# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

# MARIA JÚLIA DE ARRUDA MAZZOTI MARQUES

Estudo in vitro da inativação fotodinâmica do Rhizopus oryzae

São Carlos 2022

# MARIA JÚLIA DE ARRUDA MAZZOTI MARQUES

Estudo in vitro da inativação fotodinâmica do Rhizopus oryzae

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

Área de concentração: Física Aplicada Opção: Física Biomolecular Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Kurachi

versão corrigida (versão original na Unidade que aloja o programa)

> São Carlos 2022

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.

Marques , Maria Júlia de Arruda Mazzotti Estudo in vitro da inativação fotodinâmica do Rhizopus oryzae / Maria Júlia de Arruda Mazzotti Marques ; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2023. 98 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Mucormicose. 2. Rhizopus oryzae. 3. Inativação fotodinâmica. 4. Controle microbiano . I. Kurachi , Cristina , orient. II. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Gilson e Maria Flávia; À minha vó, Imaculada; por todo o apoio incondicional. E especialmente ao meu avô, Geraldo (*in memorian*), que sempre teve muito orgulho de mim e me incentivou muito para chegar até aqui.

### AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Gilson e Maria Flávia, por todo apoio e suporte tanto ao longo da graduação quanto agora no mestrado, não chegaria até aqui sem o apoio de vocês. Muito obrigada por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos!

Aos meus avós, Imaculada e Geraldo (*in memorian*), por toda ajuda desde a graduação e por sempre me apoiarem a continuar na carreira. Muito obrigada ao meu querido avô Geraldo por todo orgulho que o senhor sempre teve de mim, sei que estaria muito feliz por ver sua neta chegando ao final do mestrado! Aos meus familiares por estarem sempre presente em minha vida! Muito obrigada pelo apoio e pelo carinho!

A minha orientadora, professora Cristina Kurachi. Cris, obrigada por primeiramente me orientar desde a IC, por todas as palavras de apoio, toda ajuda! Muito obrigada por sempre acreditar nesse trabalho e me motivar! Você é uma grande inspiração para mim!

A Doutora Fernanda Alves, por todo auxílio com a parte experimental e por tudo que me ensinou no laboratório de microbiologia. Fer, você se tornou uma amiga para a vida! Muito obrigada por tudo, você me inspira demais!

Ao professor Francisco Guimarães, pelas imagens lindíssimas feitas no confocal do *Rhizopus oryzae* e por todo entusiasmo e simpatia sempre que fizemos experimento!

Ao professor Vanderlei Bagnato por todos os ensinamentos e apoio ao laboratório!

A professora Marcia von Zeska Kress e a técnica Ludmilla Tonani, da USP Ribeirão Preto, por toda ajuda e ensinamentos sobre os conídios!

Aos amigos maravilhosos, Gran Gatinhos do CePOF: Anaju, Bretas, Camilla, Camila A., Camilinha, Gabs, Gian, Johan, Lorraine, Malu e Rapha, por todo apoio incondicional e serem amigos tão presentes. Obrigada por todo o carinho e happy hour na república!

Aos amigos queridos do CePOF: Alejandra, Didi, Leticia Velludo, Matheus, Murilo, Gabi, Isa, Loraine, Semira, Shirly, Natasha e Rebeca, pelo dia a dia no lab e corredores! A Claudinha, por todos os cafezinhos e conselhos maravilhosos no PQ!

Ao meu namorado, Mathias! Por todo o companheirismo e incentivo!

Ao Matheus Pena, por estar sempre tão presente na minha vida e ser um amigo tão especial. Obrigada por todo apoio!

A Giu, que mesmo estando tão longe se faz tão presente, por todo o carinho, conselhos e ajudas desde o início do mestrado. Você me inspira demais!

A minha primeira orientadora de laboratório, Pan! Obrigada por todos os ensinamentos passados durante a IC e por todo carinho que tem comigo até hoje!

Ao meu querido primo, Theodoro! Por cada mensagem trocada me incentivando e por todo o carinho!

As técnicas do Laboratório de Biofotônica, Lili e Nat! Muito obrigada por estarem sempre presente e disponíveis para ajudar! A todos do Laboratório de Biofotônica, muito obrigada!

Ao Instituto de Física de São Carlos pela estrutura de alta qualidade desde a minha graduação até agora! Ao Silvio e Ricardo da pós pelo apoio no serviço de pós-graduação. Ao grupo de Óptica, por toda estrutura e apoio de alta qualidade!

A todos os professores que tive desde o ensino infantil até na pós-graduação. Por todos os ensinamentos e me mostrarem que a educação muda o mundo!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES) código de financiamento 88887.6015113/2021-00.

"Às vezes somos guiados pelo que dizemos de nós mesmos e com muita frequência pelo que outras pessoas dizem de nós, sem que paremos para refletir e julgar." Jane Austen

#### RESUMO

MARQUES, M J. A. M. Estudo *in vitro* da inativação fotodinâmica do *Rhizopus oryzae*. 2022. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Durante a pandemia da COVID-19, surgiram várias complicações em pacientes infectados, sendo uma delas a mucormicose, que é uma doença fúngica extremamente agressiva com uma elevada taxa de mortalidade, especialmente em pessoas com sistema imune comprometidos. A maioria dos casos de mucormicose é causada pelo fungo Rhizopus oryzae, também conhecido como fungo negro, com 90% dos casos afetando o sítio rinocerebral. Os tratamentos utilizados são baseados em doses elevadas de anfotericina B e posaconazol, associadas a ressecções cirúrgicas quando possível. Contudo, mesmo com um tratamento antifúngico agressivo, a taxa de mortalidade atribuível estimada é elevada. Na ausência de desbridamento cirúrgico do tecido infectado, o tratamento antifúngico por si só não é curativo. Por isso há necessidade de desenvolvimento de tratamentos adjuvantes. A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) pode ser uma opção terapêutica auxiliar para a mucormicose. Devido à falta de relatos na literatura sobre a morfologia e a inativação fotodinâmica de R. oryzae, realizamos uma caracterização desse fungo utilizando Microscopia Confocal e Microscopia Eletrônica de transmissão e investigamos diferentes protocolos utilizando o Photodithazine® (PDZ) como um fotossensibilizador. Foi estudada resposta sobre a taxa de crescimento do fungo sob parâmetros de tratamento distintos como concentração e tempo de incubação do fotossensibilizador e associação com surfactante Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Para as hifas, tanto na fase clara quanto escura, nos protocolos utilizando somente PDZ observamos uma resposta fotodinâmica ineficaz, ao adicionar SDS 0,01% notamos uma melhora na resposta e com a combinação do SDS 0,05% e PDZ obtivemos uma taxa de inibição de 98% do crescimento para 2 sessões de TFDa na fase clara e 72% de inibição no protocolo de 1 sessão para a fase escura. No estudo em conídio conseguimos observar a redução de 1,7 log<sub>10</sub> do crescimento do fungo. Neste presente trabalho, a TFDa mostrou potencial antimicrobiano no estudo in vitro do R. oryzae.

