UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANA PAULA DA SILVA

Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento
por terapia fotodinâmica

São Carlos
2017

ANA PAULA DA SILVA

Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento
por terapia fotodinâmica

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Dr^a. Natalia Mayumi Inada

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2017

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

Silva, Ana Paula da
Novas estratégias para o diagnóstico de
onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica /
Ana Paula da Silva; orientadora Natalia Mayumi Inada
- versão corrigida -- São Carlos, 2017.
195 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Onicomicose. 3.
Curcumina. 4. Clorina. 5. LED. I. Inada, Natalia
Mayumi, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus,
que é luz e sabedoria no meu caminho;
À minha família por fornecerem as ferramentas necessárias para
a construção do meu caráter, por todo o apoio e amor
incondicional.
A todos meus amigos que me acompanharam durante esta
trajetória, participaram da minha vida e
estiveram presentes em todos os
momentos fáceis ou difíceis.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por seu amor incondicional de ter me proporcionado mais esta conquista sempre guiando meus passos para que eu pudesse chegar até aqui.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, e em especial:

À minha família que eu amo, sempre presentes em minha vida, que continuamos sempre unidos e ligados pelo amor. Muito obrigada por todo o amor e carinho!

Ao Padre Zé Luiz, sempre presente e disposto a ajudar, nos momentos mais importantes de minha vida, Obrigada!

À Dra. Natalia M. Inada (*Mamy's*), pela oportunidade de tê-la como orientadora de iniciação científica, mestrado e doutorado. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional e também pessoal. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência. Você é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência.

Todos que trabalham com você admiram sua dedicação e amor ao trabalho, à pesquisa com os alunos. Enfim, vai muito além do que o dever impõe. Preocupada não só com a realização do trabalho, mas principalmente com o ser humano. Ensinando a trabalhar em grupo, a respeitar o próximo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir. Seus orientados sabem que sempre terão uma amiga e um lugar onde encontrarão apoio e palavras de sabedoria. MUITÍSSIMO obrigada!!! E que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade, Amo muito!

Ao Gugs (Dads), por cuidar tão bem de minha Mamys, por me escutar e dar conselhos durante nossas cervejinhas.

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, tenho muito orgulho de fazer parte da sua equipe!

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

Aos professores Kleber, Marciana e Professor Francisco Guimarães sempre solícitos e dispostos a ajudar.

Ao Dr. José D. Vollet Filho (Didis), pessoa mais fofa do mundo!!! Muito obrigada por me acompanhar desde a iniciação científica, por todos os ensinamentos de física e de vida e mais importante que tudo isso, muito obrigada pela compreensão, ajuda, paciência e amizade.

À minha grande amiga Hilde H. Buzzá, que é uma pessoa especial, para todo o momento, e que alegra o dia de todos no laboratório! Obrigada por todos os momentos que passamos

juntas. Sempre contei com seu apoio, incentivo e amizade. Você é a pessoa mais determinada e intensa que conheço. Com muito trabalho, competência e ética foi conquistando todos os seus objetivos. Fico muito feliz em ver que alguns dos seus sonhos já se tornaram realidade e quero ter a oportunidade de estar ao seu lado, nas próximas conquistas que certamente virão.

Lilian T. Moriyama iama (Lili), as suas interpretações objetivas sobre a vida, me fizeram desenvolver um raciocínio, um “pouquinho” mais lógico das questões do dia-a-dia, contribuindo para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

A minha querida amiga Kate Blanco (Katita), agradeço o privilégio de ser sua amiga. Sua alegria e energia contagiam a todos a sua volta. Não tem como ficar indiferente a sua presença. Obrigada por preencher meus dias com carinho e alegria. Agradeço pela companhia diária, pelo ombro amigo, pela confiança, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntas.

Você é um exemplo de generosidade e bondade. Além de ser extremamente Fashion...Não importa a distância ou o tempo, nossa amizade será eterna.

Ao casal de amigos Mirian e Lex, pessoas maravilhosas e agora com o pequeno Príncipe Gabriel, sempre nos fazendo rir e presentes em todos os momentos, Obrigada!

Às “pequeninas” de coração grande, Camilinha e Amandinha, tão meigas, fofas e super amigas e dispostas a ouvir. Muito obrigada!

À minha super amiga Larissa Marila (Larissoca), louquinha, engraçada e super companheira e ... baladeira, Obrigada por ser essa amiga tão especial!

Ao Javier (Gatito), por toda ajuda na escrita, por ser tão atencioso e por todos os momentos que passamos juntitos, muito obrigada!

Ao Matheus e Krissia da Ufscar, por me auxiliarem nas análises PCR.

Aos amigos do Laboratório de Biofotônica que sempre estavam dispostos a me ajudarem a concluir este trabalho: aos gêmeos Renanzer e Ramonera, Clara, Cintia, Thaila, Mariana, Michelle, Dra. Patrícia (Pata), Ila, Fernandinha, Carol, Bruno (Algodão), Govone, Bruninho, Sebastião. À todos do Laboratório de Biofotônica, muito obrigada!

Aos funcionários do grupo de Óptica: Cristiane, Bene, Wagner e Adriane, obrigada pela colaboração e disponibilidade constantes.

Às bibliotecárias do IFSC (Neusa e Cristina), pelo modo prestativo e eficiente com que sempre atenderam às minhas necessidades.

À PDT Pharma pela oportunidade de poder colocar em prática meus conhecimentos, além de me proporcionar novos desafios, obrigada!

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!

Alguns colaboraram no início. Alguns colaboraram no durante. Alguns colaboraram no final. Alguns colaboraram o tempo todo e outros durante só um tempo... Fato é que não se faz uma caminhada tão longa isoladamente. Por onde passei encontrei pessoas dispostas a ajudar.

Recebi ajuda das mais diversas formas. Com trabalho árduo ao lado, com boas idéias, com raciocínios que não me haviam surgido. Ajudas profissionais ou mesmo o simples fato de estar ao lado. Alguns por pequenos momentos e outros, incrivelmente, o tempo todo, sempre ali, ao lado.

Obrigada a todos e que Deus abençoe sempre vocês!

*“Quero um dia poder dizer as pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às
pessoas,
que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
E que valeu a pena.”*

Mário Quintana

“ Nada do que é feito com amor é pequeno.”

Chíara Lubich

RESUMO

SILVA, A. P. Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica. 2017. 195 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A onicomicose é uma doença comum na lâmina ungueal, constituindo aproximadamente metade dos casos de infecção nas unhas. O tratamento convencional consiste na administração de antifúngicos e antibióticos por longos períodos. O aumento de linhagens microbianas resistentes aos fármacos disponíveis e a alta incidência deste tipo de infecção na população tornam importante o desenvolvimento de novas tecnologias e opções terapêuticas. A Terapia Fotodinâmica (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 os microrganismos. Os objetivos deste estudo foram: analisar o uso de curcumina e clorina como FSs; estudar mecanismos que auxiliam na penetração do FS na lâmina ungueal através da utilização de emolientes e novas formulações farmacêuticas; Desenvolver dispositivos projetados para iluminar as unhas dos pés e das mãos para o tratamento de onicomicose por TFD. Realizar a TFD com as tecnologias desenvolvidas em pacientes com onicomicose a fim de avaliar a eficácia, além de explorar novos métodos diagnóstico da doença com base em imagens térmicas e de fluorescência.

OS resultados indicam que a curcumina é um FS mais efetivo que a clorina para o tratamento onicomicose por TFD. Também foi identificado que os veículos emulsão fornecem uma entrega superior de curcumina em unhas infectadas. Os dispositivos de iluminação desenvolvidos especificamente para a anatomia das unhas de pé e mãos também facilitaram a aplicação da TFD para o tratamento da onicomicose. Os novos veículos FS baseados em curcumina e os dispositivos de iluminação desenvolvidos foram avaliados em um estudo clínico com 30 pacientes. Este estudo indicou que a entrega de curcumina via emulsão foi mais eficaz do que a entrega via gel, conforme quantificado pelo número de sessões de TFD necessárias para resposta clínica positiva (6 semanas para emulsão e 10 semanas para gel). Finalmente, a viabilidade de realizar imagens térmicas e de fluorescência de unhas em pacientes com onicomicosis abre a possibilidade de explorar essas modalidades de imagem como ferramentas complementares para o diagnóstico não invasivo de onicomicose. Em conclusão, devido à sua eficácia demonstrada, baixo custo e simplicidade para operar, as tecnologias desenvolvidas através deste trabalho facilitarão a adoção da TFD como um tratamento novo e efetivo da onicomicose.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Onicomicose. Curcumina. Clorina. LED.

ABSTRACT

SILVA, A. P. **New strategies for the diagnosis of onychomycosis and treatment by photodynamic therapy**. 2017. 195 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Onychomycosis is a common disease of the nail plate and constitutes approximately half of the cases of nail infection. The conventional treatment of onychomycosis consists of the administration of anti-fungal drugs and antibiotics for long periods of time. Due to both the increase of microbial lines resistant to available drugs and the high incidence of this type of infections, it is highly relevant to develop new technologies and therapeutic options. Photodynamic Therapy (PDT) consists of the use of photosensitizers (FS) activated by light of specific wavelengths that, in the presence of oxygen, produces toxic reactive oxygen species that can inactivate the microorganisms. The objectives of this study were: to analyze the use of curcumin and chlorine as FSs for PDT therapy of onychomycosis; to identify mechanisms for enhancing the penetration of FS in the nail plate via the application of emollients and novel pharmaceutical formulations; to develop devices specifically designed for illuminating the nails of feet and hands for PDT treatment of onychomycosis; to perform PDT with the developed technologies on patients with onychomycosis and evaluate its efficacy; to explore novel diagnosis methods for onychomycosis based on thermal and fluorescence imaging. Our results indicate that curcumin is a more effective FS than chlorine for the PDT treatment of onychomycosis. It was also identified that emulsion vehicles provide a superior delivery of curcumin into infected nails. The illumination devices developed specifically for the anatomy of foot and hand nails also facilitated the application of PDT for the treatment of onychomycosis. The novel FS vehicles based on curcumin and the developed illumination devices were evaluated in a pilot clinical study with 30 patients. This study indicated that delivery of curcumin via emulsion was more effective than the delivery via gel, as quantified by the number of PDT sessions needed for positive clinical response (6 weeks for emulsion vs. 10 weeks for gel). Finally, the feasibility to perform both thermal and fluorescence imaging of nails in patients with onychomycosis opens to the possibility of exploring these imaging modalities as complementary tools for the noninvasive diagnosis of onychomycosis. In conclusion, due to its demonstrated efficacy, low cost and simplicity to operate, the technologies developed through this work will facilitate the adoption of PDT as a novel and effective treatment of onychomycosis.

Keywords: Photodynamic therapy. Onychomycosis. Curcumin. Chlorine. LED..

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-Conjunto anatômico que forma uma unha, consiste em quatro principais componentes epidérmicos: a matriz, que dá origem à placa ungueal, o leito ungueal, a prega ungueal e o hiponíquio 31
- Figura 2-Exemplos dos principais microrganismos causadores de onicomicose, (A) *T. Rubrum*; (B) *T. mentagrophytes* e (C) *Candida albicans* respectivamente 32
- Figura 3-Principais apresentações clínicas de onicomicoses (A) distal, (B) Proximal, (C) Superficial e (D) Onicodistrofia total 33
- Figura 4-(A)Diagrama de Jablonski para um FS. A absorção do fóton ($h\nu$) leva à excitação eletrônica para os estados singleto (S1) ou tripleto (T1). No estado singleto, o FS pode reagir com moléculas vizinhas, ou transitar para o estado excitado tripleto, T1, por cruzamento intersistema ou relaxar, S0, com dissipação de energia (nr). B) Reações do tipo I e II. O estado tripleto é o estado de maior duração, conseqüentemente, medeia as reações biológicas e fotoquímicas que levam à produção de espécies radicais através da transferência de elétrons para o oxigênio ou outros substratos celulares aceitadores de elétrons, reação do tipo I, ou à transferência de energia para moléculas de oxigênio com formação de oxigênio singleto (1O_2), reação do tipo II. O mecanismo fotodinâmico mediado por 1O_2 é o mais importante para a citotoxicidade induzida pela PDT 43
- Figura 5-Estrutura química das Clorinas (A) Clorina e6, (B) Clorina Butil 45
- Figura 6-Espectro de absorção das clorinas cl-e6 e cl-butil, respectivamente 45
- Figura 7-Esquema Síntese Clorina e6 46
- Figura 8-Esquema Síntese Clorina Butil 46
- Figura 9-Estrutura química dos pigmentos curcuminóides: (A) Curcumina, (B) demetoxicurcumina e (C) bis-demetoxicurcumina 48
- Figura 10-Estrutura e composição do sal de curcuminóides: Curcuminoides natural + N-metil-D-Glucamina 49
- Figura 11-Desenho esquemático de ampola contendo liófilo 54
- Figura 12-Metodologia utilizada para Microscopia confocal: Coletou o m.o do meio da cultura, fez-se a incubação com o FS, e após este procedimento, realizou-se a lavagem das hifas em água destilada autoclavada por 5 vezes com o auxílio do vórtex, então, os m.o foram dispostos em lâminas, coberto por lamínulas para posterior análise microscópica 57
- Figura 13-Biotable (A) Azul comprimento de onda 450 nm e (B) Vermelha comprimento de onda 660 nm desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – IFSC/USP. 58

Figura 14-Metodologia utilizada os ensaios <i>in vitro</i> para contagem UFC	60
Figura 15-Grupos controle avaliados (F-L-) e (F+L-) na inativação <i>in vitro</i> dos microrganismos <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T.rubrum</i> e <i>C.albicans</i> . As condições mostradas foram realizadas para cada tipo de FS	62
Figura 16-Parâmetros de terapia fotodinâmica avaliados na inativação <i>in vitro</i> do <i>Trychophyton mentagrophytes</i> com as duas clorinas cl-e6 e cl-butil, resultado em 2 experimentos	63
Figura 17-Parâmetros de terapia fotodinâmica avaliados na inativação <i>in vitro</i> dos m.o <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T.rubrum</i> e <i>C.albicans</i> com curcuminas (natural, sintética, Sigma Aldrich e Sal de curcuminóides). Essas condições foram realizadas para os três m.o e quatro FS, um total de total 12 experimentos	63
Figura 18 – Representação esquemática do processo de cromatografia de camada fina	66
Figura 19 - Parâmetros de TFD avaliados na inativação <i>in vitro</i> de <i>C.albicans</i> com os três pigmentos de curcuminóides (curcumina, DMC e BDC) e três origens diferentes (Extraída natural, Sigma Aldrich e Sintética) totalizando 9 experimentos	67
Figura 20 – Esquema das estratégias utilizadas visando melhorar a penetração fos FS na lâmina ungueal	68
Figura 21–Metodologia da preparação das amostras para realizar imagens por microscopia confocal, para avaliar a penetração do FS induzida pelos agentes degradantes (Uréia 40%, enzima CBM (Carbohydrate Binding Module e celulas Accellerase® 1500)	69
Figura 22-Metodologia da preparação das amostras para imagens de microscopia Electronica de Varredura, para avaliar a ação da Uréia 40% na unha	70
Figura 23 – Embalagens primária so produto, bisnaga de alumínio de 15 g e caixa de papel (A) creme de uréia 40% denominado <i>OniCleaner</i> e (B) creme de curcumina 1,5% denominado <i>OniFree</i> .	73
Figura 24-Versões inicial equipamento (Protótipo)	78
Figura 25 - Disposição dos equipamentos para análise de fluorescência (A) Camera fotográfica, (B) Acoplador e (C) Evidenciador	84
Figura 26 – câmera FLK Ti400 Fluke® utilizada para imagens termográficas	85
Figura 27 – Protótipo versao 3 do equipamento, versão final que esta em fase de aprovação pela ANVISA	86
Figura 28 - Procedimento de assepsia (A) e curetagem da lâmina ungueal (B)	86
Figura 29 – Aplicação abundante uréia 40%	87

- Figura 30 - (A), Aplicação do Fotossensibilizador, (B) proteção com filme de PVC e (C) oclusão com papel alumínio 87
- Figura 31 - Proteção do equipamento com um acessório plástico específico e descartável que se encaixa na fonte de luz LED 88
- Figura 32 - Iluminação da lâmina ungueal com equipamento de velcro por 20 minutos total de dose 120 J/cm^2 88
- Figura 33-Imagens de fragmentos de *T. mentagrophytes* por microscopia confocal em modo canal para clorina cl-e6. O painel (A) representa o controle, e painéis (B), (C) e (D) correspondem às hifas na solução de cl-e6 na concentração de $150 \mu\text{g/mL}$ incubadas durante 30, 60 e 90 minutos, respectivamente. A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência do agente patogênico, e a cor vermelha atribuída às pelas clorinas. Os parâmetros de microscopia foram mantidos constantes para comparação. A barra de escala equivale a 200 micrômetros 89
- Figura 34- Imagens de *T. mentagrophytes* incubados com cl-butil, realizadas por microscopia confocal em modo canal. Painel (A) representa o controle, e painéis (B), (C) e (D) correspondem às hifas na solução de cl-butil na concentração de $150 \mu\text{g/mL}$ incubadas durante 30, 60 e 90 minutos, respectivamente. A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência do agente patogênico, e a cor vermelha atribuída às pelas clorinas. Os parâmetros de microscopia foram mantidos constantes para comparação. A barra de escala equivale a 200 micrometros 90
- Figura 35- Imagens de *T. mentagrophytes* incubados com curcumina natural realizadas por microscopia confocal em modo canal. Painel (A) representa o controle, e painéis (B), (C) e (D) correspondem às hifas em $150 \mu\text{g/mL}$ de solução de curcumina natural na concentração de $150 \mu\text{g/mL}$ incubadas durante 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. A cor verde corresponde tanto à região da autofluorescência do agente patogênico, assim como, da fluorescência emitida pela curcumina, ambos emitem entre 400-570 nm, a análise é realizada através da intensidade da fluorescência. Os parâmetros de microscopia foram mantidos constantes para comparação. A barra de escala equivale a 200 micrometros 91
- Figura 36-As imagens de microscopia confocal de *T. mentagrophytes*, incubado com cl-e6, imediatamente após o tratamento por TFD. Os painéis (A), (B), (C) e (D) refere-se às hifas incubadas com cl-e6 e irradiadas por 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência do agente patogênico, e a cor vermelha atribuída às pelas clorinas. A barra de escala equivale a 200 micrometros 92
- Figura 37-As imagens de microscopia confocal de *T. mentagrophytes*, incubado com cl-butil, imediatamente após o tratamento por TFD. Os painéis (A), (B), (C) e (D) refere-se às hifas incubadas com cl-e6 e irradiadas por 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência do agente patogênico, e a cor vermelha atribuída às pelas clorinas. A barra de escala equivale a 200 micrometros 93

Figura 38-As imagens de microscopia confocal de *T. mentagrophytes*, incubados em curcumina, imediatamente após o tratamento por TFD nos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos, (A) (B), (C) e (D), respectivamente. A cor verde corresponde tanto à região da autofluorescência do agente patogênico, assim como, da fluorescência emitida pela curcumina, ambos emitem entre 400-570 nm, a análise é realizada através da intensidade da fluorescência. A barra de escala equivale a 200 micrometros

93

Figura 39-Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos a TFD utilizando cl-e6 como FS, com baixas concentrações. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL e 0.10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

95

Figura 40-Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos a TFD utilizando cl-e6 e cl-butil como FS. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações, com concentrações 0,6 µg/mL; 1,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0 µg/mL e 10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

97

Figura 41-Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos a TFD utilizando as quatro variações de curcumina como FS. (Sintética, Sigma, Extraída natural e Sal de curcuminóides). Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10% DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. O símbolo “*” representa os grupos que não apresentaram diferença estatística significativa (P-valor <0,05) em relação ao grupo controle F-L+. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

100

Figura 42-Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *T. rubrum* submetidos a TFD utilizando quatro variações de curcumina como FS. (Sintética, Sigma, Extraída natural e Sal de curcuminóides). Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10% DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução

significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

103

Figura 43-Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *C. albicans* submetidos a TFD utilizando as quatro variações de curcumina como FS. (Sintética, Sigma, Extraída natural e Sal de curcuminóides). Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

107

Figura 44-curva analítica padrão sigma Aldrich curcumina

109

Figura 45- curva analítica padrão sigma Aldrich demetoxicurcumina

111

Figura 46- curva analítica padrão sigma Aldrich bis-demetoxicurcumina

112

Figura 47- Cromatografia de camada fina, (A) Hexano: Acetato 1:1 e 7:3, (B)Tolueno: Acetato 9:1, 7:3 e 1:1,(C) Tolueno: Acetato Butila 7:3 e 6:4,(D) Dicloro, (E) Acetato: Butila 1:1 , (F) Dicloro: Metano 9:1, 99:1 e 98:2 e (G) : Cromatografia de camada Delgada Dicloro: Metano 98:2

116

Figura 48- Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o pigmento curcuminóide denominado **Curcumina** de diferentes fontes: Sintética, Sigma Aldrich e Natural. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,0125 µg/mL; 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

118

Figura 49 - Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o pigmento curcuminóide denominado **Demetoxicurcumina** de diferentes fontes: Sintética, Sigma Aldrich e Natural. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,0125 µg/mL; 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

121

Figura 50- Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o pigmento curcuminóide denominado **bis-demetoxicurcumina** de diferentes fontes: Sintética, Sigma Aldrich e Natural. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,0125 µg/mL; 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

123

Figura 51- Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o três pigmentos curcuminóides curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina de origem **Sintética**. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL e 0.10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

126

Figura 52- Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o três pigmentos curcuminóides curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina de origem **Sigma Aldrich**. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL e 0.10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

127

Figura 53- Fração de sobrevivência obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o três pigmentos curcuminóides curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina extraídos da **curcumina natural**. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL e 0.10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

128

Figura 54-Imagens de microscopia confocal da lâmina ungueal para avaliar a penetração do FS com auxílio de enzimas: (A) unha com uréia 40%; (B) unha incubada com coquetel; (C) unha incubada com coquetel CBM Alexia, (D) Unha com

uréia e curcumina, (E) unha incubada com Coquetel+curcumina e (F) unha incubada com Coquetel CBM Alexia + curcumina	130
Figura 55- Imagem de microscopia confocal da lâmina ungueal com uréia 40%, avaliando-se a penetração do FS com auxílio dos gráficos espectrais (à esquerda) tomados sobre o perfil da intensidade (linha vermelha) traçada na imagem (à direita)	131
Figura 56 - Imagens de microscopia confocal da lâmina ungueal para avaliar a penetração do FS com uréia 40%: (A) autofluorescência da unha; (B) unha incubada com curcumina, sem pré-tratamento com uréia; (C) unha pré-tratada com uréia; e (D) unha pré-tratada com uréia e curcumina.	132
Figura 57 MEV- Análise dos efeitos da uréia na lâmina ungueal. São apresentadas as imagens da superfície da unha: (A) sem aplicação da uréia, e (B) 24 horas após aplicação da uréia; imagens da lateral da unha: (C) sem aplicação da uréia, e (D) 24 horas após aplicação da uréia.	133
Figura 58- Imagens de microscopia de fluorescência confocal da curcumina (1,5%) solubilizada nos três veículos: (A) solução, (B) gel de carbopol e (C) emulsão	134
Figura 59- Imagens de microscopia confocal em emulsão sem (à esquerda) e com (à direita) curcumina (1,5%): A) imagem confocal por canal superposta à imagem de luz transmitida. B) Imagem espectral da mesma área	135
Figura 60- Imagens de microscopia confocal (Espectral e FLIM) da curcumina natural (1,5%) incorporada em Emulsão	136
Figura 61 –curva analítica do creme de curcumina	146
Figura 62- Versões do equipamento: painel A: Prototipo inicial; B: primeira versão da empresa e C: versão final sob análise para aprovação pela ANVISA	147
Figura 63-Imagens de luz branca hálux direito de paciente, 46 anos, sexo feminino com onicomicose a dez anos. Painel (A) antes do tratamento, painel (B) e depois de dez sessões de TFD com curcumina 1,5% dissolvida em solução	148
Figura 64-Imagens de luz branca hálux direito de paciente, 29 anos, sexo masculino com onicomicose à dez anos. Painel (A) antes do tratamento, painel (B) após duas sessões de TFD e painel (C) e depois de seis sessões de TFD com curcumina 1,5% incorporada em gel	148
Figura 65- Imagens de luz branca hálux direito de paciente, 71 anos, sexo feminino com onicomicose à dez anos. Painel (A) antes do tratamento, painel (B) após cinco sessões de TFD com curcumina 1,5% incorporada em emulsão	149
Figura 66 - compração da resposta clínica dos trinta pacientes em de acordo com a formulação utilizada (solução, gel e emulsão)	149
Figura 67- Correlação da classe de microrganismos, por tempo médio de tratamento por TFD	151

Figura 68- Padronização dos primer para o <i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	153
Figura 69- Padronização dos primer para o <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>Candida albicans</i>	153
Figura 70- Imagens de fluorescência paciente SEM onicomicose(A). (B), (C) e (D) imagens processadas no MATLAB para analisar as fluorescências nos canais azul (B), verde (C) e vermelho (D)	154
Figura 71-Imagens de fluorescência de paciente FALSO POSITIVO para onicomicose (A). (B), (C) e (D): imagens processadas no MATLAB para analisar as fluorescências nos canais azul (B), verde (C) e vermelho (D)	154
Figura 72- Imagens de fluorescência de paciente POSITIVO para onicomicose (A). (B), (C) e (D): imagens processadas no MATLAB para analisar as fluorescências nos canais azul (B), verde (C) e vermelho (D)	154
Figura 73- Histogramas referentes ao canal verde (a) e ao brilho (b) comparando os grupos controle (linha azul), falso positivo (linha preta) e positivo (linha vermelha)	155
Figura 74-Imagem termográfica de dois hálux (direito e esquerdo) de um mesmo paciente. Hálux direito positivo para onicomicose e halux esquerdo negativo para onicomicose	156
Figura 75-box plot dos valores das análises da imagem termográfica (A) pé direito e (B) pé esquerdo	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros analíticos utilizados nas análises por HPLC na identificação dos curcuminóides	65
Tabela 2 - Componentes para o preparo da solução curcumina 1,5%	71
Tabela 3 - Componentes para o preparo do gel curcumina 1,5%	71
Tabela 4 - Componentes para o preparo da emulsão curcumina 1,5%	72
Tabela 5 - As condições de acondicionamento para o estudo de estabilidade acelerada	74
Tabela 6 - Condições de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração	74
Tabela 7 - Resumo com as informações indicadas aos pares de primers retirado da literatura específica. Sendo: Ta: temperatura de anelamento; Amplicon: o tamanho esperado dos produtos de PCR.	82
Tabela 8 - Parâmetros para determinação de concentração e área do padrão curcumina Sigma Aldrich	110
Tabela 9 - Parâmetros para determinação de concentração e área do padrão DC Sigma Aldrich	111
Tabela 10 - Parâmetros para determinação de concentração e área do padrão BDC da Sigma Aldrich	112
Tabela 11 - Determinação da concentração dos pigmentos curcuminóides da curcumina natural (extração PDT) e correlação, em porcentagem, de cada pigmento encontrado na amostra	113
Tabela 12- Determinação da concentração dos pigmentos curcuminóides da curcumina Sintética Sigma Aldrich e correlação, em porcentagem, de cada pigmento encontrado na amostra	114
Tabela 13 - Medidas de pH do estudo de estabilidade no período de 1 ano	137
Tabela 14 - Resultados de densidade aparente dos produtos Onifree e Onicleaner (fev/2016 a fev/2017)	138
Tabela 15 – Comportamento reológico da amostra Onifree 2016.....	139
Tabela 16 – Comportamento reológico da amostra Onifree 2017.....	140
Tabela 17 – Comportamento reológico da amostra Onicleaner 2016	140
Tabela 18 – Comportamento reológico da amostra Onicleaner 2017	142
Tabela 19 – Tabela dos resultados das análises do creme curcumina 1,5% (Onifree) os lotes avaliados no período de 1 ano	143

Tabela 20 - Tabela dos resultados das análises do creme de uréia 40% (Onicleaner) os lotes avaliados no período de 1 ano	144
Tabela 21 - Resultados de perda por dessecação do Onifree	144
Tabela 22 - Resultados de perda por dessecação do Onifree	145
Tabela 23 - Parâmetros para determinação de concentração e área da curcumina incorporada no creme	145
Tabela 24 - Variáveis do estudo clínicos dos pacientes em função do tempo de lesão.	150

Lista de Siglas e Abreviaturas

A	Amostras
Abs	Absorbância
AMP	Aminometilpropanol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BDC	Bis-demetoxicurcumina
C	Curcumina
CCD	Cromatografia de camada Delgada
CCF	Cromatografia de camada Fina
cl-Butil	Clorina Butil
cl-e6	Clorina e6
D _{ap}	Densidade aparente
DM	Demetoxicurcumina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EOS	Equation of state
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
et al	E outros
F	Fotossensibilizador
FDA	Food and Drug Administration
FFND	Fungos Filamentosos não dermatófitos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fotossensibilizador
g	Grama
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	Intervalo de confiança
J/cm ²	Joule por centímetros quadrados
KCl	Cloreto de Potássio
KOH	Hidroxido de Potássio
L	Luz

LAT	Laboratório de Apoio Tecnológico
LED	Diodos emissores de luz
Log	Logarítimo
M	Massa
M _f	Massa final amostra
M _i	Massa inicial amostra
M _{Vazio}	Massa cadinho vazio
m.o	Microrganismos
MD	Exame micológico Direto
Min	Minutos
mL	Mililitros
mW/cm ²	Miliwhatt por centímetro quadrado
Nm	Nanometros
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/p	Peso peso
PBS	Tampão Salino Fosfato
pH	potencial hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
q.s.p	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotações por minuto
Sp	Espécie
Ssp	Espécie
T.	Trichophyton
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFD	Terapia Fotodinâmica
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UR	Umidade Relativa
USA	United States of America
UV/Vis	Ultravioleta Visível
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1	Anatomia e composição da unha.....	31
2.2	Etiologia das onicomicoses	32
2.3	Classificação clínica das onicomicoses	32
2.3.1	Onicomicoses causadas por dermatófitos	34
2.3.2	Onicomicose causadas por Fungos Filamentosos Não Dermatófitos (FFND)	35
2.3.3	Onicomicose causadas por leveduras	36
2.4	Epidemiologia das Onicomicoses	37
2.4.1	Onicomicoses no mundo e no Brasil	37
2.5	Tratamentos convencionais da Onicomicose.....	39
2.6	Diagnóstico de onicomicoses	40
2.7	Terapia Fotodinâmica.....	42
2.8	Fotosensibilizadores	44
3	OBJETIVOS	51
3.1	Objetivos gerais.....	51
3.2	Objetivos específicos.....	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	Pesquisa básica -Ensaio <i>in vitro</i>	53
4.1.1	Preparação das amostras dos fungos <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>C. Albicans</i>	53
4.1.2	Fotosensibilizadores	55
4.1.3	Avaliação do <i>T. Mentagrophytes</i> utilizando microscópio confocal de fluorescência.	55
4.1.4	Fonte de Luz e determinação da irradiância	58
4.1.5	Contagem das Unidades formadoras de colônias (UFC).....	59
4.1.6	Avaliação da efetividade da TFD sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>T. Mentagrophytes</i> , de <i>T. rubrum</i> e <i>C. albicans</i>	60
4.1.7	Quantificação dos pigmentos de curcuminóides curcumina Natural e Sigma Aldrich	64
4.1.8	– Avaliação da eficiência da TFD com os três pigmentos de curcuminóides na inativação do crescimento de <i>candida albicans</i>	65
4.1.9	Análise Estatística.....	67
4.2	Desenvolvimento da tecnologia.....	68
4.2.1	Desenvolvimento de mecanismos para otimizar a penetração dos FS na lâmina Ungueal	68

4.2.2 Desenvolvimento do equipamento para o tratamento de pacientes	77
4.3 Estudos clínicos.....	78
4.3.1 Aspectos éticos e causística.....	78
4.3.2 Identificação dos microrganismos.....	79
4.3.3 Tratamento dos Pacientes por TFD	85
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1 Pesquisa básica – Experimentos <i>in vitro</i>	89
5.1.1 Avaliação do <i>Trichophyton mentagrophytes</i> utilizando microscopia confocal de fluorescência.	89
5.1.2 Avaliação da efetividade da TFD sobre o crescimento <i>in vitro</i> de <i>T. Mentagrophytes</i> de <i>T. rubrum</i> e <i>C. Albicans</i> após contagem de UFCs	94
Determinação da curcumina e curcuminóides por cromatografia líquida de alta performance.....	108
Cromatografia em camada fina e Camada Delgada.	115
Avaliação da eficácia da TFD <i>in vitro</i> com curcumina e curcuminóides isolados após os experimentos com <i>Candida albicans</i>	117
5.2 Desenvolvimento da tecnologia	129
5.2.1 Desenvolvimento de mecanismos para otimizar a penetração dos FS na lâmina Ungueal.....	129
5.2.2 Desenvolvimento do equipamento para o tratamento de pacientes.....	146
5.3 Estudos clínicos.....	147
5.3.1 Tratamento dos Pacientes por TFD	147
5.3.2 Identificação dos microrganismos.....	151
6 Conclusão.....	159
REFERÊNCIAS	161
ANEXOS	171
Anexo A – Aprovação do comite de Ética.....	173
ANEXO B - TCLE- Para Maiores de idade	175
ANEXO C -TCLE- Para Maiores de idade -Placebo	179
ANEXO D -Ficha anamnese	183
ANEXO E – Cromatograma da curcumina da Sigma Aldrich 0,25.....	185
ANEXO F – Cromatograma da curcumina PDT Pharma- 0,25.....	187
ANEXO G – Cromatograma da curcumina da Sigma Aldrich 0,025	189
ANEXO H – Cromatograma da curcumina PDT Pharma- 0,25	191
ANEXO I – Cromatograma da curcumina PDT Pharma- 0,25.....	193
ANEXO J – Cromatograma da curcumina Sigma Aldrich- 0,25	195

1 INTRODUÇÃO

Onicomicoses são infecções fúngicas que acometem a lâmina ungueal levando ao espessamento, endurecimento, descoloração e desintegração da unha. Pode chegar a mais de 10% a incidência mundial desta doença e representa 30% de todas as infecções ungueais.¹⁻² Podem ser causadas por diversas espécies de fungos dos grupos dermatófitos, fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) e leveduras.³ Atualmente, é considerada um problema de saúde pública devido à alta incidência da doença que pode estar relacionada a vários fatores tais como hábitos de higiene, idade, sexo, atividade social, clima entre outros.³⁻⁷

Os tratamentos convencionais consistem no uso de antifúngicos tópico e/ou oral e, em casos mais avançados, podem chegar à necessidade de remoção da unha. Vários fatores devem ser considerados para um tratamento de sucesso dessa infecção fúngica, como o número de unhas atingidas, o nível da infecção e o agente etiológico. Um dos obstáculos para o tratamento convencional é que a eficiência desses fármacos está sendo reduzida devido ao aumento da resistência microbiana provocada pelos diferentes perfis de suscetibilidade aos agentes antifúngicos.^{1,7} Além disso, para obter uma cura clínica, esse tipo de tratamento é realizado por longos períodos, podendo levar vários meses e até anos e, com isso, os efeitos adversos nos pacientes podem aparecer.

