocôndrias e proteínas de membranas.<sup>48</sup> Diversos fotossensibilizadores foram investigados para uso em terapia fotodinâmica antimicrobiana, entre eles porfirinas, a protoporfirina IX, ftalocianinas, clorinas e azulenos.

As porfirinas não são naturalmente absorvidas pelas células fúngicas e o efeito fototóxico causado é devido à fotoativação das moléculas não-ligadas no meio aquoso.<sup>36, 49</sup> Quando irradiadas, as porfirinas alteram a membrana citoplasmática, permitindo sua penetração nas células e translocação para as membranas internas. Com a continuação da irradiação, iniciam-se danos nos alvos intracelulares. Em níveis bioquímicos, o fotoproceto envolve principalmente peroxidação lipídica, fotodegradação de esteróis insaturados e inativação de proteínas da parede celular.<sup>41</sup>

A morfologia microbiana pode variar com as espécies, levando às diferenças na localização do fotossensibilizador. Além disso, o tempo necessário para a absorção do fotossensibilizador antes da iluminação é importante, pois esse intervalo (denominado tempo de pré - irradiação) é o parâmetro que permite estimar se o fármaco atingiu a localização a que se destina, fundamental para o sucesso da terapia.<sup>50</sup>

A fotodestruição microbiana é mais comumente alcançada com potências da ordem de centenas de  $\text{mW/cm}^2$ . Vale ressaltar que os efeitos obtidos por esta terapia não são por temperatura elevada e sim, por reações fotoquímicas entre fotossensibilizador, luz e o substrato. Mantendo-se a mesma dose de luz (densidade de energia entregue por área de iluminação, também chamada fluência e representada em  $\text{J/cm}^2$ ), que geralmente é associada ao resultado terapêutico, pode-se variar a potência (ou taxa de fluência, dada em  $\text{mW/cm}^2$ ) ou o tempo de exposição (dado em segundos) para adaptação do protocolo. No entanto, não se pode ignorar o fato de que uma potência alta sobre um curto período de tempo (alguns segundos) pode oferecer resultados diferentes em termos de destruição microbiana, comparado a um protocolo com potência baixa por um período mais longo (alguns minutos ou horas), ainda que a dose de luz tenha sido mantida a mesma em ambos os casos.<sup>51</sup> Isto acontece porque a densidade de potência representa a taxa de entrega de energia por área e um depósito de energia mais rápido ou mais lento modifica diversos parâmetros envolvidos, como a temperatura no sítio irradiado ou a degradação das moléculas do fotossensibilizador, modificando a eficiência do processo e portanto, seu resultado.

Micro-organismos, usualmente, formam estruturas tridimensionais denominadas biofilmes. Essas organizações estruturais geralmente não respondem bem à terapêutica com fármacos antimicrobianos, desenvolvendo facilmente resistência a esses fármacos, uma vez que esta conformação lhes confere maior proteção estrutural, inclusive perante o sistema imunológico do hospedeiro.<sup>52</sup> Dovigo e colaboradores compararam o efeito da TFD em diversas espécies de *Candida sp* nas formas planctônicas e em biofilmes, utilizando curcumina como agente fotossensibilizador. Nestes experimentos, obteve-se redução de aproximadamente 98% para a forma planctônica e 85% para os biofilmes.<sup>38</sup> A TFD também foi avaliada para a inativação de biofilmes multi-espécies, incluindo *S. aureus*, *Streptococcus mutans* e *C. albicans*, e foram encontrados resultados pouco satisfatórios quando comparados aos encontrados para biofilmes de única espécie microbiana.<sup>48</sup>

Fatores tais como: interações farmacológicas, resistência fúngica e a não-adesão do paciente ao tratamento das onicomicoses (por motivos variados, como os efeitos adversos das medicações) também são razões que podem explicar as possíveis falhas terapêuticas utilizando fármacos antifúngicos.<sup>53</sup> Portanto, os

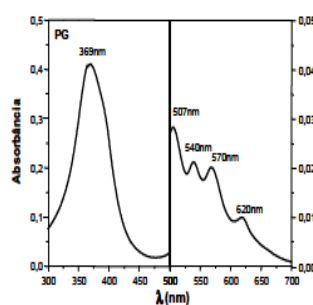
estudos relacionados à terapia fotodinâmica são de extrema importância para o estabelecimento de novos métodos que possam reduzir o número de pessoas acometidas por onicomicose, representando melhora à saúde pública e à qualidade de vida destes pacientes.<sup>53</sup>

### 1.2.5 Fotossensibilizadores

Para ser utilizado em TFD um fotossensibilizador precisa apresentar características fotofísicas e fotoquímicas específicas, como seletividade pelas células-alvo, e uma boa absorção, alto rendimento quântico e apresentar resposta biológica desejada. Neste trabalho de inativação de *Trichophyton mentagrophytes in vitro* e o tratamento dos pacientes portadores de onicomicose, investigou-se a ação de duas principais classes de compostos utilizados para inativação microbiana para a verificação do melhor fotossensibilizador para esse micro-organismo, o Photogem® (derivado de hematoporfirina) e a curcumina (polifenol).

O Photogem® (Figura 2-A) é um medicamento produzido a partir da hematoporfirina, uma substância presente no sangue de animais e de humanos. Apresenta-se na forma de um pó violeta escuro, comercializado em frascos esterilizados contendo 200 mg, sendo que sua distribuição é realizada somente sob prescrição para instituições especializadas. Pode ser armazenado por até 2 anos em um local protegido da luz e em temperatura inferior a 5 °C. Possui estabilidade química e fotoquímica e afinidade com estruturas biológicas. Uma das características é uma intensa banda de absorção aproximadamente em 400 nm, (com coeficiente de absorção molar maior do que 200.000) conhecida como banda de Soret.

O espectro de absorção mostra a banda de Soret na região aproximadamente de 369 nm e quatro bandas Q entre 500 e 635 nm, como pode ser visualizado na Figura 2-B. O espectro de fluorescência, para excitação em 405 nm, apresenta bandas em aproximadamente 614 nm e em 660 nm (Figura 2-B).<sup>54</sup>

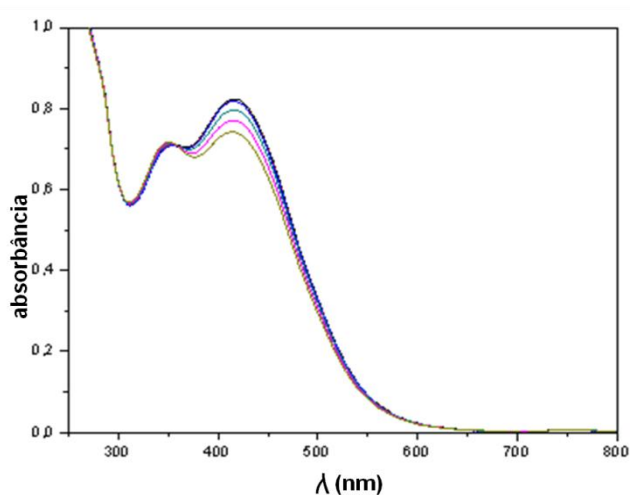


**Figura 2 -** A) Embalagem comercial e B) Espectro de absorção óptica do fotossensibilizador Photogen®.

A curcumina (Figura 3A), sintetizada pela PDTPharma Ltda., Cravinhos-SP, Brasil, é um composto natural extraído do açafrão (*Curcuma longa*), um dos curcuminóides do tubérculo indiano da família das Zengibriáceas, de cor amarela, e usado, também, para colorir alimentos. Quando reage com o ácido bórico, a curcumina produz um composto vermelho chamado rosocianina. Curcuminóides tem sido extensivamente estudados devido à sua ampla variedade de propriedades farmacológicas, em especial a atividade antitumoral. A curcumina pode existir de duas formas: keto e enol (Figura 4A e 4B, respectivamente). A forma enol é a mais energeticamente estável.<sup>54</sup>



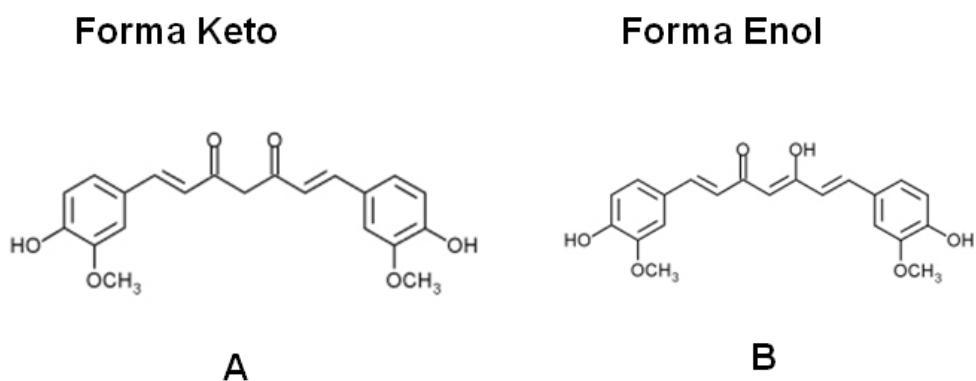
A



B

**Figura 3 -** A) Embalagem comercial e B) Espectro de absorção óptica do fotossensibilizador Curcumina.





**Figura 4** - Estrutura química da Curcumina A) Forma Keto e B) forma Enol.

A curcumina também tem efeito bactericida: aplicando a TFD como um tratamento antibiótico alternativo, a curcumina pode ser usada como fotossensibilizador e atuar em infecções superficiais localizadas.<sup>55</sup> O pico de absorção máximo da Curcumina encontra-se em torno de 430 nm (3-B) e é praticamente insolúvel em água.<sup>55</sup>

### **1.3 JUSTIFICATIVA**

A relevância do estudo proposto reside no fato das onicomicoses serem uma das mais comuns infecções ungueais e aumenta a incidência do risco de desenvolvimento de infecções. Por não apresentar sintomas dolorosos inicialmente, sendo predominantemente estético; o paciente costuma postergar a procura por atendimento especializado, e quando vai ao médico, a infecção já se encontra num estágio mais avançado, necessitando de medicação via oral.

O tratamento desta afecção é longo, difícil e oneroso, exigindo múltiplas visitas ao médico e exames complementares, dificultando o tratamento. Além de afetar a qualidade de vida dos pacientes, a onicomicose altera a estrutura da unha, causando microtraumas na pele ao redor, que podem se tornar porta de entrada para outras infecções.

Propomos a terapia fotodinâmica para o tratamento da onicomicose, sendo um tratamento eficaz, seguro e com menor custo para esta afecção tão comum, além de manter a mesma eficácia e segurança do tratamento convencional.

### **1.4 OBJETIVOS**

#### **1.4.1 Geral**

O presente trabalho tem como objetivo reunir e atualizar o estudo a respeito da terapêutica das onicomicoses, bem como a avaliação da eficiência da TFD na inativação de micro-organismos causadores desta doença. Primeiramente, avaliamos o efeito da técnica em ensaios *in vitro* e posteriormente em aplicação clínica. Esta pesquisa é a única descrita até o momento para investigar a distribuição dos compostos fotossensibilizadores em solução tópica, assim como a possível seletividade dos fármacos pelos micro-organismo. Além disso, pretendemos obter importantes informações relativas à fluência e intensidade luminosa necessárias para o tratamento das lesões, estabelecendo a TFD como uma nova modalidade terapêutica e com a padronização de protocolos clínicos.

### 1.4.2 Específicos

#### Capítulo 1

- Detalhar os agentes causadores da onicomicose em humanos e os aspectos clínicos da doença;
- Descrever os grupos de medicamentos antifúngicos existentes e disponíveis;

#### Capítulo 2

- Acompanhar a cinética de duas classes distintas de fotossensibilizadores com localização seletiva em *Trychophyton mentagrophytes* por microscopia confocal de fluorescência;
- Avaliar através de ensaios *in vitro* o dano celular fotodinâmico ocasionado no micro-organismo;
- Avaliar os efeitos da TFD sobre cultura do fungo *Trychophyton mentagrophytes* para diferentes concentrações de fotossensibilizadores, tempos de incubação e fluências de luz;
- Avaliar os efeitos da TFD com ativação destes compostos fotossensibilizantes através de fontes de luz em 470 e 630 nm (*Biotables*), cujos dispositivos foram desenvolvidos no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT/IFSC-USP);

#### Capítulo 3

- Ensaios clínicos e avaliação da terapia fotodinâmica para o tratamento da onicomicose em pacientes infectados que já haviam testado outras terapias;
- Detalhar os agentes causadores de onicomicoses em humanos e os aspectos clínicos da doença;
- Abordar a viabilidade da prática da TFD em onicomicoses para uso clínico, assim como a viabilidade de custo e tempo de tratamento.
- Comparar os resultados dos pacientes tratados com duas classes distintas de fotossensibilizadores;

- Avaliar eficácia da TFD como tratamento de onicomicoses em lesões com tempos diferentes

## **Capítulo 4**

- Desenvolver um *kit* para TFD em onicomicose, constituído de solução fotossensibilizadora e fonte de luz desenvolvida especificamente para se adaptar adequadamente desenvolvida à geometria dos pés e mãos.





## 2.1 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a TFD em inativação de micro-organismos vêm despertando atenção especial à etiologia fúngica nos processos infecciosos. Existem muitas diferenças não compreendidas entre as variedades de micro-organismos causadores de onicomicose. Os fungos patogênicos mais comumente isolados pertencem ao grupo dos dermatófitos, seguido das leveduras. Existem relatos de maior dificuldade no tratamento com antifúngicos nas infecções por *Trychophyto sp.* Neste contexto, avaliamos a viabilidade da inativação fotodinâmica de cepas de espécies de *Trychophyton mentagrophytes*, um dos fungos causadores de onicomicose.

Existe, portanto uma lacuna de conhecimento associado ao estudo de parâmetros para inativação deste patógeno por TFD. Nos testes *in vitro* estudaremos quais parâmetros podem ser mais eficazes e determinaremos a concentração de fotossensibilizadores e intensidade de luz necessária para inibir o crescimento do micro-organismo enfocando a padronização. Assim, os ensaios *in vitro* poderá ampliar os conhecimentos sobre a viabilidade celular após TFD e contribuir para o melhor entendimento da biologia destes microrganismos, possibilitando o estabelecimento de estratégias futuras no tratamento da onicomicose nos pacientes acometidos.

## OBJETIVOS

### 2.1.1 Específicos

### 2.1.2 In vitro:

- Acompanhar a cinética de duas classes distintas de fotossensibilizadores: a porfirina e curcumina, para analisar a localização seletiva em *Trychophyton mentagrophytes* por microscopia confocal de fluorescência;

- Avaliar o dano celular fotodinâmico ocasionado no micro-organismo por microscopia confocal de fluorescência;
- Avaliar os efeitos da TFD sobre cultura do fungo *Trychophyton mentagrophytes* para diferentes concentrações de fotossensibilizadores, tempos de incubação e fluências de luz;
- Avaliar os efeitos da TFD com ativação destes compostos fotossensibilizantes através de fontes de luz em 470 e 630 nm (*Biotables*), cujos dispositivos foram desenvolvidos no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT/IFSC-USP);

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 MATERIAL**

Foi utilizado isolado de *Trychophyton mentagrophytes* ATCC 11481 obtido de uma dermatofitose humana (INCQS-401811; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), cedido pela FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). Foi utilizada a Instrução de Reidratação das Culturas de acordo com o POP (Procedimento Operacional Padrão) 65.32330.006 fornecido pela FIOCRUZ .

O isolado foi cultivado e mantido em placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Agar (Difco® – BD & Co, EUA) com incubação a 37 °C por 7 dias, com subcultivos semanais.

### **2.2.2 Fotossensibilizadores**

Foram investigados dois fotossensibilizadores pertencentes a duas classes distintas: porfirina e curcumina. A porfirina (Photogem® – Moscou, Rússia. Aprovado pelo *Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation*), apresenta-se na forma de um pó violeta escuro, comercializado em frascos esterilizados contendo 200 mg do pó. Pode ser armazenado por até 2 anos em local



protegido da luz e temperatura inferior a 5 °C. A Curcumina (PDTPharma Ltda., Cravinhos-SP, Brasil), consiste em pó de cor amarela, insolúvel em água, pouco solúvel em etanol e muito solúvel em solvente orgânico DMSO (dimetil sulfóxido) e em N-metil-glucamina.

Atualmente, a curcumina é disponibilizada em duas formas de apresentação farmacêutica: em solução contendo 30% (p/v) do princípio ativo (curcumina e derivados curciminóides) diluídos no solvente N-metil-glucamina; em pó (envelopes metalizados contendo 1 g), contendo 40% de curcumina e 60% de outros curcuminóides (demetoxi-curcumina + Bis-demetoxicurcumina). Neste trabalho para os testes *in vitro* utilizamos a curcumina em solução, a qual denominamos curcuminóides.

### 2.2.3 Microscópio Confocal

As imagens foram realizadas em microscópio confocal invertido (Zeiss – LSM780) com excitação em 405 nm tanto para o Photogem® quanto para a curcumina.

### 2.2.4 Fonte Luminosa

A fonte de luz empregada na iluminação das amostras deste estudo foram dois equipamentos constituído de LEDs (*light emitting diodes*), desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico - LAT/USP (Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP), intitulado de *Biotable* (Figura 5), sendo uma vermelha (630 nm) e outra azul (450 nm). O equipamento é projetado para a irradiação uniforme de placas tipo *multi-poços* contendo 24 poços.

A *Biotable* possui intensidade de saída constante, sendo a vermelha em 46 mW/cm<sup>2</sup>, e a azul 35 mW/cm<sup>2</sup>. A luz emitida se encontra numa estreita faixa do espectro eletromagnético, na qual o FS empregado apresenta alta capacidade de absorção de luz.

Para os ensaios com Photogem® foi utilizado equipamento com emissão em 630 nm (Figura 5 A) e para os realizados com Curcumina foi utilizado equipamento

com emissão em 450 nm (Figura 5 B), escolhidos de acordo com os espectros de absorção dos fotossensibilizadores.



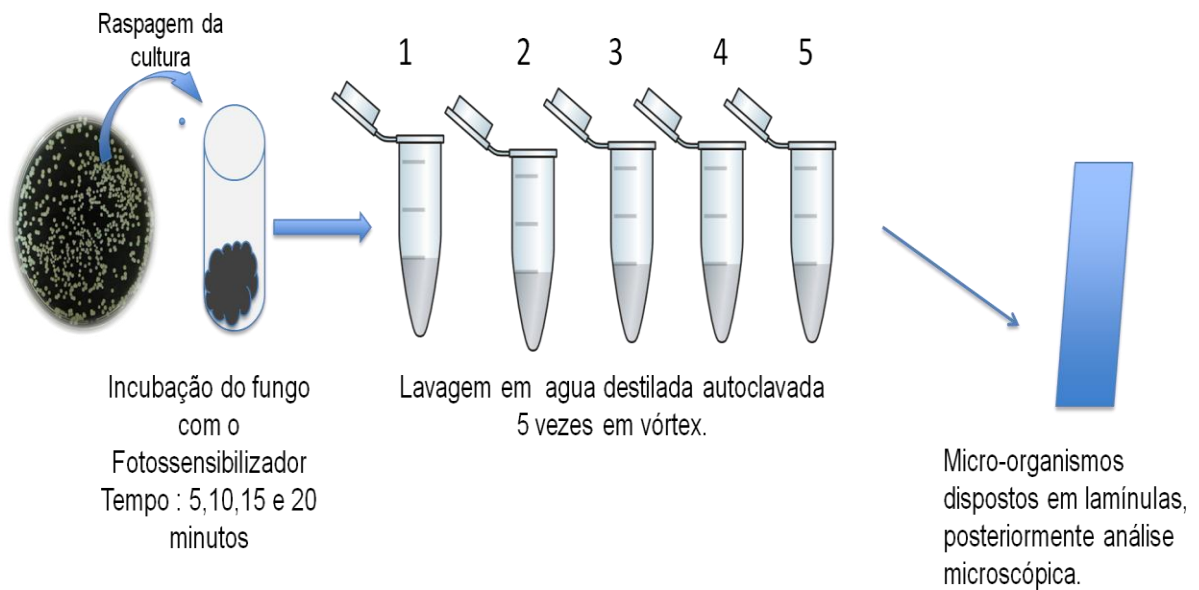
**Figura 5 - Biotable** – Equipamentos de LEDs A) vermelho emitindo em 630nm e B) azul emitindo em 450 nm, desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – IFSC/USP.