Palavras-chave: Mucormicose. *Rhizopus oryzae*. Inativação fotodinâmica. Controle microbiano.

### ABSTRACT

MARQUES, M J. A. M. *In vitro* study of photodynamic inactivation of *Rhizopus oryzae*. 2022. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

During the COVID-19 pandemic, several complications arose in infected patients, one of them was mucormycosis, which is an extremely aggressive fungal disease with a high mortality rate, especially in people with compromised immune system. The majority of the mucormycosis cases are caused by the fungus Rhizopus oryzae, also known as black fungus, with 90% of cases affecting the rhinocerebral region. The treatment used are based on high doses of amphotericin B and posaconazole, associated with surgical resection whenever possible. However, even with an aggressive antifungal treatment, the estimated attributable mortality rate is high. In the absence of surgical debridement of the infected tissue, antifungal treatment alone is not curative. Therefore, there is a need for development of alternative auxiliary treatments. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) may be an auxiliary therapeutic option for mucormycosis. The purpose of this study is to evaluate the efficiency of photodynamic inactivation in controlling the growth of *R. oryzae*. Due to the lack of reports in the literature on the morphology and photodynamic inactivation of R. oryzae, we performed a characterization of this fungus using Confocal Microscopy and Transmission Electron Microscopy and investigated different protocols using Photodithazine® (PDZ) as a photosensitizer. Response on fungal growth rate under different treatment parameters such as photosensitizer concentration and incubation time, and association with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) surfactant was studied. For hyphae, both in the light and dark phases, in the protocols using only PDZ we observed an ineffective photodynamic response, when adding SDS 0.01% we noticed an improvement in the response and with the combination of SDS 0.05% and PDZ we obtained a 98% growth inhibition rate for 2 sessions of aPDT in the light phase and 72% inhibition in the 1 session protocol for the black phase. In the conidium study we were able to observe 1.7 log<sub>10</sub> reduction in the fungus growth. In this present work, TFDa showed great potential in the in vitro study of R. oryzae.

Keywords: Mucormycosis. Rhizopus oryzae. Photodynamic inactivation. Microbial control.

### LISTA DE FIGURAS

gura 1 - Esquema da estrutura da espécie Rhizopus spp	.29
gura 2 - Ciclo de vida do Rhizopus sp	.30
gura 3 - Esquema representando a inalação dos esporos fúngicos,que geralmente infectam	os
seios da face ou pulmões	.31
gura 4 - Diagrama de Jablonski	.33
gura 5 - Estrutura química do PDZ	.35
gura 6 - Imagem representativa das fases de crescimento do fungo, à direita a Fase Clara	que
ocorre com 24h de crescimento, à esquerda a Fase Escura que ocorre com 48h	de
crescimento	.44
gura 7 - A) Hifas (1), Esporângio (2) e esporos (3) da fase escura do R. oryzae observados	s na
Microscopia de campo claro, no aumento de 20x. B) Hifas (1) e esporângios (2)	de

Figura 8 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão em amostras de R. oryzae, em
A) e B) para a fase clara, com 24 horas de crescimento, em que é possível notar os esporos, em C) e D) para a fase escura, com 48 horas de crescimento, em que se nota o esporângio, em E) e F) para a fase escura, com 7 dias de crescimento, em que é possível observar o esporângio. A seta 1 representa a membrana do esporângio e a seta 2 a columela.

- Figura 11 Esquema do tratamento de hifa do R.oryzae com AMB. Inicialmente com o auxílio de uma seringa se obtém um disco de 8 mm de diâmetro das hifas crescidas em meio sólido. Os discos são depositados na placa de 24 poços para o posterior tratamento.
- Figura 12 Incubação do FS na placa de 24 poços. Foram adicionados 200  $\mu$ L do FS por poço.
- Figura 13 Placa sendo iluminada durante um protocolo de IFD. ...... 56

Figura 15 - Cálculo da área de inibição do crescimento do fungo no software ImageJ. ...... 59

Figura 17- Espalhamento da gota de água sem SDS e com SDS em amostra do R. oryzae.... 62

Figura 1	-Taxas de inibição de crescimento obtidas para amostras de R.oryzae, na f	àse clara,
	submetidos à TFD utilizando Photodithazine® como agente fotossensib	ilizador e
	SDS 0,05%	65

- Figura 23 Imagens de microscopia confocal de amostras da fase clara do R. oryzae submetidos à TFD com o fotossensibilizador Photodithazine na concentração de 150 μg/mL. Em A) e B) imagens de fluorescência, em vermelho é a fluorescência do Photodithazine, no aumento de 63x. Em C) e D) imagens de campo claro, no aumento de 63x. .....70

Figura 25 - Esquema do preparo e filtragem da suspensão de conídios......80

Figura	26 - Es	quema da	a diluição	seriada	da sus	pensão	de cor	nídios	 80
0		1	,			1			

- Figura 27 Contagem de Unidade Formadora de Colônias (UFC) na Câmara de Neubaeur..81
- Figura 28 Esquema de preparo da placa de 96 poços para os experimentos. ......81
- Figura 29 Esquema de incubação de 100 uL de AMB por poço......82

Figura 30 - Plaqueamento pelo método da gota, das diluições 0 até 4
Figura 31 - Esquema de incubação de 100 uL de FS por poço
Figura 32 - Taxas de redução de crescimento obtidas para amostras de suspensão de conídios
de R.oryzae, submetidos à diferentes tempos de incubação com o fotossensibilizador PDZ na concentração de em A) 25 $\mu$ g/mL, em B) 62,5 $\mu$ g/mL, em C) 125 $\mu$ g/mL e