Embora tenha uma aparência nitidamente doente, o tratamento para onicomicoses nem sempre é procurado pelo paciente, sendo considerada por eles apenas um problema estético. Principalmente nos países em desenvolvimento, a atenção médica também é voltada para outras doenças e a infecção é, muitas vezes, ignorada pelo médico e pelo paciente. Entretanto, distrofias ungueais, quando não tratadas, podem provocar mudanças substanciais na qualidade de vida do paciente, como, por exemplo, limitar o paciente quanto à realização de atividades físicas, uma vez que as unhas tornam-se espessas, causando pressão, irritação e dor nas bordas ungueais.⁷ Problemas mais sérios também podem ocorrer se não tratada essa doença, propiciando uma porta de entrada para infecções secundárias.⁷⁻⁸ Estima-se que 26% de pessoas portadoras de diabetes possuem onicomicoses, quando não tratadas, aumentam o risco de evoluir para uma lesão na pele e levar às infecções secundárias, que tendem à amputação das extremidades.^{1,9}

Outra dificuldade encontrada para o tratamento dessa doença é que as onicomicoses são difíceis de serem diagnosticadas e tratadas e, mesmo que o diagnóstico e tratamento sejam

realizados corretamente, a reincidência é alta, pelo menos um em cada cinco pacientes não conseguem uma cura definitiva.¹⁰⁻¹¹ Vários são os fatores que podem explicar a reincidência alta tais como a localização da lesão, a manutenção da higiene e tratamento, e os cuidados para não se recontaminar, entre outros.

Diante das informações supracitadas, percebe-se a importância do desenvolvimento de novas tecnologias e opções terapêuticas para o tratamento de onicomicose. Com o intuito de desenvolver uma técnica não invasiva, para reduzir o impacto no paciente com esse quadro clínico, propusemos a Terapia Fotodinâmica (TFD) como alternativa para o tratamento dessa doença. Sua ação depende da interação da luz com o fotossensibilizador (FS), um composto fotoativo, em um ambiente rico em oxigênio, causando danos a diversos componentes celulares através de reações oxidativas.¹² A grande vantagem dessa técnica é que até o presente momento não há relatos do desenvolvimento de resistência microbiana a essa modalidade terapêutica.¹³

Dessa forma, as propostas desse trabalho foram de otimizar a técnica (TFD), avaliando a segurança e eficácia para a aplicação clínica, com bases nos estudos *in vitro* avaliando se a curcumina é o melhor fotossensibilizador para o tratamento da onicomicose e este composto necessitaria da ação sinérgica de outros curcuminóides presentes na raiz do açafrão. Realização dos testes de eficácia e estabilidade de três formulações farmacêuticas foram realizados com o objetivo de desenvolvermos um *kit* de tratamento constituído por creme de uréia 40%, creme de curcumina 1,5% e um equipamento com cinco ponteiros, com elaboração de material didático e treinamento para especialistas nas áreas de dermatologia e podologia que poderão adotar a TFD como nova modalidade terapêutica para o tratamento de onicomicose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia e composição da unha

Para compreender melhor a patogênese das onicomicoses é fundamental entender a estrutura, a composição e as propriedades ungueais. A unha é constituída por um conjunto de estruturas, onde cada uma tem sua função (Figura 1). A lâmina ungueal é composta por células epiteliais queratinizadas; a matriz ungueal é composta por um epitélio que fixa a unha ao seu leito e suas células produzem a queratina rígida do leito que é localizado entre a matriz e o hiponíquio, sendo esse último a porção entre a parte livre da placa e o sulco distal; o hiponíquio age principalmente como uma barreira de proteção, impedindo a entrada de agentes infecciosos na extremidade distal da unha. A parte proximal da unha é coberta por uma extensão de pele, que é protegida pelo eponíquio, também conhecida como cutícula, cuja função também é prevenir a entrada de fungos e bactérias. A porção ventral da placa consiste de queratina flexível, que é produzida pelas células do leito, na qual está firmemente ligada.¹⁴⁻

17

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

Fonte: Adaptada de YARAK et al.¹⁸

Os componentes químicos da lâmina ungueal, em sua maioria, são moléculas de queratina com ligações dissulfeto e baixo nível de lipídeos. Constitui uma estrutura rígida e impermeável devido às ligações de hidrogênio e dissulfeto entre as moléculas de queratina.¹⁹ Fatores como idade e sexo podem interferir na composição química das unha. Por exemplo, o

carbono presente pode aumentar conforme o aumento da idade e unhas de mulheres possuem mais enxofre e menos nitrogênio em relação às unhas dos homens.¹⁷

2.2 Etiologia das onicomicoses

A invasão da unidade ungueal por fungo é denominada onicomicose. O termo onicomicose é derivado do grego “onyx” (unha) e “mykes” (fungo).⁵ É a mais frequente das doenças ungueais, sendo responsáveis por 30% das infecções superficiais e 50% de todas as desordens da unha, sendo maior a incidência em idosos.^{1,20} Os agentes causadores de onicomicose estão inseridos em três grandes grupos: dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND), mostrados na Figura 2.²¹⁻²² O primeiro grupo é o mais freqüente, podendo chegar a 90% na etiologia das infecções, seguido do grupo de leveduras e FFND.^{4,23} Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os dermatófitos afetam aproximadamente 25% da população mundial e apresentam enorme variação epidemiológica, sendo influenciados pelas características individuais do paciente.^{1,21-22} Estima-se que 10 a 15% da população poderá ser infectada por microrganismos causadores de onicomicoses no decorrer da vida.²⁴

Figura 2- Exemplos dos principais microrganismos causadores de onicomicose ATCC, (A) *T. rubrum*; (B) *T. mentagrophytes* e (C) *Candida albicans* respectivamente. Aumento 40X A barra de escala refere-se a 200 micrômetros

Fonte: Elaborada pela autora.

2.3 Classificação clínica das onicomicoses

A apresentação clínica da onicomicose causada por uma determinada espécie fúngica é de difícil distinção e embora alguns sinais clínicos podem sugerir a espécie causadora, ela somente pode ser determinada após identificação laboratorial.^{9,15,25}

Essa doença pode ser classificada de acordo com sua apresentação clínica, que são definidas pelo modo como o fungo invade a unidade ungueal.²⁵⁻²⁷ As principais formas clínicas das onicomicoses são:

(A) Onicomicose subungueal distal e lateral: é a mais frequente, acomete cerca de 90% das lesões. O fungo invade primeiro o hiponíquio, camada endurecida da epiderme sob a borda livre da unha e progride de forma lenta e progressiva para afetar o lado de baixo da lâmina ungueal lateral e proximal.

(B) Onicomicose superficial branca: Esse tipo de lesão é encontrada com maior frequência nas unhas dos pés e representa cerca de 2 a 5% das onicomicoses causada por dermatófitos. O fungo invade a superfície da lâmina ungueal e produz “ilhas” brancas de infecção, podendo ser facilitadas por traumas anteriores.

(C) Onicomicose subungueal proximal: é a apresentação clínica menos frequente, o micro-organismo invade a unidade ungueal via dobra ungueal proximal através da cutícula e progride distalmente. A infecção ocorre dentro da unha, porém a superfície permanece intacta.

(D) Onicodistrofia total: nesse tipo de lesão a lâmina ungueal é invadida distalmente através do espessamento total provocado por fungos dermatófitos, FFND e leveduras.

Há uma tendência a rotular qualquer alteração envolvendo a lâmina ungueal como uma infecção fúngica, porém, outras doenças cutâneas também podem alterar a estrutura da unha tais como psoríase, líquen plano, infecções bacterianas, dermatite de contato, tumores ungueais, onicólise idiopática, paquioníquia congênita e onicodistrofias traumáticas.^{8,11}

Figura 3- Principais apresentações clínicas de onicomicoses (A) distal, (B) Proximal, (C) Superficial e (D) Onicodistrofia total

Fonte: Elaborada pela autora.

O contágio dessas infecções ungueais, podem ocorrer através do contato direto do paciente com piscinas, banheiros públicos e objetos de uso comum, sendo necessário possuir

fatores predisponentes, como alteração da barreira tegumentar, diabetes, corticoterapia, atopia, etc. Esses fatores contribuem para que a infecção seja crônica e de progressão lenta, fazendo com que a patologia se agrave.²⁸

2.3.1 Onicomicoses causadas por dermatófitos

Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos que taxonomicamente classificam-se nos gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*.⁹ Caracterizam-se pela capacidade de invadir tecidos queratinizados como pele, pêlo e unhas. Normalmente, causam infecções superficiais em homens e em animais.^{9,29} Também são divididos de acordo com seu nicho ecológico: antropofílicas, zoofílicas e geofílicas.

Os dermatófitos **antropofílicos** acometem preferencialmente seres humanos e raramente animais. Exemplos de microrganismos dessa classe são: *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton megninii*, *Trichophyton schoenleinii* e *Trichophyton rubrum*. As espécies antropofílicas representam cerca de 70% das infecções humanas.³⁰

Dermatófitos **zoofílicos** normalmente infectam animais e, ocasionalmente, humanos. Este tipo de microrganismos tem preferência por materiais queratinosos, como pêlos, penas, cascos ou chifres, que podem estar presentes na superfície de solos. Exemplos: *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum equinum* e *Microsporum persicolor*. As espécies zoofílicas são responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas.^{29,31}

As espécies **geofílicas** têm como reservatório o solo e podem acometer o homem.³² A transmissão direta entre pessoas é muito limitada. Exemplos: *Microsporum gypseum*, *Microsporum fulvum* e *Microsporum praecox*.

Onicomicoses causadas por dermatófitos também são conhecidas pelo termo *Tinea unguium*. Esses tipos de lesões são comumente permanentes, sem tendência a auto-cura pelo fato da lâmina ungueal conter células mortas e não apresentar região vascularizada. Quando ocorre contaminação na lâmina ungueal, dificilmente os microrganismos entram em contato com as células de defesa ou agentes antimicrobianos do sangue, pois esse tipo de lesão é restrita às camadas cornificadas, porque os fungos não têm a capacidade de penetrar em tecidos profundos.²⁹

O gênero *Trichophyton*

Trichophyton rubrum é a espécie mais frequentemente encontrada em onicomicoses. Estudos apontam ampla distribuição mundial desse fungo.³³⁻³⁴ Para diagnosticar esse tipo de microrganismo na lesão deve-se ficar atento às características morfológicas do *T. rubrum*, já que as hifas são septadas com microconídios piriformes a arredondados. Os macroconídios são raramente encontrados, porém possui parede delgada e multisseptadas. Para um melhor diagnóstico sugere-se realizar a prova de urease com *T. interdigitale*, cujo resultado para *T. rubrum* é negativo.³³

2.3.2 Onicomicose causadas por Fungos Filamentosos Não Dermatófitos (FFND)

Os FFND são considerados contaminantes ambientais, pois são encontrados na natureza como sapróbios do solo ou patógenos de plantas, porém, também podem invadir as unhas. Esse tipo de lesão na lâmina ungueal ocorre em cerca de 1 a 17% dos pacientes, dependendo da região e do clima onde vivem. A prevalência é maior em locais quentes e úmidos, como em áreas subtropical e tropical.^{8,23,35} Esse tipo de lesão é mais comum nas unhas dos pés, e a maioria das vezes envolve a unha do hálux, pelo fato de estar mais próximo do solo e também ao hábito de andar descalço e/ou usar sandálias.^{8,36} Diversos são os tipos de FFND isolados de unhas, mas somente algumas são identificadas como agente de onicomicose, tais como: *Scolopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium sp*, *acremonium sp*, *aspergillus sp*, *scytalidium sp*.³⁵ Os gêneros *Fusarium* e *Scytalidium* são capazes de degradar a queratina das unhas, ainda que essa degradação aconteça de forma mais lenta que por dermatófitos.^{11,37}

Fusarium ssp. pode causar lesões superficiais, invasivas, localizadas ou disseminadas. A apresentação clínica depende do estado imunológico dos pacientes.^{8,38} Apresentam-se morfológicamente em conídios multisseptados em forma de fuso. As espécies mais frequentemente isoladas em onicomicoses são *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*.^{8,11} A característica clínicada unha afetada por *Fusarium spp.* é apresentar cor branca-amarelada e superfície opaca. A coloração é observada na dobra proximal da unha e a cutícula, indicando a origem proximal da infecção. A parte distal pode apresentar coloração amarelada quando há progressão da micose.³⁹ *Scytalidium spp.* tem prevalência de 9 a 24% nas lesões. São encontrados com maior frequência em países tropicais em regiões consideradas endêmicas

como a Nigéria, Tailândia, Jamaica e Austrália.⁴⁰ A morfologia pode variar de acordo com cada espécie, por exemplo, *Scytalidium dimidiatum* apresenta hifas aéreas de coloração escura variando de cinza a preta, já *Scytalidium hyalinum* apresenta coloração clara, sendo ambas as espécies de crescimento mais rápido que os dermatófitos. O isolamento de *Scytalidium hyalinum* é sempre considerado significativo, enquanto que o crescimento de outros FFND precisa ser interpretado com cuidado, pois são comumente encontrados no ambiente. Clinicamente, as lesões causadas por *Scytalidium spp* não diferem daquelas causadas por dermatófitos.⁴¹

Estudos têm chamado a atenção para o aumento do número de casos de onicomicoses causadas pelos gêneros *Scytalidium* e *Fusarium*. Esse aumento pode ser explicado pelo fato de que somente nos últimos tempos esses tipos de microrganismos são reconhecidos como causadores de onicomicoses; ao aumento da população imunocomprometida e ao uso excessivo de medicamentos que aumentam a resistência desses patógenos.⁴⁰

2.3.3 Onicomicoses causadas por leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, pertencente ao reino *Fungi* caracterizada pela presença de parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear e a reprodução pode ser sexuada e assexuada por brotamento ou cissiparidade.^{34,42,43} Possuem capacidade fermentativa, sendo capazes de crescer em uma variedade de substratos orgânicos, aspectos utilizados, inclusive, para a identificação de gênero/espécies.^{34,42,43} Quanto às características morfológicas, consideram-se aspectos macroscópicos da colônia e microscópicos das leveduras. Presença de cápsulas, ascos, hifas, formação do tubo germinativo devem ser pesquisadas através de metodologia específica, e não pela simples observação do isolamento

As leveduras são consideradas parte da microbiota normal do homem e somente é considerada doença quando existe alterações nas condições normais do hospedeiro.^{29,34,42} As espécies frequentemente responsáveis por infecções são: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida rugosa* e *Candida stellatoidea*. O espectro dessas infecções inclui desde a colonização de pele e unhas até quadros sistêmicos, como, por exemplo, a invasão de vários órgãos.⁴²

2.4 Epidemiologia das Onicomicoses

Até o momento é desconhecida a real incidência e prevalência de onicomicoses na população brasileira, devido a esse tipo de doença não requerer notificação ao Sistema Único de Saúde (SUS).²⁶ Estima-se, por meio de estudos científicos, que cerca de 10 a 15% da população pode ser infectadas no decorrer de sua vida e que a prevalência da onicomicose pode variar de acordo com alguns fatores: idade, classe social, ocupação, clima, ambiente onde vive e frequência de viagem.³⁴

O aumento da incidência devido à idade avançada pode ser explicada pelo fato de idosos apresentarem baixa circulação periférica, redução da taxa de crescimento ungueal, além de ocasionar trauma com maior frequência na unha, resultando em uma maior exposição ao patógeno.^{3,6-7} Algumas atividades do cotidiano também podem estar associadas com o aumento da incidência dessa doença, tais como: a profissão, o uso de sapatos e o cuidado das unhas em salões, que podem resultar no aparecimento de traumas e umidade excessiva.⁵

O problema do aumento da incidência dessa doença é que ela pode agravar outras afecções clínicas, tornando-se um fator de aumento de custos e cuidados com a saúde especialmente em idosos e em portadores de diabetes. Se esses pacientes possuem onicomicose e não a tratam, podem apresentar algumas sequelas e levar, inclusive, a amputações de membros inferiores.³⁹ Quando as onicomicoses são associadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV), deve-se ter maior cautela, pois é considerada clinicamente mais agressiva, com apresentações incomuns da doença, além de maior resistência ao tratamento convencional. Estima-se que cerca de 15 a 40% dos portadores de HIV são acometidos por onicomicoses, o que pode ser diretamente relacionada ao grau de imunossupressão.⁴⁴

2.4.1 Onicomicoses no mundo e no Brasil

Estudos da onicomicose no mundo e no Brasil apontam particularidades da doença, mostrando que dependendo da região, o agente etiológico que acomete a unha pode variar, porém, é difícil saber até que ponto estas variações entre países refletem diferenças reais, pois, embora a etiologia das onicomicoses possa estar relacionada às condições climáticas ou geográficas, elas também podem sofrer influência de diferentes métodos de amostragem dos

pacientes, como idade, sexo ou tipo clínico da infecção e interpretação de dados laboratoriais.⁴⁵

Nas zonas de clima temperado, pelo menos 80% das onicomicoses são causadas por dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale*. Por exemplo, na América do Norte, infecções por FFND, incluindo *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium spp.*, são responsáveis por 1,5 a 6% das onicomicoses.² Entretanto, um estudo no Canadá realizado com 15000 pessoas, mostrou que aproximadamente 17% apresentaram anormalidades nas unhas e 8% do total apresentaram onicomicoses. Os principais agentes encontrados nas mãos foram os dermatófitos (70,8%), seguido pela *Candida spp.* (29,2%); já nas unhas dos pés foram dermatófitos (90,5%), seguidos de não-dermatófitos (7,8%) e *Candida spp.* (1,7%).¹

Em países como por exemplo na Alemanha, Itália e Grécia os patógenos mais isolados nas unhas das mãos foram leveduras (46%), seguido de dermatófitos (42%) e FFND (2%).³⁶ Na Itália, em um estudo de 15 anos, 4046 casos foram avaliados, e as unhas dos pés foram as mais acometidas por dermatófitos em 71% dos casos, *Candida* 16% e FFND, 13%.⁴⁶ Também na Itália, Tosti *et al.* (2000) verificaram que entre os FFND, o mais freqüente foi *Fusarium spp.*, encontrados mais nas unhas dos pés do sexo feminino. Apenas 40% do total de pacientes evoluíram para cura após o tratamento e não houve nenhum registro de *Scytalidium spp.*³⁵. Na Grécia, os FFND foram responsáveis por 9,4% das onicomicoses.⁶

Na maior parte dos estudos, *T. rubrum* destaca-se como o dermatófito mais isolado das onicomicoses, entretanto, no Irã, os fungos mais isolados foram *T. verrucosum* e *T. interdigitale*; a espécie *T. rubrum* apareceu em apenas 7% dos casos. Esses dados talvez possam ser explicados pela atividade econômica da região, já que trabalham com manejo de rebanho que predispõe o contato com tais fungos prevalentes⁴⁷. Na Colômbia, avaliaram 299 pessoas e 183 casos de onicomicose foram confirmados. As unhas dos pés foram as mais atingidas, tanto em homens quanto em mulheres. Foram isolados FFND das unhas dos pés, sendo os mais freqüentes *Fusarium spp.* e *Scytalidium dimidiatum*.⁴⁸

No Brasil, as espécies mais frequentes nas dermatomicoses são do gênero *Trichophyton* (*T. rubrum* e o *T. mentagrophytes*), conforme indicam estudos realizados em Porto Alegre (2007), Rio de Janeiro (2005) e Maringá (2003).^{3,5,34,49} Dentre as leveduras, a *Cândida albicans* é a mais comumente relacionada com a onicomicose, contaminando, geralmente, unhas já danificadas e em pacientes com imunossupressão. No Brasil, existem

poucos estudos epidemiológicos para onicomicoses, pois a atenção está voltada para infecções invasivas, com risco a curto prazo.³⁹

2.5 Tratamentos convencionais da Onicomicose

Os tratamentos convencionais para onicomicose consistem na utilização de antifúngicos tópicos ou orais. A terapia tópica é mais desejável por ser mais localizada e causar poucos efeitos colaterais, não interagindo com outros fármacos utilizados pelo paciente e melhorando a adesão do paciente ao tratamento.^{22,50} Apesar dos agentes tópicos terem ação na área infectada, a difusão do fármaco na lâmina ungueal é difícil devido a unha ser bastante queratinizada (e, por isso, compacta), dura e, algumas vezes, impermeável, restringindo o acesso dos fármacos ao agente causador da onicomicose.⁵¹ Outra dificuldade é que as soluções tópicas incorporadas em cremes são facilmente removidas, prejudicando a liberação do fármaco no tecido subungueal.⁵² Devido a esses fatores, o tratamento tópico é recomendado nos estágios primários da doença, em onicomicoses superficiais com comprometimento inferior a 50% da lâmina ungueal ou em casos em que o medicamento sistêmico é contra-indicado.⁵³⁻⁵⁶

Por sua vez, o tratamento por antifúngicos via oral, as vezes, é mais eficaz, pois é absorvido pela circulação e se difunde na placa ungueal através do leito. Os principais fármacos sistêmicos utilizados são a terbinafina, o itraconazol e o fluconazol. São considerados mais seguros e apresentam mecanismos de ação semelhantes, inibindo a via de biossíntese do ergosterol na célula fúngica, diferenciando-se nos pontos distintos da via em que atuam.⁵⁷ A desvantagem é que aumentam os riscos de reações adversas pelo fato deles serem utilizados por longos períodos, podendo levar meses para obter uma cura clínica. Além do que, apresentam altas taxas de falha terapêutica entre 30% e 50%, de interações medicamentosas.^{9,22} Os efeitos adversos mais comuns são: cefaléia, hipersensibilidade e eritema, interagindo também com outras drogas (anticoagulantes orais e fenobarbital), acelerando seu metabolismo e diminuindo sua biodisponibilidade.⁵⁶ Em adição aos efeitos mencionados, o acúmulo crônico ou agudo destas drogas em órgãos vitais, como o fígado, podem provocar outras modificações metabólicas e desencadear doenças hepáticas severas.⁵⁴⁻

55

Apesar de agentes sistêmicos terem altas taxas de sucesso no tratamento, as falhas ocorrem em 20 a 25% dos casos, levando muitas vezes à recidiva.⁵³ O motivo pode ser as

interações antagonistas entre os fármacos, assim como fatores inerentes aos pacientes, como as respostas imunológicas, a não adesão ao tratamento e a resistência aos medicamentos tanto em leveduras como em fungos filamentosos.⁵⁸ FFND, por exemplo, não respondem bem à terapia comum, necessitando de remoção da unha seguida de tratamento tópico, a fim de se obter melhores resultados.⁵⁹ Devido às suas interações medicamentosas e aos efeitos colaterais, há uma clara necessidade do uso de drogas antifúngicas que possam ser administradas por via tópica, seja em monoterapia ou em combinação com antifúngicos por via oral, de modo a alcançar maiores taxas de cura clínica e micológica.⁶⁰

Estudos mostram que, aproximadamente dois anos após o início do uso disseminado de cada novo fármaco antimicrobiano, existe o relato das primeiras linhagens resistentes. Isso decorre da seleção de espécies com mecanismos de resistência ao fármaco e ao intervalo de tempo para a observação clínica da infecção.⁵⁴⁻⁵⁶ Essa situação ressalta ainda mais a importância do desenvolvimento de alternativas terapêuticas capazes de atingir especificamente o microrganismo patogênico com poucos efeitos colaterais.⁶¹⁻⁶³

2.6 Diagnóstico de onicomicoses

A fim de selecionar um tratamento mais adequado da onicomicose, é necessário estabelecer um diagnóstico apropriado para evitar a prescrição de medicamentos quando a unha não está contaminada, evitando conduzir doentes à graves situações de saúde devido à elevada toxicidade dos antifúngicos.^{5,15,27,64}

Atualmente, o diagnóstico de onicomicose pode ser realizado por diagnóstico clínico, baseado no histórico clínico dos pacientes e inclui o exame por microscopia direta e a cultura de fungos, análise molecular e, mais recentemente, através do registro de imagens por meio de técnicas diversas.^{1,7,10}

O **diagnóstico clínico** é realizado através de um exame físico, durante o qual observam-se alterações nas lâminas ungueais, porém, muitas vezes pode levar a erros terapêuticos.²⁶ O aspecto clínico das lesões causadas por fungos pode mimetizar outros tipos de infecções, como, por exemplo, espessamentos resultantes de traumatismos, lesões ungueais de psoríase e até tumores sub-ungueais. Assim, o diagnóstico é extremamente importante para definir a verdadeira causa da lesão e auxiliar na escolha da terapia adequada.⁶⁵

Um diagnóstico incorreto pode gerar problemas, tais como, recidiva da doença, risco da exposição do paciente a fármacos com efeitos adversos importantes, além da utilização de uma terapia ineficaz e muitas vezes dispendiosa.⁶⁶ Em contrapartida, um diagnóstico correto e veloz pode ser um aspecto fundamental, possibilitando a prescrição de um tratamento antifúngico específico que permite o seu uso racional e limita o desenvolvimento de resistência a esses fármacos.⁶⁷

O diagnóstico por **microscopia direta** é um teste rápido, responsável por cerca de 5 a 10% de resultados falso negativos. A amostra de unha é examinada de forma a pesquisar hifas, artrosporos ou células fúngicas e consiste em detectar a presença ou ausência de fungos e, assim, fornecer informações quanto à sua morfologia.⁶⁸⁻⁶⁹ É um teste complementar que fornece informações como observação de filamentos septados, de células ou de esporos, e também pode ser útil na determinação da importância patogênica do microrganismo, mas não deve substituir a cultura.¹³ Para facilitar a visualização é necessário clarificar as amostras com o hidróxido de potássio (KOH), através de uma ação degradativa. Na presença de substâncias fortemente alcalinas, qualquer substância orgânica que possa ser confundida com elementos fúngicos, quando observada através do microscópio, desaparece quase completamente, deixando o fundo praticamente limpo.⁶⁹

O **diagnóstico por cultura** é uma técnica relativamente demorada, porém, mais confiável quando se pretende estudar a morfologia microscópica dos fungos, e consiste na escolha do meio de cultura apropriado ao crescimento de todos os fungos existentes na amostra biológica.⁷⁰ Este meio pode ser simples ou com adição de compostos que inibem o crescimento de outros microrganismos, como, por exemplo, a cicloheximida e cloranfenicol.³³⁻³⁴ A adição de cicloheximida ao meio de cultura é para inibir o crescimento de fungos saprófitas, que tem crescimento mais rápido, impedindo os fungos patogênicos a se desenvolver. A cicloheximida é utilizada no isolamento de fungos dermatófitos, que têm uma taxa de crescimento relativamente lenta em relação aos FFND. Entretanto, inibe o crescimento de alguns patogênicos importantes, como *Candida*, *Aspergillus* e *Fusarium*. Assim, é necessário realizar simultaneamente meios de cultura com e sem cicloheximida. O cloranfenicol e/ou a gentamicina são compostos bactericidas normalmente usados para inibir o crescimento bacteriano que, se for abundante, pode inibir o crescimento de qualquer fungo, tanto de dermatófitos como de FFND.⁶⁹

Para aumentar a eficácia do diagnóstico laboratorial, têm sido realizadas **Diagnóstico por análise molecular**, para identificação de fungos patogênicos, pois o método de identificação por cultura é dependente do acerto do meio de cultura e, portanto, se faltar

algum nutriente, os fungos podem não produzir estruturas que permitam sua identificação, o que pode levar a um diagnóstico errado do agente etiológico.

O diagnóstico por análise molecular têm sido usados para classificar e identificar bactérias e fungos através do DNA e do RNA.⁶⁹ O sequenciamento do DNA ribossômico na identificação de fungos permite tanto o diagnóstico de microrganismos, como de análises filogenéticas, epidemiológicas e estudos de genética de populações.

Outra abordagem que tem sido utilizada é o **Diagnóstico por imagem**. Essa técnica vem se destacando no cenário atual, por ser um método não invasivo, rápido e de baixo custo. Varias pesquisas em diagnóstico de onicomicose estão voltadas para análises de imagens. Bet *et al*⁷¹, realizaram estudo clínico com 177 pacientes utilizando a dermatoscopia, uma técnica bastante utilizada na dermatologia, e se mostrou promissora de diagnóstico dessa doença.

Villaseñor-Mora *et al.* propuseram o diagnóstico baseado em imagens de termografia. O procedimento não permite determinar a diferença entre os dermatófitos, no entanto, sua utilização é recomendada para determinar se a lâmina ungueal apresenta ou não onicomicose.⁷² Outras abordagens para o diagnóstico de onicomicose por imagem incluem o diagnóstico por imagens de fluorescência, onde Silva *et al*⁶⁴ utilizaram um dispositivo que consiste de um conjunto óptico de iluminação em UV com fonte de luz a LED emitindo em comprimento de onda em $400\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ (Evince, MM Optics).

2.7 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que combina o uso de luz, o FS e o oxigênio (O_2). A interação desses três elementos resulta em espécies reativas capazes de induzir ao sistema biológico alvo a inviabilização de células. O mecanismo de ação se dá por dois tipos de reações físico-químicas chamadas reações tipo I e tipo II.⁷³⁻⁷⁵

A **reação do tipo I** ocorre através de transferência de carga elétrica, onde o FS no estado excitado interage com um substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas, produzindo radicais livres ou íons radicais.⁷⁴⁻⁷⁵ A maioria destes radicais reage com o O_2 , gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (EROs), os quais podem, por sua vez, oxidar uma variedade de biomoléculas.⁷⁴⁻⁷⁵

A **reação do tipo II** resulta na formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), uma espécie altamente reativa, através da transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular.⁷⁶ O $^1\text{O}_2$ pode reagir com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácidos

nucléicos e, como lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, as reações fotooxidativas ocasionam alterações da permeabilidade da membrana celular e danos nas organelas, provocando a morte da célula alvo via necrose ou apoptose.⁷⁶

Figura 4- (A) Diagrama de Jablonski para um FS. A absorção do fóton ($h\nu$) leva à excitação eletrônica para os estados singlete (S_1) ou tripleto (T_1). No estado singlete, o FS pode reagir com moléculas vizinhas, ou transitar para o estado excitado tripleto, por cruzamento intersistema S_0 , com dissipação de energia (nr). B) Reações do tipo I e II. O estado tripleto é o estado de maior duração, conseqüentemente, medeia as reações biológicas e fotoquímicas que levam à produção de espécies radicais através da transferência de elétrons para o oxigênio ou outros substratos celulares, reação do tipo I, ou a transfere a energia para moléculas de oxigênio com formação de oxigênio singlete (1O_2), reação do tipo II. O mecanismo fotodinâmico mediado por 1O_2 é o mais importante para a citotoxicidade induzida pela PDT

Fonte: Adaptada de DAI et al.⁷⁷

Os protocolos de tratamento, considerando o tipo e concentração do FS, o tempo de espera e os parâmetros de iluminação, devem ser padronizados para cada aplicação da TFD.^{78,79,12} Entre as diversas fontes de luz existentes para TFD, uma das mais importantes e utilizadas é a que utiliza LED (do inglês *Light-Emitting Diodes*, "Diodos Emissores de Luz"). Esses dispositivos são muito mais acessíveis economicamente que lasers e apresentam uma reduzida componente térmica, além de luz com banda estreita de comprimentos de onda quando comparados às lâmpadas, satisfazendo, assim, às necessidades da maioria das aplicações para TFD.⁸⁰⁻⁸¹

A TFD vem se mostrando eficiente na inativação de bactérias, fungos e vírus. Uma das vantagens da técnica é a baixa probabilidade de seleção de microrganismos resistentes, uma vez que a resistência às espécies reativas de oxigênio é praticamente impossível de ocorrer. O oxigênio singlete gerado através da fotoexcitação do FS 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 microrganismos, mesmo daqueles resistentes às drogas antimicrobianas, salvo mecanismos de proteção ao estresse oxidativo.⁷⁸⁻⁷⁹

Diversos FS são investigados para uso em TFD antimicrobiana, entre eles, porfirinas, particularmente a protoporfirina IX, ftalocianinas, clorinas e curcuminas.^{62-63,82-83}

Fatores tais como interações farmacológicas, resistência fúngica e a não-adesão do paciente ao tratamento das onicomicoses são razões que podem explicar as possíveis falhas terapêuticas utilizando antifúngicos.^{56,84} A TFD é uma técnica que pode suprir essas falhas e, por isso, 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.^{61,85-86}

2.8 Fotossensibilizadores

A terapia fotodinâmica vem sendo empregada para o controle microbiano com resultados bastante favoráveis. No entanto, limitações são encontradas e uma das estratégias é melhorar os FS disponíveis no mercado e desenvolver compostos mais adequados e eficientes para cada aplicação. Neste trabalho, vamos abordar duas classes distintas de FS as Clorinas, pertencentes a uma classe de substâncias tetrapirrólicas e as curcuminas, um polifenol.