## 2.2.5 MÉTODOS

### 2.2.5.1 Procedimentos

#### 2.2.5.1.1 Protocolo de preparo das amostras para Microscopia Confocal

Para preparo das amostras para microscopia confocal fragmentos de *T. mentagrophytes* foram cultivados em caldo Sabouraud Dextrose (Difco® – BD & Co, EUA) por 24 horas em estufa à 37 °C, os fragmentos foram lavados em água destilada autoclavada por cinco vezes com agitação em vortex de modo a eliminar o ágar sabouraud, uma vez que este meio de cultura apresenta fluorescência e poderia influenciar nos resultados obtidos. Após estes procedimentos os microorganismos foram então, dispostos em lamínulas conforme demonstrado na Figura 6.



**Figura 6** - Metodologia utilizada para Microscopia confocal: após a raspagem da cultura, fez-se a incubação do fungo com o fotossensibilizador por 5,10,15 e 20 minutos, e após este procedimento, realizou-se a lavagem dos fungos em água destilada autoclavada por 5 vezes no vórtex, então, os micro-organismos foram dispostos em lâminulas para posterior análise microscópica.

#### 2.2.5.2 Análise da morfologia de fragmentos de *Trychophyton mentagrophytes* em microscópio confocal

Para visualizar as características do patógeno, preparamos as amostras, sem marcador para analisar as características naturais do micro-organismo e em uma segunda amostra marcamos o micro-organismo com Safranina, que Bond e colaboradores<sup>56</sup>, descreveram a influência no comprimento de onda da fluorescência da safranina em função da composição celular, eles relatam que a fluorescência na região entre o verde e o amarelo refere-se à parede celular rica em quitina.

### **2.2.5.3 Cinética em microscópio confocal para fragmentos de *Trychophyton mentagrophytes*.**

Para análise da cinética dos fotossensibilizadores, os micro-organismos isolados, após o preparo das amostras, foram incubados em solução contendo o composto a ser analisado, que para este estudo foram o Photogem® e o Curcuminóide, na concentração de 150 µg/mL para cada um dos fotossensibilizadores em recipientes separados, foram avaliados nos seguintes tempos: 5, 10, 15 e 20 minutos, após o tempo de incubação os micro-organismos foram lavados novamente e dispostos em lamínulas para posterior análise.

### **2.2.5.4 Avaliação do efeito da Terapia Fotodinâmica em microscopia confocal**

Para a avaliação e análise do efeito da TFD nos micro-organismos, preparamos as amostras conforme o protocolo proposto e então deixamos os micro-organismos incubados nos tempos: 5, 10, 15 e 20 minutos, na concentração de 150 µg/mL para os dois FS e após o tempo de incubação os micro-organismos foram lavados novamente e irradiados nas *Biotables* sendo que, para os micro-organismos incubados com o Photogem® utilizamos comprimento de onda 630 nm e intensidade 35 mW/cm<sup>2</sup>, por 20 minutos, totalizando fluência de 42 J/cm<sup>2</sup>, e para os micro-organismos incubados com o o curcuminóide comprimento de onda 450 nm e intensidade 46 mW/cm<sup>2</sup>, por 16 minutos, totalizando fluência de 42 J/cm<sup>2</sup> e imediatamente após a Terapia Fotodinâmica, avaliou-se a morfologia dos fragmentos do patógeno em microscópio confocal. A aquisição de imagem para visualizar o Photogem® ocorreu em dois canais: um na região do verde-azul para visualizar a morfologia do patógeno e outro na região do vermelho para detectar o fotossensibilizador. Para detectar a curcumina a aquisição de imagem foi realizada em espectral com 32 canais.

#### 2.2.5.5 Protocolo de preparo do isolado de *Trychophyton mentagrophytes* para os ensaios In vitro e condições experimentais avaliadas.

Para a realização dos experimentos, misturas de conídios e fragmentos de hifas dos dermatófitos foram transferidas para um tubo falcon estéril e em seguida homogeneizadas em vórtex vigorosamente por 30 segundos. A densidade da suspensão foi analisada em espectrofotômetro Cary 50bio Varian® levando a uma concentração celular de  $1,5 \times 10^6$  células/mL.

Alíquotas de 150 µL das suspensões celulares do micro-organismo avaliado foram pipetadas individualmente em três poços de uma placa multipoços. A seguir analisamos quatro condições experimentais: Sem Luz e sem FS (**P-L-**, onde **P** é o fotossensibilizador e **L** é Luz); Com FS e sem Luz (**P+L-**). Sem FS e com Luz (**P-L+**) e Com FS e Com Luz (**P+L+**) = **grupo TFD**. Todas as placas foram deixadas em repouso antes dos procedimentos no escuro durante 20 minutos.

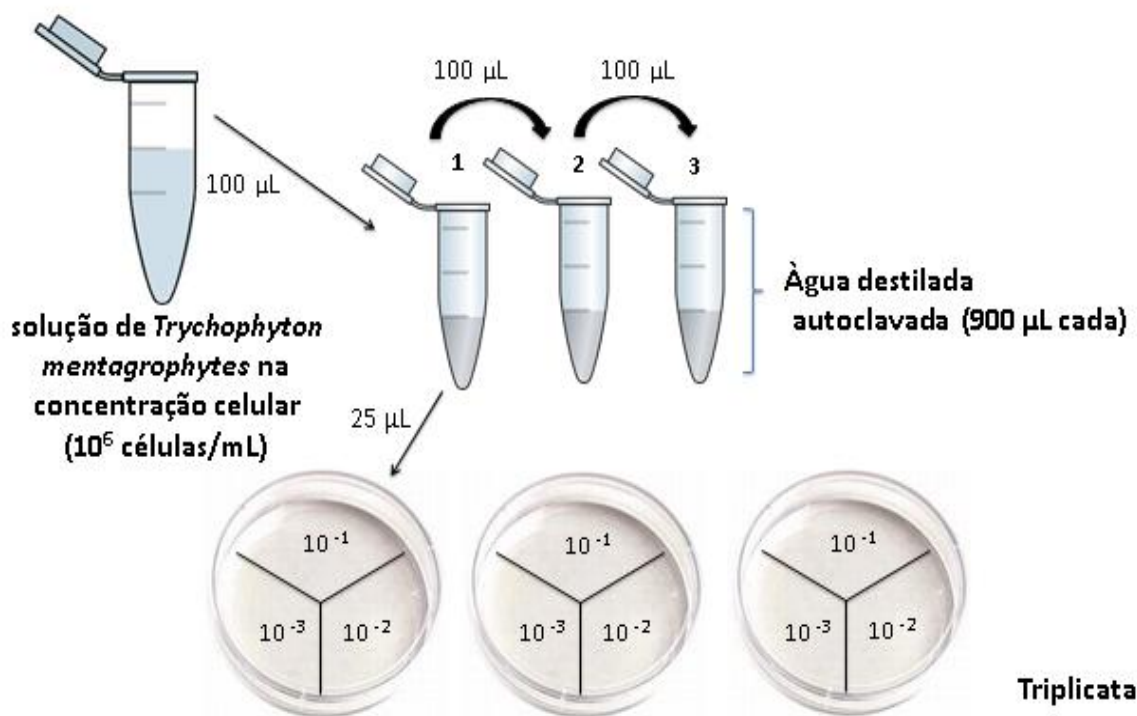
#### 2.2.5.6 Procedimento para análise da eficácia dos testes In vitro em cada condição experimental avaliada.

Para todas as condições avaliadas, foram realizadas diluições seriadas de 1:10 a partir das amostras contidas nos orifícios das placas. Para isso, uma alíquota de 100 µL foi removida de cada amostra e transferida para um tubo de ensaio contendo 900 µL de água destilada autoclavada. Este tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos e uma nova alíquota de 100 µL foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 900 µL de água destilada autoclavada. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra e, desta forma, as diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  foram obtidas.

Foram utilizadas as diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ) para a realização da semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar. A seguir, alíquotas de 25 µL de cada diluição seriada foram pipetadas em triplicata. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes de três placas de Petri contendo o meio de cultura. Adicionalmente, alíquotas de 25 µL

foram removidas das cavidades das placas de orifícios e transferidas diretamente para um quadrante da placa de Petri, sem a realização de diluição (Figura 7). Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. Também os procedimentos de semeadura foram realizados em triplicatas.

Após uma semana de incubação a 37 °C, as placas de Petri referentes às amostras das condições experimentais avaliadas foram submetidas à contagem de colônias. Para este procedimento, a quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados.



**Figura 7-** Diluições seriadas pipetadas em triplicata, sendo que 100 µL da solução de *Trychophyton mentagrophytes* na concentração celular de  $10^6$  células /mL), foram transferidas para 900 µL de água destilada autoclavada, posteriormente alíquotas de 25 µL de cada transferida para um dos quadrantes de três placas de Petri contendo o meio de cultura.

### 2.2.5.7 Procedimento para análise da eficácia dos testes *In vitro* em cada condição experimental variando as condições experimentais.

Os parâmetros avaliados nos ensaios *In vitro* foram comparativos entre dois fotossensibilizadores o Photogem® e o Curcuminóide, onde analisamos diferentes dose de energia, concentração dos fotossensibilizadores, intensidade de luz e tempo de exposição representados na Tabela 1.

**Tabela 1- Parâmetros de terapia fotodinâmica avaliados na inativação *in vitro* do *Trychophyton mentagrophytes***

Fotossensibilizador	Dose energética	Concentração do fotossensibilizador	Intensidade	Tempo de exposição
Photogem®	11 J/cm <sup>2</sup>	1,25 mg/mL	46 mW/cm <sup>2</sup>	4 minutos
		2,5 mg/mL		
		5 mg/mL		
		10 mg/mL		
	22 J/cm <sup>2</sup>	1,25 mg/mL		8 minutos
		2,5 mg/mL		
		5 mg/mL		
		10 mg/mL		
	33 J/cm <sup>2</sup>	1,25 mg/mL		12 minutos
		2,5 mg/mL		
		5 mg/mL		
		10 mg/mL		
Curcumina	10,5 J/cm <sup>2</sup>	10 mg/mL	35 mW/cm <sup>2</sup>	5 minutos
		25 mg/mL		
		50 mg/mL		
		100 mg/mL		
	21 J/cm <sup>2</sup>	10 mg/mL		10 minutos
		25 mg/mL		
		50 mg/mL		
		100 mg/mL		
	31,5 J/cm <sup>2</sup>	10 mg/mL		15 minutos
		25 mg/mL		
		50 mg/mL		
		100 mg/mL		

#### **2.2.5.8 Avaliação do crescimento in vitro de *Trychophyton mentagrophytes* sem luz e sem fármaco (P-L-)**

Na condição experimental, sem luz e sem fármaco (P-L-, onde **P** é o fotossensibilizador e **L** é luz), foram incluídas amostras do micro-organismo na concentração celular ( $10^6$  células/mL), que não foram submetidas aos procedimentos de TFD denominamos este grupo como grupo controle. O mesmo volume de água destilada estéril foi transferido para cada um dos poços, no escuro e em seguida foram contados os tempos de incubação, representando os mesmos tempos de irradiação, e os resultados obtidos nesse grupo (P-L-) foram utilizados como parâmetro para comparação com aqueles obtidos com as culturas das amostras submetidas à fotossensibilização (citotoxicidade no escuro) e à iluminação com o LED.

#### **2.2.5.9 Avaliação da citotoxicidade no escuro dos fotossensibilizadores sobre o in vitro de *Trychophyton mentagrophytes* (P+L-)**

Para a avaliação da existência de efeitos tóxicos dos fotossensibilizadores sobre o crescimento *in vitro* de *Trychophyton mentagrophytes*, foram adicionados 150 µL dos fotossensibilizadores (Photogem® e/ou Curcumina), porém em concentrações diferentes (ver Tabela 1), e na mesma concentração celular do patógeno. Neste estudo amostras continham o fotossensibilizador, porém, não foram iluminadas com o LED (P+L-). Após o tempo de incubação 20 minutos, e o tempo representando semelhante ao tempo de cada uma das doses de luz avaliadas, o patógeno foi plaqueado. Esses tempos equivalem aos tempos de irradiação para os grupos de fungos irradiados na presença (P+L+) e na ausência (P-L+) de FS. As concentrações de Photogem® avaliadas foram de 1,25, 2,5, 5 e 10 mg/mL, e para o Curcuminóide as concentrações foram de 10, 25, 50 e 100 mg/mL.



#### **2.2.5.10 Avaliação do efeito luminoso sobre o crescimento *in vitro* de *Trychophyton mentagrophytes* (P-L+)**

Este experimento avaliou se a aplicação de luz, na ausência do fotossensibilizador, poderia apresentar efeitos tóxicos ou estimuladores para os micro-organismos avaliados. Após 20 minutos de incubação no escuro, iniciou-se a irradiação. Os resultados foram comparados com os grupos *controle*. Para cada teste, foram avaliadas alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  da suspensão de celular, com o mesmo volume de água destilada autoclavada (150  $\mu\text{L}$ ), tempo de incubação (prévio à irradiação). A placa foi colocada sobre a *Biotable* (Figura 5). O aparelho foi acionado e todos os poços da placa foram iluminados uniforme e simultaneamente.

Irradiamos com intensidade de  $46 \text{ mW/cm}^2$  e fluências de 11; 22 e  $33 \text{ J/cm}^2$ , para o comprimento de onda de 630 nm; na intensidade de  $35 \text{ mW/cm}^2$  e também nas fluências de 10,5; 21 e  $31,5 \text{ J/cm}^2$ , para o comprimento de onda de 450 nm.

#### **2.2.5.11 Avaliação do efeito fotodinâmico sobre o crescimento *in vitro* de *Trychophyton mentagrophytes* (P+L+)**

Para a avaliação da TFD propriamente dita, avaliou-se a solução de *Trychophyton mentagrophytes* na concentração celular ( $10^6$  células/mL) adicionou-se a mesma quantidade de fotossensibilizador. Após o tempo de incubação no escuro, iniciou-se a irradiação. Variando as concentrações avaliadas. As concentrações de Photogem® avaliadas foram de 1,25, 2,5, 5 e 10 mg/mL, e para o Curcuminóide as concentrações foram de 10, 25, 50 e 100 mg/mL. Irradiamos com intensidade de  $46 \text{ mW/cm}^2$  e fluências de 11; 22 e  $33 \text{ J/cm}^2$ , para o comprimento de onda de 630 nm; na intensidade de  $35 \text{ mW/cm}^2$  e também nas fluências de 10,5; 21 e  $31,5 \text{ J/cm}^2$ , para o comprimento de onda de 450 nm.

## 2.2.6 Avaliação da Eficácia do tratamento *in vitro* depois dos experimentos

### 2.2.6.1 Contagem de UFC- Unidades formadoras de colônia

Para cada condição avaliada neste estudo, foram realizadas três repetições. Esta decisão baseou-se em metodologias publicadas que avaliaram a efetividade da TFD antimicrobiana, nas quais a utilização de três amostras por grupo mostra-se adequada<sup>57</sup>. Quando observamos valores inferiores a 30 (como por exemplo no grupo P+L+ com Photogem®), o número de colônias considerado foi referente à diluição que apresentou algum crescimento. Após a contagem, foi obtida a média entre as triplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). O cálculo das UFC/mL foram realizados através da seguinte equação<sup>1</sup>,

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} de colônias \times n^{\circ} de diluições}{Volume (mL)} \quad (1)$$

Como os valores de UFC/mL são extremamente elevados, estes foram transformados em logaritmo (de base 10). Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo. Como o objetivo principal do estudo foi verificar a eficácia dos tratamentos na redução de viabilidade do *T. mentagrophytes*, a análise inferencial a ser utilizada possibilita a comparação entre os grupos estudados.

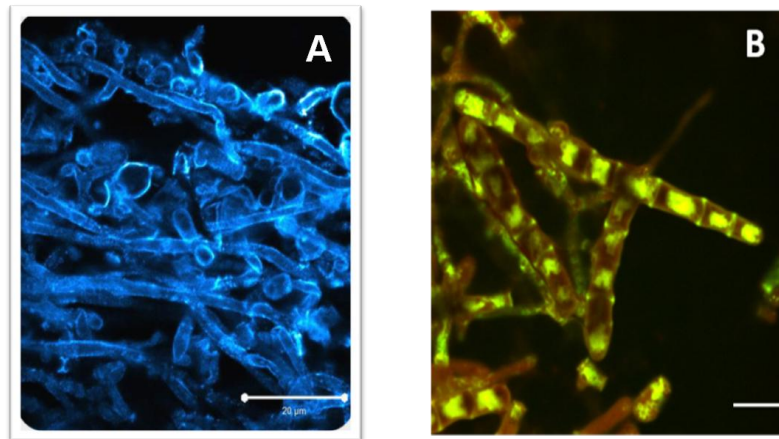
### 2.2.6.2 Análise Estatística

Os dados foram tratados por teste do tipo Student-T, realizado no programa Microsoft Excel 2007.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Cinética em microscopia confocal

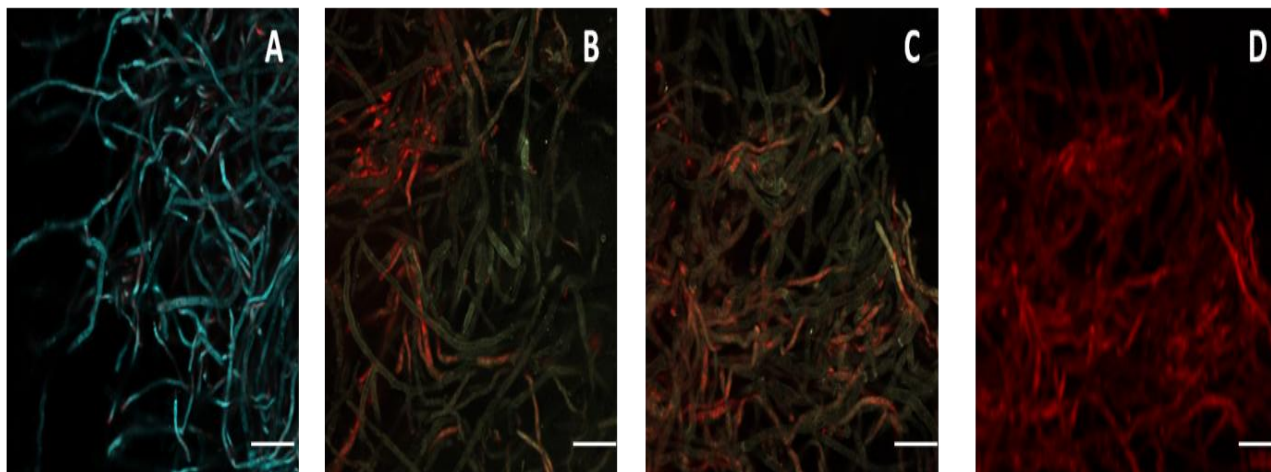
Através do estudo da imagem de microscopia óptica confocal de fragmentos de *T. mentagrophytes* analisamos a morfologia deste micro-organismo. A Figura 8-A mostra, a fluorescência natural (não-marcada), onde observamos as características das hifas do patógeno que são cilíndricas alongadas e com ramificações. Na figura 8-B demonstramos o micro-organismo marcado com safranina, pudemos observar a emissão de fluorescência da safranina que evidencia a parede celular rica em quitina como descrito por Bond e colaboradores.<sup>56</sup>



**Figura 8 -** A) Fluorescência natural de *T. Mentagrophytes* na região do azul-verde. A escala refere-se a 20 µm e aumento de 40X com água de imersão. B) *T. Mentagrophytes* marcado com safranina. Observa-se fluorescência na região entre o verde e o amarelo da parede celular e da estrutura intracelular correspondente à quitina. A escala refere-se a 20 µm.

### 2.3.2 Incubação em solução de Photogem®

Figura 9 mostra a distribuição do Photogem® nas hifas do patógeno em diferentes tempos de incubação. A fluorescência no espectro do azul-verde refere-se à fluorescência natural do *T. Mentagrophytes* e em vermelho à emissão de fluorescência do Photogem®.