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de IFD para a Fase Clara utilizando somente PDZ	56
Tabela 2 - Parâmetros de IFD para a Fase escura utilizando somente PDZ	56
Tabela 3 - Parâmetros de IFD para a Fase Clara utilizando PDZ e SDS	57
Tabela 4 - Parâmetros de IFD para a Fase Escura utilizando PDZ e SDS	57
Tabela 5 - Parâmetros de IFD para suspensão de conídios utilizando PDZ	84

# SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TERAPIA FOTODINÂMICA MUCORMICOSE	АЕ 27
1.1 INTRODUÇÃO	27
1.2 Rhizopus oryzae	28
1.3 MUCORMICOSE	30
1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA	32
1.4.1 FOTOSSENSIBILIZADORES	34
1.4.1.1 CLORINAS	34
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DO Rhizopus oryzae	43
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.2.1 Rhizopus oryzae	43
3.2.2 MICROSCOPIA CONFOCAL	44
3.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	44
3.3 RESULTADOS	45
3.3.1 MICROSCOPIA CONFOCAL	45
3.3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	47
CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMEN in vitro DE Rhizopus oryzae NA FASE DE HIFA	JTO 53
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.2.1 Rhizopus oryzae	53
4.2.2 PREPARO DA AMOSTRA	53
4.2.3 ANFOTERICINA B	54
4.2.4 FOTOSSENSIBILIZADOR	54
4.2.5 FONTE DE LUZ	55
4.2.6 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA	55
4.2. 7 TAXA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO	58

4.2.8 MICROSCOPIA CONFOCAL	59
4.3 RESULTADOS	60
4.3.1 TAXA DE INIBIÇÃO	60
4.3.1.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM PHOTODITHAZINE	60
4.3.1.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM PDZ E SDS	63
4.4.1 MICROSCOPIA CONFOCAL	68
4.4.1.1 INTERNALIZAÇÃO DO PHOTODITHAZINE	68
4.4.1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA COM PHOTODITHAZINE	69
4-5 DISCUSSÃO	
CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESO in vitro DE Rhizopus oryzae NA FASE DE CONÍDIOS	CIMENTO 79
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	
5.2.1 Rhizopus oryzae	
5.2.2 PREPARO DA AMOSTRA	79
5.2.2.1 SUSPENSÃO DE CONÍDIOS	79
5.2.2.2 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER	80
5.2.3 ANFOTERICINA B	81
5.2.4 FOTOSSENSIBILIZADOR	83
5.2.5 FONTE DE LUZ	83
5.2.6 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA	83
5.3 RESULTADOS	
5.3.1 INATIVAÇÃO	
5.3.1.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM PDZ	85
5.4 DISCUSSÃO	86
CAPÍTULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	
REFERÊNCIAS	

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TERAPIA FOTODINÂMICA E MUCORMICOSE

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TERAPIA FOTODINÂMICA E MUCORMICOSE

### 1.1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são doenças que se propagam entre pessoas ou entre pessoas e animais, e são causadas por microrganismos, como bactérias, fungos, vírus ou parasitas. (1), Antes da descoberta do antibiótico penicilina, as doenças infecciosas eram a principal causa de morte sendo as que mais matavam a população mundial eram endocardite bacteriana, meningite, pneumonia pneumocócica, gonorreia e sífilis. (2-4), após a descoberta da penicilina, vários outros antibióticos foram desenvolvidos e impediram milhares de mortes por infecções bacterianas, porém o grande desafio agora é a redução da eficácia destes medicamentos, devido a resistência antimicrobiana. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é uma das 10 principais ameaças à saúde pública que a humanidade enfrenta, tendo uma previsão no aumento do número de mortes por infecções. (5), Atualmente, morrem por ano cerca de 700 mil pessoas por infecções ocasionadas por resistência microbiana, a projeção é que até o ano de 2050 morram 10 milhões de pessoa por ano, ficando a frente até mesmo das mortes por câncer. (6)

As micoses são infecções cutâneas causadas por fungos, que contaminam inicialmente a região queratinizada da pele humana, esse tipo de infecção afeta de 20-25% a população mundial, sendo uma das formas mais frequentes de infecção. (7), O tratamento dessa infecção fúngica, comparada às infecções bacterianas, é bem mais complexo devido a baixa quantidade de opções de antifúngicos disponíveis, longa duração dos tratamentos, efeitos colaterais e resistência fúngica. (7-8), Além disso, as infecções fúngicas têm se tornado uma grande ameaça à saúde pública, devido ao aumento do número de casos, identificação de novos patógenos e desenvolvimento de resistência aos tratamentos comumente utilizados, que são os antifúngicos. Adicionalmente, durante a pandemia de COVID-19 foi identificado o surgimento de infecções fúngicas secundárias em indivíduos internados e em indivíduos com remissão da infecção por SARS-CoV-2, sendo a maior parte causada por Aspergillus, Mucorales e Candida. No início de 2021, a mucormicose associada à COVID-19 (CAM) chamou a atenção mundial devido ao elevado número de casos, tendo sido declarada como endêmica na Índia. (9), O patógeno predominante em casos de CAM são cepas de Rhizopus spp. A dificuldade no tratamento dessa infecção reside no fato de não existir resposta aos antifúngicos disponíveis, além das características de rápido crescimento e invasão de estruturas ósseas.

Em 25 de outubro de 2022, a OMS divulgou a primeira lista de fungos que apresentam um grande risco à saúde pública, devido a carência de diagnósticos rápidos e a forma invasiva que essas doenças fúngicas afetam pacientes debilitados. Um dos fungos citados nessa lista é o *Rhizopus spp.*, causador da mucormicose. A OMS teve como objetivo divulgar essa lista para chamar a atenção do mundo para a importância em investimentos em pesquisa, e desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos e de controle dessas infecções. Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica tem se mostrado como tratamento alternativo ao tratamento convencional, como o uso de antifúngicos, para o tratamento de micoses (10,11), e, portanto, pode ser um potencial alternativo coadjuvante de controle microbiano do *Rhizopus spp*.