Clorinas

Foram estudadas duas clorinas, a Clorina e-6 (cl-e6) e a clorina butil (cl-butil), cujas estruturas estão representados na Figura 5.^{63,87}

Figura 5-Estrutura química das Clorinas (A) Clorina e6, (B) Clorina Butil
Fonte: Elaborada pela autora.

As clorinas apresentam uma absorção característica em aproximadamente 660 nm, como representados no espectro de UV-Vis (Figura6) e, quando irradiadas em 405 nm, apresentam emissão de fluorescência em 670 nm.⁸³

Figura 6-Espectro de absorção das clorinas cl-e6 e cl-butil, respectivamente
Fonte: Elaborada pela autora.

A cl-e6 é semelhante ao composto comercial Photoditazine® e sua efetividade é bem estabelecida, porém, apresenta um elevado custo, além de ser uma mistura complexa de produtos. Dessa maneira, surgiu a necessidade de produzir compostos nacionais e de baixo custo, o que levou à síntese de forma efetiva e com elevada pureza da cl-e6 nacional.

A síntese foi realizada através do derivado Metil-feoforbideo *a*, extraído de uma hidrólise básica da Clorofila *a*, que foi obtida diretamente da reação da cianobactéria *Spirulina máxima* (Figura7).⁶³

Figura 7-Esquema Síntese Clorina e6
Fonte: Adaptada de ULIANA et al.⁶³

A cl-butil surgiu através de modificações realizadas na molécula a fim de conferir aos pigmentos características estruturais, de modo a se aproximarem das características de um fotossensibilizador ideal. As abordagens sintéticas propostas a seguir convergem para compostos de caráter hidrofílico e anfifílico (Figura 8).⁶³

Figura 8-Esquema Síntese Clorina Butil
Fonte: Adaptada de ULIANA et al.⁶³

Uma vez que o metil feoforbídeo-*a* e as aminas glicosiladas foram sintetizadas, foram realizados a inserção das aminas alifáticas aos derivados da clorofila, no caso, a butilamina (figura 7).

Curcumina

A curcumina é um produto natural que é bastante utilizado na culinária indiana, como açafrão da Índia, e é obtida a partir dos rizomas de *Curcuma longa*, uma planta da mesma família do gengibre. Nos últimos tempos, o consumo de açafrão vem sendo estimulado em função das inúmeras ações terapêuticas apontadas e atribuídas à curcumina e seus derivados. O açafrão é composto por pigmentos curcuminóides, além de alguns terpenóides (óleos essenciais). Um rizoma da cúrcuma pode conter de 4 a 8 mg/100 g de pigmentos curcuminóides e o teor dos pigmentos pode variar de acordo com o tempo da raiz, e da região que foi plantada. Também foi observado um aumento no teor dos pigmentos curcuminóides, se mantido por mais tempo no solo. O pigmento curcumina foi isolado pela primeira vez por Vogel em 1842, caracterizada como um pó cristalino amarelo. Atualmente sabe-se que é um derivado fenólico, insolúvel na água e no éter etílico, mas solúvel no etanol e no DMSO (dimetilsulfóxido).⁸⁸ Sua estrutura química foi descrita por Lampe e Milobedeska em 1910 e, quimicamente, é um diferoilmetano com a fórmula $C_{21}H_{20}O_6$ e peso molecular 368,4 g.⁸⁹

Tornou-se prática usual expressar que o composto curcuminóide é simplesmente curcumina.⁹⁰ A curcumina comercial encontrada no mercado possui 3 pigmentos curcuminóides, compostos por (A) curcumina (77%), que é a mais abundante, (B) demetoxicurcumina (17%) e (C) bisdemetoxicurcumina (3%). Suas estruturas são mostradas na Figura 9. Alguns pesquisadores descrevem que os curcuminóides tem ação sinérgica e que possuem a cor amarelo alaranjada típica por apresentarem espectro de absorção numa pequena região de 420 a 425nm.⁹¹⁻⁹³

Figura 9- Estrutura química dos pigmentos curcuminóides: (A) Curcumina, (B) demetoxicurcumina e (C) bis-demetoxicurcumina

Fonte: Elaborada pela autora.

A aplicação da curcumina não se limita à área alimentar e, ao longo do último século, ela tem se revelado uma verdadeira panaceia natural. Por possuir vários efeitos biológicos, a curcumina tem sido objeto de investigação, tais como a supressão da carcinogênese, evitando a proliferação de uma grande variedade de células tumorais (pele, pulmão, estômago, cólon e mama), atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e bactericidas, antifúngico, analgésica e com efeitos neuro-protetores para tratamento e prevenção de mal de Parkinson.⁹²⁻⁹³

Além deste amplo espectro de atividades terapêuticas sistêmicas, a curcumina vem, recentemente, despertando o interesse de diversos grupos de terapias fotônicas, principalmente por sua excelente atividade fotodinâmica. A utilização da curcumina como FS tem tido grandes avanços em aplicações e pesquisas, especialmente no Brasil. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o uso da curcumina com FS inibiu alguns microrganismos, tais como: *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras.⁹⁴⁻⁹⁸ Podendo ser aplicada em tratamentos de desinfecção bucal, eliminação das larvas do mosquito da dengue e também no tratamento da

onicomicose.^{82,95,99} Além da sua utilização como FS, pode atuar também sobre infecções superficiais localizadas e as ações farmacológicas podem ser intensificadas quando a curcumina é irradiada com luz azul em espectro UV-visível a 420 nm.¹⁰⁰⁻¹⁰¹

Os maiores obstáculos ao uso de curcumina são a insolubilidade em água devido à sua hidrofobicidade, baixa absorção, baixa biodisponibilidade combinada com instabilidade e o fato do composto ser rapidamente degradado. No entanto, é solúvel em solventes extremamente ácidos.^{91,102} Para solucionar os problemas de estabilidade, estudo recentes buscam novas abordagens para a entrega do FS.¹⁰³

No entanto, para implementar a utilização de curcumina como fotossensibilizador na prática clínica, é necessário melhorar as abordagens de fotossensibilização utilizadas no local da lesão, por isso, são necessários vários estudos para assegurar uma fotoatividade suficiente durante o tratamento. Motivado por estas razões, Rego et al.¹⁰⁴ realizaram estudo das propriedades fotoquímicas e fotofísicas via absorção e espectroscopia de fluorescência do sal de curcuminóides, que é composto por curcumina natural com a adição de N-metil-D-glucamina. Essa adição foi realizada para tornar o composto solúvel em água (Figura 10).

Figura 10-Estrutura e composicao do sal de curcuminóides: Curcuminoides natural + N-metil-D-Glucamina
Fonte: Elaborada pela autora.

Outros estudos foram realizados com interesse de amenizar os obstáculos da curcumina, por exemplo, incorporar a curcumina com nanopartículas, micropartículas lipídicas liofilizadas, tais como quitosano ou complexadas com fosfolípidos dissolvidos em meio aquoso.¹⁰¹ Outra possibilidade proposta foi adicionar surfactante Plurônico, também para melhorar a solubilidade.^{102,104} O grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos vem trabalhando, nos últimos anos, em formulações de novas abordagens com curcumina como FS em diversos estudos clínicos na área de inativação de microrganismos. Por exemplo, para o tratamento de grandes áreas, foram desenvolvidas películas poliméricas com curcumina para

o tratamento de úlceras e desinfecção de tubos médicos com o objetivo de maior circulação, melhor permeabilidade e estabilidade.¹⁰⁵

Neste estudo realizamos ensaios *in vitro* e clínico para a aplicação da curcumina para a inativação dos microrganismos causadores de oncomicosose, alcançando um cenário favorável para a viabilidade da curcumina para a pesquisa clínica, o que deve ajudar a acelerar a disponibilidade dessa técnica para a realidade clínica nacional e internacional. No entanto, a investigação sobre as formulações e estabilidade do composto deve ser realizada de modo que no futuro próximo, a curcumina possa ser produzida em grande escala e a um baixo custo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo do presente projeto foi avaliar a eficiência da terapia fotodinâmica em inativação de microrganismos causadores de onicomicose, padronizar protocolos clínicos, otimizando a técnica, indicando a TFD como nova modalidade terapêutica para o tratamento de onicomicose, além de sugerir novas ferramentas para auxiliar no diagnóstico da doença.

3.2 Objetivos específicos

Pesquisa básica

- Comparar a eficiência da TFD de duas classes distintas de fotossensibilizadores a curcumina e clorinas na inativação do crescimento de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*;
- Determinar parâmetros experimentais (concentração de FS, tempo de incubação e dose de luz) para estabelecer protocolos capazes de inativar os principais microrganismos causadores de onicomicose;
- Avaliar a eficiência da TFD dos três pigmentos de curcuminóides na inativação do crescimento de *Candida albicans*;

Desenvolvimento da tecnologia

- Estudar mecanismos que visam melhorar a penetração do FS na lâmina ungueal e propor novas formulações para incorporar os FS melhorando a aplicação clínica; assim como realizar estudo de estabilidade das formulações propostas;
- Melhorar o protótipo do equipamento para o tratamento de pacientes, cujos dispositivos foram desenvolvidos no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT/IFSC-USP);
- Desenvolver um *kit* de tratamento através de TFD para onicomicose, constituído por creme de ureia 40%, creme de curcumina 1,5% e fonte de luz desenvolvida especificamente para se adaptar adequadamente à geometria dos pés e mãos.

Estudos clínicos

- Realizar ensaios clínicos para avaliar a terapia fotodinâmica como tratamento da onicomicose em pacientes infectados que já haviam testado outras terapias;
- Determinar a relação entre tipo de microrganismo e eficiência do TFD em pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia adotada abrange os ensaios de pesquisa básica, o desenvolvimento da tecnologia e os ensaios clínicos. A seguir é apresentada uma descrição detalhada dos procedimentos realizados.

4.1 Pesquisa básica -Ensaio *in vitro*

Ensaio *in vitro* foram realizados com três dos principais microrganismos causadores de onicomicoses, a fim de comparar a eficiência da TFD de duas classes de FSs, as curcuminas e as clorinas, além dos três pigmentos de curcuminóides isoladamente. Nesses ensaios também foram avaliados parâmetros experimentais tais como concentração de FS, tempo de incubação e dose de luz para estabelecer o melhor protocolo para cada tipo de FS para estabelecer protocolos de TFD.

4.1.1 Preparação das amostras dos fungos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *C. albicans*

Os microrganismos estudados foram os três principais encontrados em onicomicoses: *Trichophyton rubrum* (A), ATCC 28189 (New York, USA), *Trichophyton mentagrophytes* (B), ATCC 11481 (Inglaterra, UK) e (C), *Candida albicans*, ATCC 90028 (Rockville, MD USA), cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As amostras se encontravam em ampolas, liofilizadas e armazenadas na temperatura igual ou inferior a 5 °C (Figura 11). Esse procedimento foi realizado de acordo com as instruções do Procedimento Operacional Padrão (POP), também fornecido pela FIOCRUZ.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

Figura 11–Desenho esquemático de ampola contendo liófilo

Fonte: Adaptada de BRASIL ...¹⁰⁶

Retirou-se a parte fragmentada com o auxílio de uma pinça esterilizada, e iniciou-se a ressuspensão do sedimento adicionando 0,5 mL do meio de cultura líquido *Sabouraud Dextrose*, homogeneizando suavemente e deixado em repouso por alguns minutos até a sua reidratação. Posteriormente a suspensão foi cultivada em Agar *Sabouraud Dextrose* (Difco® – BD & Co, EUA) e foi acondicionada em estufa a 37 °C para todas as amostras; o tempo de armazenamento foi de 7 dias para os fungos e de 24 horas para a levedura, com subcultivos semanais.

As amostras dos microrganismos foram preparadas, para a realização dos ensaios *in vitro*, sendo inicialmente lavadas, para a retirada do meio de cultura das cepas e na sequência realizados ajustes na densidade óptica (D.O) da amostra para a obtenção da concentração inicial.

A lavagem dos fungos foram realizadas com água destilada. Para isso, fragmentos dos *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* foram retirados do meio de cultura e transferidos para um tubo falcon estéril com água destilada autoclavada, em seguida homogeneizada em vórtex vigorosamente por 30 segundos. A D.O da suspensão foi ajustada para 0,16 no espectrofotômetro em comprimento de onda 630 nm, levando a uma concentração de 10^9 células/mL para os dois microrganismos. Enquanto que, para os ensaios com as leveduras, a lavagem foi realizadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), com o auxílio de um Swab foram coletadas colônias de *C. albicans*, da placa de Petri contendo àgar *Sabouraud dextrose* (Difco, Detroit, MI, USA), em seguida, cultivadas em tubo falcon contendo meio líquido *Sabouraud broth* (Difco) por 24 horas a 37 °C. Após esse tempo a cultura foi centrifugada 1400 rpm (Eppendorf Model. 5702) por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O procedimento foi repetido por duas vezes, e o sobrenadante ressuspendido em 15 mL de PBS.

O número de células viáveis na suspensão foi de 10^9 células/mL, medidas através D.O 0,38 no espectrofotômetro no comprimento de onda 530 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.2 Fotossensibilizadores

Com o intuito de avaliar a eficiência de novos FS para TFD e propor a utilização de produtos nacionais e derivados de compostos naturais, foram investigados duas classes distintas de FS: as clorinas, derivadas da clorofila e a curcumina, derivadas do açafrão.

As clorinas utilizadas nesse estudo, foram: (1) clorina e6 (cl-e6); (2) clorina butil (cl-butil). Ambas sintetizadas a partir de clorofila *a*, extraída da alga *Spirulina máxima*, no Laboratório de Química Bio-orgânica, com colaborações do Prof. Dr. Kleber T. De Oliveira e Profa. Dra. Marciana Uliana.⁶³

As curcuminas utilizadas nesse estudo foram:

- (1) curcumina sintética -Referência C1386, produzida pela Sigma Aldrich[®], utilizada como referência, a qual em sua composição 84,87% de curcumina 11,91% de demetoxicurcumina e 3,20 % bis-demetoxicurcumina;
- (2) curcumina sintética, produzida pela PDT Pharma[®], constituída 100% de curcumina;
- (3) curcumina natural, também produzida pela PDT Pharma[®], constituída por 57,64% de curcumina e 16, 5% de demetoxicurcumina e 25,99% bis-demetoxicurcumina;
- (4) sal de curcuminóides, produzido pela PDT Pharma[®], constituída por curcumina natural + N-metil-D-Glucamina, uma amina primária já utilizada em outros medicamentos como agente solubilizante. Para obter um fotossensibilizador mais solúvel em meio aquoso .

4.1.3 Avaliação do *T. mentagrophytes* utilizando microscópio confocal de fluorescência.

A fim de investigar a penetração dos FSs no interior dos microrganismos, e assim, determinar o melhor tempo de incubação para cada FS, foram realizados estudos utilizando microscopia confocal por fluorescência. Para isso, inicialmente, foi retirado o meio de cultura

das amostras, para que a fluorescência do meio de cultura não interferir nas análises. Assim, realizou-se a coleta de *T. mentagrophytes* previamente cultivados em caldo *Sabouraud* Dextrose (Difco® – BD & Co, EUA), em estufa a 37 °C e colocados em um tubo falcon com 10 mL de água destilada autoclavada e agitados no vórtex (Gehaka, AV-2) por aproximadamente 30 segundos, retirou-se o microrganismo (m.o) do tubo-1 com auxílio de uma alça estéril e colocou no tubo-2 com 10 mL de água destilada autoclavada e assim por diante até o tubo-5. Após estes procedimentos as amostras foram dispostas em lamínulas para análises de autofluorescência ou incubadas em solução contendo os FSs.

Para avaliar o tempo de incubação das clorinas (cl-e6 e cl-butil), colocou-se amostras de fungos incubados por 30, 60 e 90 minutos com o FS na concentração de 150 µg/mL, e nos respectivos tempos, retirou-se as amostras das soluções, lavou novamente para retirar o excesso de FS no exterior das hifas. As amostras, foram dispostas em lâminas e avaliou-se os tempos de incubação. Os tempos de incubação utilizados para as clorinas foram baseados no trabalho de Uliana et al⁶³ que avaliaram tempos de incubação em bactérias e leveduras, e observaram que tempos menores que 30 minutos não tinham boa penetração dos FS no interior dos microrganismos.

Para avaliar o tempo de incubação da curcumina no patógeno, e assim, verificar o menor tempo para encontrar FS nas hifas, foram utilizados tempos de incubação menores 5,10,15 e 20 minutos. Colocou-se amostras de fungos incubados com o FS na concentração de 150 µg/mL, e nos respectivos tempos, retirou-se as amostras das soluções, lavou novamente, colocou em lâminas e avaliou-se os tempos de incubação.

A fim de averiguar se a TFD causa danos morfológicos nas hifas, foram realizadas imagens por microscopia confocal nos fragmentos de *T. mentagrophytes* imediatamente logo após a TFD.

Para essas análises, foram utilizadas uma parte dos fragmentos que foram incubados com os FS (cl-e6, cl-butil e curcumina), todos separadamente na concentração de 150 µg/mL. O tempo de incubação dos fragmentos com clorinas foi de 60 minutos e a irradiação foi realizada com auxílio da *Biotable* (protótipo desenvolvido no LAT/IFSC, como descrito à seguir, na sessão 4.1.4.) vermelha no comprimento de onda 660 nm, com intensidade de 35 mW/cm², totalizando a dose de energia de 42 J/cm². Enquanto que, o tempo de incubação dos fragmentos incubados em curcumina, foi de 20 minutos, e irradiados com auxílio da *Biotable* azul, comprimento de onda 450 nm numa intensidade de 30 mW/cm², totalizando fluência de

42 J/cm². Logo após a TFD, as amostras foram lavadas novamente, em água destilada autoclavada por cinco vezes com agitação em vortex e, em seguida, dispostas em lâminas e coberta por lamínulas, conforme demonstrado na Figura 12. Posteriormente, avaliou-se a morfologia dos fragmentos do patógeno com o auxílio do microscópio de fluorescência confocal de varredura a laser invertido (Zeiss –LSM780, Zeiss, Jena, Alemanha), que possui um laser de diodo emitindo em 405 nm, um laser de Argônio (Ar⁺) emitindo em 488 nm, o primeiro operando em modo contínuo e pulsado, e o segundo apenas contínuo, para excitações por único fóton e um laser pulsado de femtosegundo de Ti:Sa (Chameleon XR, Coherent Inc., Santa Clara, Canadá) com largura de pulso de aproximadamente 100 fs de comprimento de onda sintonizável entre 690-1080 nm, contudo este foi fixado em 800 nm.¹⁰⁸ A aquisição das imagens foram realizadas no chamado modo de canais, considerando regiões espectrais da autofluorescência do substrato e da emissão dos FS, separadamente. Sendo assim, as imagens com o FS clorinas foi fixado a fluorescência em 420-570 nm (canal 1) e 620-700 nm (canal 2), enquanto que para a curcumina foi fixados os intervalos de 400-500 nm (canal 1) e 500-700 nm (canal 2). Deste modo cada pixel da imagem contém intensidade de fluorescência de cada uma das duas regiões espectrais separadamente.

Figura 12- Metodologia utilizada para Microscopia confocal: Coletou o m.o do meio da cultura, fez-se a incubação com o FS, e após este procedimento, realizou-se a lavagem das hifas em água destilada autoclavada por 5 vezes com o auxílio do vórtex, então, os m.o foram dispostos em lâminas, coberto por lamínulas para posterior análise microscópica

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 Fonte de Luz e determinação da irradiância

As fontes de luz empregadas na irradiação das amostras deste estudo foram dois equipamentos constituídos por 24 LEDs, desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico - LAT/USP (Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP), intitulado de *Biotable*. A *Biotable* azul, emitindo em comprimento de onda 450 nm utilizada nos ensaios com as curcuminas; e a vermelha, emitindo em 660 nm utilizadas nos ensaios com as clorinas (Figura 13). Os equipamentos foram escolhidos de acordo com os espectros de absorção dos FS e projetados para a irradiação uniforme de placas contendo 24 poços, com a intensidades de saída de 35 mW/cm² para 450 nm e 30 mW/cm² para 660 nm.

Figura 13- *Biotable* (A) Azul comprimento de onda 450 nm e (B) Vermelha comprimento de onda 660 nm desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – IFSC/USP

Fonte: Elaborada pela autora.

Para determinar a irradiância da luz que chega em cada poço com as amostras, deve-se realizar medidas da potência entregue pelo equipamento. Para essas medidas utilizou-se um potenciômetro FieldmasterTM (Coherent, USA) com coletores de 2,5 cm² para biotable de area e altura similar a da placa de multipoços, ao longo de toda área de irradiação

$$I = \frac{P}{Ac} \quad (1)$$

Onde (P) corresponde a potência medida e (Ac) a área do coletor e (I) é a irradiância fornecida pelo equipamento às amostras. Durante os experimentos, para evitar que a luminosidade ambiente interferisse na irradiação das placas contendo as amostras, a placa que estava no equipamento era coberta por um papel alumínio.

Com o valor de I (em W/cm^2), pode –se calcular o tempo de iluminação das amostras (em segundos) com base na dose de luz desejada (em $\text{Joules}/\text{cm}^2$)

$$D = I \cdot t_{\text{irr}} \quad (2)$$

Onde D é a dose de luz ou fluência e t_{irr} corresponde ao tempo de irradiação.

A eficiência da TFD depende da capacidade de absorção do FS. A capacidade de absorção do FS diminui com o tempo de irradiação (*Photobleaching effect*). Para avaliar esse efeito nos curcuminóides, uma amostra de cada FS numa concentração inicial de $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ foi irradiada com a *Biotable* 450 nm (intensidade $35 \text{ mW}/\text{cm}^2$) de forma contínua e o espectro de absorção (Varian Cary 50 Bio UV/ Visible Spectrophotometer, Asia Pacific Australia) foi medido a cada 5 minutos por um período de 30 minutos. Estudos similares foram realizadas anteriormente por Uliana *et al.*⁶³ para as Clorinas.

4.1.5 Contagem das Unidades formadoras de colônias (UFC)

Para a realização dos experimentos, a concentração celular inicial foi de 10^6 células/mL para os fungos *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* e de 10^7 células/mL de *Candida albicans*. Todas as placas foram deixadas em repouso, no escuro, para o tempo de incubação do FS com o microrganismo, sendo o tempo de 20 minutos para curcumina e 60 minutos para clorinas.

A contagem das UFCs foi realizada após os experimento, sendo 48 horas para a *Candida albicans* e após 1 semana para o *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Cada condição foi realizada em triplicata e o número de colônias considerado, foi referente a diluição que apresentou inicialmente algum indício de crescimento (Figura 14). Após a contagem das colônias, obteve-se a média das triplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). O cálculo das UFC/mL foi realizado através da equação 3,

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ de colônias} \times n^{\circ} \text{ de diluições}}{\text{Volume (mL)}} \quad (3)$$

Como os valores de UFC/mL são extremamente elevados, estes dados foram apresentados em escala logaritma (de base 10), com o objetivo principal de verificar a eficácia

dos tratamentos na redução de viabilidade dos microrganismos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos distintos.

Figura 14-Metodologia utilizada os ensaios *in vitro* para contagem UFC

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.6 Avaliação da efetividade da TFD sobre o crescimento *in vitro* de *T. mentagrophytes*, de *T. rubrum* e *C. albicans*

Foram analisadas quatro condições experimentais para os três microrganismos: sem Luz e sem FS (“F-L-”, onde F é o fotossensibilizador e L é Luz); com FS e sem Luz (“F+L-”); sem FS e com Luz (“F-L+”) e com FS e com Luz (“F+L+”), que representa o grupo TFD. Todas as condições experimentais foram realizados nas placas de multipoços com 500 µL do microrganismo em sua concentração inicial e em triplicata.

Os ensaios com as clorinas (cl-e6 e cl-butil), foram realizadas apenas com o microrganismo *Trichophyton mentagrophytes*, pois estudos com a *Candida albicans* já haviam sido realizados por Uliana, M P et al.⁶³ e não viu-se necessidade dos ensaios com o *T. rubrum*, devido pouca diferença entre na inativações dos *Trichophyton* nos ensaios realizados com as curcuminas. (Os estudos com as curcuminas foram realizados com os três microrganismos *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *C. albicans*). Os ensaios iniciais, foram realizados com concentrações das clorinas semelhantes as concentrações das curcuminas (0.0125, 0.025, 0.050 e 0.10 µg/mL). No entanto, novas condições foram avaliadas, as quais descrevemos a seguir.

Na condição experimental **F-L-**, também denominada grupo controle, foram incluídas 500 mL água destilada estéril nas amostras dos microrganismos na concentração celular inicial. Estas amostras não foram submetidas aos procedimentos de TFD, foram colocadas na estufa em temperatura de 37 °C durante os mesmos tempos de incubação das amostras que foram irradiadas na presença de FSs.

O grupo **F+L-** foi para avaliar a existência dos efeitos tóxicos dos FS sobre os microrganismos. Para esta análise adicionou 500 µL dos FS na maior concentração, sendo 10 µg/mL de clorinas (cl-e6 e cl-butil) e 0,10 µg/mL de curcuminas (sigma, natural, sintética, sal de curcuminóides. Neste estudo as amostras continham FSs, porém, não foram iluminadas (Figura 15). As condições mostradas foram realizadas para cada tipo de FS.

Para os ensaios com curcumina foram adicionados mais um grupo experimental **F-L- + DMSO 10%** comparativo, para avaliar se o solvente utilizado para diluição das curcuminas não causava inativação dos microrganismos.

Figura 15-Grupos controle avaliados (F-L-) e (F+L-) na inativação *in vitro* dos microrganismos *T. mentagrophytes*, *T.rubrum* e *C.albicans*. As condições mostradas foram realizadas para cada tipo de FS

Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo **F-L+**, avaliou-se os efeitos da iluminação na ausência dos FSs sobre os microrganismos. Simulando o tempo de incubação no escuro como se houvesse Fs, após esse período, as placas eram posicionadas sobre a *Biotable* no comprimento de onda de 660 nm, com intensidade de 30 mW/cm^2 e as outras amostras eram irradiadas na *Biotable* no comprimento de onda de 450 nm, com intensidade de 35 mW/cm^2 , demonstrado na fileira 6 das figuras 16 e 17.

Para a avaliação do grupo **F+L+**, a TFD propriamente dita, adicionou-se o FS nos microrganismos e, após o tempo de incubação no escuro, iniciou-se a irradiação. Nestes ensaios foram analisados diferentes doses de energia, concentração de FS, intensidade de luz e tempo de irradiação. Na figura 16 demonstra-se os parâmetros da TFD avaliados na inativação do *Trychophyton mentagrophytes* com cl-e6 e cl-butil, resultando em 2 experimentos.

Concentração FS ($\mu\text{g/mL}$)							Dose de Energia (J/cm^2)

	1	2	3	4	5	6		
Clorinas	A	0,6 $\mu\text{g/mL}$	1,25 $\mu\text{g/mL}$	2,5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	F-L+	10,5 J/cm^2
	B	0,6 $\mu\text{g/mL}$	1,25 $\mu\text{g/mL}$	2,5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	F-L+	21 J/cm^2
	C	0,6 $\mu\text{g/mL}$	1,25 $\mu\text{g/mL}$	2,5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	F-L+	31,5 J/cm^2
	D	0,6 $\mu\text{g/mL}$	1,25 $\mu\text{g/mL}$	2,5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	F-L+	42 J/cm^2

Figura 16-Parâmetros de terapia fotodinâmica avaliados na inativação *in vitro* do *Trychophyton mentagrophytes* com as duas clorinas cl-e6 e cl-butil, resultando em 2 experimentos

Fonte: Elaborada pela autora.

Enquanto que na Figura 17 mostra os parâmetros avaliados na inativação dos *T. mentagrophytes*, *T.rubrum* e *C.albicans* com as curcuminas (sigma, natural, sintética, sal de curcuminóides). Essas condições foram realizadas para os três m.o e os quatros FS, um total de total 12 experimentos.

Concentração FS (µg/mL)							Dose de Energia (J/cm²)
	1	2	3	4	5	6	
A	0,0125 µg/mL	0,025 µg/mL	0,050 µg/mL	0,10 µg/mL		F-L+	10,5 J/cm²*
B	0,0125 µg/mL	0,025 µg/mL	0,050 µg/mL	0,10 µg/mL		F-L+	21 J/cm²
C	0,0125 µg/mL	0,025 µg/mL	0,050 µg/mL	0,10 µg/mL		F-L+	31,5 J/cm²
D	0,0125 µg/mL	0,025 µg/mL	0,050 µg/mL	0,10 µg/mL		F-L+	42 J/cm²

Figura 17-Parâmetros de terapia fotodinâmica avaliados na inativação *in vitro* dos m.o *T. mentagrophytes*, *T.rubrum* e *C.albicans* com curcuminas (natural, sintética, Sigma Aldrich e Sal de curcuminóides).

Essas condições foram realizadas para os três m.o e quatro FS, um total de total 12 experimentos

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.7 Quantificação dos pigmentos de curcuminóides curcumina Natural e Sigma Aldrich

Para quantificação dos pigmentos de curcuminóides da curcumina Natural, extraída pela PDT Pharma e a da Curcumina Sintética da Sigma Aldrich -Referência C1386, foram realizadas análises *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) com o auxílio do equipamento Waters Alliance 2695 HPLC System. As amostras foram preparadas de acordo com a metodologia de Li et al.¹⁰⁹ Inicialmente, fez a extração em Metanol, para isso pesou-se 0,5 g da amostra e colocou-se em balão volumétrico de 50 mL, completando o volume do balão com metanol e deixou em ultrassom por 60 minutos; em seguida realizou a filtração utilizando um filtro de membrana de 0,45µm.

Antes da utilização o equipamento também foi preparado, todos os solventes (metanol, acetonitrila, água e ácido fórmico), foram filtrados e desaerados antes da utilização. A coluna utilizada foi a C18 de dimensões 150 × 4,6 mm, na temperatura de 30 °C. Esta coluna caracteriza-se pela presença de uma cadeia hidrocarbonada constituída por 18 átomos de carbono, que lhe confere um carácter apolar. Realizou a limpeza do injetor com a mistura dos solventes da fase móvel. A fase móvel: é composta por duas fases: Fase A: Acetonitrila e Fase B: Ácido fórmico 0,1% em água, sendo o volume de injeção: 15 µL e o tempo de retenção: 22-27 minutos, tempo médio que o composto em análise demora a atingir o detector depois de passar através da coluna de HPLC. Este parâmetro é fortemente influenciado pelas características da coluna e da fase móvel (tabela 1).

Para iniciar o processo de acondicionamento da coluna com a fase móvel, Deixou o sistema sob vazão de 0,5 mL.min⁻¹ por 30 minutos, em seguida, aumentou a vazão para 1,0 mL.min⁻¹ por mais 30 minutos. Terminado esse processo, reduziu a vazão para 0,2 mL.min⁻¹. Os dados foram obtidos em triplicata e usados como valor final a média.

As curvas de calibração foram realizadas com os pigmentos padrão da Sigma-Aldrich e, e em seguida, realizadas com os FSs comparativos. Os pigmentos foram preparados na concentração de 0,025 mg/mL e, posteriormente, dissolvidos em metanol, o volume de injeção: 5µL; Fluxo: 1 mL/min. Os parâmetros de aquisição e o gradiente utilizado na eluição encontram-se especificados na Tabela 1;

Tabela 1 - Parâmetros utilizados nas análises por HPLC na identificação dos curcuminóides

Parâmetros de aquisição dos cromatogramas de HPLC	
Coluna	C18
Solvente A	Água 99% : ácido fórmico 1%
Solvente B	Acetonitrila
gradiente	Foram realizadas diluições seriadas para construção de curva padrão para cada pigmento.
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura da coluna	30°C
Comprimento de onda	380 nm (UV)

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.8 – Avaliação da eficiência da TFD com os três pigmentos de curcuminóides na inativação do crescimento de *Candida albicans*

A fim de explorar os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* com as quatro variações de curcumina, foram realizados testes em termos de composição dos pigmentos curcuminóides. Para isso realizou-se a separação dos 3 pigmentos curcuminóides da curcumina natural (curcumina (C), demetoxicurcumina (DC) e bis-demetoxicurcumina(BDC)), conforme descrito abaixo, e posteriormente comparou com os 3 pigmentos sintetizados pelo Laboratório de química bio-orgânica, com colaborações do Prof. Dr. Kleber T. De Oliveira e Profa. Dra. Marciana Uliana, e ambos grupos comparados com padrões Sigma Aldrich dos três pigmentos isolados. (curcumina- padrão analítico código 08511, demetoxicurcumina código D7696 e bis-demetoxicurcumina código B6938).

Para a extração dos pigmentos curcuminóides da curcumina natural, inicialmente realizou-se a **Cromatografia de Camada Fina (CCF)**, um método analítico bastante utilizado para isolar componentes presentes numa mistura de maneira simples, rápida e econômica.¹¹⁰ Neste caso foi utilizada para a separação dos curcuminóides, com o auxílio de uma placa de sílica gel (230-400 mesh), constituída por alumínio e revestida por uma fina camada de SiO₂, um composto sólido adsorvente, qual se designa fase estacionária. A amostra da curcumina foi colocada na extremidade inferior da placa, e inserida num béquer com o

eluente, também denominado fase móvel. O eluente move-se pela fase estacionária por capilaridade, arrastando os componentes da mistura de acordo com as respectivas afinidades com as fases móvel e estacionária. As diferenças de afinidade possibilitam a separação dos diversos componentes da mistura. Quando a fase móvel se moveu em uma distância adequada, foi visualizado e demarcado os compostos (Figura 18). Vários foram os eluentes testados Hexano: Acetato 1:1 e 7:3, Tolueno: Acetato 9:1, 7:3 e 1:1, Tolueno: Acetato Butila 7:3 e 6:4, Dicloro, Acetato: Butila 1:1, Dicloro: Metano 9:1, 99:1 e 98:2.