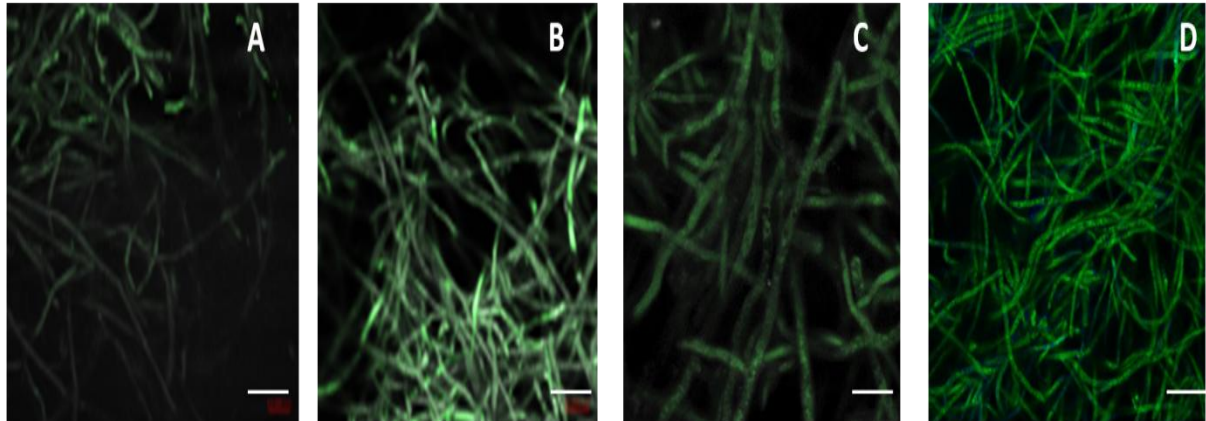
**Figura 9 -** Imagem de microscopia confocal de *T. Mentagrophytes* imerso por 5, 10, 15 e 20 minutos, A, B, C e D, respectivamente, em solução de Photogem® na concentração de 150 µg/mL e em seguida lavado por cinco vezes com agitação em vortex. A fluorescência em azul-verde representa a fluorescência natural do patógeno, e em vermelho a fluorescência do Photogem®. É importante observar a presença do fotossensibilizador nas paredes das hifas, sendo dependente do tempo de incubação. Quanto maior o tempo de incubação, maior a distribuição do composto no interior da hifa. A escala refere-se à 20 µm.

O Photogem® mostrou afinidade pelo micro-organismo, uma vez que com apenas 5 minutos de incubação foi possível observar a presença da droga em algumas partes do fungo. Para maior tempo de incubação, houve uma distribuição mais homogênea do composto por todo o citoplasma e na parede celular das hifas (

Figura 9). Isto explica um provável mecanismo de distribuição da droga dentro da célula do patógeno, em que o medicamento é rapidamente absorvido por uma estrutura específica e depois distribuído por toda a célula. Após 20 minutos de incubação do FS, é possível observar o Photogem® em toda superfície da hifa, sem privilégio de uma localização específica.

### 2.3.3 2.3.5 Incubação em solução de Curcuminóide

Figura 10 mostra a localização da solução de curcumina em diferentes tempos de incubação. Podemos observar a autofluorescência emitida pelo patógeno combinada com a fluorescência emitida pela curcumina. Observamos que com o aumento do tempo de incubação a fluorescência da curcumina aumenta.



**Figura 10-** Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *T. Mentagrophytes* imersos em solução de curcuminóide na concentração de 150  $\mu\text{g/mL}$  por 5, 10, 15 e 20 minutos, A, B, C e D, respectivamente. É notável a presença do fotossensibilizador em todos os tempos de incubação avaliados – quanto maior o tempo de incubação, maior a concentração do fotossensibilizador no patógeno. A escala refere-se a 20  $\mu\text{m}$ .

A curcumina estava localizada no patógeno, em todos os tempos de incubação avaliados e, mostrando afinidade pelo micro-organismo, uma vez que com apenas 5 minutos de incubação foi possível observar o composto na parede celular do micro-organismo. Pode-se observar que no tempo de 5 minutos o fotossensibilizador não está presente em todas as hifas; com 10 minutos de incubação apresenta-se mais homogêneo, e após 15 minutos observamos uma distribuição mais generalizada da fluorescência.

Observou-se, para os dois fotossensibilizadores que em maior tempo de incubação houve uma distribuição mais homogênea dos compostos por todas as hifas. Através desta análise estudamos a localização dos fotossensibilizadores distribuídos nas hifas do micro-organismo de acordo com o tempo de incubação como demonstrado na Tabela 2.

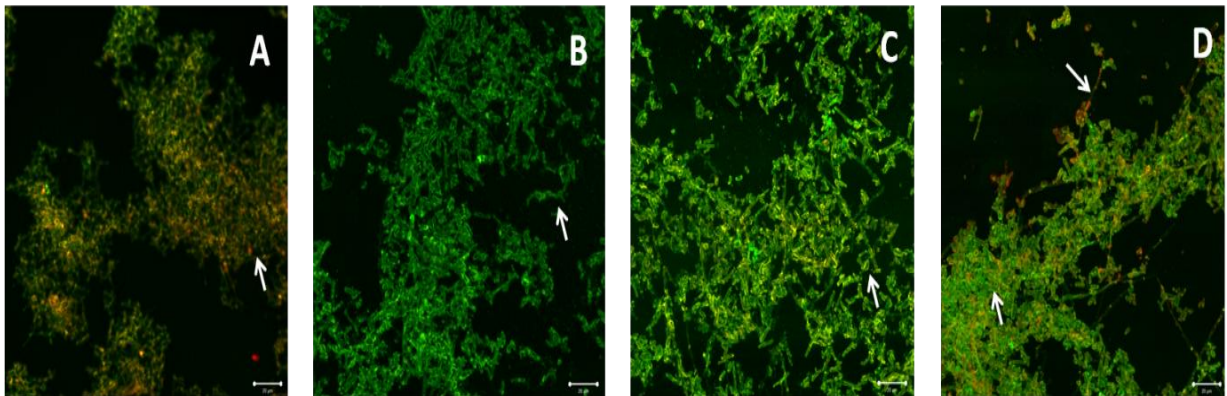
**Tabela 2** - Localização dos fotossensibilizadores nas hifas de *T. Mentagrophytes* em função do tempo de incubação.

		Tempo (minutos)			
Photogem®		5	10	15	20
	Superfície Externa	*	*	*	*
	Parede/ Membranas	*	*	*	*
	Citoplasma			*	*
Curcuminóide	Superfície Externa	*	*	*	*
	Parede/ Membranas			*	*
	Citoplasma		*	*	*

### 2.3.4 Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica em microscopia confocal

#### 2.3.4.1 Terapia fotodinâmica com Photogem®

A Figura 11 apresenta os fragmentos de *T. Mentagrophytes* submetidos à TFD após imersão em Photogem® por 5, 10, 15 e 20 minutos, com dose final de energia de 52,5 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 11-** Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *T. Mentagrophytes* imediatamente após tratamento com TFD após imersão por 5, 10 15 e 20 minutos A, B, C e D, respectivamente em solução de Photogem® na concentração de 150 µg/mL. A escala refere-se a 20 µm. A seta na figura A indica resquício de FS após a TFD, na figura B e C indica hifas íntegras após a TFD e na figura D indica a presença de material amorfo.

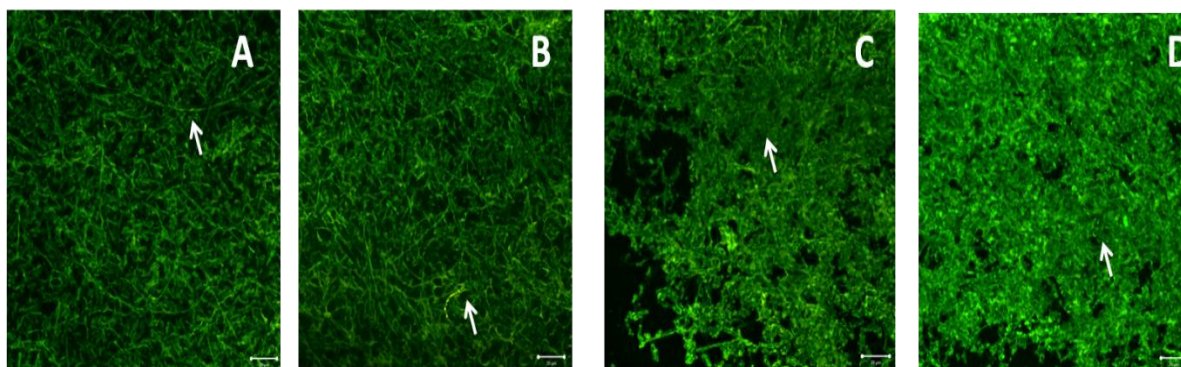
A Figura 11, demonstra a distribuição do Photogem® após a terapia fotodinâmica nas hifas do patógeno. Na

Figura 11-A, observa-se as hifas do patógeno fragmentadas com fluorescência do fotossensibilizador, além da evidência do efeito fotodinâmico, porém, não houve a degradação de todo o fotossensibilizador. Quando a TFD foi realizada com o tempo de incubação de 10 minutos (Figura 11-B), não se observa fluorescência do fotossensibilizador nas hifas, porém, ainda existem hifas inteiras. Nos tempos de incubação 15 e 20 minutos (Figura 11- C e D), quando realiza-se a TFD, observa-se mudança na fluorescência e presença de material amorfo, conforme indicada nas setas e não sendo possível visualizar hifas intactas. Crescimento quantitativo não foi observado no patógeno após o tratamento. Este ensaio sugere que o tempo de incubação do micro-organismo com o FS pode aumentar a eficiência da TFD, e que não é viável que este seja menos que 20 minutos. Esses resultados explicam as altas taxas de inibição obtidas para este fotossensibilizador.

#### 2.3.4.2 Terapia fotodinâmica com Curcumina

Os resultados da TFD em fragmentos imersos em solução de Curcuminóide por 5, 10, 15 e 20 minutos são apresentados na Figura 12.





**Figura 12-** Imagens de microscopia confocal de fragmentos de *T. Mentagrophytes* imediatamente após tratamento com TFD após imersão por 5, 10 15 e 20 minutos A, B, C e D, respectivamente em solução de curcumina na concentração de 150 µg/mL. A escala refere-se a 20 µm. A escala refere-se a 20 µm. A seta na figura A e B indica hifas íntegras após a TFD, na figura C e D indica a presença de material amorfo.

Os patógenos incubados com a curcumina também demonstram a distribuição heterogênea desta nas hifas do patógeno. A Figura 12 refere-se ao fragmento imerso por 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. De acordo com a cinética avaliada anteriormente, neste período, o composto localiza-se principalmente nas paredes celulares. Após a terapia fotodinâmica observa-se uma quebra e diminuição no tamanho das hifas. Neste caso, o efeito da TFD foi evidenciado. Observa-se na Figura 12-A que ainda existem algumas hifas inteiras, por isso, a necessidade de um tempo maior de incubação. Quando a TFD foi realizada com o tempo de incubação de 10 minutos (Figura 12-B), observa-se uma maior quantidade de hifas quebradas, porém, ainda existem hifas inteiras. Para os tempos de incubação 15 e 20 minutos (Figura 12-C e D), observa-se a presença de material amorfo, conforme indicada nas setas e já não é possível visualizar hifas intactas.



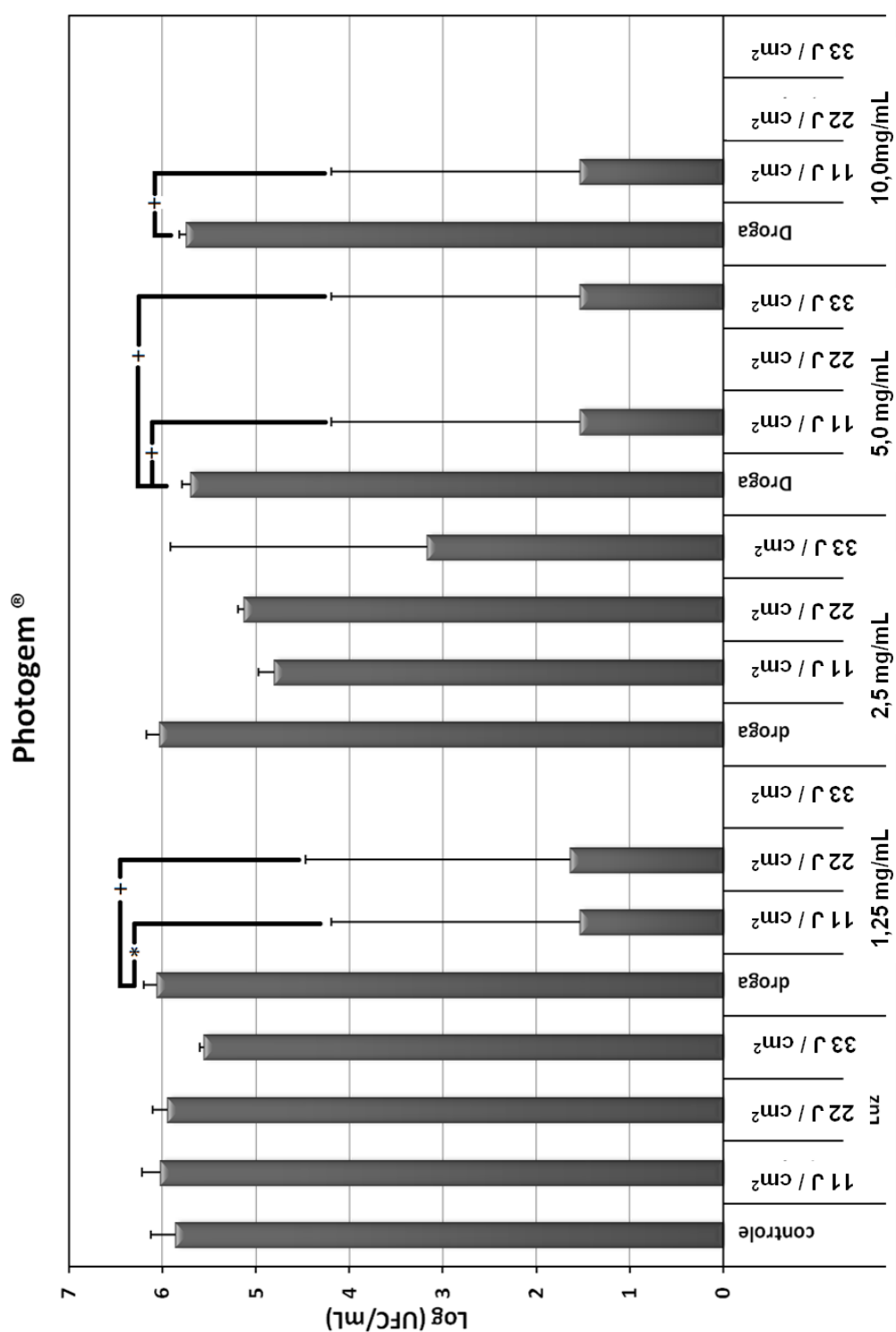
### **2.3.5 Avaliação da efetividade da TFD na inativação de *Trychophyton mentagrophytes* (ATCC)**

#### **2.3.5.1 Avaliação dos testes efetuados com o Photogem® como fotossensibilizador.**

Foram investigadas através da contagem de colônias ações isoladas utilizando Photogem® como agente fotossensibilizador (toxicidade no escuro) e da luz nas doses empregadas sobre o crescimento microbiano do *T. mentagrophytes* e comparando com os resultados dos micro-organismos submetido a TFD foi constatado que somente o FS e somente a luz, exerceram pouco efeito inibitório, demonstrando que as condições padronizadas foram devidamente estabelecidas de modo a não deixar dúvidas sobre a eficiência fotodinâmica. (Figura 13)

Nos resultados dos grupos submetidos a TFD, observou-se uma tendência de redução nos valores em escala logarítmica (base 10) dos grupos avaliados em relação ao grupo controle. Os grupos TFD com concentrações de Photogem® 1, 2,5, 5 e 10 µg/mL apresentaram redução na viabilidade do micro-organismo superiores a 4 e 5 ordens logarítmicas, respectivamente, em comparação ao grupo controle. Estes grupos demonstraram um efeito de inibição do crescimento para todos os parâmetros investigados, porém, os melhores resultados foram verificados quando as concentrações de fotossensibilizadores foram associadas às altas taxas de fluências da luz. É possível observar uma tendência de redução nos valores log em função do grupo avaliado. A variação de UFC observadas após a TFD com Photogem® mostrou uma resposta positiva do tratamento na inativação *in vitro* do patógeno para concentração do fotossensibilizador e fluência.

Entretanto, a utilização de baixas concentrações de FS não foram dequada, pois, provavelmente o dano celular provocado por ocorrer em níveis que permitam a reparação celular e, conseqüentemente, a inativação não foi efetiva. Os valores originais de UFC/mL obtidos após a avaliação do Photogem® podem ser encontrados no anexo 3 deste trabalho. A inviabilização celular dos fungos foi efetivamente constatada pela ausência ou redução do crescimento do micro-organismo por contagem de UFC/mL.

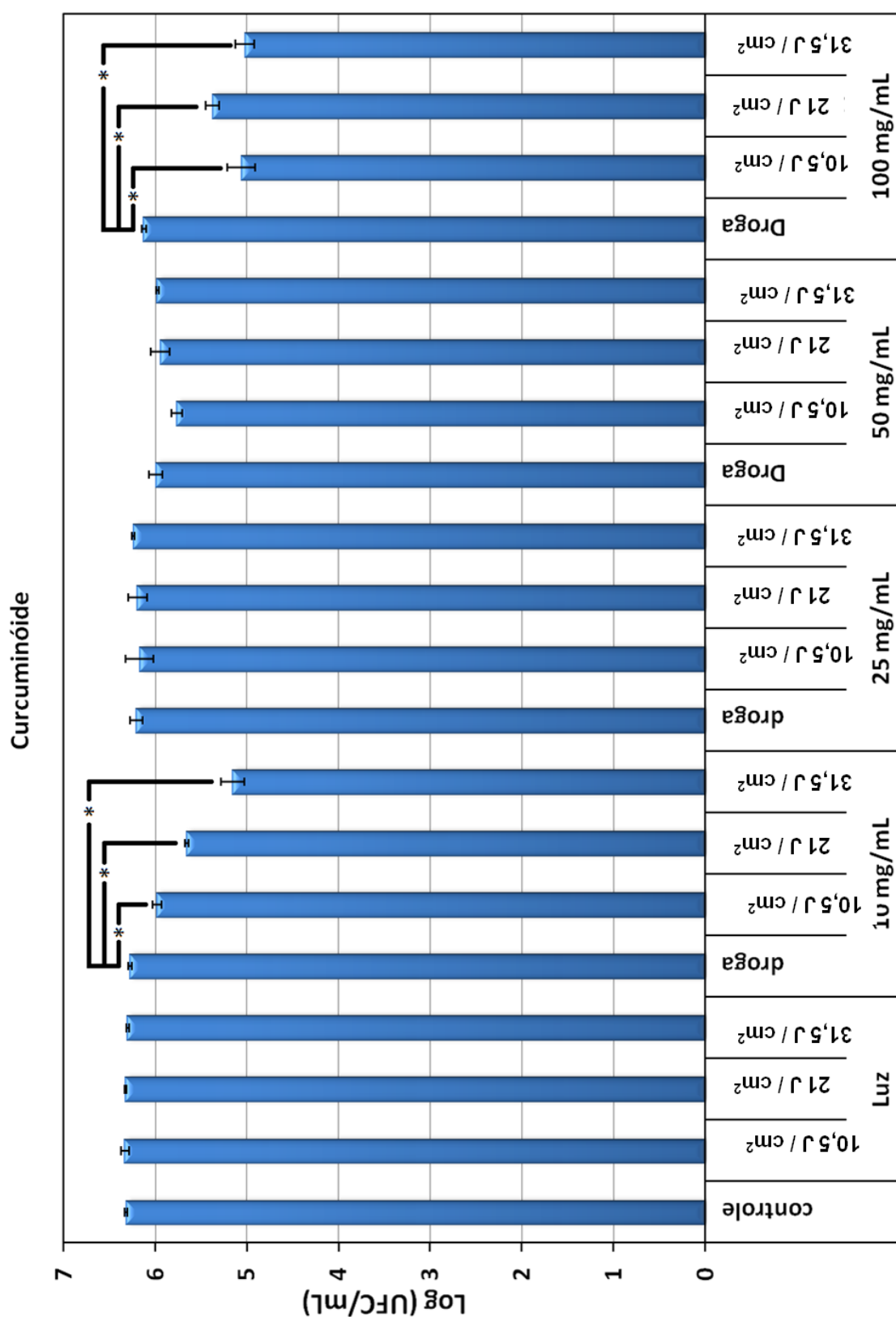


**Figura 13** – Viabilidade Celular obtidas para os fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos à TFD utilizando Photogem® como agente fotossensibilizador. O símbolo “\*” representa grupos que apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle, e o símbolo “+” os grupos que não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). Onde p= média e desvio padrão.