Neste trabalho, apresenta-se o estudo do fungo *Rhizopus oryzae*, em termos de caracterização das fases de crescimento *in vitro* e a avaliação da Inativação Fotodinâmica como método antimicrobiano. Na literatura, poucas informações sobre a estrutura celular desse fungo são encontradas, desta forma, foram feitos estudos utilizando microscopia confocal de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão, para observar parede celular e organelas e ajudar no entendimento da resposta fotodinâmica em inativar este microrganismo. Posteriormente foram feitos ensaios de TFD em hifas e conídios do *R. oryzae*.

### 1.2 Rhizopus oryzae

*Rhizopus oryzae* é um fungo filamentoso pertencente ao filo Zygomycota, classe Zygomycete e à ordem Mucorales. (12-13), É relatado na literatura que este fungo apresenta  $\beta$ -glucano, quitina, quitosana e ergosterol na estrutura celular. (14–16), Este fungo apresenta características particulares, tais como fase clara durante as primeiras 24 horas de crescimento e fase escura a partir das 48 horas de crescimento, devido à presença de melanina. (17), Este fungo é um dos mais utilizados para produção de lipases, encontrado em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, sendo também encontrado em grande quantidade no solo, possui rápido crescimento e é responsável pela decomposição de frutos e por causar doenças em plantas. (18–21)

Esse fungo também pode ser um patógeno oportunista, causando infecção em indivíduos que possuem o sistema imune comprometido, como pacientes com câncer, HIV+, transplantados de órgãos, doenças respiratórias crônicas e infecção por tuberculose. (22), O fungo *R. oryzae* ganhou destaque mundial durante a pandemia de COVID-19, por ser o principal patógeno associado aos casos de mucormicose, sendo conhecido também como fungo negro.

Porém, devido a escassez de dados na literatura pouco se sabe sobre a complexidade da sua estrutura celular.

O *Rhizopus* se reproduz de forma assexuada e sexuada. A reprodução assexuada ocorre quando os esporangióforos são produzidos opostos a região de formação dos rizóides dos micélios. Cada esporangióforo possui um único esporângio, o esporângio possui uma região estéril chamada columela, como mostrada na figura 1. Os esporos são produzidos ao redor dessa columela, e quando ocorre o rompimento da parede do esporângio, a columela colapsa e os esporos são dispersos. Os esporos ao caírem em um substrato adequado, germinam e produzem novos micélios. (23)

A reprodução sexuada ocorre através da cópula gametangial. Os micélios produzem gamentângios de linhagens opostas (+) ou (-). Durante a plasmogamia, forma-se um zigósporo, contendo múltiplos núcleos haploides dos dois progenitores. Em condições favoráveis, ocorre a cariogamia e, posteriormente, a meiose. Durante a meiose, o zigósporo germina em um esporângio. Em seguida, o esporângio dispersa esporos haploides, que germinam e ocorre o crescimento de novos micélios. (23), O esquema da reprodução assexuada e sexuada estão mostrados na figura 2.



Figura 1 - Esquema da estrutura da espécie Rhizopus spp.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 2 - Ciclo de vida do *Rhizopus sp*. Fonte: Elaborada pela autora

Estudos desenvolvidos com *Candida*, sugerem que fungos filamentosos, assim como bactérias, também podem formar biofilmes. (24–26), Os biofilmes são comunidades microbianas estruturadas com uma matriz extracelular (MEC), no caso do biofilme de *C. albicans* o biofilme é composto por células em forma de levedura e hifas. (27), A organização estrutural dos biofilmes serve como barreira física contra agentes físicos e químicos, como exemplo medicamentos. (28–30), A formação dos biofilmes tem aumentado a resistência aos fármacos antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro, tornando-os um grande desafio no seu tratamento antimicrobiano. A resistência antifúngica mediada por biofilme, provavelmente é um fator que contribui para falhas em tratamentos com antifúngicos. Devido a dificuldade no combate aos biofilmes, o desenvolvimento de tratamentos alternativos é necessário.

#### **1.3 MUCORMICOSE**

A mucormicose é uma doença fúngica extremamente agressiva que tem uma elevada taxa de mortalidade, especialmente em pacientes com sistema imune comprometido. (31), Geralmente, a doença se desenvolve inicialmente no seio da face ou nos pulmões após a inalação de esporos fúngicos, que, subsequentemente, causam infecção. (32), Os sítios acometidos por essa infecção já relatados na literatura são: pulmonar, rinocerebral, cutânea e gastrointestinal. A maioria dos casos de mucormicose é causada pelo fungo *R. oryzae*, e cerca de 90% dos casos são rinocerebrais. (33)



Figura 3 - Esquema representando a inalação dos esporos fúngicos, que geralmente infectam os seios da face ou pulmões.

Fonte: Elaborada pela autora

Indivíduos com mucormicose podem apresentar manifestações clínicas diversas, dependendo da imunidade do hospedeiro, da extensão da infecção e dos órgãos afetados pela infecção. Nos casos de infecção rinocerebral, os esporos fúngicos são inalados e se instalam nos seios da face, a partir daí, a infecção pode permanecer localizada e os sintomas comuns são sinusite aguda, febre, cefaleia e congestão nasal. Em indivíduos imunocomprometidos, a infecção pode progredir e invadir a órbita e o palato, chegando até a região cerebral. A invasão do tecido pode ocasionar perda de visão, alterações no estado mental e necrose. (34–36)

O diagnóstico de mucormicose é um desafio. Segundo Maartens *et al.*, um atraso de 12 h no diagnóstico pode ser letal para o paciente, e cerca de 50% dos casos são diagnosticados na autópsia. (37), Um estudo mostrou que o início tardio do tratamento resultou em um aumento da taxa de mortalidade nas 12 semanas de avaliação pós-diagnóstico, em comparação com o início precoce do tratamento (82,9% vs 48,6%) (38). Os métodos atualmente utilizados são o diagnóstico clínico, testes histopatológicos, testes microbiológicos e métodos avançados de biologia molecular.