Após encontrado os eluentes e a melhor proporção para a separação dos pigmentos curcuminóides, foi realizada a **Cromatografia de Camada Delgada (CCD)** para a purificação dos pigmentos, para isso foram utilizadas placas preparativa de vidro com SiO_2 e o eluente diclorometano e metanol 98:2, após a separação das curcuminas, as mesmas foram extraídas da sílica proveniente da placa preparativa com metanol, o solvente foi evaporado com o auxílio de um rotaevaporador e então, as curcuminas foram recristalizadas em etanol.

Figura 18 – Representação esquemática do processo de cromatografia de camada fina
Fonte: Elaborada pela autora.

Esses experimentos foram realizados no Laboratório de química bio-orgânica, da Universidade Federal de São Carlos, com colaborações do Prof. Dr. Kleber T. De Oliveira e Profa. Dra. Marciana Uliana.

Após realizada a extração dos curcuminóides da curcumina natural, foram realizados os ensaios de inativação de *C.albicans* com os pigmentos curcuminóides separadamente (curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina). Ensaio semelhantes foram realizados com os compostos de origens diferentes, padrões Sigma Aldrich® e amostras sintéticas nas condições demonstrada na figura 19, totalizando 9 experimentos. A *C. albicans* foi a espécie escolhida para a essa etapa dos experimentos devido a maior resistência a TFD

quando comparada aos *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, além de ter um crescimento mais rápido.

Figura 19 - Parâmetros de TFD avaliados na inativação *in vitro* de *C.albicans* com os três pigmentos de curcuminóides (curcumina, DMC e BDC) e três origens diferentes (Extraída natural, Sigma Aldrich e Sintética) totalizando 9 experimentos

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.9 Análise Estatística

Para determinar quais as combinações de parâmetros TFD foram eficazes, (tipo FS, concentração de FS, energia de dose de luz) foi realizada a seguinte análise estatística. Primeiro, o valor médio de log (UFC/mL) entre as três condições de controle (F-L-, F+L-, F-L+) foi comparado usando ANOVA. Em todos os experimentos, não foram observados diferença significativa entre as três condições de controle. Portanto, foi utilizado o controle F-L+ (sem FS na dose máxima de energia luminosa) para avaliar a eficácia de todas as combinações de parâmetros TFD (F+L+). Uma combinação de parâmetros TFD foi considerada eficaz se resultar numa redução média de pelo menos 3 log (UFC/mL) em relação ao valor médio sob condições de controle (F-L+). Para determinar isso, estimou-se o intervalo de confiança de 95% (95% -IC) da diferença nas médias entre as condições do parâmetro controle e de cada TFD. Se o 95% -IC cai acima de 3 log (UFC/mL), esse parâmetro foi

considerado efetivo com um P-valor $<0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Microsoft Excel.

4.2 Desenvolvimento da tecnologia

Com o intuito de estudar mecanismos que visam melhorar a penetração do FS na lâmina ungueal, foram preparadas novas formulações para incorporar a curcumina para facilitar a aplicação clínica. Concomitantemente foram realizados estudos de estabilidade das formulações propostas, assim como melhorias no protótipo do equipamento para o tratamento de pacientes.

4.2.1 Desenvolvimento de mecanismos para otimizar a penetração dos FS na lâmina Ungueal

Visando melhorar a penetração do FS na lâmina ungueal duas estratégias foram propostas (Figura 20): estudar agentes abrasivos que rompessem as ligações dissulfetos da queratina da unha e o desenvolvimento de formulações para melhorar penetração na lâmina ungueal, considerando que a unha apresenta baixo nível de lipídeos.

Figura 20 – Esquema das estratégias utilizadas visando melhorar a penetração dos FS na lâmina ungueal
Fonte: Elaborada pela autora.

Seleção de agentes degradantes

Para avaliar a penetração de três componentes na lâmina ungueal, realizou-se imagens em microscopia confocal de fluorescência. Os componentes inicialmente realizados foram:

Carlos, EESC campus II pelo técnico Wagner R. Correia, no microscópio eletrônico de varredura Inspect F-50.

Figura 22-Metodologia da preparação das amostras para imagens de microscopia Electronica de Varredura, para avaliar a ação da Uréia 40% na unha
Fonte: Elaborada pela autora.

Testes semelhantes foram realizados para estudar a penetração da curcumina através da lâmina ungueal com o auxílio da uréia 40%. No entanto, as amostras utilizadas para essas análises, foram obtidas de um voluntário que incubou a uréia e a curcumina e depois cedeu a amostra para análises. A pesquisa em humanos foi aprovada pela comissão de Ética da Universidade Federal de São Carlos. Protocolo de pesquisa nº 841.063 (ANEXO A).

Desenvolvimento de Novas Formulações

Ainda visando a melhoria da penetração do FS na lâmina ungueal, foram realizados testes de incorporação da curcumina natural na concentração de 1,5% em três diferentes veículos: solução, gel de carbopol e emulsão sob patente Silva, AP et al.¹¹¹ Os ensaios com as formulações foram realizados com a curcumina natural, devido aos resultados dos ensaios *in vitro* mostrar maior inativação dos microrganismos.

Preparo do veículo Solução

Na tabela 2. Observa-se a solubilização de 1,5% de curcumina foi realizada em 1% DMSO e em seguida, em 10% de etanol absoluto para solubilizar totalmente a curcumina. Completou a solução com álcool em quantidade suficiente para (q.s.p) 100 mL.

Tabela 2 - Componentes para o preparo da solução curcumina 1,5%

Solução	
Fase A	
Componente	Quantidade
DMSO	1g
Álcool	q.s.p 100 g

Fonte: Elaborada pela autora.

Preparo do veículo Gel de Carbopol

O preparo da curcumina 1,5% em gel de carbopol e mostrado na tabela 3. Pesou-se 0,1 g de EDTA dissódico, 5 g de glicerol, 3,3g de solução de parabenos, 99,0g álcool 70% e deixou sob agitação. Em seguida, adicionou 1 g de carbomer 940 e misturou-se até que tivesse sido totalmente solubilizado. Realizou-se a neutralização (pH 7,0) com o AMP95 e agitou por mais 1 hora com auxílio de agitador magnético.

Tabela 3 Componentes para o preparo do gel curcumina 1,5%

Gel Carbopol	
Fase A	
Componente	Quantidade
EDTA Dissódico	0,1g
Glicerol	5 g
Solução de Parabeno	3,3 g
Álcool 70% p/p	99,0
Fase B	
Carbomer 940	1 g
AMP	q.s.p (pH=5)

Fonte: Elaborada pela autora.

Preparo do veículo Emulsão Água /Óleo (A/O)

O preparo da curcumina 1,5% em emulsão A/O é mostrado na tabela 4. Para preparar a fase aquosa, pesou-se 1 g de borato de sódio, 3,3 g de solução de parabenos e 100 g (q.s.p) de água purificada, e a mistura foi aquecida em banho maria até 80 °C. Em outro bequer preparou-se a fase oleosa, com 15 g de cera de abelha, 50 g petrolato líquido e 0,05 g de butil hidroxitolueno e aqueceu-se em banho maria até 75 °C. Após esses procedimentos verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa e agitou por mais 1 hora com auxílio de agitador magnético, até a formação de emulsão.

Tabela 4 - Componentes para o preparo da emulsão curcumina 1,5%

Emulsão A/O	
Fase A	
Componente	Quantidade
Borato de Sódio	1g
Solução de Parabeno	3,3 g
Água Purificada	q.s.p 100 g
Fase B	
Cera branca de abelha	15 g
Petrolato líquido	50 g
Butil Hidroxitolueno	0,05 g

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de acompanhar a interação das curcumina natural com os veículos estudados, e ainda avaliar o decaimento de fluorescência da curcumina nas diferentes formulações, foram realizadas imagens das formulações com auxílio do microscópio confocal invertido (Zeiss, LSM780) com excitações por um fóton (1P) em 405 nm para a clorina e 488 nm para a curcumina e em 800 nm por dois fótons (2P) no caso da curcumina em emulsão. Utilizou-se modos de imagens espectral e de tempo de vida (FLIM, Fluorescence Lifetime Imaging), bem como por canais em comprimentos de onda específicos para cada FS.

Estudo estabilidade formulações propostas

A fim de monitorar as características dos produtos formulados, foram realizados o estudos de estabilidade acelerado e o estudo de estabilidade de longa duração para os dois

produtos: a curcumina em emulsão na concentração de 1,5 %, denominada *OniFree* e o creme de uréia 40%, denominado *OniCleaner*.

O estudo foi conduzido de acordo com as normas descritas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC-45/2012) ¹¹²– que dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. A qual, solicita que estudo seja realizado em três lotes consecutivos, e os produtos devem estar acondicionados em suas embalagens primárias, ou seja, da mesma forma que os mesmos serão comercializados.

Devido ao produto ser fotossensível, as embalagens primárias devem, obrigatoriamente, ser fotoprotetora e impermeável, por isso, optou-se por embalagens de alumínio, conforme demonstrada na figura 23.

Figura 23 – Embalagens primárias dos produtos, bisnaga de alumínio de 15 g e caixa de papel (A) creme de uréia 40% denominado *OniCleaner* e (B) creme de curcumina 1,5% denominado *OniFree*
Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios foram realizados nas embalagem de maior relação área da embalagem por quantidade de produto. Essa relação para a embalagem 70x70mm (1g) é de 4900 mm²/g, para a de 5 gramas 125x190mm é de 158 mm²/g e para a de 15 gramas 100x145mm de 725 mm²/g. Desta forma, o estudo foi realizado com a embalagem de 15 g, pois, esta possui uma relação de volume de ar por quantidade de produto muito superior às outras.

Os lotes amostrados foram: fevereiro/2016, Maio/2016, Agosto/2016, Novembro/2016 e Fevereiro/2017. E os produtos foram monitorados com relação às suas características físico-químicas. O monitoramento das condições de armazenamento, quanto

ao ambiente de umidade e temperatura eram controlados e funcionavam 24h por dia. Onde temperatura de análise é diferente da temperatura de armazenamento.

Na tabela 5 demostramos as condições adotadas para o estudo de estabilidade acelerada.

Tabela 5 - As condições de acondicionamento para o estudo de estabilidade acelerada

Condições de armazenamento	Temperatura (°C)	Umidade relativa (UR)	Frequência das análises (tempo)	Tempo total do estudo
2-8 °C	25± 2°C	60±5% UR	0,3 e 6 meses	6 meses
15-30 °C	40± 2°C	75±5% UR	0,3 e 6 meses	6 meses
-	50± 2°C	90±5% UR	0,3 e 6 meses	6 meses

Fonte: Elaborada pela autora.

Na tabela 6 demostramos as condições adotadas para o estudo de estabilidade de longa duração.

Tabela 6 – Condições de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração

Condições de armazenamento	Temperatura (°C)	Umidade relativa (UR)	Frequência das análises	Tempo total do estudo
2-8 °C	5± 3°C	-	0,3,6,9,12,18 e 24 meses	24 meses
15-30 °C	30± 2°C	75±5% UR	0,3,6,9,12,18 e 24 meses	24 meses

Fonte: Elaborada pela autora.

O tempo zero é o tempo da realização da análise que deve ser realizada imediatamente antes de iniciar qualquer estudo, são necessários 5 bisnagas ao tempo zero, sendo assim a quantidade mínima para a realização de todo o estudo são de 90 bisnagas. A distribuição do lote aos respectivos estudos é de, aproximadamente, 61% destinados ao estudo de longa duração e 39% ao estudo acelerado. Uma vez concluídos todos os testes e verificações será definido o prazo de validade adotado para cada produto.

Os ensaios realizados no teste de estabilidade foram: Separação de fases, características organolépticas, pH, Resíduo por dessecação, densidade aparente, ensaio de determinação de umidade por Karl Fisher e teor por HPLC.

Teste de separação de fases: Este teste foi realizado para avaliar a integridade do creme, verificando possíveis alterações nos aspectos. Através desses teste verificou-se se o creme se encontrava normal sem alteração; levemente separado ou separado ou precipitado ou turvo.

Pesou-se, aproximadamente, 4g de creme em um tubo de centrifugação, tubos tipo Falcon de 15 mL. Paralelamente, pesou um tubo com água, com mesma massa do tubo com a amostra, e então colocou o tubo com água na centrífuga em posição transversal (oposta) ao tubo com amostra, a fim de manter o equilíbrio da centrífuga durante todo o processo; A centrifugação foi realizadas a 3.000 RPM por 30 minutos;

Características Organolépticas: Ensaios organolépticos (aspecto, cor, odor e tato), Foram realizados para avaliar as características do produto.

- **Aspecto:** Foi observado visualmente se a amostra manteve as características ou se ocorreram alterações do tipo separação de fases, precipitação, turvação, etc;
- **Cor:** A análise da cor foi realizada por meio visual , comparando visualmente a cor da amostra com a cor de um padrão armazenado em frasco da mesma especificação. A Análise foi realizada em luz “branca” natural;
- **Odor:** A amostra e o padrão de referência, acondicionados no mesmo material de embalagem, devem ter seu odor comparado diretamente através do olfato;

Determinação do pH: A medida de pH foi realizada com o auxílio do pHmetro *mPA-210. Marca Tecnozon*. A escala de pH vai de 1 (ácido) a 14 (alcalino), sendo que o valor 7 é considerado pH neutro.

Resíduo por Dessecação: A perda por dessecação refere-se à perda em massa, de água e outros componentes residuais voláteis, por secagem em condições especificadas. Então, pesou-se um cadinho de porcelana vazio em balança analítica calibrada. Colocou-se 2 gramas das amostras e à seguir, foram colocadas na estufa a 60 °C por um período de 24 horas, realizou-se a pesagem novamente. Esse procedimento foi realizado a cada 24 horas, até quando a massa da amostra não mostrou alteração entre uma medida e outra antecedente. (amostra apresentar peso constante, com variação apenas de 0,5 mg)

Foi determinado a massa de amostra inicial, pela equação:

M_v = massa do cadinho vazio

M_a = massa do cadinho com amostra

M_i = massa inicial da amostra, antes da dessecação

Foi determina a porcentagem de massa perdida por dessecação pela equação

$$\left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100 = \text{perda por dessecação} \quad (4)$$

Onde:

M_i = massa inicial da amostra

M_f = Massa final da amostra após dessecação em estufa

Densidade Aparente: Densidade aparente, foi realizada através da análise do volume ocupado pelo creme em uma proveta graduada. Primeiramente, pesou-se a massa da proveta vazia em uma balança analítica calibrada. Na proveta graduada, colocou-se uma pequena quantidade de amostra, para nivelar a superfície da amostra, realizou leves batidas nas laterais da proveta acomodou-se a amostra. A proveta com a amostra foi novamente pesada e determinada a massa das amostras.

Seguindo a equação:

$$M_v - M_a = A \quad (5)$$

Onde:

M_v = massa da proveta vazia

M_a = massa da proveta com amostra

A = massa da amostra

Para determinação da densidade aparente verificou-se o volume ocupado pela amostra na proveta e, pela equação :

$$A / V = D_{ap} \quad (6)$$

Onde:

A = massa da amostra

V = volume ocupado pela amostra

D_{ap} = densidade aparente

Ensaio de determinação de umidade por Karl Fisher: A determinação de teor de umidade foi realizada com o auxílio do aparelho Karl Fisher modelo Q349. Para realização dessa análise pesou 2,5 g da amostra e transferiu para o frasco de titulação e iniciou-se a titulação. O volume gasto do reagente de Karl Fisher, foi transformado em porcentagem de peso de água contida na amostra.

$$\% \text{ de água} = \frac{V \times F}{10 \times P} \quad (7)$$

V- volume gasto (em mL) de Karl Fischer (ler na bureta)
F- fator de correção
P- peso da amostra em g

Determinação da viscosidade: A viscosidade do creme foi determinada em viscosímetro de Brookfield, Marca Fungilab, Modelo viscoled ADV, e padronizaram-se as leituras utilizando-se *spindle R6* do equipamento (*spindle R6* é a parte do equipamento que é colocado na amostra para determinar sua viscosidade, deve ser ajustado para cada amostra, de acordo com a consistência, mais ou menos fluida). O equipamento realiza das análises medindo a força necessária para vencer a resistência que a viscosidade da amostra oferece a um movimento rotacional com velocidade constante e uniforme. O eixo do aparelho é mergulhado 50 gramas da amostra e então é empregada uma velocidade de rotação constante, e o aparelho mede a força exercida pela amostra contra a força de rotação.

Teor por HPLC da curcumina incorporada no creme: Para quantificação dos pigmentos de curcuminóides no creme de curcumina, foram realizadas análises HPLC com o auxílio do equipamento Waters Alliance 2695 HPLC System. A metodologia utilizada foi a mesma descrita descrita no item 4.1.7, porém, a curcumina analisada está em creme, para isso pesou-se 0,5 g do creme de curcumina e colocou-se em balão volumétrico de 50 mL, completando o volume do balão com metanol e deixou em ultrassom por 60 minutos; em seguida realizou a filtração utilizando um filtro de membrana de 0,45µm.

4.2.2 Desenvolvimento do equipamento para o tratamento de pacientes

Outro aspecto importante na busca de melhorar a aplicação da TFD para o tratamento de onicomicoses foi inovar a tecnologia. Inicialmente, o LAT/IFSC-USP,¹¹³ desenvolveu

dispositivos a base de LEDs (Diodos Emissores de Luz), para adequar à geometria dos pés e das mãos para a realização dos ensaios clínicos (Figura 24).

Figura 24-Versões inicial equipamento (Protótipo)

Fonte: Adaptada de SILVA. et al.⁸²

As fontes de luz utilizadas foram os dispositivos LED que emitem um comprimento de onda na região 450 nm de região azul, intensidade 100 mW/cm².

Com a colaboração de podólogos parceiros em São Paulo, Ribeirão Preto e São Carlos, que testaram e opinaram sobre a primeira versão do protótipo Figura 24.⁸² Esta colaboração dos podólogos ao longo desta pesquisa foi essencial para realizarmos melhorias para fornecer maior comodidade tanto para o paciente, como para o operador.

4.3 Estudos clínicos

Com o intuito de aplicar a técnica para o tratamento da doença, foram realizados ensaios clínicos em pacientes infectados que já haviam testado outras terapias; e também realizados testes a fim de determinar a relação entre tipo de microrganismo com eficiência do TFD em pacientes.

4.3.1 Aspectos éticos e casuística

Aspectos éticos

O presente estudo clínico foi aprovado pela comissão de Ética da Universidade Federal de São Carlos. A aprovação do protocolo de pesquisa nº 841.063 (ANEXO A). A aceitação dos pacientes e/ou seus responsáveis foi documentada por meio de Termo Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O TCLE foi elaborado com base no modelo pré

estabelecido pela CAPPesq (ANEXO B). Tal consentimento somente era obtido após esclarecimento do estudo ao paciente ou ao seu responsável pelo pesquisador executante.

Casuística

Foram estudados 30 pacientes com suspeita clínica de onicomicose, tais como alterações da coloração ou da espessura, ou ainda descolamento da lâmina ungueal. Foi solicitado aos voluntários que permaneceram sem tratamento antifúngico por no mínimo 6 meses antes do início do tratamento por TFD. E excluídos pacientes menores de 18 anos; gestantes e voluntários que fizeram uso de antifúngico no tempo inferior a 6 meses antes do começo da participação no estudo clínico.

4.3.2 Identificação dos microrganismos

Com o propósito de identificar os microrganismos que causavam as lesões nos pacientes selecionados, foram coletados materiais para análises (MD, cultura, e diagnóstico molecular) e realizadas imagens de fluorescência e termográficas. Após incluídos no estudo, foram realizadas anotações na ficha de anamnese para acompanhamento do tratamento, assim como marcado os dedos lesionados e devidamente numerados. (ANEXO C)

Foi solicitado aos pacientes que viessem com os pés limpos e secos, para a realização da coleta das imagens e das amostras. Porém, antes das coletas de imagens e amostras, foi realizada assepsia com álcool 70%, a fim de minimizar as contaminações secundárias e sujidades. As amostradas (material proveniente da região de transição entre a unha normal e a porção lesionada) eram coletadas com o auxílio de alicates e lâminas esterilizadas.

O material coletado foi dividido e armazenado separadamente, uma parte da amostra em um tubo do tipo Eppendorf para análises de PCR a temperatura de -20 °C devidamente identificados e a outra parte das amostras em Tubos com meio Stuart para transporte -Absorve[®] para as análises de micologia (direta e cultura).

A. Exame M.D

Exames eram realizados em até no máximo 24 horas. O material coletado foi enviado ao laboratório de microbiologia, para serem preparadas para análises do microscópio óptico por fluorescência com aumento 40x. A preparação consistia em clarificar com KOH+DMSO

(Dissolver 10 g KOH em 60 mL de água destilada e acrescentar a solução de 40 mL de DMSO) para a visualização de elementos fúngicos em escamas de unhas.

B. Exame de cultura

Paralelamente ao MD, as escamas do raspado ungueal foram semeadas em agar *Sabouraud Dextrose* (Difco® – BD & Co, EUA) acrescido com cloranfenicol para o isolamento de leveduras e ágar adicionado com cicloheximida para inibição dos fungos anemófilos. Foram encubados na estufa a 28 °C, durante 4 semanas com revisão periódica a cada 5 dias. Após esse período, as culturas que estavam sem crescimento fúngico foram descartadas. A identificação do agente foi realizada pela avaliação dos aspectos macroscópicos (aspecto, textura, tempo de desenvolvimento das colônias, pigmentação do verso e anverso dos cultivos).

C. Diagnóstico molecular

Inicialmente foram realizadas a padronização das culturas para obter uma concentração maior de concentração de DNA dos principais microrganismos de onicomicose. Para isso, realizou-se a cultura prévia dos m.o ATCC em meio *Sabourand* líquido, e as culturas foram incubadas em agitador por cinco dias a 37 °C em 180 rpm para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e 24 horas para *C. albicans*. Paralelamente, as amostras dos pacientes ficavam armazenadas em freezer à temperatura de -20 °C, em pequenos fragmentos.

Com as amostras nas mesmas condições, realizou-se a extração de DNA dos microrganismos utilizando duas metodologias de extração, uma baseada em fenol-clorofórmio e outra no kit Yeast DNA Purification (Cellco) para as extração do DNA das unhas contaminadas foram realizadas apenas a extração com fenol-clorofórmio.

Fenol-clorofórmio (DNA 1)

As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min. As células fúngicas precipitadas foram maceradas em cadinho com auxílio de pistilo estéril e nitrogênio líquido. Os pedaços de unhas também foram maceradas. Ao material macerado foram adicionados 500 µL de tampão de extração, e o tubo misturado vigorosamente em aparelho vórtex. Em seguida, foram adicionados 500 µL de mistura fenol:clorofórmio (1:1), e o tubo agitado novamente por aproximadamente 10 minutos em vórtex. Após homogeneização, as amostras foram novamente centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, e a fase aquosa (sobrenadante) foi

transferida para outro tubo contendo 900 µL de isopropanol, e então misturada por inversão. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 1 min, e o sobrenadante descartado. Após esse procedimento foi realizada a lavagem das amostras com etanol a 70%, uma nova centrifugação foi realizada a 1200 rpm por 1 min. Ao final, as amostras foram eluídas em 50 µL de água Mili-Q estéril e armazenadas em temperatura de -20 °C.

Kit Yeast DNA Purification (DNA 2)

Transferiu-se 1,5 mL de cada cultura com os microrganismos (m.o) para microtubos, e em seguida centrifugou a 15000 rpm por 1 minuto e descartou-se o sobrenadante. O material centrifugado foi ressuspensionado em 300 µL de *Cell Resuspension Solution*. Adicionou-se 1 µL de *Lyticase Solution* e misturou por inversão o conteúdo por 25 vezes. A amostra foi incubada a 37°C por 60 min, e depois centrifugada a 15000 rpm por 1 min, descartou o sobrenadante. O material restante foi ressuspensionado em 300 µL de *Cell Lysis Solution*. Foi adicionado 100 µL de *Protein Precipitation Solution* e misturou-se com o auxílio do vórtex por 20 segundos para precipitar o conteúdo proteico. A amostra foi centrifugada novamente 15000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, e adicionou-se 300 µL de isopropanol. As amostras foram misturadas por inversão cuidadosamente e centrifugamos a 15000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi secado adequadamente em papel. Adicionou 500 µL de solução de lavagem, e centrifugou-se novamente a 15000 rpm por 1 min, descartando cuidadosamente o sobrenadante. A eluição do pellet de DNA foi realizada em 50 µL de *DNA Hydration Solution*, e os DNAs extraídos foram tratados com o kit com 1,5 µL de RNase e incubamos a 37°C por 30 min.

Quantificação e verificação da integridade de DNA

As quantificações das sete amostras (3 DNAs 1, 3 DNAs 2 e DNA unha) foram realizadas em *NanoView (NanoDrop)*, através das leituras das absorbâncias A260, A260 e A230. As medidas de quantificação em ng/µL foram realizadas em duplicatas de 1 µL.

A verificação de integridade foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Preparo do gel de agarose 1,5%

Em um *erlenmeyer*, adicionou 100 mL de tampão TAE 1X e 1,5g de agarose comum. Fundiu-se a agarose em micro-ondas por 1 minuto. Após o resfriamento, o gel foi corado com

2 µL de brometo de etídio para a marcação e visualização adequada do DNA. O gel foi solidificado em forma com pente para corrida em 15 poços e transferido para a cuba de eletroforese. A cuba foi preenchida com TAE 1x e a ligou em uma fonte a 110V.

Padronização dos primers para PCR convencional de fungos dermatófitos

Segundo Brillowska-Dabrowska (2007)¹¹⁴, utilizamos um par de primers alvo para a região *chitin synthase 1* específica de fungos dermatófitos, e um par alvo para a região ITS 2 específica de *T. rubrum*. Para *C. albicans*, utilizamos segundo Kanbe (2002)¹¹⁵, dois pares de primers específicos para a região do gene da DNA topoisomerase II: CABF59 / CADBR125 e CABF59/CABR110. Os *primers* (ou curtos fragmentos de DNA) para a região ITS1 e ITS4 de fungos foram utilizados como controle positivo, conforme mostrado na tabela 7.

Tabela 7 - Resumo com as informações indicadas aos pares de primers retirado da literatura específica. Sendo: Ta: temperatura de anelamento; Amplicon: o tamanho esperado dos produtos de PCR.

Primer	Ta	Nº de ciclos	Amplicon
<i>panDerm</i>	60°C	45	366 pb
<i>Trubrum</i>	60°C	45	203 pb
<i>C.albicans</i>	57°C	30	515 pb/665 pb
<i>ITS</i>	54°C	35	500 pb

Fonte: Adaptada de KANBE, T. et al.¹¹⁵; DABROWSKA, I. et al.¹¹⁶

Os primers foram sintetizados pela empresa Extend e foram eluídos em volumes de água MiliQ autoclava conforme indicado pelo fabricante. A solução estoque (100 pmol/uL) foi diluída para 1:10 (20 µL de primer: 180 µL de água) em soluções de trabalho (10 pmol/uL), e guardada em freezer -20°C.

Comparamos a eficiência das reações utilizando DNAs extraídos segundo as distintas metodologias citadas acima. Dessa forma, para cada espécie apresenta-se dois resultados em PCR. Cada reação foi montada com base no protocolo padrão, sendo adicionados em um microtubo para PCR: 10 µL de 2xTaq Pol Master Mix*, 1 µL de primer F (10 pmol/uL), 1 µL de primer R (10 pmol/uL), 1 µL de DNA e 7 µL de água MiliQ estéril – reação final em 20 µL. Cinco 5 conjuntos de reações de PCR foram montadas:

Reação específica para *T. rubrum*;

Reação específica para *T. mentagrophytes*;

Reação específica para *C. albicans* (CABF59 / CABR110);

Reação específica para *C. albicans* (CABF59 / CADBR125);

Reação com primers ITS (controle positivo).

*Conteúdo do 2x Taq Pol Master Mix: nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), MgCl₂, loading buffer, estabilizadores de reação e DNA polymerase termoestável

Para cada espécie e seus respectivos primers utilizamos o DNA 2 e o DNA da unha como template de reação. Realizamos uma reação sem DNA para cada conjunto de primers (controle negativo –NTC: no template control)

As reações foram incubadas em termociclador segundo o seguinte ciclo: 95°C por 1 min (desnaturação inicial), 95°C por 30s (desnaturação), 60°C por 30s (anelamento dos primers), 72°C por 1 min (extensão) e 72°C por 2 min (extensão final). Foram realizados 40 ciclos em cada reação. O tempo de extensão foi determinado segundo a processividade da Taq Pol. (1 min por cada 1000 pb).

Verificação das reações de PCR em gel de agarose 1,5%

Os produtos de PCR foram verificados via eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE1x corado com brometo de etídio. Foi aplicado 10 µL de cada reação no gel, juntamente com o marcador Gene Ruller 1kB Plus. Em seguida, o gel foi colocado na cuba de eletroforese com a fonte ligada em 110V durante 30 min. As bandas visualizadas foram fotodocumentadas em um Image Lab Bio-rad.

D. Imagens de Fluorescência e Termográficas

A fim de auxiliar a identificação dos microrganismos nos pacientes, foram recrutados 33 pacientes com suspeita clínica de onicomicose. Para a aquisição das imagens foi solicitado ao participante que compareciam com os pés limpos sem ter usado talco em pó, loção, vaselina, ou qualquer outra limpeza ou produto cosmético, e que não tinha usado produtos antifúngicos por, pelo menos, quatro semanas.⁶⁴

Os pacientes foram distribuídos nos seguintes grupos: Grupo POSITIVO (n=15), Grupo CONTROLE (n=15), que não continha lesões na lâmina ungueal, e Grupo FALSO-POSITIVO (N=3), no qual se encaixam pacientes que não possuem onicomicose, mas cujas

unhas possuem anomalias em sua aparência. Foi solicitado ao paciente manter seus pés descalços e descobertos durante 20 minutos para que eles se adaptassem às condições ambientais do local, controlada a 23° C.

Imagens de fluorescência

Para a análise de fluorescência, utilizou-se um equipamento de imagem de fluorescência de campo amplo (Evince[®], MM Optics, São Carlos-SP), que consiste em um conjunto óptico com um LED emitindo numa faixa de comprimentos de onda 400 nm $\pm$ 10 nm, e cuja intensidade de luz máxima é de 40 mW/cm² $\pm$ 20%. As imagens de fluorescência foram adquiridas com uma câmera fotográfica Sony H50, e as mesmas foram processadas utilizando rotinas desenvolvidas em software MATLAB[®] medindo canais RGB. Estas análises foram realizadas em colaboração com o Renan Arnon Romano GO/IFSC.

Figura 25 - Disposição dos equipamentos para análise de fluorescência (A) Câmera fotográfica, (B) Acoplador e (C) Evidenciador

Fonte: Adaptada de COSTA.¹¹⁷

Imagens Termográficas

Para a termografia, foi utilizada uma câmera FLK Ti400 Fluke[®] com sensibilidade térmica $\leq 0,05$ °C, precisão de ± 2 °C e resolução 320 x 240 pixels. Para as análises, foram extraídas as matrizes de valores de temperatura em cada pixel da imagem através do *software* SmartView[®] 3.6 fornecido pela empresa, e estas matrizes foram processadas utilizando o Software MATLAB[®]. Cada paciente permaneceu 15 minutos em uma sala com temperatura

de 23 °C, o suficiente para que se tenha uma termalização das unhas.¹¹⁸ Estas análises foram realizadas em colaboração com a Ms. Mirian Denise Stringasci GO/IFSC.

Figura 26 – câmera FLK Ti400 Fluke® utilizada para imagens termográficas
Fonte: Elaborada pela autora

4.3.3 Tratamento dos Pacientes por TFD

Foram tratados 30 pacientes com suspeita de onicomicose para o teste das novas formulações, sem predileção por sexo ou tempo de apresentação da lesão. Estes pacientes foram divididos nos seguintes grupos: Grupo A (10 pacientes tratados com Curcumina incorporada em solução); Grupo B (10 pacientes tratados com Curcumina incorporada em Gel) e Grupo C (10 pacientes tratados com Curcumina incorporada em Emulsão). O presente estudo clínico foi aprovado pela Comissão de Ética (ANEXO 1) e a aceitação dos pacientes foi documentada por meio de termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2). Os pacientes foram tratados com o último protótipo do equipamento (Figura 27) e o protocolo pré- estabelecido, conforme segue:

Figura 27 – Protótipo versão 3 do equipamento, versão final que está em fase de aprovação pela ANVISA

Fonte: Elaborada pela autora.

Protocolo clínico

Após os resultados obtidos nos ensaios realizados em pesquisa básica e desenvolvimento da tecnologia, foi estabelecido o protocolo clínico para a pesquisa clínica.

Na Figura 28 é mostrada a assepsia e coleta da unha dos pacientes. Primeiramente foi realizada uma assepsia com álcool 70%; seguida realizada a coleta do material e enviado ao laboratório para as análises.

Figura 28 - Procedimento de assepsia (A) e curetagem da lâmina ungueal (B)

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 29 mostra a aplicação da uréia 40% logo em seguida da assepsia. O agente degradante é aplicado abundantemente por toda a lâmina ungueal, deixando esta em contato por no mínimo 1 hora e após esse período com o auxílio de uma gaze retirou-se o excesso para o passo seguinte.

Figura 29 – Aplicação abundante uréia 40%
Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 30, painel (A) é mostrada a aplicação do FS incorporado em emulsão de curcumina natural a 1,5%, apresentado como creme, foi aplicada em quantidade abundante sobre a lâmina ungueal. Nos ensaios clínicos foram testados também a curcumina incorporada em solução e gel na mesma concentração. Logo em seguida as lesões foram ocluídas com papel filme, painel (B) e papel alumínio para evitar a degradação do FS, painel (C). O tempo de contato do fotossensibilizador com a lesão foi de 30 minutos.