### **2.3.5.2 Avaliação dos testes efetuados com o curcuminóide como fotossensibilizador.**

Os valores originais de UFC/mL obtidos após a avaliação do Curcuminóide estão mostrados no anexo 3 deste trabalho. Como descrito anteriormente, os valores de UFC/mL foram transformados em  $\log_{10}$  para a análise pretendida neste trabalho. A Figura 14 mostra as principais estatísticas descritivas calculadas para todos os grupos investigados. É possível observar uma tendência de redução nos valores log dependendo do grupo avaliado. A utilização da curcumina como do fotossensibilizador sem luz não resultou em uma redução significativa em relação ao grupo controle. Para os grupos submetidos à TFD, apresentaram redução na viabilidade do micro-organismo aproximadamente 1 log para a concentração 10 mg/mL com dose de energia  $31,5 \text{ J/cm}^2$ , em comparação ao grupo controle. Nos grupos 25 e 50 mg/mL não houve diferença significativa, porém, foi evidenciado para maior concentração de fotossensibilizador 100 mg/mL uma redução de aproximadamente 1 log independente da fluência utilizada.

Os estudos com curcuminóides exigiram alta concentração do fármaco para que ocorresse inibição de crescimento do patógeno, entretanto, em altas concentrações, acredita-se que o composto produz agregados que não são ativos para a TFD.



**Figura 14-** Viabilidade celular obtidas para os *T. mentagrophytes* submetidos à Terapia Fotodinâmica utilizando o curcuminóide como agente fotossensibilizador. O símbolo “\*” representa grupos que apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Onde p= média e desvio padrão.

## 2.4 DISCUSSÃO

Embora promissora, a inativação fotodinâmica antimicrobiana encontra-se em fase inicial de desenvolvimento. Poucos trabalhos avaliaram a eficácia da inativação fotodinâmica para o tratamento de onicomicoses. A TFD apresenta algumas vantagens em relação às drogas antimicóticas. Diferentemente desses fármacos, a TFD tem diversos alvos potenciais para oxidação como proteínas, enzimas e lipídios insaturados, o que dificulta qualquer mecanismo de resistência e diminui a variação de susceptibilidade entre os isolados.<sup>58</sup> Neste trabalho avaliamos o efeito da terapia fotodinâmica em *Trychophyton mentagrophytes*, um dos principais fungos causadores da onicomicose uma vez que a morfologia influencia diretamente na resposta da técnica. As características físicoquímicas da superfície da célula fúngica influenciam a seletividade e a eficácia de vários FS.<sup>59</sup> Já as características estruturais e físicoquímicas (por exemplo, composição química, carga eletrostática, hidrofobicidade) da parede diferem muito entre diferentes fases do desenvolvimento e entre diferentes espécies<sup>60-62</sup>. Através das imagens de fluorescência ótica do patógeno corado com safranina conseguimos evidenciar a presença de quitina em regiões diferentes da hifa do micro-organismo, e então, analisamos a provável afinidade do micro-organismo aos fotossensibilizadores Photogem® e Curcumina. A distribuição dos FS na célula microbiana, melhorou com o aumento do tempo de incubação, atingindo parede e membranas em tempos maiores. A eficácia da inativação fotodinâmica depende da escolha do FS mais apropriado, e também de estudos nos quais são determinados parâmetros (como por exemplo, concentração do FS, dose e fonte de luz) mais apropriados para a inativação<sup>60-62</sup>.

Wainwright<sup>63</sup> descreveu a importância do tempo de incubação, uma vez que os compostos localizam-se primeiramente na parede celular e, portanto, curto tempo de incubação são necessários para dano nessa região. Entretanto, para danificar estruturas intracelulares é necessária uma longa incubação, pois os compostos levam um tempo maior para se concentrar nestas estruturas. Estes fatos evidenciam a necessidade de adequação dos parâmetros utilizados para diferentes espécies microbianas, pois como vimos neste experimento o comportamento do FS foi diferente do previsto por Wainwright.<sup>63</sup> Apesar de ainda não existirem estudos conclusivos sobre resistência bacteriana à ação da terapia fotodinâmica, só o fato

dela não agir indiscriminadamente no organismo do hospedeiro já constitui um benefício significativo nos complexos sistemas bacterianos e fúngicos<sup>64, 65</sup>

Sabendo-se que a fotoinativação depende da oxidação do ergosterol e do consequente aumento de permeabilidade da membrana, é possível que o efeito fotodinâmico em células resistentes a fluconazol seja dificultado.<sup>66</sup> Dessa forma, a utilização de maiores concentração de FS pode ser justificada, por permitir a formação de maior quantidades de oxigênio singlete, necessário para a fotoxidação do ergosterol. Todavia, não são encontrados estudos na literatura que confirmem essa possibilidade.

Ainda na microscopia confocal observamos que as hifas que entraram em contato com o fotossensibilizador ficaram notavelmente modificadas. Quando o fotossensibilizador não é bem distribuído nas células do patógeno, o efeito fotodinâmico não é homogêneo, sendo algumas hifas inativadas e outras não. A interação da droga com o patógeno foi maior à medida que aumentou o tempo de incubação, entretanto, 10 minutos não foi suficiente para uma distribuição uniforme. Apesar de haver inibição, o patógeno recupera o crescimento devido às hifas íntegras que restaram. Em contrapartida, quando realiza a TFD nos tempos de incubação 15 e 20 minutos, observa-se a presença de material amorfo, e já não é possível visualizar hifas intactas.

Uma PDT bem sucedida sempre envolve a otimização de um grande número de parâmetros. Obviamente, a seleção de um fotossensibilizador eficaz é essencial para o sucesso da técnica. Assim, como ele não deve ser tóxico para os seres humanos, o fotossensibilizador necessita absorver luz em comprimentos de onda compatíveis e precisa produzir uma eficiência de alta excitação.<sup>64, 65</sup>

Neste estudo, foram analisados as taxa de inibição, cinética e efeito morfológico da TFD, e observou-se que os efeitos dos dois fotossensibilizadores foram eficientes para inativação do *Trychophyton mentagrophytes*. Além disso, comprovou-se que o tempo de incubação está diretamente relacionado ao dano causado e, por isso, tempos de incubação superiores a 20 minutos são provavelmente mais indicados para a inativação destes patógenos. Nos ensaios *in vitro* para cálculo da fração de sobrevivência, fixou-se o tempo de incubação para 20 minutos, uma vez que estes foram os primeiros estudos realizados para observar a possível susceptibilidade do *T. mentagrophytes* à TFD. Depois de realizadas as comparações entre os grupos dos experimentos, observou-se que o grupo que era presente o FS sem a presença

de luz não apresentou redução na porcentagem de crescimento das colônias indicando que o FS sozinho não leva a morte fúngica. Já os grupos Com luz e sem FS apresentaram pouca redução na porcentagem de crescimento das colônias mostrando que a ação do LED, sem a presença do FS, não foi capaz de inibir o crescimento do fungo de maneira satisfatória. Para os grupos submetidos ao tratamento, a TFD foi efetiva com os dois fotossensibilizadores, a morte microbiana mostrou ser dependente do tempo de incubação. O patógeno não apresentou crescimento quantitativo após o tratamento.

As taxas de inibição do crescimento *in vitro* do patógeno obtidas para a terapia fotodinâmica mostraram-se equivalentes ou superiores às descritas na literatura para as drogas antimicóticas,<sup>45, 67-70</sup> comprovando o potencial da terapia fotodinâmica na inativação do patógeno. Os resultados encontrados no presente estudo poderão servir como parâmetro para futuras investigações, nas quais a associação do Photogem® e da curcumina à luz do tipo LED poderão ser avaliada em situações que simulem as condições encontradas clinicamente.

Deve-se ressaltar que o micro-organismo utilizado neste estudo foram totalmente inativados com a TFD quando associada ao Photogem®, a eficácia não foi a mesma para TFD com curcuminóide. Para o curcuminóide, foram testadas doses maiores que do Photogem®, isso porque a solução testada se tratava de uma mistura e não de curcumina pura. Na mistura estão presentes estruturas diferentes da estrutura da curcumina, mas que também apresentam atividade fotodinâmica quando iluminado em 450 nm. Certamente, ao testarmos uma solução de curcumina pura ou em maior concentração no total da mistura, doses menores serão mais efetivas. Porém, estudos com inativação de cândida por curcumina, foram relatados por Dovigo.<sup>37</sup> Esse resultado possui grande relevância para o tratamento de infecções recorrentes, uma vez que a TFD poderia ser utilizada também para o tratamento de infecções resistentes aos medicamentos convencionais e a eliminação total do micro-organismo diminuiria a possibilidade de recidivas da doença. Entretanto, essa hipótese será validada por meio de estudos clínicos.

As propriedades fotossensibilizadoras de substâncias corantes, como o azul de metileno e o azul de toluidina, também têm sido avaliadas e demonstraram que o azul de toluidina foi efetivo para promover a inativação de micro-organismos. Para a iluminação de suspensões celulares com laser na presença de azul de metileno, promoveu-se 80% de redução no número de UFC/mL de espécies de *Candida* sp.

No entanto, devido às características desses corantes, a utilização dessas substâncias poderia ocasionar alteração na cor de superfícies ungueais, dessa forma, para o tratamento, optamos por substâncias que não ocasionassem manchamento às unhas.

Em comparação com o azul de metileno, o Photogem® e a curcumina não mancham as unhas, como ocorre com o FS azul de metileno, dependendo da concentração utilizada, podendo ser utilizados com segurança nos pacientes, aumentando inclusive a adesão dos mesmos aos tratamentos.

Em se tratando de onicomicoses, o tratamento convencional utilizando drogas antifúngicas orais, muitas vezes não é capaz de remover o fungo das unhas antes que estas sejam renovadas. Isto sugere uma possível explicação para o difícil tratamento de tal condição patológica. Apesar da escassez de trabalhos presentes na literatura, a TFD direcionada ao tratamento de dermatofitoses, com o desenvolvimento de fotosensibilizadores específicos para onicomicoses, representa uma opção de tratamento contra uma infecção fúngica em constante expansão.

Neste estudo demonstram que a terapia fotodinâmica constitui uma alternativa de inibir “*in vitro*” o crescimento de *T. mentagrophytes*. É necessária a realização de outros estudos, principalmente “*in vivo*”, para melhor adaptação da técnica às condições orgânicas dos pacientes. Esta técnica, aliada a um diagnóstico correto, pode possibilitar um aumento da cura desta doença, sem os efeitos colaterais produzidos pelas drogas antifúngicas e com maiores taxas de adesão ao tratamento pelos pacientes.







### 3.1 JUSTIFICATIVA

O tratamento convencional utilizando drogas antifúngicas orais, muitas vezes não é capaz de remover o fungo das unhas antes que estas sejam renovadas. Isto sugere uma possível explicação para o difícil tratamento de tal condição patológica.

Demonstramos que a terapia fotodinâmica constitui uma alternativa de inibir “*in vitro*” o crescimento de *T. mentagrophytes*. É necessária a realização de outros estudos, principalmente “*in vivo*”, para melhor adaptação da técnica às condições orgânicas dos pacientes. Esta técnica, aliada a um diagnóstico correto, pode possibilitar um aumento da cura desta doença, sem os efeitos colaterais produzidos pelas drogas antifúngicas e com maiores taxas de adesão ao tratamento pelos pacientes. Sugerimos estudos clínicos com a TFD, acreditando que esta proporcione resultados mais rápidos e eficientes, e de fácil execução, podendo ser realizado pelo clínico no próprio consultório.

A TFD direcionada ao tratamento de onicomicoses, representa uma opção de tratamento contra uma infecção fúngica em constante expansão e possui grande relevância para o tratamento de infecções recorrentes, uma vez que a TFD poderia ser utilizada também para o tratamento de infecções resistentes aos medicamentos convencionais e a eliminação total do micro-organismo diminuindo a possibilidade de recidivas da doença. Entretanto, essa hipótese será validada por meio de estudos clínicos.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ensaios clínicos e avaliação da terapia fotodinâmica para o tratamento da onicomicose em pacientes infectados que já haviam testado outras terapias;
- Detalhar os agentes causadores de onicomicoses em humanos e os aspectos clínicos da doença;
- Abordar a viabilidade o efeito da técnica em aplicação clínica, assim como a viabilidade de custo e tempo de tratamento.
- Avaliar e comparar os resultados dos pacientes tratados com duas classes distintas de fotossensibilizadores utilizados nos ensaios *in vitro* para o tratamento de dermatomicoses nas unhas dos pés;

- Investigar a distribuição dos compostos em solução tópica, assim como a possível seletividade destas drogas pelos micro-organismos causadores da onicomicose
- Avaliar eficácia da TFD como tratamento de onicomicoses em lesões com tempos diferentes e obter informações relativas à fluência e intensidade luminosa necessárias para o tratamento destas lesões.

### **3.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.2.1 MATERIAIS:**

##### **3.3.1.1 Pacientes**

Foram estudados 90 pacientes com suspeita clínica de onicomicose, conforme triado por um mesmo especialista, no caso, podólogos. Após incluídos no estudo, eram coletadas de cada participante as amostras das unhas alteradas e enviadas para estudo micológico no laboratório de análises clínicas Pasteur, em São Carlos-SP. Eram considerados suspeitos de onicomicose aqueles doentes que apresentassem alteração da coloração ou da espessura, ou até mesmo descolamento da lâmina ungueal.

##### **3.3.1.2 Aspectos Éticos**

O presente estudo clínico foi aprovado pela comissão de Ética da Universidade Anhemi Morumbi (ANEXO 1).

A aceitação dos pacientes ou seus responsáveis foi documentada por meio de consentimento livre e esclarecido. Tal consentimento foi obtido após esclarecimento do estudo ao sujeito ou ao seu responsável, o qual foi feito pelo pesquisador executante, junto com o professor responsável da instituição colaboradora. O consentimento livre e esclarecido foi elaborado com base no modelo pré estabelecido pela CAPPesq (ANEXO 2).

### **3.3.1.3 Critérios de Inclusão**

Foram incluídas na pesquisas pessoas que possuíam lesões clínicas sugestivas de onicomicose, avaliados pelos podólogos. Todos os pacientes permaneceram sem tratamento antifúngico por no mínimo 6 meses antes do início da terapia fotodinâmica durante todo tempo de procedimento.

### **3.3.1.4 Critérios de Exclusão**

Foram utilizados como critérios de exclusão:

1. Menores de 18 anos;
2. Mulheres Grávidas;
3. Paciente em uso de tratamento antifúngico sistêmico, recente – menos de 6 meses antes do começo da participação no estudo clínico.

### **3.3.1.5 Fotossensibilizadores**

Utilizou-se os dois compostos analisados nos ensaios *in vitro*: o Photogem® (Limited Liability Company Photogem, Moscou, Rússia), aprovado pelo *Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation* sob autorização 42-3199-98. A utilização desse agente é aprovada para uso em humanos pelo Comitê Estatal de Farmacologia da Federação Russa e também pela ANVISA (data 08/04/2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4), sob autorização 42-3199-98, sendo que sua distribuição é realizada somente sob prescrição para instituições especializadas. A droga foi mantida sob proteção da luz e acondicionada em geladeira à temperatura de 4 a 8 °C e preparada em solução fisiológica na concentração de 1 mg/mL.

Também foi utilizada a curcumina da empresa PDT Pharma (Cravinhos, SP), composto natural extraído do açafrão (*Curcuma longa* L.), entregue em forma de pó acondicionado em envelopes metálicos. Foi mantida sob proteção da luz e acondicionada em geladeira à temperatura de 4 a 8 °C. A solução na concentração 1.5 mg/mL (p/v) foi preparada diluindo o pó numa mistura de álcool (etanol), quantidade suficiente para o volume desejado e dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%). Ambos os FS foram administrados por meio de solução tópica. Devido aos resultados *in vitro*, para os ensaios clínicos tratou-se os pacientes com a solução mais concentrada de curcumina pura, contendo 40% de curcumina e 60% de outros curcuminóides (demetoxi-curcumina + Bis-demetoxicurcumina).

### 3.3.1.6 Fonte luminosa

Para os ensaios com Photogem® foi utilizado um equipamento a LED emitindo em 630 nm, com intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>. Para os ensaios com curcumina foi utilizado o equipamento a LED emitindo em 470 nm, com intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup>.

Para maior comodidade do paciente e do profissional durante a aplicação, desenvolveu-se um equipamento específico, adequando-o à geometria das mãos e dos pés (Figura 1515).



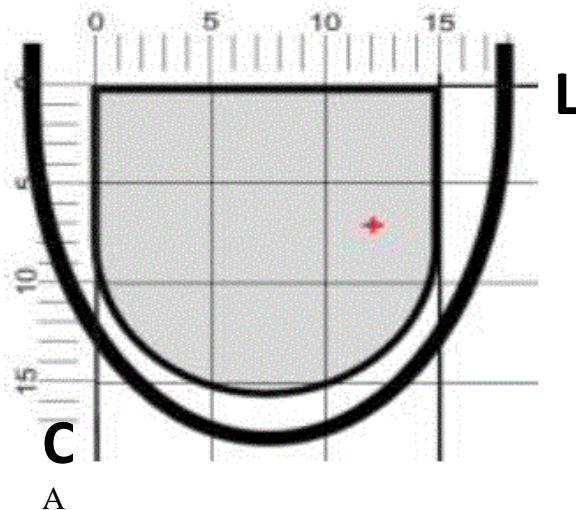
**Figura 15** - Equipamento portátil a base de LED para o tratamento da onicomicose. O dispositivo é composto de uma presilha à qual foi acoplado um LED para irradiação da lesão ingual.

Este equipamento foi desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT/IFSC-USP), e foi patenteado sob o protocolo: 01811047225 (ANEXO 5). As fontes de luz usadas foram dispositivos LED (*Light-emitting Diodes* – Diodos

Emissores de Luz), emitindo num comprimento de onda na região do vermelha 630 nm e outra na região do azul 470 nm, ambos com intensidade 100 mW/ cm<sup>2</sup>.

### 3.3.1.7 Medida da redução da área micótica.

Para análise da redução da área micótica, foi necessário conhecer uma das distâncias da unha; uma vez feito este reconhecimento, foi inserida nas imagens com uma película semelhante a um escalímetro, projetando assim, uma distância comparativa com a distância real. É um método muito utilizado em navegação marítima e aeronáutica denominado Projeção de Mercator<sup>1</sup>. Com esta adaptação, é possível endereçar um ponto determinado da unha (ver Figura 1616).



**Figura 16** - Coordenada Ungueal1 - projeção em unha, medidas em milímetros; (C) céfalo-caudal x (L) latero-lateral.

Utilizou-se para a medição um paquímetro digital antes e depois do tratamento, no sentido de verificar o tamanho tanto da unha saudável quanto da região micótica, como representado na Figura 17.

<sup>1</sup> É um modo de representação das coordenadas espaciais relativas a três dimensões num planisfério cilíndrico de duas dimensões.