O tratamento convencional consiste em doses elevadas de antibióticos e agentes antifúngicos associados a ressecções cirúrgicas, mas mesmo com tratamento agressivo, a taxa de mortalidade é ainda elevada, em torno de 50%. (33), Na ausência de desbridamento cirúrgico do tecido infectado, o tratamento antifúngico por si só raramente é curativo, resultando numa taxa de mortalidade de 100% para os doentes com doença disseminada. (39)

Durante a pandemia de COVID-19, ocorreram várias complicações em pacientes hospitalizados, e uma destas complicações foi a mucormicose. As principais causas de contaminação em pacientes hospitalizados podem estar relacionadas com baixa taxa de oxigenação, ambiente com elevada glucose (tais como diabetes, hiperglicemia de início recente, hiperglicemia induzida por esteroides), ambiente ácido (acidose metabólica, cetoacidose diabética) níveis elevados de ferro (aumento das ferritinas) e diminuição da atividade fagocitária dos leucócitos devido à imunossupressão (comorbidades mediadas pelo SARS-CoV-2), combinados com vários outros fatores de risco, incluindo hospitalização prolongada com ou sem a utilização de ventiladores mecânicos. (39), De acordo com o website do Governmentstats, de 5 de Maio a 3 de Agosto de 2021, mais de 45.000 casos e 4.000 mortes de doentes com COVID-19 foram associados à mucormicose, tendo uma grande parte destes casos sido notificados na Índia, declarando esta doença endêmica naquele país.

Por conseguinte, há necessidade de estratégias de tratamento alternativas. Contudo, o conhecimento limitado sobre as características da estrutura celular de *R. oryzae* torna difícil o desenvolvimento de tratamentos alternativos, dessa forma são necessários estudos para uma melhor compreensão deste microrganismo e, consequentemente, o desenvolvimento de tratamentos que sejam eficazes.

### 1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

Inicialmente, a Terapia Fotodinâmica (TFD) foi descrita no campo médico como promovendo uma ação letal sobre as células neoplásicas (40), atualmente, a TFD apresenta grandes perspectivas no controle microbiano, sendo amplamente utilizada na odontologia. (41)

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), também conhecida como Inativação Fotodinâmica (IFD), baseia-se na interação da luz com o fotossensibilizador (FS), que são moléculas fotossensíveis, e devido à absorção da luz, o FS inicia uma série de reações químicas que levam à produção direta ou indireta de oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio, resultando na inativação de microrganismos. (41)

A IFD tem se mostrado eficiente na inativação de bactérias, fungos e vírus. (42-43), Uma das grandes vantagens que a IFD apresenta é a baixa probabilidade de seleção de microrganismos resistentes, visto que é praticamente impossível que ocorra à resistência as espécies reativas de oxigênio.



Figura 4 - Diagrama de Jablonski

Fonte: Adaptada de LAKOWICZ. (42)

A destruição dos microrganismos pode ocorrer de duas maneiras diferentes: através da geração de radicais livres, que são extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou da geração do oxigênio singleto (mecanismo tipo II), representadas na figura 4.

No mecanismo tipo I, o FS no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e/ou moléculas vizinhas, preferencialmente o  $O_2$ , produzindo radicais ou íons radicais. A maioria destes radicais reage instantaneamente com o  $O_2$ , gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido e hidroxila, que podem oxidar uma variedade de biomoléculas. (43)

No mecanismo do tipo II, ocorre a geração do oxigênio singleto. O oxigênio singleto representa o estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular, com os elétrons pareados, sendo formado por meio da transferência de energia do FS para o oxigênio molecular, sendo apontado como o maior responsável pelo efeito fotodinâmico. O oxigênio singleto produzido nas células, é extremamente reativo, podendo causar danos aos diversos sistemas biológicos, por meio da oxidação de macromoléculas, incluindo lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. (44), Como lipídeos e proteínas são os principais constituintes de membranas biológicas, as

reações foto-oxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do microrganismo.

Nos dois tipos de reação fotodinâmica, a resposta somente ocorrerá quando as moléculas do fotossensibilizador apresentam interação direta com a célula microbiana, seja na sua parede/membrana ou internalizadas.

#### 1.4.1 FOTOSSENSIBILIZADORES

Um fator importante para a realização da TFD é o fotossensibilizador, que precisa apresentar características fotofísicas e fotoquímicas específicas, como alta absorção na região entre 600 e 810 nm, seletividade para células alvos devendo induzir a morte apenas dessas células específicas, não ser tóxico para células no escuro e possuir alto rendimento quântico nos estados singleto e alto tempo de vida no tripleto, para que a produção de oxigênio singleto seja mais efetiva.

No caso da TFDa também existem fotossensibilizadores com absorção em comprimentos de onda inferiores a 600 nm, a escolha será especialmente na dependência do tecido alvo a ser tratado, sendo que para infecções que afetam os tecidos além da superfície tecidual existe a necessidade de trabalhar com irradiação de menor atenuação da luz. No presente trabalho, o fotossensibilizador escolhido foi a clorina em decorrência de resultados positivos para a inativação fotodinâmica em fungos filamentosos. (45-46), Após busca na literatura científica, por nosso conhecimento, não existem até o momento estudos realizados empregando a TFDa em *R. oryzae*.

#### 1.4.1.1 CLORINAS

As clorinas são derivadas de porfirinas, que apresentam forte banda de absorção na região de 640-700 nm, região do vermelho. A clorina  $e_6$  é uma forma derivada da clorofila-a e apresenta propriedades importantes, que viabilizam o potencial do fotossensibilizador, como alto rendimento quântico de formação de oxigênio singleto e alta absorção em comprimentos de onda maiores. (47-48)

O Photodithazine® (Photodithazine®-PDZ, Moscou–Rússia), que foi o fotossensibilizador escolhido para ser usado nesse trabalho, é sintetizado a partir da alga *Spirulina plantensis*, tendo a forma de sal de glucosamina e solubilidade em água. (49)

O PDZ apresenta banda de Soret com máximo de absorção em 401 nm e três bandas Q, com máximos em 505, 600 e 655 nm, com máxima absorção em 655 nm, sendo vantajoso para aplicações em TFD, visto que a luz penetra mais profundamente em tecidos em comprimentos de ondas maiores. (50), O PDZ já mostrou eficácia fotodinâmica na inativação de outros fungos, como *Candida albicans* e *Candida guilliermondii*. (5152).