Figura 30 - (A), Aplicação do Fotossensibilizador, (B) proteção com filme de PVC e (C) oclusão com papel alumínio
Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 31 é mostrada como foi realizada a proteção do equipamento. O equipamento deve, obrigatoriamente, ser protegido para evitar contaminação cruzada. Para

isso utilizou-se um acessório plástico específico e descartável que se encaixa na fonte de luz LED.

Figura 31 - Proteção do equipamento com um acessório plástico específico e descartável que se encaixa na fonte de luz LED

Fonte: Elaborada pela autora.

Mostra-se na figura 31, a iluminação da unha com a terceira versão do equipamento. A iluminação foi realizada após o tempo de 30 minutos da aplicação tópica do FS, e manteve por 20 minutos, totalizando na dose energética de 120 J/cm^2 .

Figura 32 - Iluminação da lâmina ungueal com equipamento de velcro por 20 minutos total de dose 120 J/cm^2

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, foi realizada a avaliação clínica do paciente ao final de cada sessão, que ocorreu semanalmente e registrou por imagens fotográficas imagens da unha para acompanhamento. Outras sessões foram realizadas quando necessário repetindo o procedimento acima descrito 1 vez por semana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pesquisa básica – Experimentos *in vitro*

5.1.1 Avaliação do *Trichophyton mentagrophytes* utilizando microscopia confocal de fluorescência.

Cinética das clorinas

A avaliação da cinética das clorinas (cl-e6 e cl-butil) nos microrganismos pode ser observadas nas Figuras 33 e 34, que mostram as imagens de fluorescência de um corte confocal no modo canal. Para facilitar as análises, as imagens foram coloridas artificialmente com recurso do próprio *software* do microscópio (Carl Zeiss, Zen 2012). A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência emitida entre 400-570 nm pelo agente patogênico e a cor vermelha atribuída à região correspondente à fluorescência emitida na região entre 620-700 nm pelas clorinas. Os parâmetros de microscopia para todas as amostras foram mantidos constantes para fins de comparação. A Figura 33 painel (A) mostra a imagem do *T. mentagrophytes* sem FS, também denominado grupo controle, enquanto que, a Figura 33, painéis (B), (C) e (D), mostra o fungo incubado com 150 µg/ mL de cl-e6 por 30, 60 e 90 minutos, respectivamente.

cl-e6

Figura 33-Imagens de fragmentos de *T. mentagrophytes* por microscopia confocal em modo canal para clorina cl-e6. O painel (A) representa o controle, e painéis (B), (C) e (D) correspondem às hifas na solução de cl-e6 na concentração de 150 µg/mL incubadas durante 30, 60 e 90 minutos, respectivamente. A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência do agente patogênico, e a cor vermelha atribuída às pelas clorinas. Os parâmetros de microscopia foram mantidos constantes para comparação. A barra de escala equivale a 200 micrômetros

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 34 mostra as imagens de fluorescência das hifas de *Trichophyton* incubadas com 150 µg/ mL de cl-butil. A Figura 34 painel (A), mostra as hifas sem FS, grupo controle, enquanto que, as Figuras 34 painéis (B), (C) e (D), mostra o fungo incubado com cl-butil por 30, 60 e 90 minutos, respectivamente.

cl-butil

Figura 34- Imagens de *T. mentagrophytes* incubados com cl-butil, realizadas por microscopia confocal em modo canal. Painel (A) representa o controle, e painéis (B), (C) e (D) correspondem às hifas na solução de cl-butil na concentração de 150 µg/mL incubadas durante 30, 60 e 90 minutos, respectivamente. A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência do agente patogênico, e a cor vermelha atribuída às pelas clorinas. Os parâmetros de microscopia foram mantidos constantes para comparação. A barra de escala equivale a 200 micrometros

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora as duas clorinas incorporam-se ao microrganismo de forma efetiva para todos os tempos de incubação utilizados, foi possível observar uma maior penetração do FS cl-butil no interior das hifas (Figura 34, painéis B, C e D) quando comparada com a cl-e6 (Figura 33, painéis B, C e D). Isso se deve ao fato de que a cl-butil apresentam um grupo ácido carboxílico nas moléculas deixando o composto mais hidrofílico, o que facilita a sua penetração no meio celular, enquanto que a cl-e6 apresenta um grupo éster.⁶³

Em todos os tempos de incubação analisados, foi possível observar a presença das duas clorinas cl-e6 e cl-butil no interior das hifas (cor vermelha nas Figuras 33 e 34). Nas Figuras 33 painel C e 34 painel C é possível constatar maior intensidade da fluorescência das clorinas no interior das hifas após 60 minutos de incubação, enquanto que após 90 minutos de incubação observa-se, levemente, a diminuição da fluorescência do FS em algumas partes das hifas (Figuras 33 painel D e Figura 34 painel D). Desta forma, foi considerado que o melhor tempo de incubação é 60 minutos para ambas clorinas.

Cinética da Curcumina natural

A avaliação da cinética, nos *Trichophyton*, da curcumina natural extraída diretamente do açafrão em solução pode ser observada na Figura 35. As imagens de fluorescência mostradas são de um corte confocal no modo canal. Para facilitar as análises, as imagens também foram coloridas artificialmente com recurso do *software* do microscópio (Carl Zeiss, Zen 2012). No entanto, a cor verde corresponde tanto à região da autofluorescência do agente patogênico, como da fluorescência emitida pela curcumina, uma vez que ambos emitem entre 400-570 nm. As análises, então, foram realizadas pela diferença na intensidade da cor verde: quanto mais intensa, mais FS se encontra nas hifas. Os parâmetros de microscopia para todas as amostras foram mantidos constantes para fins de comparação. A Figura 35, painel (A) mostra o fungo sem FS, enquanto que a Figura 35 painéis (B), (C), (D) e (E), mostra o fungo incubado em 150 µg/ mL de solução de curcumina natural por 10, 15, 20 e 30 minutos, respectivamente.

Figura 35- Imagens de *T. mentagrophytes* incubados com curcumina natural realizadas por microscopia confocal em modo canal. Painel (A) representa o controle, e painéis (B), (C), (D) e (E) correspondem às hifas em 150 µg / mL de solução de curcumina natural na concentração de 150 µg/mL incubadas durante 10, 15, 20 e 30 minutos, respectivamente. A cor verde corresponde tanto à região da autofluorescência do agente patogênico, assim como, da fluorescência emitida pela curcumina, ambos emitem entre 400-570 nm, a análise é realizada através da intensidade da fluorescência. Os parâmetros de microscopia foram mantidos constantes para comparação. A barra de escala equivale a 200 micrometros

Fonte: Elaborada pela autora.

Nesta análise, observa-se a presença de curcumina no interior das hifas para todos os tempos de incubação. Entende-se que, quanto maior o tempo de incubação, mais elevada é a intensidade de fluorescência do FS no interior do patógeno. A curcumina mostrou afinidade para o fungo, com apenas 10 minutos de incubação e, após 20 minutos de incubação do composto, é possível observar a curcumina natural em toda as hifas, enquanto que após 30

minutos decai a fluorescência do FS no patógeno. Em contrapartida, o melhor tempo de incubação para as clorinas foi de 60 minutos, sendo que, em tempos de incubação menores, não foi possível verificar a fluorescência do FS em todas as hifas.

Através deste estudo, portanto, foi possível determinar o melhor tempo de incubação para cada fotossensibilizador, sendo o tempo de 20 minutos para a curcumina e de 60 minutos para as clorinas.

Avaliação do efeito da TFD em hifas de *T. mentagrophytes*

A fim de verificar possíveis danos nas hifas dos fragmentos do *T. mentagrophytes* logo após a realização da TFD, foram analisadas as imagens de fluorescência por microscopia confocal para as duas classes de FS, clorinas e curcumina.

Efeito da TFD nos microrganismos incubados com clorinas

Devido ao ensaio de cinética, o microrganismo ficou incubado com 150 µg/mL de solução de cl e-6 por 60 minutos, por ser considerado o melhor tempo de incubação. Após esse tempo, as amostras foram irradiadas na *Biotable* emitindo em 660 nm e, em seguida, foram lavadas para retirar o excesso de FS, dispostas nas lâminas e as imagens foram realizadas. Na Figura 36, estão mostrados fragmentos dos fungos incubados com a cl-e6, logo após a TFD. A Figura 36, painéis (A), (B), (C) e (D), mostra imagens das hifas imediatamente após a TFD irradiadas por 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente.

cl-e6

Figura 36-As imagens de microscopia confocal de *T. mentagrophytes*, incubado com cl-e6, imediatamente após o tratamento por TFD. Os painéis (A), (B), (C) e (D) refere-se às hifas incubadas com cl-e6 e irradiadas por 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência do agente patogênico, e a cor vermelha atribuída às pelas clorinas. A barra de escala equivale a 200 micrometros

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 37, painéis (A), (B), (C) e (D), mostra as imagens das hifas incubadas por 60 minutos em cl-butil e irradiadas por 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente.

cl-butil

Figura 37-As imagens de microscopia confocal de *T. mentagrophytes*, incubado com cl-butil, imediatamente após o tratamento por TFD. Os painéis (A), (B), (C) e (D) refere-se às hifas incubadas com cl-e6 e irradiadas por 5, 10, 15 e 20 minutos, respectivamente. A cor verde foi atribuída à região correspondente à autofluorescência do agente patogênico, e a cor vermelha atribuída às pelas clorinas. A barra de escala equivale a 200 micrometros

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que, após a realização da TFD em solução de clorinas (cl-e6 e cl-butil), apesar das hifas não apresentarem nenhuma mudança visível em suas estruturas, nem mesmo após 20 minutos de irradiação, foi possível observar a diminuição da intensidade de emissão dos FS conforme o aumento do tempo de irradiação. Isto provavelmente aconteceu devido à fotodegradação dos FS provocada pela irradiação.

Efeito da TFD nos microrganismos incubados com curcumina natural

O efeito da TFD também foi avaliado em fragmentos incubados com curcumina natural (150 µg/mL). As hifas foram irradiadas nos tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos para compraração dos resultados. Na Figura 38, painéis (A), (B), (C) e (D). Observa-se a dimuição da intensidade de fluorescência da curcumina natural nos microrganismos, sem observar danos na morfologia das hifas, semelhante aos resultados com as clorinas.

Figura 38- As imagens de microscopia confocal de *T. mentagrophytes*, incubados em curcumina, imediatamente após o tratamento por TFD nos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos, (A) (B), (C) e (D), respectivamente. A cor verde corresponde tanto à região

da autofluorescência do agente patogênico, assim como, da fluorescência emitida pela curcumina, ambos emitem entre 400-570 nm, a análise é realizada através da intensidade da fluorescência. A barra de escala equivale a 200 micrometros

Fonte: Elaborada pela autora.

Através destas análises verificamos o decaimento da fluorescência da curcumina conforme o aumento do tempo de irradiação do microrganismos incubados com curcumina.

5.1.2 Avaliação da efetividade da TFD sobre o crescimento *in vitro* de *T. Mentagrophytes* de *T. rubrum* e *C. Albicans* após contagem de UFCs

Avaliação da eficácia da TFD *in vitro* com clorinas (cl-e6 e cl-butil) após contagem de UFCs

A TFD foi realizada, inicialmente, com a clorina e6 nas seguintes concentrações 0,25, 0,05, 0,01 µg/mL. As amostras foram incubadas por 60 minutos e irradiadas na *biotable* em 660 nm, com a dose máxima 42 J/cm² e os resultados estão apresentados na Figura 39. Observa-se que os controles (F-L-), e (F+L-) e (F-L+), cresceram normalmente, mostrando que tanto a clorina e-6 (F+L-) quanto a luz não são tóxicas para ao fungo. Os grupos submetidos à TFD não mostraram inibição significativa no crescimento dos microrganismos.

Figura 39-Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos a TFD utilizando cl-e6 como FS, com baixas concentrações. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL e 0.10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de avaliar o motivo da falta de inativação deste microrganismos com a cl-e6, foram realizados experimentos aumentando as concentrações, além de avaliar o outro composto, a cl-butil, sintetizado por Uliana, M. P *et al.*, que obtiveram bons resultados quando testados com os microrganismos *A. aureus* e *C. albicans*.⁶¹

Sendo assim, utilizando os FS cl-e6 e cl-butil em concentrações mais elevadas (0,6 µg/mL; 1,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL), está mostrada a fração de sobrevivência de fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos a TFD na Figura 40.

Figura 40-Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos a TFD utilizando cl-e6 e cl-butyl como FS. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações, com concentrações 0,6 µg/mL; 1,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0 µg/mL e 10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

Nesses ensaios, foi observado que, para ambos FS (cl-e6 e cl-butil), os três grupos controles (F-L-), (F-L+) e (F+L-) cresceram normalmente, mostrando que tanto a luz, quanto os FS não foram tóxicos aos microrganismos, quando analisados separadamente. Todos os grupos submetidos à TFD tiveram inibição do crescimento dos fungos, sendo que, conforme a dose de luz e concentração do FS foram aumentados, a inibição do crescimento das colônias também aumentou. Observa-se ainda que tanto a clorina e6 quanto a cl-butil na concentração 10 µg/mL reduziram 8 log deste microrganismo, quando realizado a TFD, em todos os tempos de irradiação (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05).

Na Figura 40, pode-se observar que, em todos os grupos submetidos à TFD, a cl-e6 teve maior ou igual crescimento dos fungos quando comparada com a cl-butil. A concentração de 0,5 µg/mL evidencia essa diferença, quando a cl-butil não apresentou crescimento em nenhuma condição avaliada (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato da cl-butil ter maior penetração nas hifas dos microrganismos, conforme verificou-se nas imagens realizadas por microscopia confocal. Através desses experimentos, concluímos que quanto maior a concentração de FS no interior dos microrganismos, maiores serão os danos e, conseqüentemente, maior será a inibição dos mesmos, quando a TFD é realizada. Esse resultado, então, justifica os resultados obtidos no microscópio confocal, onde a cl-butil foi mais eficaz na incorporação do microrganismo do que a cl-e6.

A resposta nas taxas de inibição do crescimento dos patógenos revela o potencial da TFD utilizando as clorinas como FS. As clorinas foram selecionadas neste estudo porque elas já são amplamente utilizadas em TFD contra microrganismos, especialmente a clorina cl-e6, que é comercial, sob a forma de sal, com o nome de Photoditazine®,^{60-61,86} e ainda porque são ativadas em comprimento de onda de 660 nm, comprimento de onda de maior penetração no tecido quando comparado à 450 nm ou mesmo 630 nm. Assim, esse FS permitiria propor o tratamento de lesões mais profundas já que são, ainda, facilmente obtidas da clorofila, um produto natural e, por isso, com um custo reduzido.

Avaliação da Eficácia da TFD in vitro com curcuminas após contagem de UFCs

Os estudo com as curcuminas foram realizados com os três microrganismos: *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *C. albicans* submetidos à TFD. Também foram avaliadas, neste estudo, diferentes tipos de curcumina (Sintética, natural, Sigma e Sal de curcuminóides) nas mesmas concentrações e dose de energia. O tempo de incubação foi de 20 minutos para todos os ensaios.

Na Figura 41, pode ser observada a fração de sobrevivência obtida para os fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos a TFD utilizando as quatro variações de curcumina como FS.

Figura 41-Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *T. mentagrophytes* submetidos a TFD utilizando as quatro variações de curcumina como FS. (Sintética, Sigma, Extraída natural e Sal de curcuminóides). Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. O símbolo “*” representa os grupos que não apresentaram diferença estatística significativa (P-valor <0,05) em relação ao grupo controle F-L+. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que todos os grupos controles testados não tiveram reduções significativas quando comparados ao grupo de referência, (F-L-).

Utilizando a **curcumina sintética**, ocorreu inibição em todos os grupos realizados TFD, sendo que a redução nas concentrações de curcumina 0,025 e 0,05 µg/mL foram semelhantes, reduzindo aproximadamente 3 log para os tempos de 1 e 5 minutos de iluminação e de 5 Log nos tempos de 10 e 20 minutos de iluminação (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05). Na maior concentração de FS, 0,10 µg/mL, teve crescimento de colônias apenas no grupo que foi iluminado por 1 minuto e nas maiores doses de energia, 5, 10 e 20 minutos, não foi observado o crescimento dos microrganismos (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Com a **curcumina da Sigma Aldrich®**, não foi observado a redução em nenhum grupo iluminado por 1 minuto. Com a concentração de 0,025 µg/mL ocorreu inibição de, aproximadamente, apenas 1 log, quando irradiadas por 5 e 10 minutos e, com 0,05 µg/mL, houve redução de 1 log no grupo irradiado por 5 minutos e inibição total de crescimento nos grupos de 10 e 20 minutos de irradiação.

Nos grupos que foram realizados a TFD utilizando a **curcumina natural**, observou-se inativação total dos microrganismos em todas as condições analisadas (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05). Esse resultado não era esperado, visto que essa curcumina contém 57,64% do pigmento curcumina, enquanto que a da Sigma Aldrich® tem 84,87 % e acreditava-se que o pigmento curcumina tivesse maior atividade

O uso do **sal de curcuminóides** mostrou inibição dos microrganismos na maior concentração de FS, 0,10 µg/mL, e maior dose de energia, 20 minutos, sendo que não foi observada redução significativa em nenhuma outra condição. Como foi adicionado N-D glucamina com a intenção de melhorar a penetração do FS no microrganismo, esperava-se que esse grupo tivesse uma boa inibição, porém ocorreu o contrário.

Quando comparamos os resultados das quatro curcuminas na inativação do *T.mentagrophytes*, pode-se considerar que a curcumina natural foi a que mais inativou o crescimentos do fungo, seguida pela curcumina da Sigma Aldrich, a curcumina sintética e, por último, o sal de curcuminóides.

A fim de verificar possíveis diferenças na inativação de diferentes microrganismos, foram realizados experimentos com *T. rubrum* e *C. albicans* nas mesmas condições experimentais utilizadas em *T. mentagrophytes*. A Figura 42 mostra os resultados obtidos para o *T. rubrum*.

Figura 42-Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *T. rubrum* submetidos a TFD utilizando quatro variações de curcumina como FS. (Sintética, Sigma, Extraída natural e Sal de curcuminóides). Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível visualizar que os resultados para o *T. rubrum* foram semelhantes aos ensaios realizados com o *T. mentagrophytes*.

Os grupos controles testados também não tiveram reduções significativas, quando comparados ao grupo de referência, o grupo (F-L-).

Os grupos que foram realizados a TFD utilizando a **curcumina sintética** ocorreu inibição todas as condições testadas, sendo que nas concentrações de curcumina de 0,025 µg/mL não teve redução significativa, enquanto na concentração de 0,05 µg/mL, houve redução de aproximadamente 2 log nos tempos de 1 e 5 minutos de iluminação. A redução dos grupos iluminados por 10 e 20 minutos foram de 3 log e, se comparados aos resultados obtidos para o *T. mentagrophytes* nos mesmos parâmetros, observa-se um efeito reduzido de 2 log. Na maior concentração de FS, 0,10 µg/mL, foi observado um crescimento de, aproximadamente, 3 log no grupo iluminado por 1 minuto. Já nas maiores dose de energia 5, 10 e 20 minutos, não houve crescimento dos microrganismos (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Os resultados obtidos com o uso da **curcumina da Sigma Aldrich®** em *T. rubrum* ficaram muito próximos dos ensaios realizados com *T. mentagrophytes*, Portanto, não foi observada a redução em nenhum grupo iluminado por 1 minuto e houve redução 1 log nas concentrações do FS de 0,025 µg/mL irradiadas por 5 e 10 minutos e na concentração de 0,05 µg/mL irradiado por 5 minutos. A inibição total de crescimento ocorreu nos grupos de 10 e 20 minutos de irradiação para a maior concentração. (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Com a **curcumina natural**, observou-se a inativação dos microrganismos em quase todas as condições analisadas assim como os testes realizados para o *T. mentagrophytes* (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05). Entretanto, houve crescimento no grupo com concentração de 0,025 µg/mL e irradiação por 1 minuto.

Nos grupos com o **sal de curcuminóides** em *T. rubrum* bem como os ensaios realizados com *T. mentagrophytes*, não foi observado reduções significativas nos grupos TFD, exceto a inibição de, aproximadamente, 5 Log, na maior concentração de FS e maior dose de energia.

Portanto, a inativação das duas espécies de *Trichophyton* foram semelhantes quando comparados os resultados obtidos com as quatro curcuminas. Entretanto, observou-se uma

resistência um pouco maior nos grupos tratados com a curcumina da Sigma Aldrich® e com a Curcumina natural para o *Trichophyton rubrum* quando comparado ao *Trichophyton mentagrophytes*. Mesmo assim, manteve-se a ordem de maior inativação dos *T. rubrum*, sendo a curcumina natural, seguida pela Sigma Aldrich®, curcumina sintética e o Sal de curcuminóides.

Na Figura 43, foram analisados os resultados dos ensaios com a levedura *C. albicans*, que não mostraram grandes mudanças quando comparados aos resultados dos fungos. No entanto, de forma geral, a *C. albicans* apresentou maior resistência à inativação por TFD nas mesmas condições analisadas quando comparamos os três microrganismos.

Os grupos controles não apresentaram reduções significativas e para os grupos que foram realizados a TFD utilizando a **curcumina sintética**, ocorreu inibição em todos os grupos. Entretanto, na concentração de 0,025, houve redução de menos de 1 log e na de 0,05 µg/mL a redução foi de, aproximadamente, 1 log em todos os tempos de iluminação. As reduções significativas foram observadas apenas na maior concentração de FS, 0,10 µg/mL, com redução de, aproximadamente, 4 logs no grupo iluminado por 1 minuto e ausência de crescimento de colônia nos grupos iluminados por 5 e 10 minutos. Porém, foi observado crescimento novamente no grupo iluminado por 20 minutos.

Os resultados obtidos com a **curcumina da Sigma Aldrich®** ficaram muito semelhantes aos dos ensaios realizados com os fungos. Não foram observado a redução em nenhum grupo iluminado por 1 minuto. Nas concentrações do FS de 0,025 µg/mL, ocorreu inibição de aproximadamente 1 log quando irradiadas por 5 e 10 minutos e inativação total quando irradiado por 20 minutos (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05). Na concentração de 0,05 µg/mL, houve redução de 1 log no grupo irradiado por 5 minutos e inibição total de crescimento nos grupos de 10 e 20 minutos de irradiação.

A **curcumina natural** mostrou inativação dos microrganismos em quase todas as condições analisadas (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05). Entretanto, observou-se crescimento no grupo em que a concentração foi de 0,025 µg/mL e irradiada por 1 minuto.

Os grupos que foram realizados a TFD utilizando o **sal de curcuminóides** não mostraram resultados diferentes dos ensaios com os fungos e, portanto, não foram observadas

muitas reduções nos grupos TFD, exceto a inibição das leveduras na maior concentração de FS, 0,10 µg/mL, e maior dose de energia (20 minutos). Através desses resultados, portanto, ficou evidente a eficácia das curcuminas para a inativação dos três microrganismos *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *C. albicans*. Observa-se uma resistência um pouco maior da levedura nos grupos tratados com curcuminas da Sigma Aldrich e os grupos com curcumina natural. A ordem de maior inativação dos três microrganismos foram: a curcumina natural, seguida pela curcumina da Sigma Aldrich, curcumina sintética e por último o Sal de curcuminóides.

Figura 43-Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *C. albicans* submetidos a TFD utilizando as quatro variações de curcumina como FS. (Sintética, Sigma, Extraída natural e Sal de curcuminóides). Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10% DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

Não era esperado essa ordem de inativação, uma vez que acreditava-se que o pigmento curcumina fosse o mais efetivo para inativação de microrganismos.

A curcumina natural é extraída diretamente da raiz do açafrão (*Curcuma longa*) e, portanto, tem uma origem natural. Uma das vantagens de utilizar essa curcumina é que ela não requer processos elaborados para a sua obtenção, além do fato do açafrão ser amplamente utilizado na preparação de alimentos e, então, é conhecido que ele é facilmente eliminado pelo corpo e apresenta baixa toxicidade. Além disso, a curcumina é um composto já aplicado em saúde, facilitando sua investigação e utilização.¹¹⁶⁻¹¹⁷ A desvantagem do uso deste tipo de curcumina é a sazonalidade que, dependendo da origem do açafrão, obtém-se proporções diferentes de curcumina e curcuminóides. A idéia de sintetizar uma curcumina sintética foi, então, para solucionar este problema e garantir 100% do pigmento curcumina.

Contudo, uma tentativa de uso de curcumina sintética (pura) apontou para uma menor atividade antimicrobial nos microrganismos, levantando algumas dúvidas sobre uma atividade muito pronunciada dos curcuminóides minoritários (DC e BDC) do extrato ou mesmo para um possível sinergismo entre todos eles. Há ainda uma terceira hipótese de que, sendo a curcumina bem mais sensível à fotodegradação que os outros dois curcuminóides, ela esteja se decompondo rapidamente e desempenhando uma atividade fotodinâmica de curto prazo. Assim, os compostos remanescentes DC e BDC do extrato é quem realizariam a atividade fotodinâmica após os primeiros minutos de ação da luz. A fim de obter essas respostas foram realizados novos experimentos para entender a ação dos pigmentos curcuminóides separadamente, quando realizada a TFD.

De qualquer forma, as curcuminas foram mais eficazes na inativação dos microrganismos estudados, quando comparada às clorinas, já que apresentaram inativação total em concentrações até 100 vezes menores que as concentrações testadas para as clorinas. Além disso, a curcumina mostrou maior afinidade com os microrganismos, observado incorporação do FS após 20 minutos de incubação, enquanto foram necessários 60 minutos para as clorinas.

É importante lembrar que este foi um estudo *in vitro* e, portanto, não foram simuladas as condições possivelmente encontradas clinicamente. Apesar disso, os resultados obtidos demonstraram que a TFD pode representar uma alternativa promissora para o tratamento de onicomicose, incluindo infecções resistentes.

Determinação da curcumina e curcuminóides por cromatografia líquida de alta performance

As proporções de cada curcuminóide presente na curcumina natural e na curcumina sintética da Sigma Aldrich® foram demonstrada através de análises realizadas por HPLC. Nas Figuras 44, 45 e 46 estão as curvas de calibração analíticas, realizadas com os três pigmentos padrões de curcuminóides da Sigma-Aldrich®. A equação da reta foi obtida através da regressão linear dos pontos obtidos pela análise de diferentes concentrações conhecidas dos padrões analíticos. Assim, foi possível estimar a equação de equivalência das áreas pela concentração das amostras. Na Figura 44, é mostrada a curva de calibração analítica do pigmento padrão curcumina da Sigma Aldrich®. A curva é obtida através do cálculo da área dos picos obtidos no cromatograma (Anexos E ao J), referente a curcumina.

Uma vez determinada a equação da reta do padrão curcumina, padrão com concentração conhecida, foi possível determinar a concentração da amostra. Na Tabela 8, verifica-se os parâmetros analisados para determinar a relação entre a concentração e a área do pigmento avaliado em 5 concentrações, sendo a concentração inicial denominada ‘concentração mãe’ e, a partir dessa concentração, obteve-se a amostra diluída conc 1, conc 2, conc 3, conc 4 e conc 5. O grupos denominados m1, m2 e m3 são referentes as triplicatas.

Figura 44-curva analítica padrão sigma Aldrich curcumina

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8- Parâmetros para determinação de concentração e área do padrão curcumina Sigma Aldrich

CURCUMINA						
	m1		m2		m3	
	conc.	Área	conc.	Área	conc.	Área
Conc. Mãe	1,06		1,08		1,07	
Conc. 1	0,0106	311846	0,0108	309102	0,0107	314735
Conc. 2	0,0212	641407	0,0216	645643	0,0214	697149
Conc. 3	0,053	1721280	0,054	1504192	0,0535	1655843,8
Conc. 4	0,106	3811698	0,108	3910350	0,107	3917153,2
Conc. 5	0,212	7749296	0,216	7538954	0,214	7594359,6

	concentração média	desvio padrão	CV concentração	área média	desvio padrão	CV área
Conc. 1	0,0107	0,0001	0,93	311894,33	2816,811	0,9
Conc. 2	0,0214	0,0002	0,93	661399,67	31032,19	4,7
Conc. 3	0,0535	0,0005	0,93	1627105,3	111360,8	6,8
Conc. 4	0,107	0,001	0,93	3879733,7	59018,78	1,5
Conc. 5	0,214	0,002	0,93	7627536,5	109025,1	1,4

Fonte: Elaborada pela autora.

*O CV é o coeficiente de variação, obtido pela razão entre o desvio-padrão e a média (expresso em porcentagem), usado para estimar a precisão de experimentos. Quanto menor o CV, maior a precisão dos dados. Se for menor ou igual a 15% → baixa dispersão: dados homogêneos; entre 15 e 30%, média dispersão e maior que 30% → alta dispersão: dados heterogêneos. No caso, o CV foi menor que 15, mostrando que as amostras analisadas estavam homogêneas. Os pontos de interesse são os dados na tabela em azul, que mostra a relação entre concentração média e área média.

Na Figura 45 é mostrada a curva de calibração do pigmento padrão demetoxicurcumina da Sigma Aldrich®. A curva foi obtida através do cálculo da área dos picos obtidos no cromatograma (Anexos E ao J), referente a demetoxicurcumina e, então, determinou-se a equação da reta e, conseqüentemente, a concentração da amostra. Na Tabela 9, estão mostrados os parâmetros analisados para determinar a relação entre a concentração e a área do pigmento avaliado.

Figura 45- curva analítica padrão sigma Aldrich demetoxicurcumina
 Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9- Parâmetros para determinação de concentração e área do padrão DC Sigma Aldrich

DEMETOXI-CURCUMINA						
	m1		m2		m3	
	conc.	Área	conc.	Área	conc.	Área
Conc. Mãe	0,99		1,03		1,07	
Conc. 1	0,0099	445139	0,0103	472604,33	0,0107	497992
Conc. 2	0,0198	1000225	0,0206	1034304	0,0214	1042418
Conc. 3	0,0495	2412200	0,0515	2518310,5	0,0535	2584740
Conc. 4	0,099	5315995	0,103	5533233,2	0,107	5759513
Conc. 5	0,198	10451376	0,206	10882150	0,214	11409748

	concentração média	desvio padrão	CV concentração	área média	desvio padrão	CV área
Conc. 1	0,0103	0,0004	3,883495146	471911,78	26433,31	5,6013235
Conc. 2	0,0206	0,0008	3,883495146	1025649	22388,48	2,1828599
Conc. 3	0,0515	0,002	3,883495146	2505083,5	87027,17	3,4740227
Conc. 4	0,103	0,004	3,883495146	5536247,1	221774,4	4,005861
Conc. 5	0,206	0,008	3,883495146	10914425	480000,5	4,3978541

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que o CV foi menor que 15, mostrando que as amostras analisadas estavam homogêneas.

Na Figura 46, é mostrada a curva de calibração do pigmento padrão bis-demetoxicurcumina da Sigma Aldrich®. A curva foi obtida seguindo os mesmos procedimentos anteriores. Na tabela 10, verifica-se os parâmetros analisados para determinar a relação entre a concentração e a área do pigmento avaliado.

Figura 46- curva analítica padrão sigma Aldrich bis-demetoxicurcumina
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 10- Parâmetros para determinação de concnetração e área do padrão BDC da Sigma Aldrich

BIS-DEMETOXI-CURCUMINA						
	m1		m2		m3	
	conc.	Área	conc.	Área	conc.	Área
Conc. Mãe	0,73		0,74		0,72	
Conc. 1	0,0073	207975	0,0074	201507	0,0072	206821
Conc. 2	0,0146	475730	0,0148	490917	0,0144	493475
Conc. 3	0,0365	1149983	0,037	1206107	0,036	1205780
Conc. 4	0,073	2591889	0,074	2593929	0,072	2575522
Conc. 5	0,146	5087645	0,148	5054391	0,144	5078686
	concentração média	desvio padrão	CV concentração	área média	desvio padrão	CV área
Conc. 1	0,0073	0,0001	1,369863014	205434,33	3449,767	1,6792551
Conc. 2	0,0146	0,0002	1,369863014	486707,33	9592,3	1,9708559
Conc. 3	0,0365	0,0005	1,369863014	1187290	32309,22	2,7212579
Conc. 4	0,073	0,001	1,369863014	2587113,3	10090,08	0,390013
Conc. 5	0,146	0,002	1,369863014	5073574	17206,29	0,3391356

Fonte: Elaborada pela autora.

Como o CV foi menor que 15, pode-se, mais uma vez, afirmar que as amostras estavam homogêneas.

Uma vez determinada a concentração e área dos 3 pigmentos curcuminóides, separadamente, o teor foi quantificado para cada um dos três pigmentos encontrados nas curcuminas natural da PDT Pharma[®] e da curcumina sintética adquirida da Sigma Aldrich[®].

Tabela 11- Determinação da concentração dos pigmentos curcuminóides da curcumina natural (extração PDT) e correlação, em porcentagem, de cada pigmento encontrado na amostra

concentração teórica = 0,25						
PDT Pharma [®]						
	1		2		3	
	área	conc.	área	conc.	área	conc.
BDC	1311787	0,038	1308652	0,038	1323774	0,039
DC	1202613	0,024	1197914	0,024	1210634	0,024
C	3003130	0,085	3004535	0,085	3028607	0,086
	média		conc.			
BDC	1314738		0,038			
DC	1203720		0,024			
C	3012091		0,085			
	área	conc.	área	conc.	área	conc.
% BDC	23,775	26,001	23,746	25,965	23,796	26,019
% DC	21,796	16,381	21,736	16,336	21,762	16,352
% C	54,429	57,618	54,518	57,699	54,442	57,629
	área		concentração			
	média	desv.pad	média	desv.pad		
% BDC	23,772	0,025	25,995	0,027		
% DC	21,765	0,030	16,356	0,023		
% C	54,463	0,048	57,649	0,044

Tabela 12-Determinação da concentração dos pigmentos curcuminóides da curcumina Sintética Sigma Aldrich e correlação, em porcentagem, de cada pigmento encontrado na amostra

concentração teórica = 0,25

	Sigma Aldrich®					
	1		2		3	
	área	conc.	área	conc.	área	conc.
BDC	259727	0,009	258991	0,009	255724	0,009
DC	1636198	0,032	1629190	0,032	1612069	0,032
C	8292593	0,231	8258171	0,230	8175275	0,228

	média	conc.
BDC	258147,3	0,009
DC	1625819	0,032
C	8242013	0,229

	área	conc.	área	conc.	área	conc.
% BDC	2,549	3,201	2,553	3,206	2,546	3,204
% DC	16,059	11,919	16,057	11,918	16,052	11,917
% C	81,392	84,880	81,391	84,876	81,402	84,879

	área	
	média	desv.pad
% BDC	2,549	0,003
% DC	16,056	0,004
% C	81,395	0,006

	concentração	
	média	desv.pad
% BDC	3,203	0,003
% DC	11,918	0,001
% C	84,878	0,002

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos foram, para a curcumina sintética da Sigma Aldrich®: curcumina: 84,87%, desvio padrão (DV) =0,003; DC: 11,91% - DV= 0,001 e BDC: 3,20 % - DV=0,002. Enquanto que os resultados quantitativos da Curcumina Natural, extraída pela PDT Pharma®, foram: curcumina: 57,64% - DV=0,044; DC: 16,35% - DV= 0,023 e BDC: 25,99% - DV=0,027.