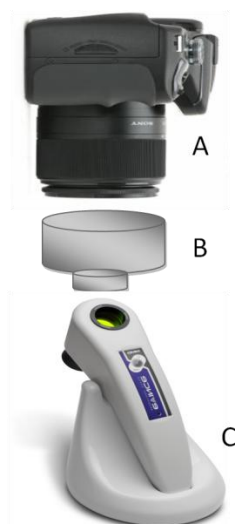


**Figura 17** – Medida da unha com paquímetro digital (Carbon Fiber Composites, marca Western® Pro).

#### **3.3.1.8 Imagem de fluorescência**

Com o intuito de avaliar a presença do fotossensibilizador na lesão no momento da realização da TFD, as unhas acometidas pela doença foram monitoradas por imagens de fluorescência através de um sistema portátil acoplado a uma câmera fotográfica denominado Evinco Diagnóstico®, produzido pela MM Optics (figura 18). O evidenciador clínico não é invasivo, e consiste em um conjunto óptico com fonte de luz LED na região do ultravioleta-azul do espectro luminoso. Este equipamento é seletivo porque permite evidenciar tanto a fluorescência natural do tecido e dos micro-organismos quanto a advinda do FS e, portanto, auxilia no reconhecimento de lesões e contaminações via fluorescência óptica em tempo real.





**Figura 18** - Disposição dos equipamentos para análise de fluorescência: A) Câmera fotográfica, B) Acoplador, C) Evidenciador.

A emissão da fluorescência de moléculas do fotossensibilizador no tecido superficial pode ser parcialmente coletada, o que permitiu visualizar se houve ou não a degradação do medicamento após a irradiação.

### 3.3.2 Métodos

#### 3.3.2.1 Avaliação clínica

No estudo clínico, os pacientes foram randomizados aleatoriamente para o Grupo A Photogem® ou Grupo B curcumina, independente do tempo de evolução da doença. Os voluntários foram submetidos à anamnese (ANEXO 4), e através dos dados coletados fora preenchidos um questionário.

A anamnese incluiu de: Nome, sexo, idade, tempo de evolução da doença, comorbidades e uso de medicação antifúngica anterior ao estudo, assim como tentativas anteriores de outra técnicas para a eliminação da doença.

No exame clínico foi avaliado o número de unhas acometidas e foram observados os aspectos macroscópicos e a coexistência ou não de *tinea pedis* e/ou

*tinea manuum*. Em seguida, foi feita a coleta da amostra ungueal para exames micológicos (direto e cultura). A amostra da unha do doente com suspeita de onicomicose subungueal distal ou lateral foi obtida através do raspado subungueal, raspando a área infectada desde a porção distal até a proximal. Os primeiros detritos coletados da porção distal foram descartados, já que são ricos em contaminantes. As escamas obtidas da transição entre a unha normal e a afetada foram utilizadas para o exames micológicos (direto e cultura).

Na onicomicose proximal, a coleta foi transugueal, ou seja, a lâmina ungueal foi perfurada para que o acesso até o local da infecção fosse possível, e então realizado o raspado subungueal. A amostra da unha do paciente com suspeita de onicomicose superficial branca foi obtida por raspagem da parte superficial da lâmina ungueal, sobre a lesão branca. O instrumento utilizado para a coleta do material ungueal foi uma lâmina para bisturi estéril para cada paciente.

No laboratório foi realizado o exame micológico direto (MD), após clarificação da amostra com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 40% no microscópio com aumento 40x. Para a cultura do fungo em potencial, a amostra foi semeada em meio Ágar Sabouraud, incubada por 4 semanas à temperatura ambiente (25 °C). A identificação do agente foi realizada por aspectos microscópicos (aspecto, consistência, tempo de desenvolvimento, pigmentação frente e verso dos cultivos) e micromorfológico da colônia (cultivo em lâmina examinado com o corante lactofenol azul de algodão) e, quando necessário, pelos testes fisiológicos e bioquímicos adequados a cada caso.

### **3.3.2.2 Medida da redução da área micótica.**

Foi quantificado por este método a redução da área micótica da lâmina ungueal semanalmente, e avaliada clinicamente. A Tabela 2, apresenta a pontuação de acordo com a porcentagem da redução da área micótica, sendo considerado 0 % quando não havia crescimento ungueal, quando o crescimento foi de 1 a 20% foi dado 1 ponto, de 21 a 40% foi dado 2 pontos, quando o crescimento foi de 41% a

60% , 3 pontos, e de 61% a 80% foi dado 4 pontos e de 81% a 100% demos 5 pontos.

**Tabela 2 - Regra de pontuação de acordo com o percentual de redução da área micótica na unha**

<b>Percentual de redução da área micótica na unha</b>	<b>Pontos obtidos</b>
<b>0%</b>	<b>0</b>
<b>De 1% à 20%</b>	<b>1</b>
<b>De 21% à 40%</b>	<b>2</b>
<b>De 41% à 60%</b>	<b>3</b>
<b>De 61% à 80%</b>	<b>4</b>
<b>De 81% à 100%</b>	<b>5</b>

### **3.3.2.3 Imagem de fluorescência**

Após a documentação do voluntário, as imagens das unhas foram registradas pela câmera digital (Sony DSC-H50). Para análise da fluorescência, adaptou-se a esta câmera um acoplador específico para o Evince Diagnóstico®. A coleta das imagens de fluorescência foi realizada em três momentos: previamente à aplicação da medicação, antes e depois da irradiação da unha (Figura 209).



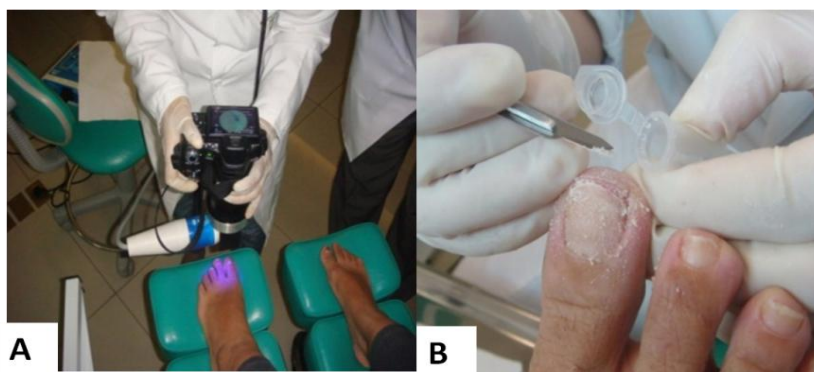
**Figura 19** - coleta das imagens de fluorescência foi realizada em três momentos: previamente à aplicação da medicação, antes e depois da irradiação da unha

### 3.3.2.4 Terapia Fotodinâmica

O estudo foi realizado com 90 pacientes (45 pacientes para cada grupo de FS), totalizando 375 unhas, com suspeita diagnóstica de onicomicose, sem predileção por sexo ou tempo de apresentação da lesão. O total de pacientes está dividido em 3 grupos distintos de colaboradores: 40 pacientes em São Carlos-SP, 40 em São Paulo-SP e 10 em Ribeirão Preto-SP, distribuídos nos grupos abaixo:

- Grupo A, que foi tratado com o fotossensibilizador Photogem®
- Grupo B, que foi tratado com o fotossensibilizador Curcumina.

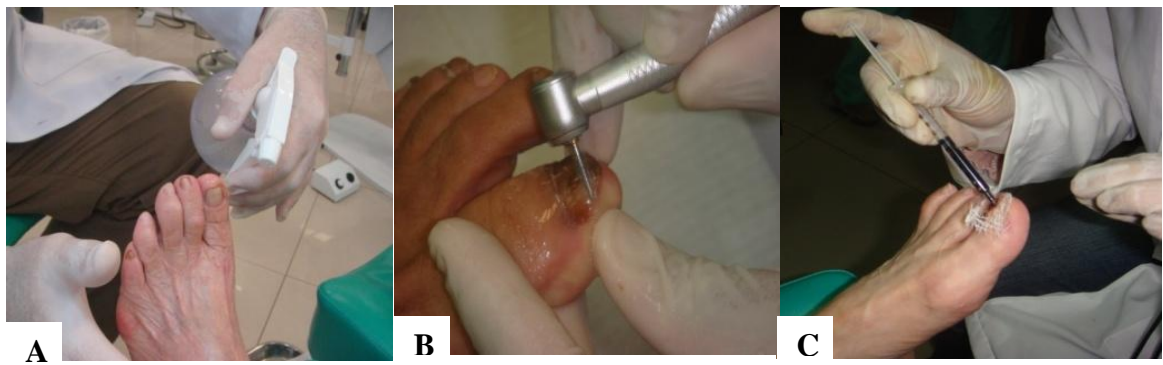
Após a coleta da imagem de fluorescência, fez-se a coleta do material para análise microbiológica (Figura 20 B).



**Figura 20** - A) Aquisição da imagem de fluorescência antes do procedimento; B) Curetagem e coleta de material.

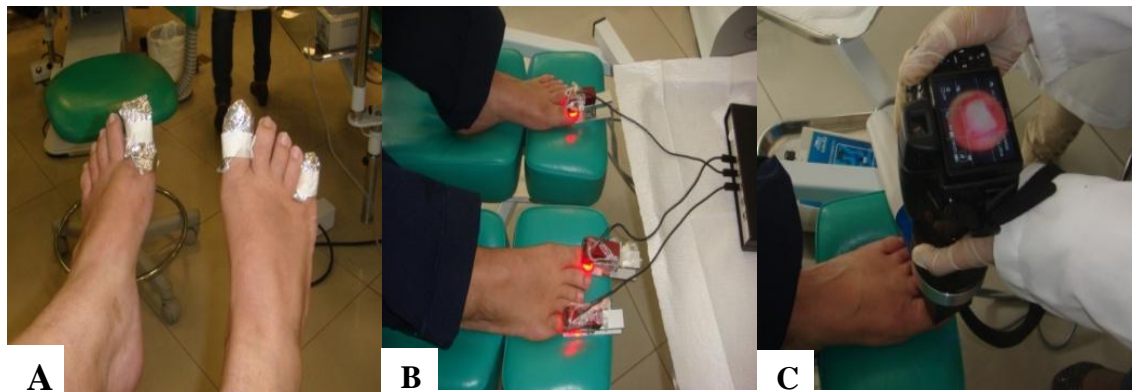
Antes da aplicação do fotossensibilizador, fez-se a preparação da unha com a assepsia com Álcool 70% (Figura 20-A), depois o desbastamento do local (Figura 20-B), então a aplicação do fotossensibilizador (Figura 20-C).

Participantes do grupo A receberam o fotossensibilizador Photogem® na concentração de 1 mg/mL, e pacientes do grupo B receberam o fotossensibilizador curcumina a 1,5 mg/mL.



**Figura 21** - A) Assepsia com Álcool 70%.; B) Desbastamento do local; C) Aplicação do fotossensibilizador

A técnica constituiu no emprego tópico dos agentes fotossensibilizantes. Em seguida, a lesão foi ocluída com papel alumínio para proteção contra a luz (Figura 22-A). Após um período de uma hora, retirou-se a oclusão, retirando o excesso de FS, e o local foi iluminado com uma fonte de luz a LED respectiva ao fotossensibilizador utilizado (Figura 22-B). Na sequência, a coleta da imagem de fluorescência para a análise após a iluminação (Figura 22-C) foi realizada.



**Figura 22** - A) Oclusão do local; B) Terapia Fotodinâmica e C) Imagem de fluorescência após iluminação.

Para o grupo A (fotossensibilizante Photogem®) foi utilizado o LED com emissão no vermelho (630 nm) do espectro e para o grupo B (fotossensibilizante curcumina) utilizou-se o LED com emissão no azul (470 nm) do espectro. Para

ambos os grupos, foi aplicada intensidade de  $100 \text{ mW/cm}^2$  durante 20 minutos, totalizando  $120 \text{ J/cm}^2$ .

Sete dias após a iluminação, foi realizada uma nova avaliação clínica para verificação da resposta ao tratamento, dependendo da resposta agendava-se outra sessão para semana seguinte. O acompanhamento do tratamento foi realizado semanalmente por meio de coleta de imagens fotográficas. O protocolo desta técnica de tratamento de onicomicose por terapia fotodinâmica está sob a patente de número PI 0805294-A2.

#### **3.3.2.5 Análise da redução da área micótica.**

Com o paquímetro digital, medimos a lâmina ungueal para comparar a redução da área ungueal micótica, antes e depois do tratamento, analisamos o crescimento do tamanho tanto da unha saudável quanto da região micótica, sendo medida a base da unha e o comprimento. Assim, conhecendo uma das distâncias da unha, foi inserida nas imagens uma película semelhante a um escalímetro, projetando assim, uma distância para comparar com a distância real. As medidas eram feitas semanalmente e, era dada uma pontuação conforme apresentada na Tabela 2, para posterior análise.

### **3.4 RESULTADOS**

#### **3.4.1 Testes Clínicos**

A TFD mostrou-se um bom auxiliar em reduções microbianas e fúngicas, e os voluntários mostraram-se bem receptivos com a terapia, visto que todos foram tratados em múltiplas ocasiões com outras técnicas convencionais, por vezes durante anos, e não tiveram sucesso. Na tabela 3, foram analisadas as variáveis de estudo de acordo com o tempo de lesão dos pacientes.

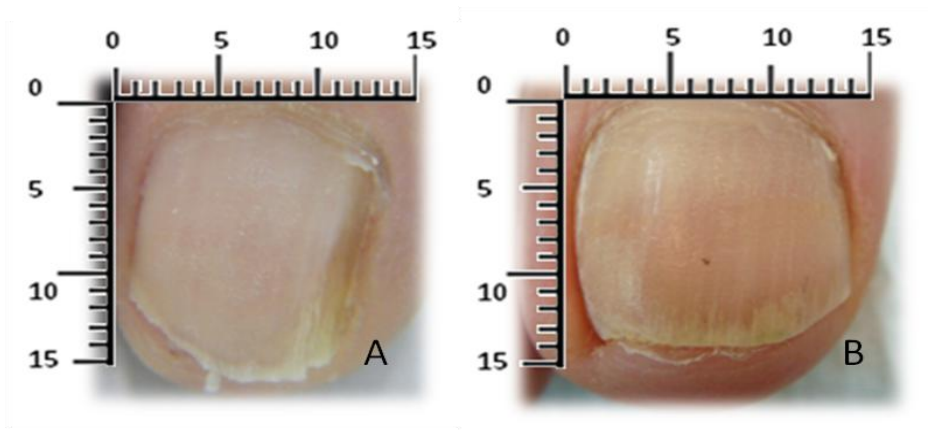
Tabela 3- Variáveis do estudo clínicos dos pacientes em função do tempo de lesão.

Variáveis do estudo	Tempo de lesão						Total
	até 1 ano	2 a 5 anos	5 a 10 anos	11 a 15 anos	16 a 20 anos	21 anos ou mais	
Nº de pacientes	6	9	33	13	14	15	90
Idade Pacientes ( entre 18e 47 anos)	6	4	0	0	0	0	10
Idade Pacientes ( entre 48e 60 anos)	0	5	31	10	12	14	72
Idade Pacientes ( Acima de 60 anos)	0	0	2	3	2	1	8
Razão Feminino:masculino	5:1	4:5	19:14	7:5	7:8	4:11	90
Doenças Crônicas	5	6	28	10	11	12	72
Nº unhas lesionadas	22	54	132	65	42	60	375
Tratamentos anteriores	6	9	33	13	14	15	90
Diagnóstico Laboratorial	2	3	10	3	5	4	27
Tempo total tratamento	2 meses	4 meses	6 meses	6 meses	6 meses ou mais	6 meses ou mais	Média 6 meses
Curados	6	9	27	11	6	3	62

Metade dos pacientes deste estudo (51%) apresentava mesma lesão durante o intervalo de 5 a 15 anos. Podemos observar também que 16% dos pacientes possuía a lesão por 21 anos ou , e apenas 6% apresentavam a lesão recente (até 1 ano). Esta distribuição permite avaliar a dificuldade de cura das lesões, mostrando que pessoas acometidas acabam portando a lesão por muito tempo. Esse resultado reflete a importância de tratamentos alternativos para as onicomicoses.

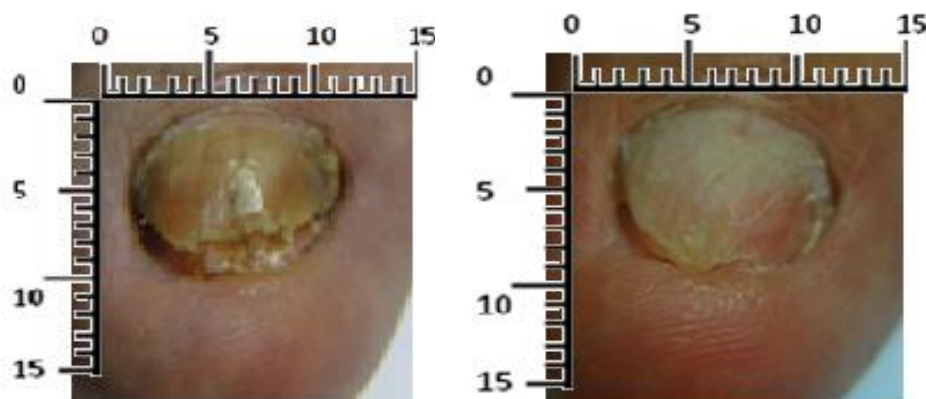
Quando tratadas a lesões com TFD, foi observada a necessidade de aumentar o número de sessões em lesões mais antigas para se obter a cura da

doença, enquanto lesões com avaliação recente, necessitaram apenas 2 ou 3 sessões. Na Figura 23, se evidencia a presença de um leito ungueal saudável após 2 sessões de TFD com curcumina.



**Figura 23** - Paciente D.L., 55 anos, com lesão há 3 anos, foi tratado no grupo “B” com Curcumina. A) Lesão antes do tratamento e B) após 30 dias de tratamento.

Na Figura 24, demonstra-se o paciente que possuía a lesão por 35 anos. Observa-se uma melhora após 8 sessões, porém este paciente ainda está em tratamento.



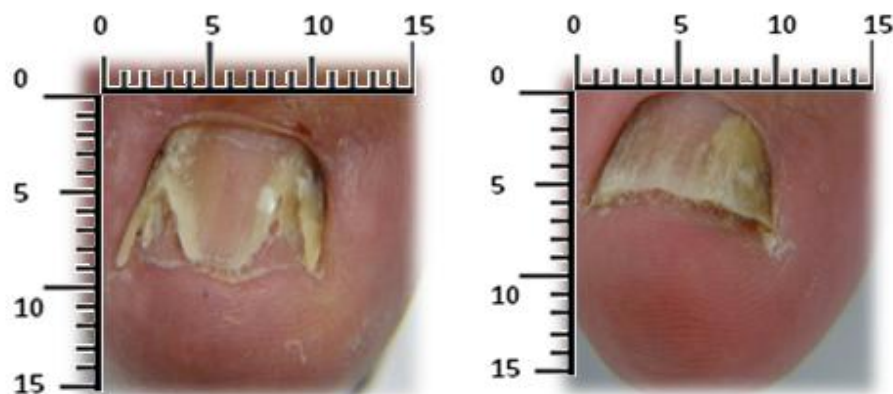
**Figura 24** - Paciente JLF., 61 anos, com lesão há 35 anos, foi tratado no grupo grupo “A” com Photogem®. A) lesão antes do tratamento e B) 60 dias após o tratamento.

De todos os pacientes participantes deste estudo, observou-se uma proporção semelhante entre homens (49%) e mulheres (51%). Observou-se também que os pacientes com um tempo de lesão maior do que 20 anos eram participantes



do sexo masculino numa proporção 11:4 com relação a mulheres, ou seja, para cada 4 mulheres com lesão acima de 20 anos, haviam 11 homens com este mesmo tempo de lesão. Também observou-se que o maior número de pacientes estão na faixa de idade entre 48 e 60 anos, e que 80% portam doenças crônicas, como hipertensão, problemas cardíacos e diabetes, sendo esses alguns dos fatores que estimulam a procura desses pacientes pela técnica, devido à dificuldade em adicionar novos medicamentos que pudessem vir a interagir com os já utilizados para tratar suas doenças crônicas.

Na Figura 25 apresenta-se o resultado parcial após 30 dias de um exemplo de um paciente com múltiplas doenças crônicas, tendo sido obrigado por isso a remover a lâmina ungueal como tratamento, por 3 vezes, sem sucesso, o que o levou a optar por tratar com a TFD.