Figura 5 - Estrutura química do PDZ

Fonte: PIRES et al. (45)

Atualmente não existe um tratamento efetivo para mucormicose, os tratamentos convencionais utilizados, como altas doses de antifúngicos e ressecção cirúrgica, apresentam baixa efetividade, além da grande retirada de tecido saudável durante a cirurgia. A TFDa pode ser uma interessante alternativa ao antifúngico por ter ação não sítio biológico, podendo ainda ser um método adicional de tratamento conjunto com a cirurgia e antifúngico.
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

### CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da eficiência da inativação fotodinâmica no controle do crescimento do R. oryzae.

#### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização do R. oryzae por microscopia eletrônica de transmissão e confocal.

- Determinação da distribuição do fotossensibilizador Photodithazine no fungo filamentoso por microscopia confocal de fluorescência.

 Avaliação da resposta fotodinâmica antimicrobiana em diferentes fases de crescimento do fungo (conídios e hifas nas fases clara e escura) e para diferentes protocolos de TFDa com PDZ, variando a concentração do fotossensibilizador, o tempo de incubação, a associação com SDS e a fluência de luz em 660 nm.

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DO Rhizopus oryzae

## CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DO Rhizopus oryzae

O *R. oryzae* é um fungo encontrado na natureza principalmente em solos e, mais recentemente, sua relevância como patógeno humano tem sido descrita. Desta forma, suas características estruturais, de crescimento ou fatores de virulência são pouco encontradas na literatura. Nesse capítulo são apresentados os resultados de caracterização do crescimento *in vitro* e da morfologia investigada por microscopias confocal de fluorescência e eletrônica de transmissão.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização do crescimento do R. oryzae in vitro;

- Caracterização da morfologia do *R. oryzae* utilizando microscopia confocal de fluorescência e eletrônica de transmissão.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.2.1 Rhizopus oryzae

A cepa de *R. oryzae* (CFP 0781) utilizada neste estudo foi gentilmente doada pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). O envio do microrganismo foi realizado em tubo Falcon contendo meio líquido Dextrose Batata, sendo, posteriormente, mantido a 4 °C em meio sólido Ágar Dextrose Batata (PDA). As amostras que vieram em meio líquido apresentavam em sua superfície o crescimento na forma de hifas, então, com o auxílio de uma alça de inoculação, uma amostra foi transferida para um tubo Falcon com 10 mL de água destilada estéril. Esse conteúdo foi agitado em vórtex por 10 segundos, então, 10  $\mu$ L foram inoculados no centro de uma placa de Petri com meio sólido de PDA. Para a manutenção da amostra para os experimentos, este procedimento de plaqueamento era realizado semanalmente.

Para obtenção da Fase clara de crescimento, como mostrado na figura 1, o fungo plaqueado no meio PDA foi mantido a 37 °C por 24 horas. Para obtenção da Fase escura, com alta concentração de melanina, o fungo foi cultivado por 48 h a 37 °C, como mostrado a figura 1.



Figura 6 - Imagem representativa das fases de crescimento do fungo, à direita a Fase Clara que ocorre com 24h de crescimento, à esquerda a Fase Escura que ocorre com 48h de crescimento.

#### 3.2.2 MICROSCOPIA CONFOCAL

Utilizando um microscópio confocal de fluorescência da Zeiss – modelo LSM 780 invertido, do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC – USP). Foi utilizado o laser de 2 fótons em 800 nm para excitação e aquisição de dados em dois canais, um entre 400-600 nm (região verde-azul) referente à fluorescência natural do patógeno e outro entre 600-710 nm (região vermelho) referente à fluorescência do PDZ. Foram obtidas imagens da autofluorescência do fungo e imagens de campo claro, para observação das estruturas celulares.

### 3.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para estudar as estruturas subcelulares do *R. oryzae* foi feita uma análise no Microscópio eletrônico de Transmissão. Primeiramente, as amostras de 24 h, 48 h e 7 dias de crescimento foram preparadas no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (ICB -USP), da seguinte forma:

Para a fixação, as amostras foram tratadas em glutaraldeído a 2% por 2 horas, em seguida foram lavadas com solução tampão, posteriormente foram tratadas com tetróxido de ósmio por 2 horas e, então, lavadas novamente com solução tampão e incubadas *overnight* em solução de acetato de uranila com sacarose.

Para a desidratação, as amostras passaram pelos seguintes processos: - Álcool 70 % por 15 minutos – 2 vezes; - Álcool 95% por 15 minutos – 2 vezes; - Álcool 100% por 15 minutos – 4 vezes; - Óxido de propileno por 15 minutos – 2 vezes.

Para a infiltração, foi colocado na amostra óxido de propileno + resina na proporção 1:1 e foi deixado rotacionando por 6 horas; após isso foi adicionada resina pura SPURR por 6 horas.

As amostras foram então incluídas em formas de silicone e depois colocadas na estufa (70-75 °C) por 30 horas. Foi feita trimagem, com cortes semi-fino e ultrafinos. E as amostras foram contrastadas com os metais pesados uranila e chumbo.

As amostras foram analisadas utilizando o Microscópio Eletrônico de Transmissão -Marca: JEOL - Modelo: JEM2100 LaB<sub>6</sub>200 kV do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC – USP).

#### **3.3 RESULTADOS**

#### 3.3.1 MICROSCOPIA CONFOCAL

A figura 7 apresenta imagens de Microscopia Confocal de amostras de *R. oryzae*, em diferentes fases de crescimento. É possível observar as estruturas celulares, como hifas cilíndricas, esporângios, parede celular das hifas e esporos. As figuras 6-A), 6-B) e 6-F) correspondem a imagens de campo claro e as figuras 6-C), 6-D) e 6-E) são imagens espectrais realizadas no modo Fluorescência. A fluorescência em azul-verde refere-se à fluorescência natural das hifas do *R. oryzae*, ou seja, autofluorescência. A fluorescência em amarelo-verde refere-se à fluorescência natural de esporos, tanto dentro dos esporângios, quanto livres na amostra.