Observa-se nesses ensaios que tanto a amostra da extração de curcumina natural (PDT PHARMA®) quanto a amostra de curcumina sintética (Sigma Aldrich®), apresentaram teor dos pigmentos curcuminóides inferior ao padrão utilizado. Acredita-se que esse resultado foi devido ao processo de síntese e/ou extração realizadas nas amostras analisadas, que podem conter impurezas, assim como os pigmento podem ter sofrido degradação ou, ainda, pode

haver a presença de moléculas anantiômeras, que não foram detectadas pelo método analítico utilizado.

Ainda avaliando esses resultados, nota-se uma diferença entre as proporções de pigmentos curcuminóides encontrados na amostra de curcumina natural (PDT Pharma®) e sintética (SigmaAldrich®). Portanto, quando avaliamos os ensaios *in vitro*, pode-se sugerir que a presença de diferentes pigmentos curcuminóides em uma mesma formulação/amostra promovem uma maior efetividade na inativação dos microrganismos devido ao fenômeno de sinergismos entre eles.

Análises por HPLC mostrma que a diferença nas proporções dos pigmentos curcuminóides podem ter favorecido os resultados e, por isso, o insumo (curcumina Natural) foi escolhido para a produção do creme para os ensaios clínicos.

Cromatografia em Camada Fina e Camada Delgada.

Na Figura 47, observa-se os resultados da separação dos pigmentos curcuminóides em placa preparativa, por CCD, onde a fase estacionária utilizada era constituída de sílica gel e a fase móvel é formada por diferentes solventes. A Figura 47 painéis (A, B, C, D, E e F) mostra a Cromatografia de camada fina, sendo observado no painel (A) os solventes Hexano e Acetato nas proporções 1:1 e 7:3, mostrando que esses solventes não separam os três pigmentos. Enquanto que, no painel (B), observa-se os solventes Tolueno e Acetato nas proporções 9:1, 7:3 e 1:1, as quais visualiza-se uma leve separação na proporção 7:3. No painel (C), estão mostrados os solventes Tolueno e Acetato Butila nas proporções 7:3 e 6:4 e, com esses solventes, foi possível observar a separação de dois pigmentos. No painel (D), apenas o solvente Dicloro é utilizado e observa-se a separação dos pigmentos, porém, as faixas estão bem próximas e ficaria difícil a extração na placa por CCD. No painel (E) é mostrado a fase móvel Acetato e Butila nas proporções 1:1, onde fica mais evidente apenas a separação de dois pigmentos. No painel (F), a fase móvel Dicloro e Metano nas proporções 9:1, 99:1 e 98:2 são mostrados e, para esse solvente na proporção 9:1, observa-se a separação de dois pigmentos, e nas proporções 98:2 e 99:1 é possível visualizar os três pigmentos.

Entre os solventes testados, então, o dicloro-metanol foi o que mostrou melhor separação dos 3 pigmentos curcuminóides. Sendo a proporção de diclorometano e metanol

(98:2) a que apresentou uma melhor separação, essa fase móvel foi escolhida para a realização da separação por CCD na placa preparativa de sílica, como representado na Figura 44, painel (G).

Figura 47- Cromatografia de camada fina, (A) Hexano: Acetato 1:1 e 7:3, (B)Tolueno: Acetato 9:1, 7:3 e 1:1,(C) Tolueno: Acetato Butila 7:3 e 6:4,(D) Dicloro, (E) Acetato: Butila 1:1 , (F) Dicloro: Metano 9:1, 99:1 e 98:2 e (G) : Cromatografia de camada delgada Dicloro: Metano 98:2

Fonte: Elaborada pela autora.

Sabendo que substâncias com maior peso molecular (e a mesma polaridade) eluem mais lentamente que os análogos menores devido às interações de Van der Waals menores e, conhecendo o peso Molecular dos pigmentos curcuminóides, foram classificadas as curcuminas na placa CCD, de baixo para cima na seguinte ordem: curcumina 368,38, de maior peso molecular, seguida pela demetoxicurcumina 338,38 e, por último, a bisdemetoxicurcumina 308,38.

Avaliação da eficácia da TFD *in vitro* com curcumina e curcuminóides isolados após os experimentos com *Candida albicans*

Os dados apresentados nas Figuras 48, 49 e 50 mostram a taxas de inibição de *Candida albicans* submetidos à TFD utilizando os três pigmentos curcuminóides separadamente como FS. Os pigmentos utilizados foram curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina obtidos por diferentes fontes: foi denominado como natural, os pigmentos extraídos da curcumina natural; como sintética, os pigmentos sintetizados na UFSCar e como Sigma Aldrich, os padrões analíticos adquiridos na empresa.

Na Figura 48 estão mostrados os resultados de fração de sobrevivência de *Candida albicans* quando realizada a TFD utilizando o pigmento curcuminóide denominado **curcumina** de diferentes origens: a natural, a sintética e a Sigma Aldrich.

Figura 48- Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o pigmento curcuminóide denominado **Curcumina** de diferentes fontes: Sintética, Sigma Aldrich e Natural. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,0125 µg/mL; 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que o pigmento **curcumina** de origem **sintética** foi o grupo que teve menor inativação, quando comparadas ao pigmento curcumina de origem Sigma Aldrich e extraído da natural. Não foi observado inativação da *C. albicans* na concentração de 0,0125 µg/mL quando irradiada por 5 minutos e observa-se redução de 3 log quando irradiado por 10 minutos na mesma concentração, porém, foi evidenciada total inativação, quando irradiado por 20 minutos. Na concentração de 0,025 µg/mL, observa-se crescimento de colônias nos três tempos de irradiação, sendo que houve redução de, aproximadamente, 1 log quando irradiadas por 5 e 10 minutos, e 6 logs quando a amostra foi irradiada por 20 minutos, mostrando uma menor eficiência do que a concentração menor de 0,0125 µg/mL. Na concentração de 0,05 µg/mL, houve um crescimento de, aproximadamente, 8 logs no menor tempo de irradiação (5 minutos) e ocorreu inativação total quando irradiadas nos tempos de 10 e 20 minutos (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05). Na maior concentração 0,10 µg/mL não houve crescimento dos microrganismos em nenhuma condição analisada (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Os ensaios realizados com o pigmento **curcumina** de origem **Sigma Aldrich** mostraram que esse grupo ficou em segundo lugar em relação a inativação das leveduras, quando comparadas com o pigmento curcumina de origem Sintética e extraído da natural. Foi observada, na inativação da *C. albicans*, a redução de, aproximadamente, 1 log na concentração de 0,0125 µg/mL quando irradiado por 5 minutos, redução de 3 logs quando irradiadas por 10 minutos e redução de 5 logs quando irradiadas por 20 minutos. Na concentração de 0,025 µg/mL observa-se crescimento de colônias somente no menor tempo de irradiação, que foi de 5 minutos, e inativação completa dos microrganismos quando irradiadas por 10 e 20 minutos (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05). Nas concentrações de 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL houve inativação total para todos os tempos de incubação (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05). Os resultados desse grupo mostraram-se mais coerentes, visto que, quanto maior a concentração do FS e maior o tempo de irradiação maior a inativação dos microrganismos.

Os ensaios realizados com o pigmento **curcumina** que foram extraídas da **Curcumina Natural** mostraram melhores resultados de inativação em *C. albicans*, quando comparadas com o pigmento curcumina de origem Sintética e os padrões da Sigma Aldrich. Foi observada a redução do crescimento dos microrganismos em todos os grupos realizados a TFD (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05), somente na

concentração de 0,025 µg/mL observou-se o crescimento de, aproximadamente, 2 logs no menor tempo de irradiação (5 minutos). Esse resultado seria mais coerente se ocorresse na menor concentração, porém, resultado semelhante aconteceu com a curcumina de origem sintética.

Na Figura 49, é demonstrada os resultados de fração de sobrevivência de *Candida albicans* quando realizada a TFD utilizando o pigmento curcuminóide denominado **Demetoxicurcumina** também de diferentes origens: a sintética, Sigma Aldrich e Natural.

Figura 49 - Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o pigmento curcuminóide denominado **Demetoxicurcumina** de diferentes fontes: Sintética, Sigma Aldrich e Natural. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,0125 µg/mL; 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios realizados com o pigmento **demetoxicurcumina** de origem **sintética** foi segundo grupo de maior inativação das leveduras, quando comparadas com o pigmento demetoxicurcumina de origem Sigma Aldrich e extraído da natural. Verifica-se das colônias dos crescimento de microrganismos apenas no grupo de menor concentração 0,0125 µg/mL e nos menos tempo de irradiação, que foram 5 e 10 minutos. Para todas as outras concentrações analisadas (0,025, 0,05 e 0,10 µg/mL) observa-se inativação total em todas as condições analisadas (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Os ensaios realizados com o pigmento **demetoxicurcumina** de padrão **Sigma Aldrich** mostraram que esse grupo ficou em primeiro lugar em relação a inativação das leveduras, quando comparadas com o pigmento demetoxicurcumina de origem Sintética e extraído da natural. Foi observada na inativação total da *C. albicans* em todos os grupos realizados a TFD (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Os ensaios realizados com o pigmento **demetoxicurcumina** que foram extraídos da Curcumina **Natural**, mostraram que esse grupo ficou em terceiro lugar no *ranking* de inativação em *C. albicans*, quando comparadas com o pigmento demetoxicurcumina de origem Sintética e os padrões da Sigma Aldrich. Verifica-se das colônias dos crescimento de microrganismos apenas no grupo de menor concentração 0,0125 µg/mL, reduziu aproximadamente 2 log quando irradiado por 5 minutos e aproximadamente 7 logs quando irradiados por 10 e 20 minutos. Para todas as outras concentrações analisadas (0,025, 0,05 e 0,10 µg/mL) observa-se inativação total em todas as condições analisadas (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Na Figura 50, mostra-se os resultados de fração de sobrevivência de *Candida albicans* quando realizada a TFD utilizando o pigmento curcuminóide denominado **Bis-demetoxicurcumina** também de diferentes origens, a sintética, Sigma Aldrich e Natural.

Figura 50- Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o pigmento curcuminóide denominado **bis-demetoxicurcumina** de diferentes fontes: Sintética, Sigma Aldrich e Natural. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0,0125 µg/mL; 0,025 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora

Os experimentos de inativação de *C. albicans* com o pigmento **Bis-demetoxicurcumina** de origem **sintética** foi o grupo que ficou em segundo lugar quando comparadas com o pigmento bis-demetoxicurcumina de origem Sigma Aldrich e extraído da natural. Os resultados observados nos ensaios com *C. albicans* foi de crescimento de colônias no menor tempo de irradiação nas concentrações de 0,0125, 0,05 e 0,10 µg/mL. Entretanto, não é observado o crescimento no menor tempo de irradiação na concentração de 0,025 µg/mL. Para todas as concentrações irradiadas por 10 e 20 minutos não foi observado crescimento dos microrganismos (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Esse mesmo pigmento de origem **Sigma Aldrich** mostrou a melhor inativação das leveduras para esse grupo, com inativação total da *C. albicans* em todos os grupos (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); condições consideradas efetivas, P-valor <0,05).

Os ensaios realizados com o pigmento **Bis-demetoxicurcumina** que foram extraídas da Curcumina **Natural**, mostraram os piores resultados de inativação em *C. albicans* quando comparadas com esse mesmo pigmento de origem Sintética e os padrões da Sigma Aldrich e, mesmo assim, foi observada a redução do crescimentos dos microrganismos em todos os grupos. Na concentração 0,0125 µg/mL, houve uma redução de, aproximadamente, 2 log quando irradiada por 5 minutos, 4 log quando irradiada por 10 minutos e no tempo de irradiação de 20 minutos não foi observado o crescimento de colônias.

Na concentração de 0,025 µg/mL, observa-se o crescimento nos três tempos de irradiação, sendo de, aproximadamente, 6 log quando irradiada por 5 minutos, 4 logs quando irradiada por 10 minutos e, aproximadamente, 6 log quando irradiada por 20 minutos. Com 0,05 µg/mL, observa-se o crescimento em dois tempos de irradiação (5 e 20 minutos), sendo de aproximadamente 6 logs quando irradiada por 5 minutos e 4 log quando irradiada por 20 minutos. As amostras irradiadas por 10 minutos, entretanto, não apresentaram crescimento. Na maior e última concentração de 0,10 µg/mL também foi observado o crescimento em dois tempos de irradiação, 5 e 10 minutos, sendo de, aproximadamente, 4 log quando irradiada por 5 minutos e 6 log quando irradiada por 10 minutos. As amostras irradiadas por 20 minutos não apresentaram crescimento de UFCs.

Com esses testes, não foi possível classificar o pigmento com maior efetividade na redução microbiana, uma vez que, dependendo da origem (natural, sintética ou padrões sigma) esse resultado foi alterado.

Então, para auxiliar nessa compreensão e comparar os resultados, os dados foram reorganizados de forma a mostrar a inativação dos três pigmentos, agora, de acordo com sua origem (Sintética, Sigma Aldrich ou Natural) Figuras 51,52 e 53.

Na Figura 51, são mostrados os resultados em fração de sobrevivência obtidos para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o três pigmentos curcuminóides curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina,, de origem **Sintética**. Na Figura 52, estão os resultados obtidos com o três pigmentos curcuminóides provenientes da empresa **Sigma Aldrich**. E, na Figura 53, são demonstrados os resultados para os três pigmentos extraídos da curcumina **natural**.

Figura 51- Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o três pigmentos curcuminóides curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina de origem **Sintética**. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL e 0.10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 53- Fração de sobrevivência (Log) obtidas para os fragmentos de *Candida albicans* submetidos a TFD com o três pigmentos curcuminóides curcuma, demetoxicurcuma e bis-demetoxicurcuma extraídos da **curcuma natural**. Os grupos controles denominados (F-L-) Sem FS e sem luz, (F+L-) com FS e sem luz, (F-L- e 10%DMSO) Sem FS e sem luz e com 10% DMSO e (F-L+) Sem Fs e com Luz, foram utilizados dose máxima de energia e a concentração mais elevadas dos grupos de ensaios. Os grupos TFD foram realizados nas seguintes concentrações 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL e 0.10 µg/mL. As condições de redução significativa (95% -IC acima de 3 log (UFC/mL); concentração considerada efetiva, P-valor <0,05). estão marcadas com “*” na caixa de texto em vermelho

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa maneira, foi possível observar que, entre os três pigmentos curcuminóides de origem **sintética**, o demetoxicurcumina foi o que teve maior inativação, seguido pelo bis-demetoxicurcumina e por ultimo o pigmento curcumina. Em relação aos pigmentos obtidos da **Sigma Aldrich**, o demetoxicurcumina bis- demetoxicurcumina mostraram inativação total em todas as condições de TFD propostas, e, apesar do pigmento curcumina também apresentar boa inativação, observou-se o crescimento de colônias nas menores concentrações.

Finalmente, os pigmentos extraídos da **Curcumina natural** mostraram resultados diferentes quando comprados com os pigmentos sintéticos e Sigma Aldrich. Neste caso, o pigmento curcumina teve melhor inativação, seguida pelo pigmento demetoxicurcumina e pelo bis- demetoxicurcumina.

Assim, com a reorganização dos dados, foi possível a classificação dos pigmentos dentro de seus grupos de origem.

5.2 Desenvolvimento da tecnologia

5.2.1 Desenvolvimento de mecanismos para otimizar a penetração dos FS na lâmina Ungueal

Microscopia Confocal - análise da penetração da curcumina na lâmina ungueal

Os resultados a seguir mostram a unha com o auxílio da microscopia confocal de fluorescência após aplicação diretamente na unha de uréia e de enzimas . Na Figura 54 painel (A), são mostradas imagens da unha com aplicação de uréia 40%. No painel (B) são imagens da unha com aplicação de enzima denominada coquetel e painel (C) são imagens da unha com aplicação de enzima denominada coquetel Alexia, sem a aplicação do FS. Os agentes degradantes ficaram em contato com a unha por 1 hora antes da realização das imagens. Na Figura 55 painel (D), observamos a unha após a incubação com ureia 40% por 1 hora e por mais 30 minutos com curcumina, no painel (E), a unha incubada com a enzima coquetel por 1 hora e por mais 30 minutos com curcumina e, painel (F), a unha incubada com a enzima coquetel Alexia por 1 hora e por mais 30 minutos com curcumina. Observa-se uma distribuição mais uniforme da curcumina quando pré-tratada com ureia 40%, enquanto a

distribuição da curcumina se mostrou mais concentrada nas superfícies externa e interna, quando pré-tratadas com as enzimas.

Figura 54-Imagens de microscopia confocal da lâmina ungueal para avaliar a penetração do FS com auxílio de enzimas: (A) unha com uréia 40%; (B) unha incubada com coquetel; (C) unha incubada com coquetel CBM Alexia, (D) Unha com uréia e curcumina, (E) unha incubada com Coquetel+curcumina e (F) unha incubada com Coquetel CBM Alexia + curcumina

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra análise realizada nessas imagens foi a do perfil de intensidade da emissão da curcumina e a quantificação da penetração desse FS no interior das unhas. A Figura 55 mostra esse perfil (linha vermelha) na imagem de um corte lateral em maior aumento.

Figura 55- (A) Imagem de microscopia confocal da lâmina ungueal com uréia 40%, avaliando-se a penetração do FS com auxílio dos gráficos espectrais (à esquerda) tomados sobre o perfil da intensidade (linha vermelha) traçada na imagem (à direita), (B) lâmina ungueal com enzima CBM + curcumina e (C) enzima coquetel accellerase+curcumina

Fonte: Elaborada pela autora.

No painel (A) verifica-se que a curcumina é detectável em uma extensão de 50 μm no interior da unha, quando utilizada uréia 40%, enquanto, no painel (B), a curcumina é detectável em uma extensão de 10 μm no interior da unha com o uso da enzima CBM. No painel (C), com a enzima coquetel Accellerase, observa-se a detecção do FS em uma extensão de 30 μm no interior da unha. Essas análises, então, evidenciaram que a uréia 40% favoreceu uma maior penetração da curcumina na unha, quando comparado aos efeitos das enzimas.

Novas imagens foram realizadas para estudar a penetração da curcumina através da lâmina ungueal com o auxílio da uréia 40%. No entanto, as amostras utilizadas para essas análises foram obtidas de um voluntário, que incubou a uréia 40% e a curcumina e, posteriormente, cedeu a amostra (Figura 56).

Figura 56 - Imagens de microscopia confocal da lâmina ungueal para avaliar a penetração do FS com uréia 40%: (A) autofluorescência da unha; (B) unha incubada com curcumina, sem pré-tratamento com uréia; (C) unha pré-tratada com uréia; e (D) unha pré-tratada com uréia e curcumina

Fonte: Adaptada de SILVA et al⁸²

Na Figura 56 é demonstrada os resultados dos ensaios realizados utilizando a microscopia confocal de fluorescência com o intuito de analisar a penetração da curcumina 1,5% na lâmina ungueal. No painel (A) observa-se a autofluorescência da unha e, no painel (B), a fluorescência da unha incubada com curcumina, sem o pré-tratamento com uréia. Nota-se por essas imagens que a curcumina (fluorescência verde) encontra-se tanto na superfície interna, quanto externa da unha, o que pode indicar que o FS “escorreu” para baixo da lâmina ungueal.

Na Figura 56, painel (C), a fluorescência da unha após incubação com uréia 40% por 1 hora é observada, mostrando uma fluorescência menos intensa que a da unha antes da aplicação da uréia. Essa diferença pode ser explicada pela provável alteração que a uréia causou na unha. Na Figura 56, painel (D), foi possível observar a curcumina por toda a unha, com uma distribuição mais uniforme e não somente na superfície como visto sem a utilização da uréia, essas análises evidenciam que o pré-tratamento com uréia 40% pode auxiliar na penetração da curcumina através de poros e/ou escamas formadas em toda lâmina ungueal.

MEV- Análise da penetração da uréia 40% na lâmina ungueal

Na Figura 57, são mostradas imagens realizada por MEV de amostras de unha. É possível verificar algumas alterações na sua estrutura após a aplicação de creme contendo uréia 40% durante um tempo de incubação de 24 horas.

Figura 57 MEV- Análise dos efeitos da uréia na lâmina ungueal. São apresentadas as imagens da superfície da unha: (A) sem aplicação da uréia, e (B) 24 horas após aplicação da uréia onde verifica-se o surgimento de pequenos orifícios (indicado pela seta vermelha). Imagens das amostras de unha imagens da lateral da unha e observada no painel (C) sem aplicação da uréia, e no painel (D) 24 horas após aplicação da uréia verificar o surgimento de fissuras (indicado pela seta vermelha) na amostra de unha

Fonte: Elaborada pela autora

Na Figura 57, painel (A), analisou-se a estrutura superficial da unha quando vista de frente, antes da aplicação da uréia 40%, enquanto que, no Painel (B), a amostra, em posição semelhante, é mostrada com aplicação da uréia 40% pelo período de 24 horas. Quando os painéis (A) e (B) são comparados, é possível verificar o surgimento de pequenos orifícios (indicado pela seta vermelha) na amostra de unha. Na Figura 57, painéis (C) e (D), a unha é visualizada lateralmente sendo que o painel (C) mostra a unha sem aplicação da ureia e o painel (D) mostra a unha após a incubação. Observa-se, então, o aparecimento de fissuras (indicado pela seta vermelha), parecidas com escamas, após a amostra ser incubada com ureia 40%. Esses resultados foram indicativos de que a substância, quando aplicada 24 horas antes do FS, pode favorecer a penetração do composto, potencializando o efeito terapêutico.

Desenvolvimento de novas formulações

Foram observadas diferenças na solubilização da curcumina natural quando incorporada em diferentes veículos. Na Figura 58 estão mostradas imagens de fluorescência da curcumina em três formulações farmacêutica: Painel A (Solução), painel B (gel) e painel C (emulsão).

Figura 58- Imagens de microscopia de fluorescência confocal da curcumina (1,5%) solubilizada nos três veículos: (A) solução, (B) gel de carbopol e (C) emulsão. A seta mostra curcumina e os círculos mostra o veículo que foi dissolvida a curcumina

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 58 painel (A), observa-se que, mesmo na solução com 10% de DMSO, cuja adição visa aumentar a solubilidade, a curcumina apresenta uma fração maior não solubilizada em forma de agregados (indicados pela seta vermelha). Na região circulada, também em vermelho, está indicada a parte da solução que acredita-se ter curcumina dissolvida, porém, a fluorescência não está muito visível. Nas formulações de gel e emulsão (painéis B e C), também observa-se agregados presentes. No gel, painel (B), a curcumina parece estar menos agregada quando comparada à solução na mesma concentração e não apresenta muita fluorescência na porção em que estaria dissolvida. No painel (C), observa-se a presença desses agregados na emulsão, assim como no gel. Porém, é possível visualizar a fluorescência da curcumina na porção em que ela se encontra dissolvida, como indicado pelo círculo vermelho.

A fim de entender a interação da curcumina com a emulsão, ela foi analisada sem e com curcumina, ainda por microscopia confocal de fluorescência. A Figura 59, painel A, mostra essa imagem na presença e na ausência de curcumina Natural. Observa-se que a emulsão não emite luz na região espectral da curcumina solubilizada (em azul) e aglomerada

(em amarelo). A Figura 59, painel B apresenta resultados para essas mesmas regiões. Detalhes dessa região serão apresentados abaixo.

Figura 59- Imagens de microscopia confocal em emulsão sem (à esquerda) e com (à direita) curcumina (1,5%): A) imagem confocal por canal superposta à imagem de luz transmitida. B) Imagem espectral da mesma área. O círculo mostra a emulsão sem a presença de curcumina

Fonte: Elaborada pela autora.

Através destes ensaios, concluiu-se que a curcumina parece estar mais disponível quando incorporada em emulsão, que quando incorporada em solução ou gel. O fato da curcumina ter uma melhor interação com essa formulação pode ser explicado pela emulsão ser constituída de (óleo/Água). .

Ainda visando compreender a interação da curcumina com a emulsão, realizou-se as imagens de microscopia confocal, registrada no modo de coleta espectral e no modo de tempo de vida de fluorescência (FLIM, do inglês *fluorescence lifetime imaging*). Na Figura 60, os painéis A e B correspondem à mesma imagem coletadas cada uma com um dos modos, de coleta espectral e no modo FLIM, respectivamente, para excitação de dois fótons (2P) em 800 nm. Cada *pixel* da imagem está associado a um espectro e a um decaimento da fluorescência da curcumina natural em emulsão. A imagem espectral da emulsão apresenta emissão predominantemente no azul entre 450 e 550 nm, associada à curcumina solubilizada na fase molecular, e emissão no amarelo entre 520 e 620 nm, advinda da curcumina nos agregados (espectros abaixo, à esquerda). A imagem de tempo de vida possui decaimentos longos da fluorescência com um único tempo de vida da ordem de 0,8 ns, tempo típico de molécula desagregada (decaimento em amarelo, abaixo à direita). Já na parte agregada, apresenta tempos de decaimento médios da ordem de 0,3 ns (decaimento em azul, abaixo à direita), comportamento característico de estados moleculares agregados.

Figura 60- Imagens de microscopia confocal (Espectral e FLIM) da curcumina natural (1,5%) incorporada em Emulsão

Fonte: Elaborada pela autora.

Com esses ensaios foi possível verificar que a curcumina não perdeu as características de fluorescência quando incorporada em emulsão e que a fluorescência encontrada na emulsão é realmente da curcumina dissolvida. Essa dissolução da curcumina na emulsão pode facilitar a penetração do Fs na lâmina ungueal.

Estudo de estabilidade das formulações propostas

Os resultados do estudo de estabilidade das formulações propostas foram parecidos entre o estudo de estabilidade acelerada e o estudo de estabilidade de longa duração para as duas formulações, os resultados do estudo de longa duração foi sequencial ao do estudo de estabilidade acelerada.

Características organolépticas

Foram analisadas as amostras do creme de curcumina 1,5% e creme de uréia 40% quanto aos aspectos, cor e odor. Ambas formulações permaneceram estáveis e não foram observadas modificações quanto aos aspectos organolépticos, sendo assim, foram consideradas satisfatórias.

Separação de fases

Após o procedimento de centrifugação, nenhuma das duas amostras apresentou alteração aparente de aspecto. O creme se encontrava normal, sem alteração e mostrando estabilidade em sua formulação.

Determinação pH

As medidas de pH foram constantes tanto para o creme de curcumina 1,5% quanto para o creme de uréia 40%.

Tabela 13 - Medidas de pH do estudo de estabilidade no período de 1 ano

Lote	Fev 16	Mai/16	Agost/16	Nov/16	fev/17
Onifree (curcumina 1,5%)	4,7	4,55	4,67	4,69	4,56
Onicleaner (Uréia 40%)	6,54	6,58	6,61	6,56	6,62

Fonte: Elaborada pela autora.

Densidade aparente

Na Tabela 14, observa-se os resultados de Densidade Aparente, obtidos através da análise do volume ocupado pelos cremes Onifree (curcumina 1,5%) e Onicleaner (uréia 40%) em uma proveta graduada.

Tabela 14 –Resultados de densidade aparente dos produtos Onifree e Onicleaner (fev/2016 a fev/2017)

Densidade Aparente (g/mL)

Lote	Fev 16	Mai/16	Agost/16	Nov/16	fev/17
Onifree (curcumina 1,5%)	1,219	1,216	1,216	1,203	1,198
Onicleaner (Uréia 40%)	1,108	1,119	1,115	1,109	1,107

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que os resultados de Densidade aparente permaneceram constantes para as duas amostras.

Determinação da viscosidade

A viscosidade é uma das variáveis que caracteriza reologicamente uma substância. Dependendo do seu comportamento reológico, pode-se classificá-la de diferentes maneiras. As amostras foram submetidas aos testes de viscosidade dinâmico, onde considerou-se a viscosidade em função do tempo. Tanto as amostras do OniFree quanto as do OniCleaner apresentaram comportamento uniforme com pequenas variações de viscosidade. A Tabela 15 mostra, então, o comportamento reológico da Onifree realizado em fevereiro de 2016, e a Tabela 16 em fevereiro de 2017. Nas Tabelas 17 e 18, está mostrado o comportamento reológico do Onicleaner nos anos 2016 e 2017, respectivamente.

Tabela 15 – Comportamento reológico da amostra Onifree 2016

Samples:
OniFree
fev_2016

	RPM	Viscosity	% EOS	Temperature	Time
1	100	8552,05	85,52	23,12	00:00:30
2	100	8598,71	85,99	23,09	00:01:00
3	100	8607,63	86,08	23,09	00:01:30
4	100	8644,66	86,45	23,16	00:02:00
5	100	8525,41	85,25	23,05	00:02:30
6	100	8516,64	85,17	23,12	00:03:00
7	100	8435,60	84,36	23,05	00:03:30
8	100	8389,43	83,89	23,01	00:04:00
9	100	8367,64	83,68	23,01	00:04:30
10	100	8489,12	84,89	22,90	00:05:00
11	100	8429,51	84,30	22,94	00:05:30
12	100	8411,58	84,12	22,83	00:06:00
13	100	8573,97	85,74	22,83	00:06:30
14	100	8589,44	85,89	22,87	00:07:00
15	100	8585,94	85,86	22,87	00:07:30
16	100	8594,81	85,95	22,90	00:08:00
17	100	8558,51	85,59	22,80	00:08:30
18	100	8580,17	85,80	22,83	00:09:00
19	100	8591,89	85,92	22,90	00:09:30
20	100	8573,45	85,73	22,80	00:10:00
	MÉDIA	8530,81	85,31		
	DES. PADRÃO	81,83	0,82		
	VARIACÃO (%)	0,96	0,96

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 16 – Comportamento reológico da amostra Onifree 2017

Samples:
OniFree
fev_2017

medida	RPM	Viscosity	% EOS	Temperature	Time
1	100	8568,47	85,68	22,61	00:00:30
2	100	8533,25	85,33	22,58	00:01:00
3	100	8489,02	84,89	22,58	00:01:30
4	100	8521,87	85,22	22,58	00:02:00
5	100	8447,27	84,47	22,54	00:02:30
6	100	8409,64	84,10	22,54	00:03:00
7	100	8385,11	83,85	22,40	00:03:30
8	100	8411,85	84,12	22,43	00:04:00
9	100	8404,54	84,05	22,36	00:04:30
10	100	8386,01	83,86	22,40	00:05:00
11	100	8359,67	83,60	22,43	00:05:30
12	100	8361,07	83,61	22,43	00:06:00
13	100	8336,01	83,36	22,40	00:06:30
14	100	8325,53	83,26	22,43	00:07:00
15	100	8316,41	83,16	22,51	00:07:30
16	100	8314,50	83,15	22,65	00:08:00
17	100	8318,90	83,19	22,69	00:08:30
18	100	8315,75	83,16	22,76	00:09:00
19	100	8297,74	82,98	22,61	00:09:30
20	100	8288,66	82,89	22,51	00:10:00
MEDIA		8389,56	83,90		
DESV. PAD		83,75	0,84		
VARIAÇÃO		1,00	1,00

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 17 – Comportamento reológico da amostra Onicleaner 2016

Samples:
OniCleaner
fev_2016

Medidas	RPM	Viscosity	% EOS	Temperature	Time
1	50	14846,41	74,23	21,56	00:00:30
2	50	14976,3	74,88	21,60	00:01:00
3	50	14842,9	74,21	21,56	00:01:30
4	50	14253,36	71,27	21,35	00:02:00
5	50	14946,43	74,73	21,24	00:02:30
6	50	15579,46	77,90	21,20	00:03:00
7	50	15685,9	78,43	21,24	00:03:30
8	50	15272,89	76,36	21,24	00:04:00
9	50	15267,46	76,34	21,24	00:04:30
10	50	14980,96	74,90	21,20	00:05:00
11	50	14860,01	74,30	21,24	00:05:30
12	50	14448,02	72,24	21,20	00:06:00
13	50	14786,9	73,93	21,13	00:06:30
14	50	14772,9	73,86	21,06	00:07:00
15	50	15222,58	76,11	21,02	00:07:30
16	50	15344,67	76,72	21,06	00:08:00
17	50	14872,67	74,36	20,91	00:08:30
18	50	14970,73	74,85	20,87	00:09:00
19	50	15281,92	76,41	20,87	00:09:30
20	50	15194,86	75,97	20,80	00:10:00
MÉDIA		15020,37	75,10		
DESV. PAD		346,2293	1,73		
VARIAÇÃO		2,305066	2,31		

OniCleaner fev_2016

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 18 – Comportamento reológico da amostra Onicleaner 2017

Samples:
Onicleaner
fev_2017

Medida	RPM	Viscosity	% EOS	Temperature	Time
1	50	16821,21	84,11	2084%	00:00:30
2	50	16847,17	84,24	2066%	00:01:00
3	50	16765,31	83,83	2066%	00:01:30
4	50	16780,36	83,90	2069%	00:02:00
5	50	16333,32	81,67	2055%	00:02:30
6	50	16586,11	82,93	2055%	00:03:00
7	50	16585,09	82,93	2051%	00:03:30
8	50	16642,25	83,21	2051%	00:04:00
9	50	16647,27	83,24	2051%	00:04:30
10	50	16890,19	84,45	2048%	00:05:00
11	50	16632,33	83,16	2048%	00:05:30
12	50	16699,88	83,50	2044%	00:06:00
13	50	16487,73	82,44	2044%	00:06:30
14	50	16322,48	81,61	2033%	00:07:00
15	50	17008,79	85,04	2029%	00:07:30
16	50	16815,84	84,08	2044%	00:08:00
17	50	16400,72	82,00	2026%	00:08:30
18	50	16164,33	80,82	2026%	00:09:00
19	50	15955,3	79,78	2033%	00:09:30
20	50	16449,09	82,25	2026%	00:10:00
MÉDIA		16591,74	82,96		
DESV. PAD		262,6344	1,31		
VARIAÇÃO		1,582923	1,58

Fonte: Elaborada pela autora.