**Figura 25** - Paciente M.E.F, 45 anos, com lesão há 4 anos, foi tratado no Grupo "A" Photogem® A) antes do tratamento e B) 30 dias após tratamento.

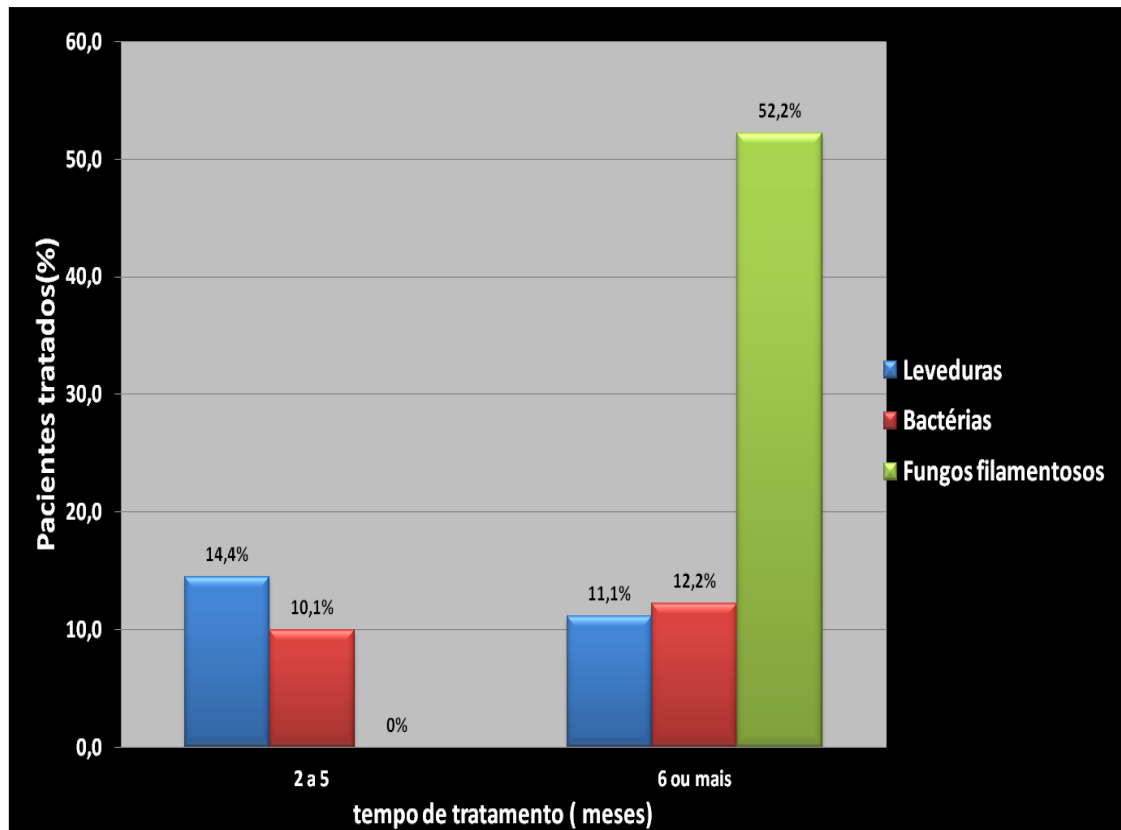
Grande parte dos pacientes possuía mais de uma unha acometida pela doença. Na Figura 26 observamos um paciente com múltiplas lesões que representa 95,6% dos casos neste estudo.



**Figura 26** - Paciente com múltiplas lesões representa a maioria dos casos.

De acordo com a análise laboratorial, constatou-se que 70% dos pacientes com uma evolução de menos de 1 ano foram curados com 2 sessões, e os 30% restantes com até 4 sessões. Os pacientes com lesões de 5 a 10 anos foram curados com uma média de 16 sessões, enquanto os pacientes com lesões de 10 a 15 anos foram curados com cerca de 22 sessões, e os pacientes com 15 anos ou mais de doença necessitaram de pelo menos 22 sessões, dependendo do tamanho das lesões. O tempo total médio do tratamento da onicomicose com TFD semanal foi de 6 meses.

Para uma análise mais aprofundada, o tempo de tratamento e a classe do micro-organismo causador da doença foram correlacionados (Figura 27).

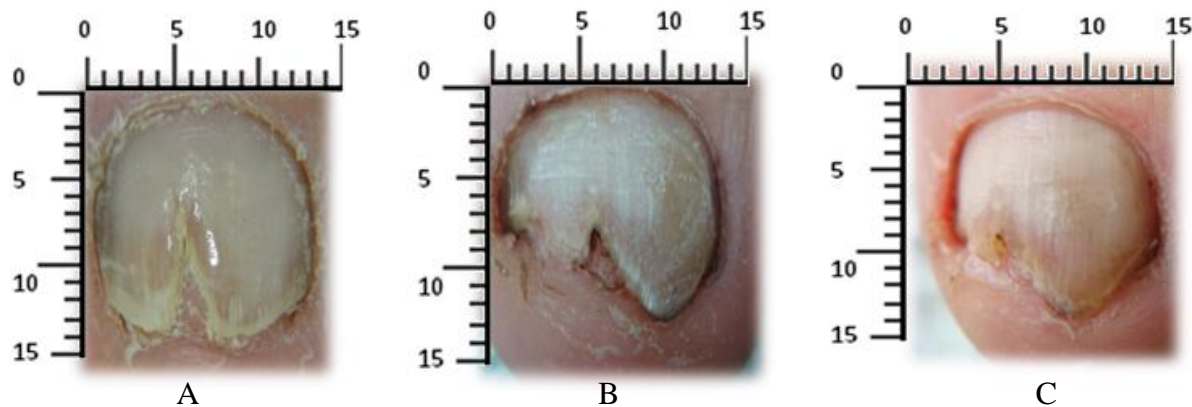


**Figura 27** - Correlação da classe de micro-organismos, por tempo médio de tratamento por TFD.

Observa-se que 52,2% dos pacientes que levaram 6 meses ou mais para finalizar o tratamento com TFD, possuíam lesões causadas por fungos filamentosos, e os restantes 11,1% das lesões foram encontradas leveduras e 12,2% bactérias. Os pacientes que tiveram o tratamento finalizado entre 2 a 5 meses representam 40% do total, sendo 14,4% com lesões causadas por leveduras e 10,1 % causadas por bactérias.

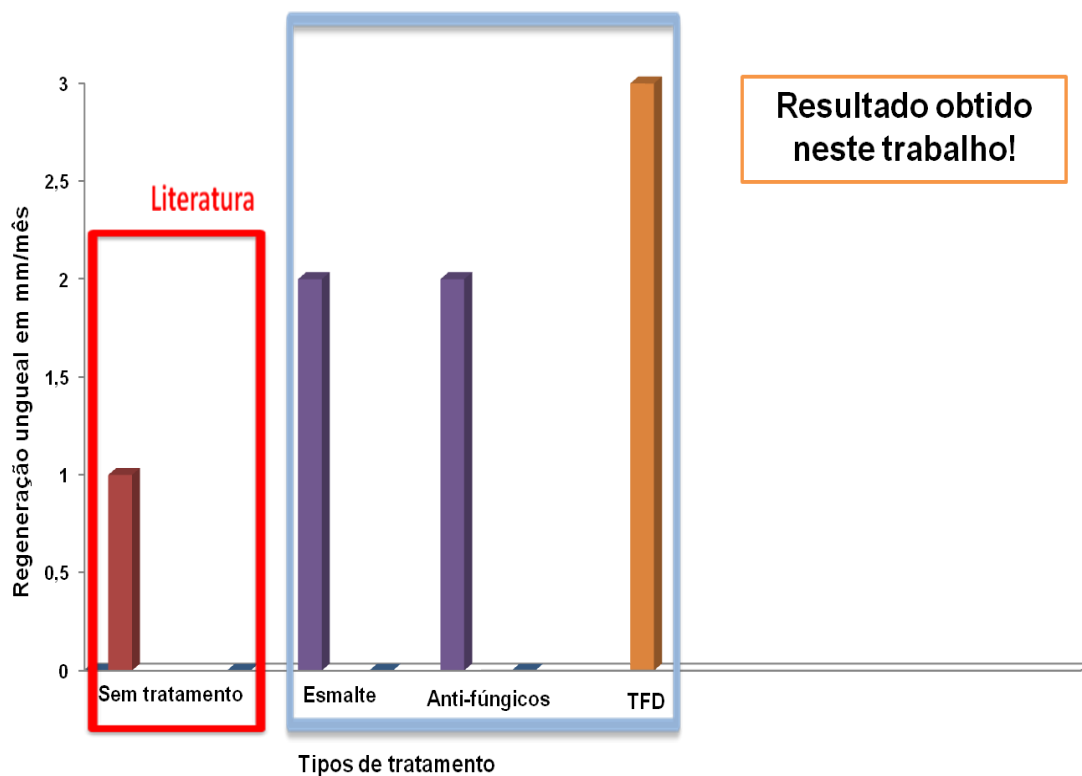
### 3.4.2 Análise do crescimento ungueal

Sabendo-se que a unha dos pés possui um crescimento lento e contínuo, na velocidade média de 1,8 mm por mês, podendo levar de 12 a 18 meses para a eliminação completa da lesão<sup>21</sup>, neste estudo o crescimento da unha do paciente foi analisado semanalmente. A Figura 28 mostra a evolução da unha do paciente, com fotos antes do tratamento, e 30 e 45 dias após o seu início.



**Figura 28** - Paciente M.C. 45 anos , com lesão há 5 anos, foi tratado no grupo, “ A” com Photogem®  
A) antes do tratamento; B) após 30 dias de tratamento e C) após 45 dias de tratamento.

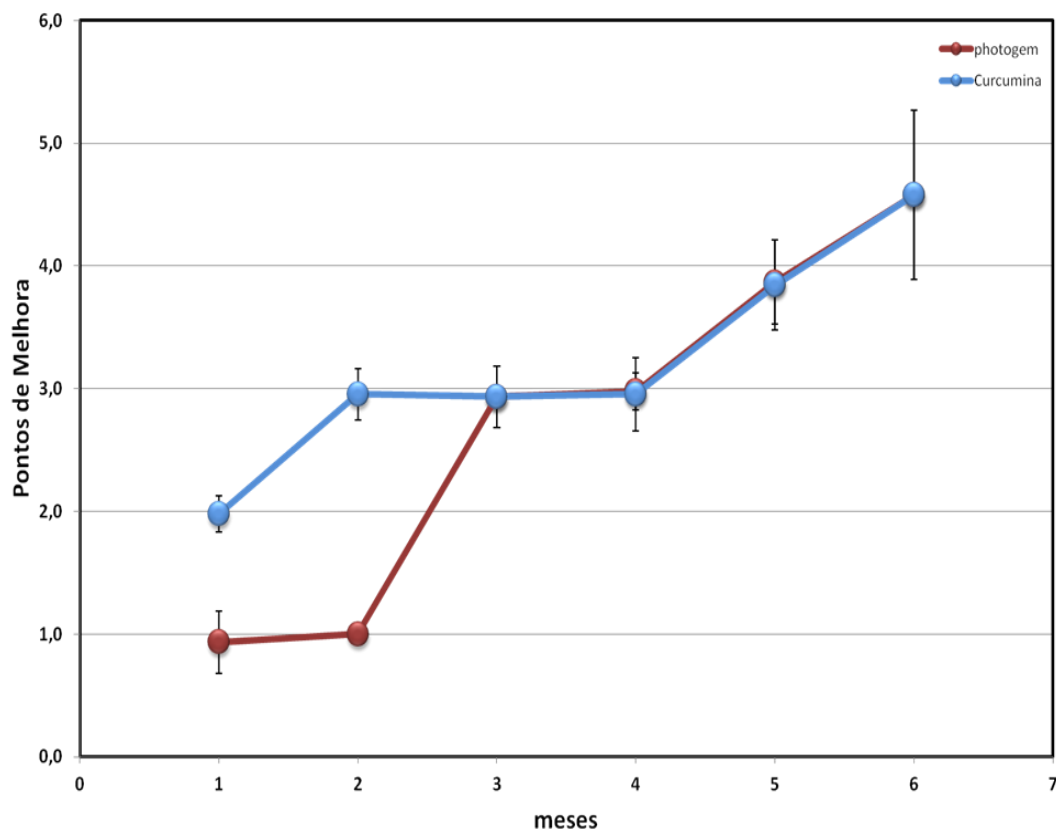
Os resultados mostraram que a regeneração ungueal dos pacientes tratados com TFD foi de 3 mm/mês, independente do fotossensibilizador utilizado (Photogem® ou curcumina). Em comparação com as terapias convencionais, foi evidente um crescimento maior para a terapia fotodinâmica, sendo visualizado um crescimento de 2 mm/mês<sup>71-73</sup> quando utilizado o esmalte terapêutico e/ou antifúngicos tópicos ou orais. Foi avaliado também o crescimento da unha lesionada sem tratamento, evidenciando-se um crescimento de 1 mm/mês<sup>25, 74, 75</sup>. Na Figura 29, apresenta-se o crescimento da unha lesionada sem tratamento, com os tratamentos usuais e o tratamento com TFD.



**Figura 29** - Gráfico comparativo da regeneração das unhas em mm/mês dos 90 pacientes tratados com terapia fotodinâmica em relação aos tratamentos convencionais e unhas lesionadas, por semana decorrida.

### 3.4.3 Evolução clínica das lesões de acordo com o fotossensibilizador utilizado

Sabendo - se que 90 pacientes selecionados para a pesquisa clínica foram divididos em 2 grupos, onde 45 voluntários foram tratados utilizando o Photogem® como fotossensibilizador e os outros 45 utilizamos a curcumina como e fotossensibilizador, comparamos a evolução clínica das lesões de acordo com o tipo de fotossensibilizador utilizado, assim obtemos o gráfico a seguir: ( Figura 30)

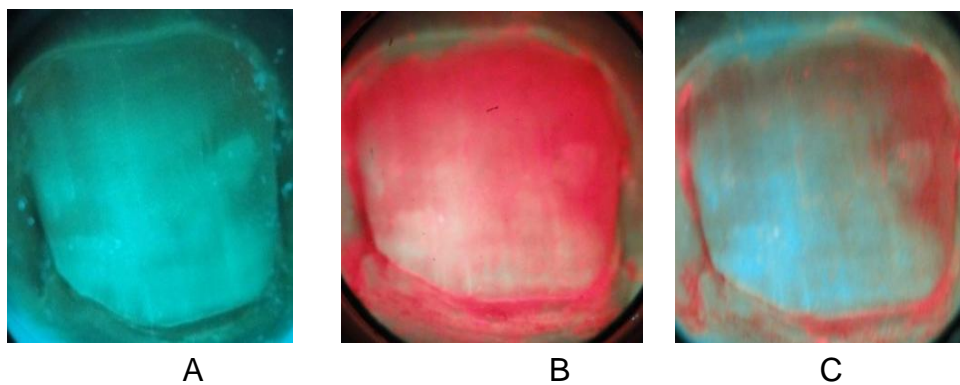


**Figura 30** - Gráfico comparativo dos resultados dos grupos “A” e “B” por semana decorrida.

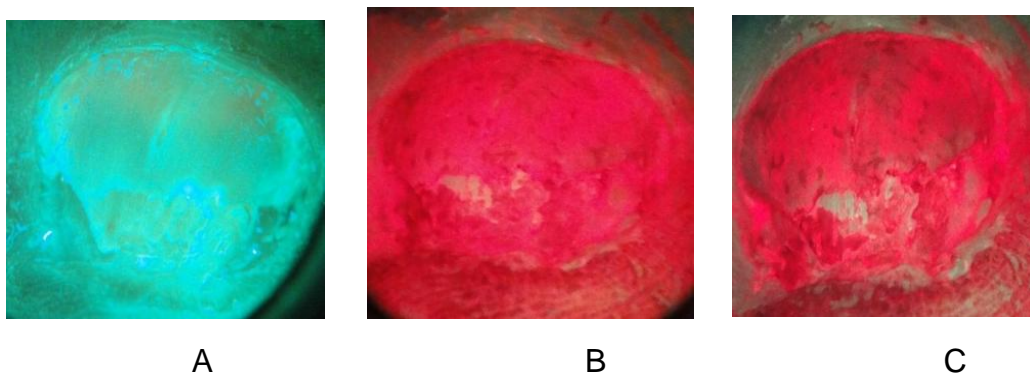
Os resultados acima descritos mostram uma melhor resposta com o tratamento por TFD quando utilizada a curcumina como fotossensibilizador até o segundo mês. Após este período, o Photogem® mostrou-se mais eficiente até o sexto mês. No final de 6 meses, porém, os dois fotossensibilizadores apresentaram a mesma eficácia (Figura 30).

### 3.4.4 Imagem de fluorescência

A espectroscopia de emissão de fluorescência foi utilizada para monitorar a presença do fotossensibilizador Photogem®, pois para o FS curcumina não foi possível devido a sua fluorescência ser próximo da fluorescência natural da unha. Foram monitoradas as lesões, assim como o consumo destas drogas após a realização da técnica. Os espectros de fluorescência anterior e posterior à TFD utilizando Photogem® são apresentados nas Figuras 31 e 32. Depois de uma hora de aplicação deste fotossensibilizador, foi evidenciada a fluorescência da hematoporfirina em toda a lâmina ungueal. Após a irradiação por 20 minutos, nota-se que não houve degradação completa do fotossensibilizador.

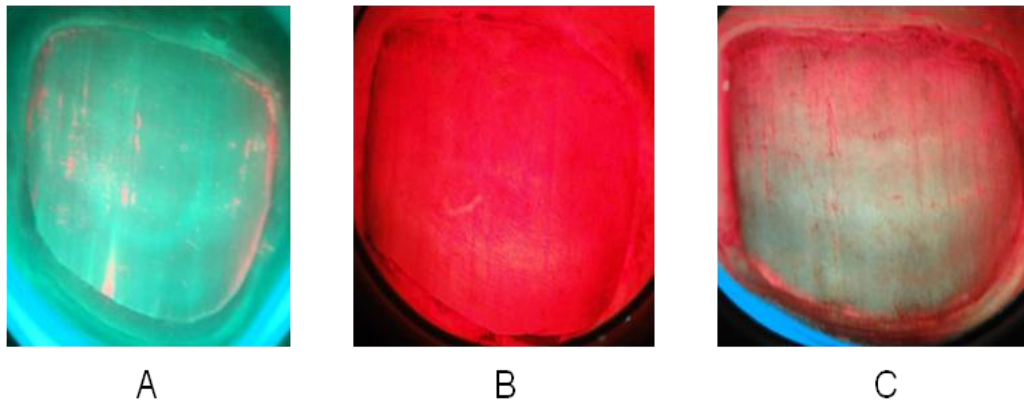


**Figura 31** - Análise da fluorescência no primeiro dia de tratamento A) antes da aplicação do fotossensibilizador, B) 1 hora após da aplicação do fotossensibilizador e C) depois da irradiação.

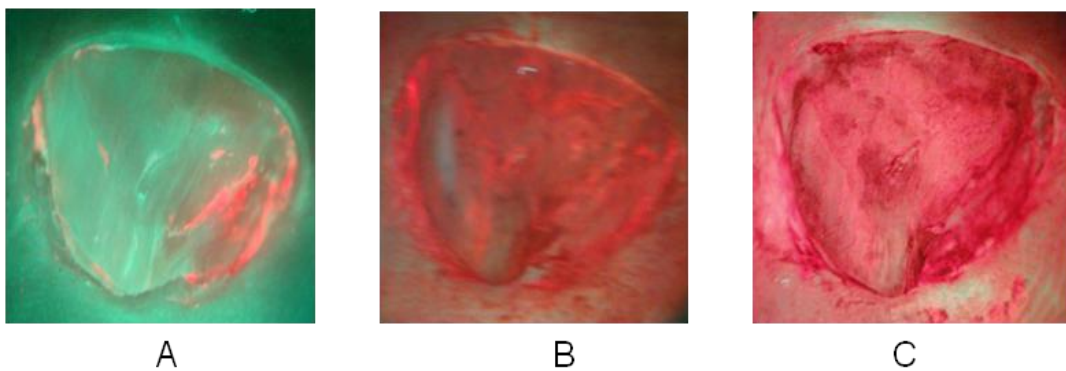


**Figura 32-** Análise da fluorescência no primeiro dia de tratamento A) antes da aplicação do fotossensibilizador, B) 1 hora após da aplicação do fotossensibilizador e C) depois da irradiação.