Através dessas análises, foi possível afirmar que, após um ano, as amostras permaneceram com suas características reológicas preservadas. Pequenas variações de viscosidade apresentadas podem ser referentes às variações de temperatura, uma vez que as amostras não apresentam características tixotrópicas ou reoplásticas (e, portanto, a viscosidade varia conforme o tempo).

Os testes se mostraram satisfatórios para os ensaios de estabilidade acelerada, assim como o de longa duração. Nas Tabelas 19 e 20 estão mostrados, resumidamente, os resultados das análises de acordo com os lotes de Onifree e Onicleaner. Os estudos de estabilidade acelerado foram finalizados em Agosto de 2016, sendo realizados por 6 meses, enquanto o de longa duração ainda continua sendo analisado, visto que a norma da ANVISA exige, pelo menos, 24 meses de acompanhamento. No entanto, apresentamos os resultados de estabilidade no período de 1 ano.

Tabela 19 – Tabela dos resultados das análises do creme curcumina 1,5% (Onifree) os lotes avaliados no período de 1 ano

Lote	OniFree				
	Fev 16	Maio/16	Agost/16	Nov/16	fev/17
Caract. organolépticas	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo
Separação de fases	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo
pH	4,7	4,55	4,67	4,69	4,56
Densidade (g/mL)	1,219	1,216	1,216	1,203	1,198
viscosidade	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 20- Tabela dos resultados das análises do creme de uréia 40% (Onicleaner) os lotes avaliados no período de 1 ano

Lote	Onicleaner				
	Fev 16	Mai/16	Agost/16	Nov/16	fev/17
Caract. organolépticas	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo
Separação de fases	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo
pH	6,54	6,58	6,61	6,56	6,62
Densidade (g/mL)	1,108	1,119	1,115	1,109	1,107
viscosidade	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo	de acordo

Fonte: Elaborada pela autora.

Resíduo por essecção

Na tabela 21, verifica-se a perda por dessecação da formulação de curcumina a 1,5 % após 1 ano do produto formulado.

Tabela 21- Resultados de perda por dessecação do Onifree

Onifree		
lote	fev/16	fev/17
Cadinho vazio	43,4823	50,728
Cadinho + amostra	44,7458	49,6788
Amostra	1,2635	1,0492
Amostra dessecada	1,0417	0,8728
% perda	-0,17554	-0,16813

Fonte: Elaborada pela autora.

Na tabela 22, verifica-se a perda por dessecação da formulação do creme de uréia 40% após 1 ano do produto formulado.

Tabela 22 - Resultados de perda por dessecação do Onifree

OniCleaner		
lote	dez/16	fev/17
Cadinho vazio	50,5635	50,7865
Cadinho + amostra	51,6681	52,0738
Amostra	1,1046	1,2873
Amostra dessecada	0,507	0,587
% perda	-0,54101	-0,5440068

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que a perda por dessecação para ambos produtos formulados (Onifree e Onicleaner) manteve-se constante, mostrando alta estabilidade das formulações após o período de 1 ano. Através destas análises, é possível fazer um balanço para verificar as porcentagens de água e produtos voláteis que existem nas amostras.

Teor por HPLC da curcumina incorporada no creme

A fim de detectar o teor da curcumina na formulação, foram realizadas as análises por HPLC da amostra produzida em fevereiro de 2016, com concentrações conhecidas. Através dessas análises, então, obteve-se a curva e a equação da amostra de referência e procedimento similar foi realizado com a amostra de fevereiro de 2017. Na Tabela 23, demonstramos os parâmetros e concentrações avaliadas.

Tabela 23 - Parâmetros para determinação de concentração e área da curcumina incorporada no creme

Conc.	1	2	3	Média	Desv. Padrão	Erro padrão	ESTABILIDADE LP 19.01.17	
0,10	312881	319019	319367	317089	3648,4	2106,4	Área conc	3095660 1,01
0,25	749174	751182	750634	750330	1037,9	599,3		
0,50	1566819	1552670	1565396	1561628	7790,7	4498,0		
1,00	3112580	3111207	3111868	3111885	686,7	396,4		
1,50	4403533	4632575	4631176	4555761	131835,5	76115,2		
2,00	6111024	6079782	6013004	6067937	50072,1	28909,1		4283142 1,39
2,50	7875112	7838807	7667198	7793706	111052,5	64116,2		

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 61 –curva analítica do creme de curcumina
Fonte: Elaborada pela autora.

Após um ano, então, a formulação possui um teor detectável de curcumina, sendo, portanto, considerada estável. Em geral, a principal conclusão dos testes de estabilidade realizados com os cremes formulados é que, mesmo após a incorporação da curcumina ou uréia, os cremes se mantiveram estáveis e com composição adequada para esse tipo de produto/uso.

5.2.2 Desenvolvimento do equipamento para o tratamento de pacientes

O equipamento foi desenvolvido a fim de se adequar à geometria dos pés e das mãos de pacientes com onicomicose. As fontes de luz utilizadas foram LEDs que emitem um comprimento de onda na região 450 nm de região azul, com intensidade de 100 mW/cm².

Na Figura 62 estão mostradas as três versões do equipamento. No painel (A) visualiza-se o protótipo inicial do equipamento, que foram entregue para três podólogos testarem em pacientes. Assim, foram sugeridas modificações no equipamento quanto à abertura, uma vez que, por ser pequena dependendo do paciente, podia se tornar um fator limitante para o tratamento. Também foi solicitado um material que pudesse ser autoclavável, para facilitar a limpeza do equipamento. A partir dessas sugestões foi, então, elaborado a segunda versão do (Painel B), com peças desmontáveis e autoclaváveis, além de possuir uma maior abertura. No

entanto, quando testados novamente, os pacientes alegaram que não era confortável, uma vez que escorregava do dedo durante a iluminação, e ainda, em alguns casos, a abertura continuava sendo um fator limitante em relação ao tamanho do dedo de alguns paciente. Então foi elaborada a terceira e última versão do equipamento (painel C), composto por uma fonte com LED e um plástico com um velcro para o encaixe do dedo, visando melhorias anatômicas. Além disso, essa versão possuía área de contato maior devido à curvatura (côncava) do suporte do LED, teve a introdução de um temporizador, a largura do dispositivo foi repensada para uso em todos os dedos, além de um protetor autoclavável, para evitar contaminação cruzada entre dedos e entre pacientes. Essa versão foi bem aceita pelos profissionais e pacientes que fizeram uso dessa tecnologia, com a vantagem de ter um menor custo.

Figura 62- Versões do equipamento: painel A: Prototipo inicial; B: primeira versão da empresa e C: versão final sob análise para aprovação pela ANVISA

Fonte: SILVA et al ⁸²

5.3 Estudos clínicos

5.3.1 Tratamento dos Pacientes por TFD

Foram tratados 30 pacientes com o FS curcumina 1,5% incorporado em três veículos diferentes: solução, gel e emulsão. A fim de comparar os resultados, dividiu-se 10 pacientes para cada grupo analisado.

Nas Figuras 63, 64 e 65 estão mostrados os resultados de 1 paciente para exemplificar cada condição estudada. Na Figura 63, está mostrado o hálux direito de um paciente com 46 anos de idade, sexo feminino que possuía a lesão por, aproximadamente, 10 anos. O painel (A) mostra a unha antes do tratamento e o painel (B) mostra o hálux após 10 sessões de TFD realizadas com curcumina a 1,5 % dissolvida em solução.

Figura 63-Imagens de luz branca hálux direito de paciente, 46 anos, sexo feminino com onicomicose a dez anos. Painel (A) antes do tratamento, painel (B) e depois de dez sessões de TFD com curcumina 1,5% dissolvida em solução

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 64, é mostrado o hálux esquerdo de um paciente com 29 anos de idade, sexo masculino, que também possuía a lesão por aproximadamente 10 anos. A unha antes do tratamento por TFD, a lesão após duas sessões de TFD, a imagem do hálux após 6 sessões de TFD realizadas com curcumina a 1,5 % incorporada em gel estão mostradas, respectivamente, nos painéis A, B e C

Figura 64-Imagens de luz branca hálux direito de paciente, 29 anos, sexo masculino com onicomicose à dez anos. Painel (A) antes do tratamento, painel (B) após duas sessões de TFD e painel (C) e depois de seis sessões de TFD com curcumina 1,5% incorporada em gel

Fonte: Elaborada pela autora.

O hálux direito de um paciente com 71 anos de idade, sexo feminino que possuía a lesão por aproximadamente 10 anos está mostrado na Figura 65. Os painéis (A) e (B) mostram a unha antes e após 5 sessões de TFD realizadas com curcumina a 1,5 % dissolvida em emulsão.

Figura 65- Imagens de luz branca hálux direito de paciente, 71 anos, sexo feminino com onicomicose há dez anos. Paine (A) antes do tratamento, paine (B) após cinco sessões de TFD com curcumin 1,5% incorporada em emulsão

Fonte: Elaborada pela autora.

Com uma análise qualitativa, é possível mostrar a redução de sessões para o uso da emulsão, nessa comparação de lesões com características de tempo semelhantes. Para a comparação da resposta clínica dos trinta pacientes de acordo com a formulação utilizada, foi feita a Figura 66. O grupo de pacientes tratados com curcumin em solução foi o que mostrou menor resposta clínica, do total de 10 pacientes tratados, onde cinco tiveram resposta clínica positiva, enquanto que os outros cinco continuam o tratamento. O grupo de pacientes tratados com curcumin incorporada em gel teve 70% de resposta positiva, sendo que três pacientes continuam o tratamento. O grupo de pacientes tratados com curcumin incorporada em emulsão foi o que mostrou melhor resposta clínica e, do total de 10 pacientes tratados, oito apresentaram resposta clínica positiva, sendo que apenas 2 continuam o tratamento.

Figura 66 - comparação da resposta clínica dos trinta pacientes em de acordo com a formulação utilizada (solução, gel e emulsão)

Fonte: Elaborada pela autora.

A curcumina incorporada em emulsão, portanto, foi a que demonstrou, até o momento, melhores resultados, com uma média de 6 sessões de TFD, enquanto para a curcumina incorporada em gel, a média foi de 10 sessões e, em solução, de 12 sessões. Esses resultados podem ser indicativos de que a curcumina tem melhor penetração na lâmina ungueal devido a sua interação com a formulação, corroborando com os resultados obtidos a partir das imagens da microscopia confocal das formulações.

Em geral, a TFD utilizando a curcumina natural como FS, mostrou-se efetiva para reduções microbianas e fúngicas. Os voluntários foram bastante receptivos com a terapia, visto que 100% dos pacientes tratados tentaram, em múltiplas ocasiões, um tratamento com as técnicas convencionais, por vezes, durante anos, e não tiveram sucesso. Na Tabela 24, foram analisadas as variáveis de estudo de acordo com o tempo de lesão dos pacientes.

Tabela 24- Variáveis do estudo clínicos dos pacientes em função do tempo de lesão.

Variáveis do estudo	Tempo de lesão						Total
	0 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	5	9	6	5	3	2	30
Razão Feminino/masculino	4/1	7/2	4/2	3/2	3/0	1/1	22/8
Doenças Crônicas	3	6	3	4	3	2	21
Nº unhas lesionadas	10	18	12	11	8	4	63
Tratamentos anteriores	5	9	6	5	3	2	30
Curados	5	8	4	3	0*	0*	20

*Pacientes continuam em tratamento até o momento

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que, dos 30 pacientes tratados, 22 foram do sexo feminino, enquanto que apenas 8 eram do sexo masculino. Cerca de 70% dos pacientes eram portadores de doenças crônicas, como hipertensão, problemas cardíacos e diabetes, sendo esses alguns dos fatores que estimularam a procura desses pacientes pela técnica, devido à dificuldade em adicionar novos medicamentos que pudessem vir a interagir com os já utilizados diariamente por conta dessas doenças.

A média de unhas lesionadas por pacientes foram as duas dos pés, sendo que 80% eram unhas laterais (hálux e Quinto pododactilo), mais conhecidos como “dedão” e

“dedinho”. Isso pode ser explicado pelo fato desses dedos terem maior frequência de atritos quando se utiliza sapatos fechados.

Analisando os resultados, observou-se que quanto maior era o tempo de lesão, maior também era o tempo de tratamento para os pacientes que obtiveram cura clínica.

5.3.2 Identificação dos microrganismos

A. Microscopia direta

Através dos análises dos ensaios realizados por microscopia direta, foi possível classificar os tipos de microrganismos encontrado nas lesões dos pacientes, como demonstrado na figura 67.

Figura 67- Correlação da classe de microrganismos, por tempo médio de tratamento por TFD
Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que 50% dos pacientes tratados precisaram de 5 a 10 sessões para finalizar o tratamento com TFD. Os microrganismos encontrados nesses pacientes foram, em maior quantidade, os Fungos Filamentosos Não Dermatófitos (FFND), seguido pelos dermatófitos e leveduras. Uma fração de 33,33% dos pacientes precisaram de um tempo maior de tratamento, acima de 10 sessões e, nesses pacientes, a ordem em quantidade dos

microrganismos encontrados foram similar aos dos pacientes que precisaram entre 5 e 10 sessões. Os pacientes que tiveram o tratamento finalizado entre 1 a 5 sessões de TFD e obtiveram resposta clínica satisfatória representam 16,6% do total com a distribuição dos microrganismos semelhante. Nota-se, portanto, que os FFND foram os tipos de microrganismos mais encontrados nesse grupo de pacientes, seguido por dermatófitos e por último as leveduras. Não foi possível correlacionar o tempo de tratamento com o tipo de microrganismo encontrado nas lesões e, para isso, talvez seja necessário uma pesquisa clínica com um *n* maior de pacientes.

A. Exame de cultura

Os materiais coletados dos pacientes foram colocados no meio de cultura com antibióticos e antifúngicos e estão, atualmente, aguardando o crescimento para a realização do isolamento dos microrganismos. Esses testes levam em torno de 4 meses ou mais para serem conclusivos.

C. Diagnóstico molecular

Realizou-se 5 reações de PCR utilizando como molde o DNA de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, que foram extraídos de duas maneiras: uma com o kit de leveduras da Cellco, e outra através do protocolo do fenol clorofórmio. Através destes ensaios, verificou-se a integridade dos DNAs, e seguiu-se com as reações de PCR. Utilizou-se *primers* específicos para *T. rubrum* e para fungos dermatófitos (panDerm), para amplificar as bandas esperadas. Para *T. rubrum*, era esperado encontrar uma banda de aproximadamente 203 pares de base, e para *T. mentagrophytes* usando o *primers* panDerm, uma banda de 366 pb. (Figura 68)

Dessa forma, foi possível padronizar os *primers* para *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*.

Figura 68- Padronização dos primer para o *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*
 Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda com o intuito de padronizar as reações de PCR dos fungos filamentosos dermatófitos (*T. rubrum* e *T. mentagrophytes*) e da *C. albicans*, utilizamos um marcador de peso molecular (1kb Plus). O resultado dessas reações está mostrado na Figura 69.

Figura 69- Padronização dos primer para o *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Candida albicans*
 Fonte: Elaborada pela autora.

Com a padronização das reações de PCR dos fungos filamentosos dermatófitos (*T. rubrum* e *T. mentagrophytes*) e da *C. albicans*, será possível, então, realizar as análises das amostras dos pacientes após o isolamento dos microrganismos por cultura.

D. Imagens de fluorescência

Nas Figuras 70, 71 e 72 observa-se as imagens de fluorescência de um paciente do grupo controle (sem onicomicose), de um falso positivo e do grupo dos pacientes positivos para onicomicose, respectivamente. As imagens de autofluorescência (painel A) e as obtidas pela separação dos canais azul (Painel B), verde (painel C) e vermelho (painel D) foram analisadas e comparadas.

Figura 70- Imagens de fluorescência da unha de paciente SEM onicomicose (A). (B), (C) e (D) são as imagens processadas no programa MATLAB para analisar as fluorescências nos canais azul (B), verde (C) e vermelho (D), respectivamente

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 71- Imagens de fluorescência da unha de um paciente FALSO POSITIVO para onicomicose (A). (B), (C) e (D) são as imagens processadas no programa MATLAB para analisar as fluorescências nos canais azul (B), verde (C) e vermelho (D), respectivamente

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 72- Imagens de fluorescência da unha de um paciente POSITIVO para onicomicose (A). (B), (C) e (D), são imagens processadas no programa MATLAB para analisar as fluorescências nos canais azul (B), verde (C) e vermelho (D), respectivamente

Fonte: Elaborada pela autora.

Por meio da análise dessas Figuras (70, 71 e 72), pode-se inferir que os canais verde e azul (painéis B e C) contém informações de diferenciação entre as classes, enquanto o canal vermelho (painel D) não forneceram informações relevantes. Para melhor investigar estas análises, foram extraídos os histogramas não só do canal verde, como também o brilho das imagens, de modo a observar diferenças entre os grupos (Figura 73, painéis A e B, respectivamente). Em azul, está o histograma do grupo controle, onde a linha preta representa o grupo falso positivo e a linha vermelha o grupo positivo.

Figura 73- Histogramas referentes ao canal verde (a) e ao brilho (b) comparando os grupos controle (linha azul), falso positivo (linha preta) e positivo (linha vermelha)

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que o grupo falso positivo (linha preta) apresenta não só uma maior frequência no canal verde (Figura 73, painél A), como também um brilho maior (Figura 73, painél B). No caminho inverso, o grupo controle apresenta ambos histogramas com valores mais baixos, enquanto o grupo positivo encontra-se no meio termo entre eles. Apesar dos histogramas demonstrarem pouca diferença significativa, acredita-se que este seja um possível caminho para melhor investigar as informações fornecidas pelos canais, de modo a obtermos um diagnóstico com maior precisão.

E. Imagens de termografia - detecção no infravermelho

Pelas imagens termográficas, que detectam a radiação infravermelha emitida pelo tecido e correlacionam essa informação com sua temperatura, foi possível observar que as regiões que apresentavam lesão micótica, em geral, possuíam um comportamento hipotérmico se comparadas com as unhas saudáveis, como observado na Figura 74, que apresenta a imagem termográfica de dois hálux de um mesmo paciente, em que a unha do pé direito (painel A) possui onicomíose e a do pé esquerdo é saudável (painel B).

Figura 74-Imagem termográfica de dois hálux (direito e esquerdo) de um mesmo paciente. Hálux direito positivo para onicomíose e halux esquerdo negativo para onicomíose
Fonte: Elaborada pela autora.

Um dos fatores que alteram a temperatura na superfície do tecido é a sua capacidade de trocar calor com o meio externo e, com o aumento da espessura da unha causado pela micose, esta capacidade diminui e faz com que o tecido apresente diferença em sua temperatura superficial ¹²¹. Outro fator que altera a temperatura do tecido é a sua perfusão sanguínea e sabe-se que a presença de micose faz com que a vascularização na região diminua, justificando novamente este comportamento hipotérmico ^{121,122}.

As matrizes contendo valores de temperatura em cada *pixel* da imagem foram processadas utilizando uma rotina do *software* MATLAB®. Neste processamento, as matrizes foram analisadas e apresentadas em forma de imagem e, na sequência, era realizada a delimitação manual da região da unha na imagem, de forma que o programa devolvesse os valores médios de temperatura e seu desvio na região delimitada. Então, com as temperaturas médias de cada unha saudável e de cada unha contendo micose, foi possível fazer um gráfico do tipo *boxplot* dos valores (Figura 75, painéis A e B).

Figura 75-box plot dos valores das análises da imagem termográfica (A) pé direito e (B) pé esquerdo
 Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 75 é possível observar que existe uma grande variação nos valores de temperaturas médias encontradas em cada grupo de pacientes, o que se pode atribuir às próprias variações de cada indivíduo, pois fatores como gênero e idade alteram o metabolismo, o que, por sua vez, altera a temperatura do local sob investigação.¹²³ Outro fator interessante que interfere na temperatura corporal é a localização: lados “direito” e “esquerdo” do corpo (mais distante e mais próximo ao coração, respectivamente) apresentam pequenas diferenças de temperatura. Essa diferença foi minimizada quando os dados foram avaliados individualmente para cada lado.

Podemos observar que existe uma grande variabilidade nos gráficos, particularmente representada pela mais ampla distribuição dos valores de temperatura das unhas contaminadas. Além disso, essa maior variação nas temperaturas das unhas infectadas apresenta-se de modo que há um desvio para menores temperaturas, se comparadas às unhas saudáveis (painel B da Figura 75), sendo possível verificar que a média tende a ser menor que a observada para unhas saudáveis. Essa maior variação da temperatura das unhas contaminadas provavelmente deve-se ao fato de que esse grupo os pacientes possuía onicomicose em vários estágios da doença, e com acometimento em diferentes áreas das unhas, havendo um aumento da variabilidade. A subdivisão do grupo onicomicose em grupos de diferentes graus de acometimento poderá aperfeiçoar esta análise.

6 Conclusão

Durante a realização deste projeto, foi possível alcançar os principais objetivos propostos.

Na **pesquisa básica**, foi comparada a eficiência da TFD utilizando duas classes distintas de FS, a curcumina e as clorinas, na inativação dos três principais microrganismos causadores de onicomicose: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*. A curcumina, então, se mostrou o FS mais eficiente na inativação desses microrganismos, uma vez que foram utilizadas concentrações 100 vezes menor e tempo de incubação de 20 minutos, enquanto que para as clorinas foram necessários 60 minutos para sua incorporação. Também foi avaliada a eficiência antimicrobiana das diferentes curcuminas, evidenciando que a curcumina natural tem melhor resposta, seguida pela sigma Aldrich, sintética e sal de curcuminóides. Acredita-se que isso ocorreu devido a maior porcentagem de curcuminóides nessa mesma ordem. Portanto, a fim de relacionar a eficiência da TFD com esses pigmentos, os ensaios de inativação de crescimentos de *Candida albicans* foram realizados, o que evidenciou ação fotodinâmica dos três pigmentos, indicando um sinergismo entre essas substâncias.

No **Desenvolvimento tecnológico** da pesquisa, foi possível melhorar a penetração do FS na lâmina ungueal utilizando a uréia 40% como emoliente, o que resultou em um creme para essa aplicação, além do desenvolvimento de formulações estáveis à base de emulsão para incorporar a curcumina natural. Foi possível ainda chegar a uma configuração favorável para viabilização comercial do protótipo de iluminação, hoje, na sua terceira versão, que apresenta uma fonte de luz desenvolvida especificamente para se adaptar à geometria dos pés e mãos, além de ser de baixo custo e fácil utilização no tratamento clínico.

Na **pesquisa clínica**, o tratamento proposto foi realizado em pacientes infectados que já haviam testado outras terapias. Um protocolo de tratamento foi padronizado, com a aplicação da emulsão de curcumina a 1,5%, tempo de incubação de 30 minutos e dose de luz de 120 J/cm^2 . Assim, a TFD alcançou uma boa resposta clínica, com um tempo menor de tratamento quando comparado às técnicas convencionais resultando em uma boa aceitação entre os pacientes.

Foi possível verificar uma relação entre o número de sessões e a classificação dos microrganismos entre levedura, FFND e dermatófitos com os testes de MD. Com as imagens de fluorescência, foram analisados os canais RGB e uma pequena diferença foi encontrada

para as análises no azul e no verde. Os histogramas extraídos do canal verde e do brilho das imagens demonstraram pouca diferença significativa. Entretanto, esta análise indica ser um possível caminho para a investigação das informações extraídas com esses canais. As imagens termográficas da lâmina ungueal de pacientes com onicomicose foram padronizadas e foi observada uma grande variação nas temperaturas médias em cada grupo de pacientes. As unhas contaminadas, entretanto, apresentaram uma média ligeiramente menor de temperatura que as unhas saudáveis e a classificação para diferentes graus de acometimento também poderá ser explorado para aumentar o potencial dessas técnicas para o diagnóstico rápido e não invasivo. A extração de DNA para o diagnóstico molecular foi padronizada e os testes de cultura estão em fase de crescimento do fungo, uma vez que é um processo mais lento do que o próprio tratamento por TFD.

Portanto, esse estudo mostrou o potencial da TFD para a inativação fotodinâmica dos microrganismos causadores de onicomicose e algumas possibilidades de diagnóstico. Um protocolo clínico foi padronizado com o desenvolvimento de *kit* de tratamento contendo a melhor formulação estudada (uréia 40% e creme de curcumina 1,5%) e a última versão do equipamento, hoje, em fase de aprovação na ANVISA, o que deverá contribuir para a rápida disponibilização desta técnica para a realidade clínica nacional e internacional.

REFERÊNCIAS

- 1 GUPTA, K. et al. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: a multicenter canadian survey of 15,000 patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 2 Pt 1, p. 244–248, 2000.
- 2 ALBERT, S. F.; WEIS, Z. H. Management of onychomycosis with topicals. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p. 605–615, 2004.
- 3 MARTINS, E. A. et al. Onicomiose : estudo clínico , epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto Onychomycosis : clinical , epidemiological and mycological study in the municipality of São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 596–598, 2007.
- 4 BARAN, R.; COQUARD, F. Combination of fluconazole and urea in a nail lacquer for treating onychomycosis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 16, n. 1, p. 52–55, 2005.
- 5 KAUR, R. et al. Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 108–116, 2008..
- 6 MARAKI, S.; MAVROMANOLAKI, V. E. Epidemiology of onychomycosis in Crete, Greece: a 12-year study. **Mycoses**, v. 59, n. 12, p. 798–802, 2016.
- 7 FINCH, J. J.; WARSHAW, E. M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. **Dermatology Therapy**, v. 20, n. 16, p. 31–46, 2007.
- 8 GODOY-MARTINEZ, P. et al. Onychomycosis in Sao Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 168, n. 3, p. 111–116, 2009
- 9 ELEWSKI, B. E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 415–429, 1998.
- 10 BALLESTÉ, R. et al. Onicomiosis. revisión del tema. **Revista Médica del Uruguay**, v. 19, n. 2, p. 93–106, 2003.
- 11 LÓPEZ-JODRA, O.; TORRES-RODRÍGUEZ, J. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomiosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16 p. 11-15, 1999.
- 12 ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004.
- 13 VATANSEVER, F. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 6, p. 955–989, 2013.
- 14 THOMAS, J. et al. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 497-519, 2010.
- 15 MAHONEY, J. M.; BENNET, J.; OLSEN, B. The diagnosis of onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 21, n. 3, p. 463–467, 2003
- 16 SUMMERBELL, R. C. Form and function in the evolution of dermatophytes. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p. 30–43, 2000. Disponível em: <<https://www.dermatophytes.reviberoammicol.com/p030043.pdf>>. Acesso em: 23 Jan. 2017
- 17 VEJNOVIC, I. et al. Permeation studies of novel terbinafine formulations containing hydrophobins through human nails in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 397, n. 1-2, p. 67-76, 2010.

- 18 YARAK, S.; ARAÚJO, T. M. D. A. Afecções ungueais nas doenças sistêmicas. o que as unhas podem dizer-nos. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, p. 15–19, 2009. Suplemento 1.
- 19 ELKEEB, R. et al. Transungual drug delivery: current status. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 384, n.1–2, p. 1-8, 2010.
- 20 SHEMER, A. et al. Ciclopirox nail lacquer for the treatment of onychomycosis: an open non-comparative study. **Journal of Dermatology**, v. 37, n. 2, p. 137–139, 2010.
- 21 FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 149, p. 1–4, 2003. Supplement.
- 22 BARAN, R. et al. **Baran and Dawber's diseases of the nails and their management**. 3rd ed. New York: John Wiley, 2008.
- 23 BALLESTÉ, D. R ; MOUSQUÉS, N.; GEZUELE, E. Onicomycosis por hongos filamentosos no dermatofitos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 19, n. 9, 2001. doi: 10.1016/S0213-005X(01)72689-4.
- 24 COSTA, M. et al. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1, p. 19–22, 2002.
- 25 ZAIAS, N. Onychomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 3, n. 3, p. 445–460, 1985.
- 26 SCHER, R. K. Onychomycosis: a significant medical disorder. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 35, n. 3 Pt 2, p. S2-S5, 1996.
- 27 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.
- 28 VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1991.
- 29 WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240–259, 1995.
- 30 COELHO, A. C. et al. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 1017–1020, 2008.
- 31 BRASCH, J. Pathogenesis of tinea. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 8, n. 10, p. 780–786, 2010.
- 32 ŚPIEWAK, R. Zoophilic and geophilic fungi as a cause of skin disease in farmers. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 5, n. 2, p. 97-102, 1998.
- 33 HERNÁNDEZ-SALAZAR, A. et al. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 2, p. 122–124, 2007.
- 34 LACAZ, C. S. et al. Tratado de micologia médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 297–298, 2002.
- 35 TOSTI, A.; PIRACCINI, B. M. Treatment of common nail disorders. **Dermatologic clinics**, v. 18, n. 2, p. 339–348, 2000.
- 36 MÜGGE, C. et al. Causative agents of onychomycosis—a retrospective study. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 4, n. 3, p. 218–228, 2006.

- 37 CASTRO LÓPEZ, N. et al. Fusarium species detected in onychomycosis in Colombia. **Mycoses**, v. 52, n. 4, p. 350–356, 2009.
- 38 TORTORANO, A. M. et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of Fusarium spp. from northern Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2683–2685, 2008.
- 39 ARAÚJO, A. J. G. et al. Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 445–455, 2003.
- 40 LACROIX, C.; CHAUVIN, M. F. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against *Scytalidium dimidiatum* and *Scytalidium hyalinum* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 835–837, 2008.
- 41 CURSI, I. B. et al. Onychomycosis due to *Scytalidium* spp.: a clinical and epidemiologic study at a University Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 689–693, 2011.
- 42 SIDRIM, J. J. C. et al. Aspectos clínicos laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM J. J. C.; ROCHA M. F. G. (Ed.). **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. p.135-161.
- 43 MEYER, S. A. et al. *Candida Berkhout*. In: KURTZMAN, C.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- 44 SURJUSHE, A. et al. A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73, n. 6, p. 397–401, 2007.
- 45 GARCIA-NIETO, A. V. et al. Onychomycosis (and II): diagnosis and treatment. **Actas Dermo-Sifiliograficas**, v. 87, n. 12, p. 659–673, 1996.
- 46 ROMANO, C. et al. Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985-2000. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 42–44, 2005.
- 47 KAZEMI, A. Tinea unguium in the north-west of Iran (1996-2004). **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 24, n. 2, p. 113–117, 2007.
- 48 ALVAREZ, M. I. et al. Onychomycosis in Cali, Colombia. **Mycopathologia**, v. 158, n. 2, p. 181–186, 2004.
- 49 LOPES, J. O. et al. A ten-year survey of: onychomycosis in the central region of the Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 41, n. 3, p. 147–149, 1999.
- 50 RAJAN, R.; VASUDEVAN, D. T. Effect of permeation enhancers on the penetration mechanism of transfersomal gel of ketoconazole. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, v. 3, n. 2, p. 112–116, 2012.
- 51 GUPTA, A. K.; PAQUET, M.; SIMPSON, F. C. Therapies for the treatment of onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 544–554, 2013.
- 52 GUNT, H. B.; KASTING, G. B. Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4–5, p. 254–260, 2007.
- 53 SHIVAKUMAR, H. N. et al. Bilayered nail lacquer of terbinafine hydrochloride for treatment of onychomycosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 10, p. 4267–4276, 2010.