Nas Figuras 33 e 34, observa-se as mesmas unhas apresentadas nas figuras 31 e 32, sete dias depois da TFD. Na imagem da fluorescência prévia ao tratamento, resíduos de hematoportifirina em alguns locais da lâmina ungueal ficaram evidenciados.



**Figura 33** - Análise da fluorescência na segunda semana de tratamento. A) antes da aplicação do fotossensibilizador, B) 1 hora após da aplicação do fotossensibilizador e C) depois da irradiação.



**Figura 34** - Análise da fluorescência na segunda semana de tratamento. A) antes da aplicação do fotossensibilizador, B) 1 hora após da aplicação do fotossensibilizador e C) depois da irradiação.



### 3.5 DISCUSSÃO

Os pacientes relatados neste estudo apresentam as características relatadas para a maioria dos pacientes de onicomicose apresentados na literatura científica.<sup>76, 77</sup> A amostra da unha do paciente com suspeita de onicomicose subungueal distal foi obtida através do raspado subungueal, entre o limite da unha normal e da unha afetada, e do leito subungueal hiperqueratótico. Na onicomicose proximal, usou-se um estilete para coleta mais profunda.<sup>78-80</sup> Com relação à etiologia das onicomicoses, os grupos de fungos mais encontrados nas lesões foram os fungos filamentosos mais encontrados nos isolados das unhas dos pés, assim como outros estudos descrito na literatura.<sup>14, 76, 77, 80</sup> Recentemente, alguns autores sugeriram que o não tratamento de onicomicose por não-dermatófitos pode significar uma porta de entrada para infecção e disseminação de micoses, que são de difícil tratamento em imunocomprometidos.<sup>16, 67, 79</sup>

Na análise laboratorial deste estudo, foi constatada a presença de fungos em 30% das amostras coletadas, o que não apresentou relação com o tempo de evolução da doença no paciente. A experiência do profissional que fez a coleta foi importante, para que as amostras coletadas e processadas após exame dos pacientes, por isso, solicitamos aos pacientes que fossem até uma clínica de análise Clínicas para realizar a coleta, com o intuito de reduzir os resultados falso negativos, por dúvidas na técnica do exame.<sup>77, 81</sup>

Este alto índice de resultados negativos em pacientes com lesões sugestivas de infecção ungueal fúngica, pode ser explicada pela baixa sensibilidade obtidas para as culturas pela escassez ou ausência de elementos fúngicos viáveis nas amostras clínicas.<sup>7, 16</sup> Outro fator pode ser a alta contaminação das culturas por bactérias locais que impedem o crescimento dos verdadeiros patógenos.<sup>16, 52, 82</sup> Também pode ser explicado pela presença de algumas enfermidades das unhas que pode ser similar as onicomicoses, como psoríase, infecções bacterianas, dermatite de contato entre outras. Esses fatores ressaltam a importância de um diagnóstico diferencial para essas doenças.<sup>16, 52, 82</sup>

A epidemiologia das onicomicoses apresenta inúmeros fatores que torna sua frequência variável, dentre eles: idade, sexo, estilo de vida, presença de doenças concomitante.<sup>83, 84</sup> Estudos sugerem que as onicomicose sejam mais encontradas em pessoas do sexo feminino,<sup>14, 15, 85</sup> porém, neste estudo a proporção de homens e mulheres foi semelhante em busca do tratamento. Este comportamento deve-se ao fato de que a cura da doença se tornou uma preocupação pela saúde física e mental, e não somente por fatores estéticos<sup>73</sup>. Também observamos que as lesões com mais de 20 anos são mais constatadas em pessoas do sexo masculino, provavelmente pelo fato de que mulheres de modo geral procuram se tratar antes.

O sucesso para o tratamento de onicomicoses tem sido desafiador para os dermatologistas<sup>86</sup>. Agentes tradicionais como a griseofulvina apresentam um limitado espectro de ação, requerendo um longo período de tratamento e possui altas taxas de recidivas. O cetoconazol apresenta alto risco de hepatotoxicidade, limitando o seu uso.<sup>86</sup> Fármacos de uso tópicos somente são quando a lesão for com menos de 50% da unha afetada e não houve comprometimento matriz ungueal. Neste contexto os pacientes buscam a TFD para o tratamento de onicomicose. E, estão na faixa etária entre 48 e 60 anos de idade. Nesta faixa etária é comum os pacientes terem doenças crônicas e necessitem receber medicamentos diariamente, o que faz com que evitem o uso de antibióticos que podem interagir com os medicamentos já utilizados.<sup>16, 79, 87</sup>

Normalmente, as unhas dos pés são mais afetadas do que as unhas das mãos devido a menor velocidade de crescimento destas e a maior frequência de traumas nessa região. Essas infecções favorecem a invasão dos fungos no aparelho ungueal.<sup>88, 89</sup> Nos pacientes tratados por TFD, observa-se um aumento significativo na velocidade da regeneração ungueal ao mês, sendo 3 mm/mês. Nas terapias convencionais (esmaltes e antifúngicos), por outro lado, as unhas crescem 2 mm/mês (próximo do crescimento de uma unha sadia, que é em torno de 1,8 mm/mês), e a unha micótica sem tratamento cresce cerca de 1 mm/mês.

Neste trabalho a maioria dos pacientes apresentavam a doença por um tempo superior a 5 anos, todos os pacientes randomizados usaram diferentes técnicas para o tratamento da doença, sem obter o sucesso por múltiplas causas, como o diagnóstico inapropriado, o uso indiscriminado e inadequado de antifúngicos e

antibióticos, ou ainda pela intolerância destes medicamentos por parte dos pacientes devido a longos tempos de tratamento. O tamanho da lesão, especialmente considerando sua espessura, foi o fato mais importante para o sucesso ou insucesso na TFD nos pacientes, a resposta foi mais rápida nas lesões menos espessas. Este fato é justificado pela limitação da penetração do FS e da luz. A vascularização da lesão também influencia diretamente na resposta tecidual frente à técnica uma vez que não facilita a difusão do oxigênio por todo o tecido.<sup>90-92</sup> Pacientes com menos tempo de lesão apresentaram resultados mais rápidos, visto que a área da lesão nesses casos é geralmente menor, assim como a profundidade do micro-organismo na lâmina ungueal.

Uma vez que sabe-se que não há restrições quanto ao número de sessões realizadas, pois se trata de um método terapêutico de ação local.<sup>82, 93</sup> Optamos pelo uso de sessões múltiplas de TFD nos pacientes, acreditando que talvez pudesse ter resultado positivo na resposta completa do tratamento.

Cabe ressaltar que a constância do paciente ao tratamento resulta em menor tempo do mesmo para obter a cura da lesão. Para a TFD, dado que os primeiros resultados são visíveis com apenas 3 sessões, observa-se que o paciente tende a ser assíduo no tratamento, estimulado a obter a cura total. Segundo o relato dos pacientes, eles não apresentaram nenhum desconforto durante ou após a TFD.

Com relação ao tempo de incubação dos FS, vimos nos teste *in vitro* que não era viável que deixasse em contato menos que 20 minutos, porém, considerando que as unhas seja uma barreira física para o FS e luz, optou-se pelo tempo de incubação do FS nas unhas por 1 hora, e assim, comparar os resultados clínicos dos pacientes tratados com a Porfirina comercial, Photogem®, e os tratados com a curcumina solúvel em DMSO foi observado maior efetividade desta última. Este fato pode ser explicado pela facilidade de difusão do DMSO no tecido, e também pode ser uma possível explicação para os resultados não satisfatório nos ensaios *in vitro*, nos quais utilizamos os curcuminóides solúvel no solvente N-metil-glucamina.

Para monitorar a presença dos fotossensibilizadores nas lesões experimentais, utilizamos a espectroscopia de emissão de fluorescência para analisar o consumo destes compostos após a realização da técnica. Para a curcumina, não foi possível fazer a análise de fluorescência, pois como vimos nos

estudos na microscopia confocal a fluorescência ocorre na mesma região em que a fluorescência natural da unha.

Eram raros os casos em que o paciente possuía apenas 1 unha lesionada devido à fácil contaminação, sendo assim foi necessário a construção de um protótipo que pudesse iluminar várias lâminas ungueais ao mesmo tempo. Porém, a duração do tratamento mostrou-se diretamente relacionada com o tempo de evolução da doença, tempo este que é muito influenciado pelo comportamento do paciente durante o tratamento – se ele melhora as condições higiênicas dos pés, se falta às sessões de TFD, ou se modifica hábitos como a frequência a lugares que possam contribuir para o aumento da lesão, como praias e piscinas públicas.





#### 4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

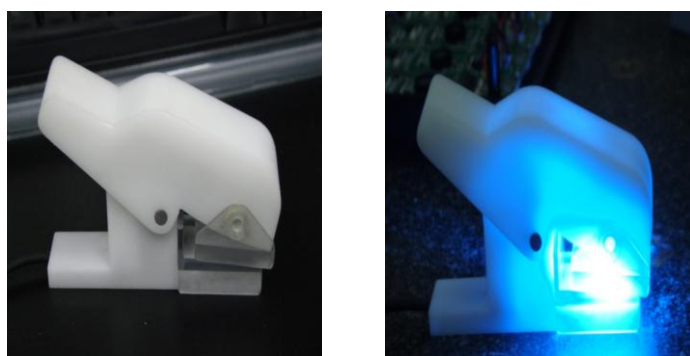
A afinidade dos compostos com o micro-organismo em estudo é de fundamental importância para a eficiência da TFD. O estudo da cinética mostrou diferentes comportamentos para cada uma das classes de compostos avaliadas. Este fato sugere que maiores tempo de incubação podem tornar a TFD ainda mais eficaz, onde observamos que necessitaram de um tempo mínimo de 20 minutos para a penetração no interior da hifa, pois ocorre uma distribuição mais difusa do fotossensibilizador, de modo que um maior número de estruturas celulares é alvo da terapia. A distribuição homogênea entre as células microbianas, é dependente do tempo de incubação do composto. Este fato pode explicar o motivo de algumas hifas retomarem crescimento após a TFD, quando não há incubação no tempo necessário. Este resultado é importante uma vez que se, após o tratamento com TFD, alguma hifa permanecer ativa, certamente a lesão recidivará.

Nos ensaios *in vitro* a fração de sobrevivência do *Trichophyton mentagrophytes* submetidos à TFD mostraram-se superiores a 80% para todos os parâmetros avaliados com o Photogem® no presente estudo. O curcuminóide se mostrou pouco eficiente na inativação do micro-organismo, porém, os melhores resultados foram obtidos para os tratados com Photogem® usando a maior dose energética investigada (33 J/cm<sup>2</sup>). As altas concentrações dos fotossensibilizadores não foram a melhor opção para a inativação do patógeno, possivelmente devido à agregação das moléculas. Ambos mostraram resultados positivos para a TFD, mostrando potencial da técnica na inativação de *Trichophyton mentagrophytes*.

Os estudos clínicos confirmaram os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, mostrando a TFD como uma potencial alternativa para o tratamento de onicomicose. Avaliou-se dois protocolos a fim de verificar a inativação microbiana, e ambos apresentaram resultados bastante satisfatórios. Uma vez que a curcumina mais concentrada utilizada nos testes clínicos apresentaram um resultado final similar ao resultado final do Photogem®, a primeira mostra-se mais interessante para viabilização clínica no Brasil, uma vez que a curcumina é um medicamento nacional,

e por isso possibilita um custo final do tratamento mais acessível para os pacientes, o que é fundamental num tipo de lesão tão disseminada na população.

Vistos os ótimos resultados na pesquisa clínica, o protótipo do equipamento sofreu modificações, incluindo melhorias anatômicas, como uma área de contato maior devido a curvatura (côncava), o emborrachamento externo, a introdução de um temporizador, largura do dispositivo – repensada para uso em todos os dedos, além de um protetor autoclavável, para evitar contaminação cruzada entre dedos e entre pacientes. Essas melhorias foram feitas para fornecer maior comodidade para o paciente e para o operador.



**Figura 35 - Versão final do equipamento (comercial).**

Com base nos resultados deste estudo, o protocolo definido de TFD para o tratamento da onicomicose com utilização de Photogem® foi na concentração de 1 mg/ml, com tempo de incubação de uma hora, uso do comprimento de onda 630 nm, intensidade luminosa de 100 mW/cm<sup>2</sup> e fluência de 120 J/cm<sup>2</sup>. Porém, o protocolo escolhido para desenvolver futuramente um dispositivo com potencial comercial foi o da curcumina na concentração de 1,5 mg/ml, sendo o tempo de incubação de uma hora, uso do comprimento de onda 450 nm, intensidade luminosa de 100 mW/cm<sup>2</sup> e fluência de 120 J/cm<sup>2</sup>, o comprimento de onda utilizados nos testes clínicos foi de 470 nm, porém vimos que para a curcumina em solução mais concentrada, teríamos um melhor resultado quando utilizamos o comprimento de onda no 450 nm.



A possibilidade para determinar estes protocolos e para desenvolver um dispositivo com potencial comercial por si só mostram evidências fortes sobre o potencial da TFD para o tratamento da onicomicose. Aliado a isso, os resultados com grande fator de cura completa das lesões, comumente difíceis de serem eliminadas, contribui ainda mais para estimular a continuidade do estudo da técnica nesse sentido. Não tivemos nenhuma desistência dos pacientes e até o momento, somos procurados quase que diariamente por voluntários interessados neste tratamento.

## **4.2 CONCLUSÕES**

A terapia fotodinâmica tem apresentado potencial crescente para auxiliar em reduções microbianas e fúngicas. Como observado neste estudo, através dos ensaios *in vitro*, de cinética e de terapia fotodinâmica em microscopia confocal, assim como da pesquisa clínica, a técnica mostra-se passível de escolha para o tratamento de onicomicose, com resultados por vezes superior às técnicas correntes. O protocolo pode ser baseado na aplicação do Photogem® ou da curcumina, com tempo de incubação superiores a uma hora e irradiância e fluência adequados. Os voluntários mostraram-se bem receptivos com a TFD devido à ausência de efeitos colaterais, a possibilidade de concomitância com outros tratamentos de saúde e à grande margem de sucesso do tratamento, visto que todos já haviam buscado tratamentos convencionais por anos e não tiveram sucesso.

O estudo realizado revela o potencial da TFD na inativação fotodinâmica dos micro-organismos causadores de onicomicose. Foi possível ainda se chegar a uma configuração favorável para viabilização comercial do protótipo desenvolvido para a pesquisa clínica, o que deverá contribuir para uma agilização da disponibilização desta técnica para a realidade clínica nacional e internacional.



## REFERÊNCIAS

- 1 ZAIAS, N. Onychomycosis. *Archives and Dermatology* v. 105, n.2, p. 236-274, 1972.
- 2 KAUR, R. K.; BHALLA, P. Onychomycosis-epidemiology, diagnosis and management. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 26, n.2, p. 108-116, 2008.
- 3 GUPTA A. K. et al. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' office: a multicenter Canadian survey of 1500 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 43, n. 2, p. 244-248, 2000.
- 4 FAERGMANN, J. B. et al. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, v. 149, n.S65, p. 1-4, 2003.
- 5 BARAN, R.; DAWBER, D. *Doenças de unhas: tratamento clínico e cirúrgico*. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- 6 WINN JUNIOR.; W.K. et al. (Ed.) *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams*, 2006.
- 7 ENGLISH, M.P. Nails and fungi. *British Journal of Dermatology*, v. 94, n. 6, p. 697-701, 1976.
- 8 HANEK, E.R. The scope of onychomycosis: epidemiology and clinical features. . *International Journal of Dermatology*, v. 26, p. 108-116, 2000. Supl. 2
- 9 POBLETE-GUTIÉRREZ, P. et al Onychomycosis in diabetic patient due to *Trychophyton gallinae*. *Mycosis*, v. 49, n.3, p. 254-257, 2006.
- 10 AQUINO, V.R.C.; BAKOS, L. Frequencia das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 82, n. 3, p. 239-244, 2007.
- 11 ARAÚJO, A.J.G. et al. Ocorrência de onicomicose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 78, n. 3, p. 299-308, 2000.
- 12 MARTELOZO, I.C.G., E.; SVIDZINSKI, T.I.E. Ocorrência de onicomicose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum Health Sciences*, v. 27, n. 2 p. 177-182, 2005.

- 13 LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. Tratado de micologia médica. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.
- 14 MARTINS, E.A. et al. Onychomycosis: clinical, epidemiological and mycological study in the municipality of Sao Jose do Rio Preto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 5, p. 596-598, 2007.
- 15 SUMMERBELL, R.C. Epidemiology and ecology of onychomycosis. *Dermatology*, v. 194, p. 32-36, 1997. Suppl. 1.
- 16 ELEWSKI, B.E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 3, p. 415-+, 1998.
- 17 WILLIAMS, H.C. The epidemiology of onychomycosis in britain. *British Journal of Dermatology*, v. 129, n. 2, p. 101-109, 1993.
- 18 HANEKE, E.; ROSEEUW, D. The scope of onychomycosis: epidemiology and clinical features. *International Journal of Dermatology*, v. 38, p. 7-12, 1999. Suppl. 2
- 19 ZAIAS, N. Onychomycosis. *Dermatologic Clinics*, v. 3, n. 3, p. 445-460, 1985.
- 20 GUPTA, A.K. et al. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. *British Journal of Dermatology*, v. 139, n. 4, p. 665-671, 1998.
- 21 HABBIF, T.P. Doenças das unhas. 4a ed. In: HABBIF, T P. *Dermatologia clínica*. Porto Alegre: Artmed., 2005, Porto Alegre.
- 22 PEREZ, N.T.A.E.A. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.
- 23 SCHER, R.K. Onychomycosis is more than a cosmetic problem. *British Journal of Dermatology*, v. 130, p. 15, 1994. Suppl. 43.
- 24 FAERGEMANN, J.BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, v. 149, p. 1-4, 2003. Suppl. 65.
- 25 PIRACINNI B M. et al. White superficial onychomycosis. epidemiological, clinical and phatological study of 79 patients. *Archives of Dermatology* v. 140, n. 6, p. 693-701, 2004.
- 26 ZAIAS, N. Clinical manisfrdtations of onychomycosis. *Clin Exp Dermatol.*, v. 17, n.: p. 6-7, 1992.

- 27 WEINBERG J M. et al. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 49, n.2, p. 193-197, 2003.
- 28 LECHA, M. Amorolfine and itraconazole combination for severe toenail onychomycosis; results of an open randomized trial in Spain. *British Journal of Dermatology*, v. 145, n.1 p. 21-26, 2001.
- 29 BALLESTE, E.; BLANCH, A.R. Persistence of bacteroides species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 22, p. 7608-7616, 2010.
- 30 SIDRIM, J.J.C. et al. Fungal microbiota dynamics as a postmortem investigation tool: focus on *Aspergillus*, *Penicillium* and *Candida* species. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, n. 5, p. 1751-1756, 2010.
- 31 INADA, N.M. et al. Photodiagnosis and treatment of condyloma acuminatum using 5-aminolevulinic acid and homemade devices. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 9, n. 1, p. 60-68, 2012.
- 32 ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 74, n. (5): p. 656-669, 2001.
- 33 MELLO, R. et al. Reactions at Interfaces: Oxygenation of n-Butyl Ligands Anchored on Silica Surfaces with Methyl(trifluoromethyl)dioxirane. *Journal of Organic Chemistry*, v. 76, n. (24): p. 10129-10139, 2011.
- 34 ZHU, T.C.FINLAY, J.C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics*, v. 35, n. (7): p. 3127-3136, 2008.
- 35 ZHU, Z. et al. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. (33): p. 10856-+, 2008.
- 36 ITO, T. Photodynamic-Action of Hematoporphyrin on Yeast-Cells - a Kinetic Approach. *Photochemistry and Photobiology*, v. 34, n. (4): p. 521-524, 1981.
- 37 DOVIGO, L.N. et al. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. *Photochemistry and Photobiology*, v. 87, n. (4): p. 895-903, 2011.
- 38 DOVIGO, L.N. et al. Susceptibility of Clinical Isolates of *Candida* to Photodynamic Effects of Curcumin. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 43, n. (9): p. 927-934, 2011.

39 CHAN, W.M. et al. Photodynamic therapy with verteporfin for subfoveal idiopathic choroidal neovascularization - One-year results from a prospective case series. *Ophthalmology*, v. 110, n. (12): p. 2395-2402, 2003.

40 DEMIDOVA, T.N.HAMBLIN, M.R. Effect of cell-photo sensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. (6): p. 2329-2335, 2005.

41 BERTOLONI, G. et al. Role of Specific Cellular Targets in the Hematoporphyrin-Sensitized Photoinactivation of Microbial-Cells. *Photochemistry and Photobiology*, v. 46, n. (5): p. 695-698, 1987.

42 LEE, S.H.;AHN, J.Y.PARK, M.Y. Photodynamic therapy with methyl 5-aminolevulinic acid for treatment of onychomycosis: The efficacy and safety. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 66, n. (4): p. Ab121-Ab121, 2012.

43 WALSH, P.F. et al. Effect of an intensivist led critical care program over five years. *Critical Care Medicine*, v. 31, n. (12): p. A24-A24, 2003.

44 STHAL, F.BOURQUIN, R. Characterizing mechanical resonators by means of a scanning acoustic force microscope. *Applied Physics Letters*, v. 77, n. (12): p. 1792-1794, 2000.

45 ARIAS, C.A.MURRAY, B.E. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century -- A Clinical Super-Challenge. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. (5): p. 439-443, 2009.

46 MAISCH, T. et al. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 9, n. (5): p. 360-366, 2011.

47 BHATTI, M. et al. Antibody-targeted lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. (10): p. 2615-2618, 2000.

48 PEREIRA, C.A. et al. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers in Medical Science*, v. 26, n. (3): p. 341-348, 2011.

49 BERTOLONI, G. et al. Biochemical and Morphological-Changes in *Escherichia-Coli* Irradiated by Coherent and Noncoherent 632.8 Nm Light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 18, n. (2-3): p. 191-196, 1993.

50 WAINWRIGHT, M. et al. A comparison of the bactericidal and photobactericidal activities of aminoacridines and bis(aminoacridines). *Letters in Applied Microbiology*, v. 26, n. (6): p. 404-406, 1998.

51 KONIG, K. et al. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cellular and Molecular Biology*, v. 46, n. (7): p. 1297-1303, 2000.

52 DUMONT, I.FERNANDEZ, E. Onychomycosis: prevalence and diagnostic in neuropathic diabetics. *Diabetes & Metabolism*, v. 32, n.: p. S103-S103, 2006.

53 SIDRIM, J.J.C. et al. *Candida parapsilosis* meningitis as the first manifestation of AIDS: case report. *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, n. (10): p. 1530-1533, 2011.

54 DETTY, M.R.;GIBSON, S.L.WAGNER, S.J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. (16): p. 3897-3915, 2004.

55 BRUZELL, E.M.;MORISBAK, E.TONNESEN, H.H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 4, n. (7): p. 523-530, 2005.

56 BOND, J. et al. Safranin fluorescent staining of wood cell walls. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 83, n. (3-4): p. 161-171, 2008.

57 DOVIGO, L.N. et al. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*, v. 54, n. (2): p. 123-130, 2011.

58 STRAKHOVSKAYA, M.G. et al. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Microbiology*, v. 71, n. (3): p. 298-301, 2002.

59 DEMIDOVA-RICE, T.N.;HAMBLIN, M.R.HERMAN, I.M. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 2: Role of Growth Factors in Normal and Pathological Wound Healing: Therapeutic Potential and Methods of Delivery. *Advances in Skin & Wound Care*, v. 25, n. (8): p. 349-370, 2012.

60 DEMIDOVA-RICE, T.N. et al. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med*, v. 39, n. (9): p. 706-15, 2007.

61 HAMBLIN, M.R.HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*, v. 3, n. (5): p. 436-50, 2004.

62 JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*, v. 38, n. (5): p. 468-81, 2006.

63 WAINWRIGHT, M. et al. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Fems Microbiology Letters*, v. 160, n. (2): p. 177-181, 1998.

64 CHAN, W.M. et al. Photodynamic therapy with verteporfin for subfoveal idiopathic choroidal neovascularization: one-year results from a prospective case series. *Ophthalmology*, v. 110, n. (12): p. 2395-402, 2003.

65 LAI, C.C. et al. Antibacterial effects of resinous retrograde root filling materials. *J Endod*, v. 29, n. (2): p. 118-20, 2003.

66 BARAN, R.;HAY, R.J.GARDUNO, J.I. Review of antifungal therapy and the severity index for assessing onychomycosis: Part I. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 19, n. (2): p. 72-81, 2008.

67 FAERGEMANN, J.SWANBECK, G. Treatment of Onychomycosis with a Propylene Glycol-Urea-Lactic Acid-Solution. *Mycoses*, v. 32, n. (10): p. 536-540, 1989.

68 GUPTA, A.K.;D GOVER, M.LYNDE, C.W. Pulse itraconazole vs. continuous terbinafine for the treatment of dermatophyte toenail onychomycosis in patients with diabetes mellitus. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 20, n. (10): p. 1188-1193, 2006.

69 GUPTA, A.K. et al. The use of an intermittent terbinafine regimen for the treatment of dermatophyte toenail onychomycosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 23, n. (3): p. 256-262, 2009.

70 GUPTA, G.GUPTA, A. A brief history of onychomycosis treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 60, n. (3): p. Ab114-Ab114, 2009.

71 GUPTA, A.BUCKLEY, L. The problems with our current definition of cure in onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 60, n. (3): p. Ab117-Ab117, 2009.

72 GUPTA, A.BUCKLEY, L. The limitations in the treatment of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 60, n. (3): p. Ab117-Ab117, 2009.

73 GUPTA, A.PAQUET, M. Placebo cure rates in the treatment of toenail onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 66, n. (4): p. Ab121-Ab121, 2012.

74 PIERARD, G.E.;ARRESEESTRADA, J.PIERARDFRANCHIMONT, C. Treatment of Onychomycosis - Traditional Approaches. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 29, n. (1): p. S41-S45, 1993.



75 ZAIAS, N. Measurement of Cure Rate in Onychomycosis - Reply. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 11, n. (4): p. 665-665, 1984.

76 GINTER-HANSELMAYER, G.;WEGER, W.SMOLLE, J. Onychomycosis: a new emerging infectious disease in childhood population and adolescents. Report on treatment experience with terbinafine and itraconazole in 36 patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 22, n. (4): p. 470-475, 2008.

77 GUPTA, M. et al. Onychomycosis: Clinico-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. *Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology*, v. 73, n. (6): p. 389-392, 2007.

78 PIERARD, G. Onychomycosis and other superficial fungal infections of the foot in the elderly: A Pan-European survey. *Dermatology*, v. 202, n. (3): p. 220-224, 2001.

79 GUPTA, A.BRINTNELL, W. Onychomycosis therapy: Past, present, and future. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 66, n. (4): p. Ab120-Ab120, 2012.

80 HAY, R.J.BARAN, R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 65, n. (6): p. 1219-1227, 2011.

81 SCHER, R.K. et al. Onychomycosis: Diagnosis and definition of cure. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 56, n. (6): p. 939-944, 2007.

82 GARCEZ, A.S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*, v. 39, n. (1): p. 59-66, 2007.

83 SVEJGAARD, E.L.NILSSON, J. Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice. *Mycoses*, v. 47, n. (3-4): p. 131-5, 2004.

84 SVEJGAARD, E. et al. Treatment of head and neck dermatitis comparing itraconazole 200 mg and 400 mg daily for 1 week with placebo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v. 18, n. (4): p. 445-9, 2004.

85 SINGAL, A.KHANNA, D. Onychomycosis: Diagnosis and management. *Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology*, v. 77, n. (6): p. 659-672, 2011.

86 MISHRA, M. et al. Epidemiological and clinicopathological study of oral leukoplakia. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, v. 71, n. (3): p. 161-5, 2005.

87 ZAIAS, N.REBELL, G. Onychomycosis treated until the nail is replaced by normal growth or there is failure. *Archives of Dermatology*, v. 136, n. (7): p. 940-940, 2000.

88 KASZUBA, M. et al. Actinomycosis mimicing advanced cancer. Pol Arch Med Wewn, v. 118, n. (10): p. 581-4, 2008.

89 KASZUBA, S.M. et al. Effect of initial treatment on disease outcome for patients with submandibular gland carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, v. 133, n. (6): p. 546-50, 2007.

90 HAMBLIN, T.J. Have we been wrong about ionizing radiation and chronic lymphocytic leukemia? Leuk Res, v. 32, n. (4): p. 523-5, 2008.

91 HUANG, L. et al. Photodynamic inactivation of bacteria using polyethylenimine-chlorin(e6) conjugates: Effect of polymer molecular weight, substitution ratio of chlorin(e6) and pH. Lasers Surg Med, v. 43, n. (4): p. 313-23,

92 JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. J Environ Pathol Toxicol Oncol, v. 25, n. (1-2): p. 505-19, 2006.

93 HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic therapy and photodynamic inactivation, or killing bugs with dyes and light--a symposium-in-print. Photochem Photobiol, v. 88, n. (3): p. 496-8,

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

(X) Aprovado  
( ) Com pendência  
( ) Reprovado

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa



### 4.3 ANEXO 2 - TCLE – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### PROCEDIMENTOS PARA O TRATAMENTO DE ONICOMICOSE POR TERAPIA FOTODINÂMICA

Os objetivos deste estudo são: comparar os resultados da Terapia Fotodinâmica em unhas com micose que receberão o corante Photogem ou Curcumina e luz com o comprimento de onda de 630nm (cor vermelha) a partir de um LASER terapêutico ou um LED (diodo emissor de luz).

Será retirado um raspado da (s) unha (s) afetada (s) pela micose para exame laboratorial, será efetuada a limpeza da unha com a remoção da parte afetada pela micose, depois será aplicado um corante que pode ser Curcumina 150µg/mL ou Photogem® e aplicada uma luz vermelha através de um aparelho chamado LED (diodo emissor de luz) ou LASER terapêutico, uma vez por semana. Será acompanhada a evolução através de fotografias do (s) dedo (s) afetado (s). O raspado da unha e a sua limpeza são procedimentos rotineiros e a aplicação do corante e a emissão da luz vermelha pelo aparelhos aqui relacionados fazem parte da pesquisa.

Os possíveis desconfortos relacionados aos procedimentos desta pesquisa são: o local, unha, que receber o corante ficará colorido pelo produto, mas esses corantes saem com os banhos, pois são superficiais e não ficam permanentemente na pele; outro possível desconforto está relacionado ao aquecimento local durante a aplicação da luz, que em hipótese alguma provoca queimadura ou qualquer dano para a pessoa que está sob o efeito da aplicação da luz. Obs: Apenas algumas poucas pessoas referem sentir esse aquecimento durante o tratamento com a Terapia Fotodinâmica. Não existe nenhum outro risco ou desconforto.

Caso não seja do seu interesse participar desta pesquisa, você poderá optar por tratamentos convencionais com medicamentos tópicos ou sistêmicos prescritos por dermatologistas.

Em qualquer fase deste estudo você terá livre acesso aos pesquisadores e aos resultados da pesquisa para esclarecer quaisquer dúvidas. Os principais pesquisadores são Ana Paula da Silva (USP São Carlos) e Sr. Armando Bega (UAM São Paulo), que poderá ser encontrado respectivamente, IFSC-Instituto de física de São Carlos, USP- Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense, 400 ou através dos telefones (16)3373-9810 r. 216 ou Email: [paulalsir@ursa.ifsc.usp.br](mailto:paulalsir@ursa.ifsc.usp.br), na Rua Dr. Almeida Lima, 1134, Brás, São Paulo – SP ou através do telefone 0xx11 2790-4534. Se você tiver qualquer dúvida a respeito desta pesquisa também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), Rua casa do Ator, 294 7º andar, Vila Olímpia – São Paulo – SP, ou através do telefone (11) 3847-3033 ou pelo e.mail [pesquisa@anhembib.com.br](mailto:pesquisa@anhembib.com.br).

É garantida a liberdade da minha retirada deste consentimento a qualquer momento da pesquisa sem prejuízo à continuidade do tratamento.

As informações obtidas nesta pesquisa são confidenciais e serão analisadas em conjunto com as demais informações obtidas de outros pacientes, não sendo divulgadas as informações pessoais, bem como a identificação a nenhum outro paciente.

O paciente tem direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.

Não há nenhum tipo de despesa com consultas ou exames, bem como não há nenhum tipo de compensação financeira por participar desta pesquisa. Caso existam custos adicionais durante o desenvolvimento da pesquisa, os mesmos serão absorvidos pelos pesquisadores.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os pesquisadores se comprometem a usar os dados obtidos nesta pesquisa apenas para os fins estabelecidos pela própria pesquisa.

Eu \_\_\_\_\_

Acredito ter sido suficientemente esclarecido e informado sobre a minha participação nesta pesquisa, uma vez que o conteúdo deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi lido para mim e ou eu mesmo li todos os seus itens, com os quais concordo livre e espontaneamente, após ter discutido com o Sr (a) Ana Paula da Silva sobre a minha decisão em participar desta pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do paciente (ou representante legal)

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura de testemunha

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

controle	Luz			10 mg/mL			25 mg/mL			50 mg/mL			100 mg/mL						
	Dose J/cm²			droga	Dose J/cm²			droga	Dose J/cm²			Droga	Dose J/cm²						
	17,5	35,0	52,5		17,5	35,0	52,5		17,5	35,0	52,5		17,5	35,0	52,5				
54	49	53	49	50	25	11	5	48	50	49	45	30	17	23	24	35	4	5	3
52	52	51	49	45	26	12	3	37	41	40	43	24	14	17	23	34	2	7	3
50	60	53	52	47	21	11	3	36	25	30	42	21	13	27	24	31	3	6	2
6,33	6,29	6,33	6,29	6,30	6,00	5,64	5,30	6,28	6,30	6,29	6,26	6,08	5,83	5,96	5,98	6,15	5,20	5,30	5,08
6,32	6,32	6,31	6,29	6,26	6,02	5,68	5,08	6,17	6,21	6,20	6,24	5,98	5,75	5,83	5,96	6,13	4,90	5,45	5,08
6,30	6,38	6,33	6,32	6,27	5,92	5,64	5,08	6,16	6,00	6,08	6,23	5,92	5,72	6,03	5,98	6,09	5,08	5,38	4,90

	Luz				1,25 µg/mL				2,5 µg/mL				5,0 µg/mL				10,0 µg/mL			
controle	Dose J/cm²			droga	Dose J/cm²			droga	Dose J/cm²			Droga	Dose J/cm²			Droga	Dose J/cm²			
	17,5	35,0	52,5		17,5	35,0	52,5		17,5	35,0	52,5		17,5	35,0	52,5		17,5	35,0	52,5	
28	16	14	9	20	0	2	0	18	2	3	2	10	0	0	0	12	0	0	0	
23	30	27	8	30	1	0	0	31	1	4	1	15	0	0	0	13	0	0	0	
9	38	27	10	38	0	0	0	33	2	3	0	13	1	0	1	17	1	0	0	
6,05	5,81	5,75	5,56	5,90	0,00	4,90	0,00	5,86	4,90	5,08	4,90	5,60	0,00	0,00	0,00	5,68	0,00	0,00	0,00	
5,96	6,08	6,03	5,51	6,08	4,60	0,00	0,00	6,09	4,60	5,20	4,60	5,78	0,00	0,00	0,00	5,72	0,00	0,00	0,00	
5,56	6,18	6,03	5,60	6,18	0,00	0,00	0,00	6,12	4,90	5,08	0,00	5,72	4,60	0,00	4,60	5,83	4,60	0,00	0,00	

## ANEXO 4 – MODELO FICHA ANAMNESE

**Nome:**

Data Nasc.: / / ( anos) - Fones:

UNHAS PARTICIPANDO DO TRABALHO:



TOTAL CASOS  
(unhas)

Nº

**FOTOSENSIBILIZADOR**

Para este paciente:

- ( ) Photogen® 1mg/ml  
( ) Curcumina

**MEDICAMENTOS EM USO NO MOMENTO:**

-

QUANDO  
PERCEBEU  
A MICOSE?  
+/-  
\_\_\_\_ anos

**TERAPIA ANTERIOR (Caso realizada):**

- ( ) Esmalte terapêutico  
( ) Creme ou Pomada  
( ) Laserterapia  
( ) Oral \_\_\_\_\_  
( ) Óleos essenciais Melaleuca  
( ) Outros \_\_\_\_\_

**ALGUMA MELHORA NO TRATAMENTO ANTERIOR?**

-



**A RECIDIVA DA MICOSE SE DEU EM FUNÇÃO:**

- ( ) Abandono do tratamento pelo paciente.  
( ) Ineficácia da terapia administrada.  
( ) Não conseguiu agendar continuidade.  
( ) Outros \_\_\_\_\_

**PROCEDIMENTO:** 1) antissepsia do pé; 2) Desbaste do corpo da unha com micromotor podológico de alta rotação; 3) Aplicação de Photogen® e/ou curcumina; 4) Cobrir com uma gaze e papel alumínio por uma hora; 5) Realizar a aplicação da luz. (100 mW/cm² 54 J totalizando 10 minutos)

EVOLUÇÃO	DATA	OBSERVAÇÕES
Início / Admissão		
1ª retorno		
2ª retorno		
3ª retorno		
4ª retorno		
5ª retorno		
6ª retorno		

## ANEXO 5 – PATENTE

< Uso exclusivo do INPI >	
 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GENL ** marleneqf 018110047225 05/12/2011 12:51 DESP  0000221112518309	Espaço para etiqueta

## DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: VANDERLEI SALVADOR BAGNATO.
- 1.2 Qualificação: Brasileiro, Casado, Físico.
- 1.3 CNPJ/CPF: 002.804.928-47
- 1.4 Endereço Completo: Rua Julio Fagá, 120, São Carlos-SP.
- 1.5 CEP: 13562-120      1.6 Telefone: 16 3371-9638      1.7 Fax: 16 3371-9638
- 1.8 E-mail: vander@ifsc.usp.br

☐ continua em folha anexa

**2. Natureza:**    ☐ Invenção    ☒ Modelo de Utilidade    ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Modelo de Utilidade.

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**

EQUIPAMENTO PORTÁTIL A BASE DE LED, PARA O TRATAMENTO DE ONICOMICOSE.

☐ continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº \_\_\_\_\_ Data de Depósito: \_\_\_\_\_

**5. Prioridade:**    ☐ interna    ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

**6. Inventor (72):**
☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: VANDERLEI SALVADOR BAGNATO.
- 6.2 Qualificação: Brasileiro, Casado, Físico      6.3 CPF: 002.804.928-47
- 6.4 Endereço completo: Rua Julio Fagá, 120, São Carlos-SP.
- 6.5 CEP: 13562-120      6.6 Telefone: 16 3371-9638      6.7 Fax: 16 3371-9639
- 6.8 E-Mail: vander@ifsc.usp.br

☐ continua em folha anexa




**ANEXO 6 – NÚMERO DO MANUSCRITO**

Elsevier Editorial System(tm) for Photodiagnosis and Photodynamic Therapy  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: FAST ELIMINATION OF ONYCHOMYCOSIS BY HEMATOPORPHYRIN DERIVATIVE-  
PHOTODYNAMIC THERAPY

Article Type: Case Presentation Research Letter

Keywords: Photodynamic Inactivation; Photodynamic Therapy; onychomycosis; photosensitizer;  
Photogem®.

Corresponding Author: Dr. Natalia Mayumi Inada, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Sao Paulo

First Author: Ana Paula da Silva

Order of Authors: Ana Paula da Silva; Cristina Kurachi, PhD; Vanderlei S Bagnato, PhD; Natalia Mayumi Inada, Ph.D.