- 54 LECHA, M. Amorolfine and itraconazole combination for severe toenail onychomycosis; results of an open randomized trial in Spain. **British Journal of Dermatology**, v. 145, p. 21-26, 2001. doi: 10.1111/j.1365-2133.2001.00044.x.
- 55 BEULE, K.; GESTEL, J. Pharmacology of itraconazole. **Drugs**, v. 61, S1, p. 27–37, 2001.
- 56 ODDS, F. C.; BOSSCHE, H. V. Antifungal activity of itraconazole compared with hydroxy-itraconazole in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 371–373, 2000.
- 57 EVANS, E. G. V. Drug synergies and the potential for combination therapy in onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. S 1, p. 11–3, 2003.
- 58 SARIFAKIOGLU, E. et al. In vitro antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing tinea unguium. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 32, n. 6, p. 675–679, 2007.
- 59 WELSH, O.; VERA-CABRERA, L.; WELSH, E. Onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 151–159, 2010.
- 60 SCHALLER, M. et al. Susceptibility testing of amorolfine, bifonazole and ciclopiroxolamine against *Trichophyton rubrum* in an in vitro model of dermatophyte nail infection. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 753–758, 2009.
- 61 SILVA, A. P. et al. A promising strategy for the treatment of onychomycosis with curcumin and photodynamic therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, p. 434–437, 2015. doi: 10.17265/2328-2150/2015.09.005
- 62 PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.
- 63 ULIANA, M. P. et al. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1137–1145, 2014.
- 64 BORGHETI-CARDOSO, L. N. et al. Onychomycosis treatment: new emerging therapies and challenges. **Advances in Medicine and Biology**, v. 91, n. 1, p. 61–79, 2015.
- 65 RUBIO, M. C. et al. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, n. 1, p. 16–22, 1999.
- 66 ARRESE, J. E.; PIÉRARD, G. E. Treatment failures and relapses in onychomycosis: a stubborn clinical problem. **Dermatology**, v. 207, n. 3, p. 255–260, 2003.
- 67 TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. Diagnóstico microbiológico de las micosis cutáneas superficiales. **Medicina Clínica**, v. 126, n. 1, p. 25–29, 2006.
- 68 LUCAMARINI, M. et al. Device-independent entanglement-based Bennett 1992 protocol. **Physical Review A**, v. 86, n. 3, p. 032325, 2012.
- 69 COPETO, S. C. M. F. **Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomicoses**. 2010. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova Lisboa, Lisboa, 2010.
- 70 SCOGNAMIGLIO, T. et al. Comparison of inhibitory mold agar to sabouraud dextrose agar as a primary medium for isolation of fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1924–1925, 2010.
- 71 BET, D. L. **Padrões de dermatoscopia da placa ungueal nas onicomicoses**. 2015. 88 p. Dissertação (Mestrado em Dermatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

- 72 VILLASEÑOR-MORA, C. Procedure to diagnose onychomycosis through changes in emissivity on infrared images. **Journal of Biomedical Optics**, v. 18, n. 11, p. 116005, 2013.
- 73 RAMIREZ, D. P. et al. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 1, p. 22–26, 2014.
- 74 ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.
- 75 ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Medical Physics**, v. 35, n. 7, p. 3127, 2008.
- 76 ZHU, T.C. et al. Comparison of singlet oxygen threshold dose for PDT. **Proceedings of the SPIE**, v. 8931, p. 89310I, 2014. doi: 10.1117/12.2039719
- 77 DAI, T. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–16, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00120
- 78 ALLISON, R. R. et al. PD/PDT for gynecological disease: a clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 1, p. 51–63, 2005.
- 79 BAGNATO, V. S. et al. PDT experience in Brazil: a regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 107–118, 2005.
- 80 GRECCO, C. et al. Single LED-based device to perform widefield fluorescence imaging and photodynamic therapy. **Proceedings of the SPIE**, v. 9531, 2015. doi:10.1117/12.2185925
- 81 TRINDADE, F. Z. et al. Toxicity of photodynamic therapy with LED associated to Photogem®: an in vivo study. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 403–411, 2012.
- 82 SILVA, A. P. et al. Development and comparison of two devices for treatment of onychomycosis by photodynamic therapy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 6, p. 61109, 2015.
- 83 CUNHA, M. C.; RIBEIRO, A. O. **Síntese e caracterização de clorinas. estudo das propriedades da terapia fotodinâmica.** Disponível em: <http://ic.ufabc.edu.br/II_SIC_UFABC/resumos/paper_5_190.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- 84 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.
- 85 SILVA, A. P. et al. Fast elimination of onychomycosis by hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 328–330, 2013.
- 86 KAUR, R. et al. Onychomycosis- epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 108–116, 2008.
- 87 LEE, S. J. H. et al. Use of the chlorophyll derivative, purpurin-18, for syntheses of sensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**, n. 19, p. 2369–2377, 1993. doi: 10.1039/P19930002369.
- 88 GOVINDARAJAN, V. S. Turmeric--chemistry, technology, and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 199–301, 1980.
- 89 SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

- 90 KHAN, I. A.; ABOURASHED, E. A. **LEUNG'S encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics**. Disponível em: <<http://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/leungs-encyclopedia-of-common-natural-ingredients-3rd-edition.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- 91 PULIDO-MORAN, M. Curcumin and health. **Molecules**, v. 21, n. 3, 2016. doi: 10.3390/molecules21030264.
- 92 BASNIWAL, R. K. et al. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 2056–2061, 2011.
- 93 KRAUSZ, A. E. et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. **Nanomedicine**, v. 11, n. 1, p. 195–206, 2015.
- 94 PANDIT, R. S. et al. Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its in vitro efficacy against human pathogens. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p. 991–997, 2015.
- 95 PANHÓCA, V. H. et al. Enhancement of the photodynamic therapy effect on streptococcus mutans biofilm. **Journal of Physical Science and Application**, v. 4, n. 2, p. 107–114, 2014.
- 96 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.
- 97 CARVALHO, M. T. et al. Curcumin in living biofilm: a study with confocal microscopy. In : OSA TECHNICAL DIGEST. Washington. **Anais...** Washington, DC: Optical Society of America, 2012
- 98 DOVIGO, L.N. et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 243–51, 2013.
- 99 SOUZA, L.M. **Fotossensibilizadores no controle de larvas do *Aedes aegypti* (diptera : culicidae)**. 2015. 119 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- 100 WANG, Y-J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867–1876, 1997.
- 101 WIKENE, K. O. et al. Formulation and characterization of lyophilized curcumin solid dispersions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): studies on curcumin and curcuminoids LII. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9045, n. 1, p. 1–9, 2014
- 102 SINGH, R. et al. The influence of Pluronic® on dark cytotoxicity, photocytotoxicity, localization and uptake of curcumin in cancer cells: studies of curcumin and curcuminoids XLIX. **Photochemical & Photobiological Sciences**. n. 3, p. 559–575, 2013. doi: 10.1039/C2PP25249J.
- 103 SANPHUI, P. et al. Fast Dissolving Curcumin Cocrystals. **Crystal Growth & Design**, n. 11, n. 9, p. 4135–4145, 2011.
- 104 REGO-FILHO, F.G. et al. Validation of photodynamic action via photobleaching of a new curcumin-based composite with enhanced water solubility. **Journal of Fluorescence**, v. 24, n. 5, p. 1407–1413, 2014.
- 105 PANHOCA, V.H. et al. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy against streptococcus mutans Biofilm in situ. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 17, n. 3, p. 184–191, 2016.
- 106 BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Osvaldo Cruz. **Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. Disponível em: < <https://www.ifsc.usp.br/cibio/arquivos/procedimentos-para-manipulacao-microorg-patogenicos-ou-recomb-fiocruz.pdf>>. Acesso em 23 Jan. 2016.

- 107 BRUMANO, L. P. et al. Estirpes bacterianas-padrão , formas de obtenção de doação e sua manutenção em laboratórios de ensino e pesquisa. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 3, p. 21-26, 2011.
- 108 BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Osvaldo Cruz. **Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. Disponível em: < <https://www.ifsc.usp.br/cibio/arquivos/procedimentos-para-manipulacao-microorg-patogenicos-ou-recomb-fiocruz.pdf>>. Acesso em 23 Jan. 2016.
- 109 LI, L. et al. Effect of growth period, storage time and varieties on the contents of main active constituents of *Curcuma longa* L. in rhizome. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 24, n. 10, p. 589-637, 1999.
- 110 COSTA, L.D. S. **Síntese e caracterização de porfirinas como potenciais agentes fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica**. 2013. 138 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013..
- 111 PDT PHARMA INDUSTRIA E COMERCIO DE PRODUTOS FARMACEUTICOS LTDA EPP. Ana Paula da Silva; Fernanda Mansano Carbinatto; Natalia Mayumi Inada. **Incorporação de curcumina e/ou curcuminóides em formulação para tratamento de onicomicose por terapia fotodinâmica**. BR 10 2015 022081 2, 09 de set. 2015.
- 112 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional Vigilancia Sanitária. Resolução - RDC Nº 45 , de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 ago. 2012.
- 113 BAGNATO, Vanderlei Salvador. Ana Paula Silva et al. **Equipamento portátil a base de Led, para o tratamento de onicomicose**. MU 9102265-7 U2, 05 dez. 2011, 18 mar. 2014.
- 114 BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A. et al. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1200–1204, 2007.
- 115 KANBE, T. et al. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**, v. 19, n. 11, p. 973-989, 2002.
- 116 DĄBROWSKA, I. et al. The use of a one-step PCR method for the identification of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* infection of pets. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 2, p. 375–378, 2014.
- 117 COSTA, M. M. **Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso médico-odontológico**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 118 FERNÁNDEZ-CUEVAS, I. et al. Classification of factors influencing the use of infrared thermography in humans: A review. **Infrared Physics & Technology**, v. 71, n. 1, p. 28–55, 2015.
- 119 ALMEIDA, L.P. **Caracterização de pigmentos da curcuma longa L., avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese in vitro na produção de curcuminóides e óleos essenciais**. 2006. 120 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- 120 ANAND, P. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 11, p. 1590–1611, 2008.
- 121 GORE, J.P., XU, L.X. Thermal imaging for biological and medical diagnostics. In: VO-DINH, T. (Ed.). **Fundamentals, devices, and techniques**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

122 ARKIN, H. et al. Recent developments in modeling heat transfer in blood perfused tissues. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 41, n. 2, p. 97–107, 1994.

123 JONES, B. F.; PLASSMANN, P. Digital Infrared thermal imaging of human skin. **Engineering in Medicine**, v. 21, n. 6, p. 41–48, 2002.

APÊNDICE

A1 Publicações geradas no período do Doutorado (artigos, capítulos de livros e patentes)

1. SILVA, A. P.; CARBINATTO, F. M.; BAGNATO V. S.; INADA, N. M. **A Promising Strategy for the Treatment of Onychomycosis with Curcumin and Photodynamic Therapy**. Journal of Pharmacy and Pharmacology. v.3, p.434 - 437, 2015.
2. SILVA, A. P.; CHIANDRONE, D. J.; TINTA, J. W. R.; KURACHI, C.; INADA, N. M.; BAGNATO, V. S. **Development and comparison of two devices for treatment of onychomycosis by photodynamic therapy**. Journal of Biomedical Optics. v.20, p.061109, 2015.
3. SALVIO, A. G.; BLANCO, K. C.; SILVA, A. P.; BUZZÁ, HILDE H.; INADA, N. M.; BAGNATO, V. S. **Non-invasive treatment of extensive eyelid cancerous lesion by photodynamic therapy: a case report**. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. v.1, p.1 - , 2015.
4. BUZZÁ, H. H.; SILVA, A. P.; FILHO, J. D. VOLLET; RAMIREZ, D. P.; TRUJILLO, J. R. ; INADA, N. M.; MORIYAMA, L. T.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. **Photodynamic Therapy: Progress toward a scientific and clinical network in Latin America**. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy v.01, p.01 - , 2015.

A2. Artigos aceitos para publicação

- 1 BLANCO, K. C.; INADA, N. M.; SILVA, A. P.; BUZZÁ, HILDE H.; STRINGASCI, M. D.; SALVIO, A. G.; Kurachi, C; BAGNATO, V. S. **A multicenter clinical study of expected and unexpected side reactions during and after skin cancer treatment by photodynamic therapy**. SKINmed. , 2016.
2. ROMANO, R.A.; PRATAVIEIRA, S.; SILVA, A. P. da; Kurachi, C.; Guimaraes, F.E.G. **Light-driven photosensitizer uptake increases Candida albicans photodynamic inactivation**. Journal of Biophotonics. 2017 DOI:10.1002/jbio.201600309

A.3 Capítulos de livros publicados

- 1 SILVA, A. P.; BAGNATO, V. S.; INADA, NATALIA M. **New Approaches to the Treatment and diagnosis of Onychomycosis**. In: Advances in Medicine and Biology.1, 2015, v.91, p. 39-.

2 SILVA, A. P.; BUZZA, H. H.; VOLLET FILHO, J. D. América Latina: **Uma rede científica e terapêutica formada pelo uso da Terapia Fotodinâmica**. In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil.1 ed.São Carlos : Compacta Gráfica e editora, 2015, v.1, p. 279-287.

3 OLIVEIRA, K.; INADA, N. M.; SILVA, A. P; CARBINATTO, F.Fotossensibilizadores para uso em Terapia Fotodinâmica. In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil.1 ed.São Carlos : Compacta Gráfica e editora, 2015, v.1, p. 61-71.

4 PERUSSI FILHO, S.; SILVA, R. C. E.; SILVA, A. P.**PDT PHARMA: Ciência, Empreendedorismo e Inovação para a saúde brasileira**. In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil.1 ed.São Carlos : Compacta Gráfica e editora, 2015, v.1, p. 289-299.

5 SILVA, A. P.; INADA, N. M.**Terapia Fotodinâmica para o tratamento da Onicomicose**. In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil.1 ed.São Carlos : Compacta Gráfica e editora, 2015, v.1, p. 249-262.

6. DOMENICO JUNIOR, A.; BLANCO, K. C.; SILVA, A.P.; INADA, N.M. **Uma visão do especialista: Centro de tratamento de Presidente Prudente**. In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil.1 ed.São Carlos : Compacta Gráfica e editora, 2015, v.1, p. 173-179.

A.4 Patentes

SILVA, A. P.; BUZZA, H. H.; INADA, N. M.; SILVA, R. C. E.; PERUSSI FILHO, S. **SÍNTESE E FORMULAÇÃO DO ÁCIDO AMINOLEVULÍNICO (ALA) E DERIVADOS PARA USO NA TERAPIA FOTODINÂMICA**, 2016. Categoria: Produto e Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020160273862. Número do depósito PCT: 870160069311. Data de depósito: 22/11/2016. Depositante/Titular: PDT Pharma Industria e Com de Prod Farmaceuticos LTDA-EPP.

SILVA, A. P.; CARBINATTO, F.; INADA, NATALIA M. **INCORPORAÇÃO DE CURCUMINA E/OU CURCUMINÓIDES EM FORMULAÇÃO PARA TRATAMENTO DE ONICOMICOSE POR TERAPIA FOTODINÂMICA**, 2015. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201502208. Data de depósito: 09/09/2015. Depositante/Titular: Ana Paula da Silva, Fernanda carbinatto, INADA, N. M.

SILVA, A. P.; KURACHI, C., INADA, N. M.; BAGNATO, V.S. **EQUIPAMENTO PORTÁTIL A BASE DE LED, PARA O TRATAMENTO DE ONICOMICOSE**, 2014. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: MU91022657. Número do depósito PCT: 18110047225. Data do depósito PCT: 18/03/2014. Data de depósito: 18/03/2014. Depositante/Titular:.

A.5 Participação em banca de trabalhos de conclusão Graduação

1 VARGAS, D. R.; SILVA, ANA PAULA DA

Participação em banca de Priscila Trindade Weis. Avaliação da inativação fotodinâmica sobre o crescimento in vitro da *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida Albicans*, 2014 (Ciências Biológicas) Centro Universitário Central Paulista

2 SILVA, A. P.; Ramirez, D.P; Dovigo, L.

Participação em banca de Thais Saldanha Lavezzo. Eficácia de fotossensibilizadores derivados de porfirina e curcuminóides na inativação fotodinâmica de *Staphylococcus Aureus*, 2012 (Fisioterapia) Universidade Federal de São Carlos

A.6 Prêmios

2015- Prêmio Yvonne Primerano Mascarenhas., IFSC - Instituto de Física de São Carlos – em Primeiro lugar como melhor trabalho de Doutorado.

A.7 Participação em congressos

15th IPA WORLD CONGRESS taking place in Rio de Janeiro, Brazil on May 22-26, 2015. title: NEW STRATEGIES FOR TREATMENT OF ONYCHOMYCOSIS, Oral presentation.

SPIE - 2014 Photonics West. Onychomycosis diagnosis using fluorescence and infrared imaging systems. 2015. Poster presentation (Congresso)

V SIFSC - Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos. Novas estratégias para o diagnóstico e tratamento de onicomicose. 2015. (Congresso).

A.8 Publicações anais de congressos

DA SILVA, A. P. ; KURACHI, C. ; BAGNATO, V. S. ; INADA, N. M. . ELIMINATION OF ONYCHOMYCOSIS BY PHOTODYNAMIC THERAPY. In: 14th World Congress of the International Photodynamic Association, 2013, Seoul. 14th World Congress of the International Photodynamic Association, 2013. p. 106-106.

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do comite de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O DIAGNÓSTICO DE ONICOMICOSE E TRATAMENTO DE POR TERAPIA FOTODINÂMICA.

Pesquisador: Ana Paula da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37040714.5.0000.5504

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 841.063

Data da Relatoria: 27/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de doutorado a ser desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. O projeto trata do uso de Terapia Fotodinâmica no tratamento de Onicomicose (micose nas unhas).

Objetivo da Pesquisa:

Do projeto:

"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. Esta pesquisa é para investigar a distribuição dos compostos fotossensibilizadores em solução tópica e Gel, assim como a possível seletividade do fármaco pelos micro-organismos. Além disso, pretendemos obter importantes informações relativas à classificação dos micro-organismos que acometem as unhas, 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. Este projeto é uma oportunidade de estabelecer uma nova forma de incorporar modernas tecnologias no panorama da saúde pública brasileira, levando em conta a realidade do sistema brasileiro de saúde e a relação custo-benefício envolvida."

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9883

E-mail: cephumanos@ufscar.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS/UFSCAR

Continuação do Parecer: 841.063

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O protocolo descreve de forma razoável os riscos e benefícios existentes no projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante em seu contexto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios estão presentes e bem redigidos.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO CARLOS, 22 de Outubro de 2014

Assinado por:
Ricardo Carneiro Borra
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

CEP: 13.565-905

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br

ANEXO B - TCLE- Para Maiores de idade

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa clínica. Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecida sobre as informações à seguir e aceitando ser uma participante desta pesquisa, preencher e assinar as DUAS vias deste documento. Uma via pertence à você e a outra ao pesquisador responsável.

Título do Projeto: “Novas estratégias para o diagnóstico de Onicomiose e tratamento de por Terapia Fotodinâmica.”

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, Profa. Dra. Cristina Kurachi, Dra. Natalia Mayumi Inada, Ms. Ana Paula da Silva **Instituição do Pesquisador Responsável:** Instituto de Física de São Carlos-USP

Contatos dos responsáveis pela pesquisa: Ms. Ana Paula da Silva : Av. Trabalhador São-carlense, 400, Grupo de Óptica, IFSC/USP, São Carlos-SP. Tel.: (16) 3373 9810, ramal 216/ 99345-6567; Dra. Natalia M. Inada: Av. Trabalhador São-carlense, 400, Grupo de Óptica, IFSC/USP, São Carlos-SP. Tel.: (16) 3373 9810, ramal 235/ 98135-6789;

NOME DA PARTICIPANTE: _____

IDADE: _____ ANOS

RG: _____

TELEFONES: _____

- 1. Justificativa e objetivos:** A TFD direcionada ao tratamento de onicomioses, 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. Os objetivos são: atualizar o estudo a respeito da terapêutica das onicomioses, bem como a avaliação da eficiência da TFD na inativação de micro-organismos causadores desta doença.
- 2. Procedimentos que serão utilizados na pesquisa:** Serão registradas imagens das lesões de cada paciente com câmera fotográfica digital Sony DSC-H50 seguida por imagens com infra-vermelho e fluorescência para uma melhor diagnóstico. Então será coletada de cada participante as amostras das unhas acometidas e enviadas para estudo micológico e cultura, assim como PCR no laboratório da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu para identificar o micro-organismo causadores de onicomioses. Os pacientes do grupo que irá ter o tratamento com Uréia a 40%, fará um curativo oclusivo com Uréia a 40%, 24 horas antes da terapia fotodinâmica, cobrindo a pele com esparadrapo para proteção á ureia. Em seguida a unha será limpa com álcool 70%. Depois, os pacientes serão colocados em uma sala com baixa ou nenhuma luminosidade. Aplicar na unha acometida a curcumina gel 1,5% sobre a área acometida pela micose na unha; Com um plástico filme (PVC) cobrir o dedo,

para melhorar a absorção do medicamento na unha; envolver o dedo com o papel alumínio para evitar o contato do medicamento com a luz; Em posição aguardar 40 minutos (penetração da droga no sítio). Após esse tempo, será realizado o tratamento com iluminação à base de LEDs com comprimento de onda em 450 nm, com Intensidade de iluminação de 100 mW/cm² para totalizar a dose de energia fornecida ao tecido de 120 J/cm². Após sete dias, os pacientes serão reavaliados e receberão um segundo tratamento, seguindo o mesmo protocolo da primeira sessão, como descrito anteriormente, e assim por diante até a eliminação completa do micro-organismo. A descrição do pós-tratamento e compilação dos dados e resultados será de no mínimo 1 ano.

3. **Os desconfortos e riscos possíveis e os benefícios esperados:** Não há na literatura nenhum relato contra-indicando ao tratamento por terapia fotodinâmica como no caso de mulheres grávidas ou com outros tipos de doenças. De fato, há um documento, produzido pela NHS – National Institute for Health and clinical Excellence localizado na Escócia, que atesta a segurança do uso da Terapia Fotodinâmica. Ao contrário das drogas sistêmicas, onde é preciso se resguardar da Luz Solar, devido à fotossensibilidade da pele, no uso tópico, a droga fotossensível é totalmente consumida pela luz durante a aplicação, deixando nenhuma possibilidade para ação da luz solar. No entanto, o tratamento é contra-indicado para pacientes que apresentarem reações alérgicas a qualquer um dos excipientes presentes na fórmula. Se no momento da primeira aplicação ficar evidente que não está havendo reposta satisfatória para um determinado paciente, este fato será imediatamente documentado e o paciente será retirado do estudo devendo ser encaminhado para receber os tratamentos convencionais. E apesar de não ser esperado nenhum incômodo ou desconforto durante os procedimentos durante os 20 minutos de tratamento iluminando a unha o procedimento poderá ser interrompido à qualquer momento e o participante será encaminhado para o tratamento convencional. O Comitê de Ética em Pesquisa da instituição será informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução CNS 466/2012. É assumida toda responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos e nesses casos, além do direito à assistência integral, a paciente terá direito à indenização. Como **benefícios esperados:** a participante receberá sem custo algum, a opção de um novo tratamento de eliminação dos micro-organismos causadores de onicomicose. Um tratamento rápido, não-invasivo, sem incômodos.
4. **Os métodos alternativos existentes:** 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. 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.
5. **A forma de acompanhamento e assistência, assim como seus responsáveis:** obedecemos os Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução CNS 466/2012, onde assumimos toda responsabilidade de dar assistência integral à participantes da pesquisa. As pacientes que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa (cobertura material para reparação a dano, causado pela pesquisa ao participante da pesquisa).
6. **A garantia de esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia, informando a possibilidade de inclusão em grupo controle ou placebo:** a participante e/ou seu representante legal deverão ter a garantia de todas as informações sobre esta pesquisa, metodologia e todos os procedimentos. Não aceite receber tratamento sem antes tirar todas as dúvidas e ter todas as perguntas respondidas. A participante também poderá ser incluída no grupo controle ou placebo (Grupo 3), o que significa que poderá: somente receber a uréia e o Gel contendo a substância ativada pela luz. Esse grupo controle é importante para que a pesquisa seja concluída com a certeza de que o grupo “tratamento”, ou seja, aquele cujas participantes receberam o gel contendo a substância ativada pela luz e a iluminação fotoativando esse composto, tenha sua eficácia e segurança comprovados. Participando do grupo controle (ou placebo), a paciente terá a garantia de receber o tratamento convencional no término do estudo.

7. **A liberdade do sujeito se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado:** a participante poderá se recusar a participar desta pesquisa e/ou retirar sua participação à qualquer momento, sem constrangimento nem penalização. Imediatamente após sua recusa ou retirada, será encaminhada para receber o tratamento convencional. A paciente não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.
8. **A garantia do sigilo que assegure a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa:** todas as informações pessoais coletadas neste estudo serão estritamente confidenciais. Somente a equipe de pesquisadores terá conhecimento dos seus dados. A participante terá toda a privacidade assegurada, podendo exigir seus direitos e ser ressarcida caso se sinta constrangida ou incomodada com alguma situação.
9. **As formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa:** a participante poderá à qualquer momento, solicitar o ressarcimento de despesas decorrentes da sua participação nesta pesquisa, tais como transporte e alimentação.
10. **As formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa:** a participante terá o direito à indenização financeira por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa, no caso de se sentir prejudicada por ter participado desta pesquisa. Não renuncie em nenhum momento do seu direito de ser amparado.
11. **Outras informações importantes:** cabe ao Comitê de Ética em Pesquisa receber denúncias de abusos ou notificação sobre fatos adversos que possam alterar o curso normal do estudo, decidindo pela continuidade, modificação ou suspensão da pesquisa, devendo, se necessário, solicitar a adequação do Termo de Consentimento; os pesquisadores responsáveis deverão justificar fundamentadamente, perante o CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) ou a CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), sobre a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar do estudo “Novas estratégias para o diagnóstico de Onicomiose e tratamento de por Terapia Fotodinâmica.”

São Carlos, _____ de _____ de _____.

Assinatura da participante

MS. Ana Paula da Silva /Dra. Natalia

ANEXO C -TCLE- Para Maiores de idade -Placebo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa clínica. Leia cuidadosamente o que segue e nos pergunte sobre qualquer dúvida que tiver. Após ser esclarecida sobre as informações à seguir e aceitando ser uma participante desta pesquisa, preencher e assinar as DUAS vias deste documento. Uma via pertence à você e a outra ao pesquisador responsável.

Título do Projeto: “Novas estratégias para o diagnóstico de Onicomicose e tratamento de por Terapia Fotodinâmica.”

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, Profa. Dra. Cristina Kurachi, Dra. Natalia Mayumi Inada, Ms. Ana Paula da Silva **Instituição do Pesquisador Responsável:** Instituto de Física de São Carlos-USP

Instituição do Pesquisador Responsável: Instituto de Física de São Carlos-USP

Contatos para esclarecimentos a qualquer momento: Ms. Ana Paula da Silva : Av. Trabalhador São-carlense, 400, Grupo de Óptica, IFSC/USP, São Carlos-SP. Tel.: (16) 3373 9810, ramal 216/ 99345-6567; Dra. Natalia M. Inada: Av. Trabalhador São-carlense, 400, Grupo de Óptica, IFSC/USP, São Carlos-SP. Tel.: (16) 3373 9810, ramal 235/ 98135-6789;

NOME DA PARTICIPANTE: _____

IDADE: _____ ANOS

RG: _____

TELEFONES: _____

- 12. Justificativa e objetivos:** 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. Os objetivos são: 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.
- 13. Procedimentos que serão utilizados na pesquisa:** Serão registradas imagens das lesões de cada paciente com câmera fotográfica digital Sony DSC-H50 seguida por imagens com infra-vermelho e fluorescência para uma melhor diagnóstico. Então será coletada de cada participante as amostras das unhas acometidas e enviadas para estudo micológico e cultura, assim como PCR no laboratório da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu para identificar o micro-organismo causadores de onicomicoses. Os pacientes do grupo que irá ter o tratamento com Uréia a 40%, fará um curativo oclusivo com Uréia a 40%, 24 horas antes da terapia fotodinâmica, cobrindo a pele com esparadrapo para proteção á ureia. Em seguida a unha será limpa com álcool 70%. Depois, os pacientes serão colocados em uma sala com baixa ou nenhuma luminosidade. Aplicar na unha acometida a curcumina gel 1,5% sobre a área acometida pela micose na unha; Com um plástico filme (PVC) cobrir o dedo,

para melhorar a absorção do medicamento na unha; envolver o dedo com o papel alumínio para evitar o contato do medicamento com a luz; Em posição aguardar 40 minutos (penetração da droga no sítio). Após esse tempo, será realizado o tratamento com iluminação à base de LEDs com comprimento de onda em 450 nm, com Intensidade de iluminação de 100 mW/cm² para totalizar a dose de energia fornecida ao tecido de 120 J/cm². Após sete dias, os pacientes serão reavaliados e receberão um segundo tratamento, seguindo o mesmo protocolo da primeira sessão, como descrito anteriormente, e assim por diante até a eliminação completa do micro-organismo. A descrição do pós-tratamento e compilação dos dados e resultados será de no mínimo 1 ano.

14. **Os desconfortos e riscos possíveis e os benefícios esperados:** Não há na literatura nenhum relato contra-indicando ao tratamento por terapia fotodinâmica como no caso de mulheres grávidas ou com outros tipos de doenças. De fato, há um documento, produzido pela NHS – National Institute for Health and clinical Excellence localizado na Escócia, que atesta a segurança do uso da Terapia Fotodinâmica. Ao contrário das drogas sistêmicas, onde é preciso se resguardar da Luz Solar, devido à fotossensibilidade da pele, no uso tópico, a droga fotossensível é totalmente consumida pela luz durante a aplicação, deixando nenhuma possibilidade para ação da luz solar. No entanto, o tratamento é contra-indicado para pacientes que apresentarem reações alérgicas a qualquer um dos excipientes presentes na fórmula. Se no momento da primeira aplicação ficar evidente que não esta havendo reposta satisfatória para um determinado paciente, este fato será imediatamente documentado e o paciente será retirado do estudo devendo ser encaminhado para receber os tratamentos convencionais. E apesar de não ser esperado nenhum incômodo ou desconforto durante os procedimentos durante os 20 minutos de tratamento iluminando a unha o procedimento poderá ser interrompido à qualquer momento e o participante será encaminhado para o tratamento convencional. O Comitê de Ética em Pesquisa da instituição será informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução CNS 466/2012. É assumida toda responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos e nesses casos, além do direito à assistência integral, a paciente terá direito à indenização. Como **benefícios esperados:** a participante receberá sem custo algum, a opção de um novo tratamento de eliminação dos micro-organismos causadores de onicomicose. Um tratamento rápido, não-invasivo, sem incômodos.
15. **Os métodos alternativos existentes:** 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. 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.
16. **A forma de acompanhamento e assistência, assim como seus responsáveis:** obedecemos os Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução CNS 466/2012, onde assumimos toda responsabilidade de dar assistência integral à participantes da pesquisa. As pacientes que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa (cobertura material para reparação a dano, causado pela pesquisa ao participante da pesquisa).
17. **A garantia de esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia, informando a possibilidade de inclusão em grupo controle ou placebo:** a participante e/ou seu representante legal deverão ter a garantia de todas as informações sobre esta pesquisa, metodologia e todos os procedimentos. Não aceite receber tratamento sem antes tirar todas as dúvidas e ter todas as perguntas respondidas. A participante também poderá ser incluída no grupo controle ou placebo (Grupo 3), o que significa que poderá: somente receber a uréia e o Gel contendo a substância ativada pela luz. Esse grupo controle é importante para que a pesquisa seja concluída com a certeza de que o grupo “tratamento”, ou seja, aquele cujas participantes receberam o gel contendo a substância ativada pela luz e a iluminação fotoativando esse composto, tenha sua eficácia e segurança comprovados.

Participando do grupo controle (ou placebo), a paciente terá a garantia de receber o tratamento convencional no termino do estudo.

A liberdade do sujeito se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado: a participante poderá se recusar a participar desta pesquisa e/ou retirar sua participação à qualquer momento, sem constrangimento nem penalização. Imediatamente após sua recusa ou retirada, será encaminhada para receber o tratamento convencional. A paciente não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

- 18. A garantia do sigilo que assegure a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa:** todas as informações pessoais coletadas neste estudo serão estritamente confidenciais. Somente a equipe de pesquisadores terá conhecimento dos seus dados. A participante terá toda a privacidade assegurada, podendo exigir seus direitos e ser ressarcida caso se sinta constrangida ou incomodada com alguma situação.
- 19. As formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa:** a participante poderá à qualquer momento, solicitar o ressarcimento de despesas decorrentes da sua participação nesta pesquisa, tais como transporte e alimentação.
- 20. As formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa:** a participante terá o direito à indenização financeira por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa, no caso de se sentir prejudicada por ter participado desta pesquisa. Não renuncie em nenhum momento do seu direito de ser amparada.
- 21. Outras informações importantes:** cabe ao Comitê de Ética em Pesquisa receber denúncias de abusos ou notificação sobre fatos adversos que possam alterar o curso normal do estudo, decidindo pela continuidade, modificação ou suspensão da pesquisa, devendo, se necessário, solicitar a adequação do Termo de Consentimento; os pesquisadores responsáveis deverão justificar fundamentadamente, perante o CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) ou a CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), sobre a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar do estudo “Novas estratégias para o diagnóstico de Onicomucose e tratamento de por Terapia Fotodinâmica.”

São Carlos, _____ de _____ de _____.

Assinatura da participante

MS. Ana Paula da Silva /Dra. Natalia Inada

ANEXO D -Ficha anamnese

Nome: _____ Código: _____

Data Nasc.: __/__/__ Faixa etária __ anos - Fones: _____

UNHAS PARTICIPANDO DO TRABALHO:

ESQUERDO

DIREITO

FOTOSENSIBILIZADOR

Para este paciente:

- () Curcumina Gel 1,5%
 () Curcumina Gel ureia a 40%
 () Controle Curcumina + Ureia sem Luz

TOTAL CASOS (unhas) =
 Medidas Paquímetro:

MEDICAMENTOS EM USO NO MOMENTO:

FUMANTE SIM () NÃO ()

QUANDO PERCEBEU A MICOSE? +/- __ anos

TERAPIA ANTERIOR (CASO REALIZADA): _____

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 _____

Diagnóstico laboratorial

Culturas: _____

Micologia: _____

PCR: _____

Imagem Fluorescência: _____

Imagem IF: _____

PROCEDIMENTO: 1) antissepsia do pé; 2) Aplicação Uréia 40%; 3) Aplicação do fotossensibilizador; 4) Cobrir com uma gaze e papel alumínio por uma hora; 5) Realizar a aplicação da luz. (100 mW/cm² 120 J totalizando 20 minutos)

EVOLUÇÃO	DATA	OBSERVAÇÕES
Admissão		
1º retorno		
2º retorno		
3º retorno		
4º retorno		
5º retorno		
6º retorno		

ANEXO E – Cromatograma da curcumina da Sigma Aldrich 0,25

ANEXO F – Cromatograma da curcumina PDT Pharma- 0,25

ANEXO G – Cromatograma da curcumina da Sigma Aldrich 0,025

ANEXO H – Cromatograma da curcumina PDT Pharma- 0,25

ANEXO I – Cromatograma da curcumina PDT Pharma- 0,25

ANEXO J – Cromatograma da curcumina Sigma Aldrich- 0,25