Figura 7 - A) Hifas (1), Esporângio (2) e esporos (3) da fase escura do *R. oryzae* observados na Microscopia de campo claro, no aumento de 20x. B) Hifas (1) e esporângios (2) de amostra da fase clara do *R.oryzae* observados na Microscopia de campo claro, no aumento de 20x. C) Autofluorescência de amostra da fase clara do *R. oryzae* observada no Microscópio Confocal de Fluorescência, no aumento de 20x. A seta com número 1 representa uma hifa. D) Imagem espectral da fase escura do *R. oryzae*, em que é possível observar as hifas (1), esporângios (2) e a parede celular de uma hifa (4), no aumento de 63x. E) Imagem espectral de amostra da fase clara do *R. oryzae*, em que é possível observar as hifas (1) e esporos (3), no aumento de 63x. F) Esporos (3) do *R. oryzae* observados na Microscopia de campo claro, no aumento de 63x.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir das figuras 7-A) a 7-E) podemos observar a estrutura das hifas, representadas como 1, do *R. oryzae* vista tanto por microscopia de campo claro, quanto fluorescência, em 7-C) é possível observar a presença de hifas cilíndricas bastante alongadas, com diâmetro médio de 10-15 μm. Dentro das hifas é possível observar alta densidade de estruturas celulares esféricas, com padrão de alta ou ausência de fluorescência, sendo que as regiões negras são relacionadas aos melanossomas. A fluorescência emitida na região do azul-verde é referente a emissão natural do patógeno, a autofluorescência. Na figura 7-D) é possível observar a parede celular (4) de uma hifa, essa parede apresenta um tamanho médio de 1,5 μm. Nota-se pela figura 7-E) a autofluorescência das hifas, e observa-se espaços em que não houve fluorescência, essas regiões são muito absorvedoras de luz e provavelmente apresentam melanina.

Podemos notar também a presença dos esporângios (2), figuras 7-A), 7-B) e 7-D), possuem um diâmetro médio variando entre 50-70 µm, nota-se também que os esporângios da fase escura apresentam mais esporos quando comparados aos da fase clara. Dentro dos esporângios observa-se a presença dos esporos, que são mais bem observados na figura 7-F), e apresentam um tamanho médio de 10-20 µm.

#### 3.3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A figura 7 apresenta imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão feita em amostras com diferentes dias de crescimento do *R. oryzae*, em A) e B) com 24 h de crescimento, correspondendo a fase clara, em C) e D) com 48 h de crescimento (fase escura), em E) e F) com 7 dias de crescimento (fase escura).



Figura 8 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão em amostras de *R. oryzae*, em A) e B) para a fase clara, com 24 horas de crescimento, em que é possível notar os esporos, em C) e D) para a fase escura, com 48 horas de crescimento, em que se nota o esporângio, em E) e F) para a fase escura, com 7 dias de crescimento, em que é possível observar o esporângio. A seta 1 representa a membrana do esporângio e a seta 2 a columela.

Podemos notar observando a figura 8, a complexidade das estruturas do *R. oryzae*, em que observamos na figura 8-A) e 8-B) os esporos, o esporângio é observado nas figuras 8-C) à 8-F), e nota-se a grande quantidade de vesículas no interior desses esporângios. Nota-se pela seta 1 a membrana do esporângio e em seu interior uma grande quantidade de ultraestruturas celulares, muitos vacúolos, e muitas vesículas, podemos notar a columela, que é uma região estéril do esporângio, estando representada pela seta 2. Todos esses fatores implicam na complexidade das estruturas da parede celular do patógeno, que limitam a internalização de fármacos.

CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO in vitro DE Rhizopus oryzae NA FASE DE HIFA

# CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO in vitro DE Rhizopus oryzae NA FASE DE HIFA

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a IFD no *R. oryzae* nas fases clara e escura de crescimento, com diversos parâmetros de tratamento.

#### 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.2.1 *Rhizopus oryzae*

*R. oryzae* (CFP 0781) foi doado pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e armazenado a 4 °C em meio sólido de Ágar Dextrose de Batata (PDA).

### 4.2.2 PREPARO DA AMOSTRA

O fungo foi plaqueado em placas de Petri contendo meio PDA e incubado em estufa a 37 °C. Para avaliar a fase clara, as placas permaneceram 24 horas na estufa, enquanto para a avaliação da fase escura, as placas foram incubadas por 48 horas. Para obtenção das amostras de cada fase, foram retirados discos de 8 mm de diâmetro, de cada placa, com o auxílio de uma seringa estéril. Então, os discos foram inseridos em um poço de uma placa de 24 poços (figuras 9 e 10).



Figura 9 - Esquema do preparo da amostra para o estudo da inativação fotodinâmica da Fase Clara. Inicialmente com o auxílio de uma seringa se obtém um disco de 8 mm de diâmetro das hifas crescidas em meio sólido. Os discos são depositados na placa de 24 poços para o posterior tratamento.

Fonte: Elaborada pela autora



Figura 10 - Esquema do preparo da amostra para o estudo da inativação fotodinâmica da Fase Escura. Inicialmente com o auxílio de uma seringa se obtém um disco de 8 mm de diâmetro das hifas crescidas em meio sólido. Os discos são depositados na placa de 24 poços para o posterior tratamento.

Fonte: Elaborada pela autora

### 4.2.3 ANFOTERICINA B

O antifúngico comumente usado contra *R. oryaze* é a Anfotericina B<sup>®</sup> (AMB – Sigma-Aldrich), então, primeiramente foram feitos alguns experimentos para observar a resposta do fungo frente à AMB e, posteriormente, compará-la com a resposta fotodinâmica. Para isso, as amostras foram preparadas da mesma forma como citado em 3.2.2. Em seguida, foi adicionado 200  $\mu$ L por poço de AMB na concentração de 250  $\mu$ g/mL. As amostras permaneceram incubadas com o antifúngico pelo tempo de 1h.



Figura 11 - Esquema do tratamento de hifa do *R.oryzae* com AMB. Inicialmente com o auxílio de uma seringa se obtém um disco de 8 mm de diâmetro das hifas crescidas em meio sólido. Os discos são depositados na placa de 24 poços para o posterior tratamento.

Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.2.4 FOTOSSENSIBILIZADOR

O FS escolhido pertence a classe da clorina, chamado de Photodithazine<sup>®</sup> (PDZ – Moscou, Rússia). Esse FS já é utilizado comercialmente para o tratamento do câncer com a terapia fotodinâmica e já foram reportados resultados favoráveis em *Candida albicans* e *Pythium insidiosum*. (45), (53) Foram testados diversos protocolos variando os tempos de incubação de 20 minutos a 2 horas, concentrações do PDZ e associação com o surfactante Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). O PDZ foi testado em concentrações que variaram entre 150 µg/mL até 2,6 mg/mL. Para isso, os discos de 8 mm do fungo *R. oryzae* foram inseridos na placa de 24 poços e, então, incubados com 200 µL do FS.



Figura 12 - Incubação do FS na placa de 24 poços. Foram adicionados 200 µL do FS por poço. Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.2.5 FONTE DE LUZ

Foi utilizado um dispositivo de arranjo de LEDs centrados em 660 nm para realizar TFDa, com irradiância de 50 mW/cm<sup>2</sup> e foi entregue uma fluência entre 100 e 200 J/cm<sup>2</sup>. Esse dispositivo possui 24 LEDs centrados uma para cada poço da placa e foi desenvolvido pelo LAT-IFSC. Para o protocolo de 100 J/cm<sup>2</sup> a amostra foi iluminada durante 34 minutos e para 200 J/cm<sup>2</sup> a iluminação foi durante 68 minutos.

### 4.2.6 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Para avaliar a ação fotodinâmica foram variadas as concentrações de FS, tempos de incubação e associação do fotossensibilizador com o surfactante SDS. Os parâmetros usados estão elencados nas tabelas a seguir.



Figura 13 - Placa sendo iluminada durante um protocolo de IFD.

Tabela 1 - Parâmetros de IFD para a Fase Clara utilizando somente PDZ

Protocolo	[PDZ]	Sessões	Tempo de incubação	Iluminação (J/cm <sup>2</sup> )
Controle	0	0	0	0
<b>Controle luz</b>	0	1	0	100
<b>Controle FS</b>	2,6 mg/mL	1	2h	0
1	150 μg/mL	1	30 min, 1h e 2h	100
2	$500 \ \mu g/mL$	1	30 min, 1h e 2h	100
3	2,6 mg/mL	1	1h	100
4	2,6 mg/mL	2	1ª sessão – 2h	100
			$2^{a}$ sessão — 1h	

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 2 - Parâmetros de IFD para a Fase escura utilizando somente PDZ

Protocolo	[PDZ]	Sessões	Tempo de incubação	Iluminação (J/cm <sup>2</sup> )
Controle	0	0	0	0
<b>Controle luz</b>	0	1	0	100
<b>Controle FS</b>	2,6 mg/mL	1	2h	0
1	150 µg/mL	1	30 min, 1h e 2h	100
2	$500 \ \mu g/mL$	1	30 min, 1h e 2h	100
3	2,6 mg/mL	1	2h	100
4	2,6 mg/mL	2	1ª sessão – 2h	100
			$2^{a}$ sessão – 1h	

Fonte: Elaborada pela autora

Protocolo	[PDZ]	SDS	Sessões	Tempo de incubação	Iluminação
	(µg/mL)				(J/cm <sup>2</sup> )
Controle	0	0	0	0	0
<b>Controle luz</b>	0	0	1	0	200
<b>Controle SDS</b>	0	0,01%	0	0	0
<b>Controle SDS</b>	0	0,05%	0	0	0
<b>Controle FS-SDS</b>	500	0,01%	0	2h	0
<b>Controle FS-SDS</b>	500	0,05%	0	2h	0
1	250	0,01%	1	20 min, 40 min, 1h e 2h	$100 \text{ J/cm}^2$
2	500	0,01%	1	20 min, 40 min, 1h e 2h	$100 \text{ J/cm}^2$
3	150	0,05%	1	30 min, 1h e 2h	200 J/cm <sup>2</sup>
4	250	0,05%	1	30 min, 1h e 2h	200 J/cm <sup>2</sup>
5	500	0,05%	1	1h	$100 \text{ J/cm}^2$
6	500	0,05%	1	1h e 2h	200 J/cm <sup>2</sup>
7	500	0,05%	2	1ª sessão – 1h	$200 \text{ J/cm}^2$
				$2^{a}$ sessão — $2h$	

Tabela 3 - Parâmetros de IFD para a Fase Clara utilizando PDZ e SDS

Tabela 4 - Parâmetros de IFD para a Fase Escura utilizando PDZ e SDS

Protocolo	[PDZ]	SDS	Sessões	Tempo de incubação	Iluminação
	(µg/mL)				$(J/cm^2)$
Controle	0	0	0	0	0
<b>Controle luz</b>	0	0	1	0	200
<b>Controle SDS</b>	0	0,01%	0	0	0
<b>Controle SDS</b>	0	0,05%	0	0	0
<b>Controle FS-SDS</b>	500	0,01%	0	2h	0
<b>Controle FS-SDS</b>	500	0,05%	0	2h	0
1	250	0,01%	1	20 min, 40 min, 1h e 2h	100 J/cm <sup>2</sup>
2	500	0,01%	1	20 min, 40 min, 1h e 2h	100 J/cm <sup>2</sup>
3	150	0,05%	1	30 min, 1h e 2h	200 J/cm <sup>2</sup>
4	250	0,05%	1	30 min, 1h e 2h	200 J/cm <sup>2</sup>
5	500	0,05%	1	1h	100 J/cm <sup>2</sup>
6	250	0,05%	1	1h e 2h	200 J/cm <sup>2</sup>
7	250	0,05%	2	1ª sessão – 1h	200 J/cm <sup>2</sup>
				$2^{a}$ sessão – $2h$	

#### 4.2.7 APÓS O TRATAMENTO COM AMB E IFD

Após os experimentos, as amostras controles e tratadas com AMB e IFD são colocadas em placas de Petri com meio PDA. Utilizando a seringa de molde, foi feito um furo no centro dessas placas, como observado na figura 14, para que seja possível observar o crescimento radial do *R. oryzae*. As amostras foram armazenadas em estufa a 37°C por 24 horas.



Figura 14 – Esquema de como a amostra do *R. oryzae* é armazenada em placa após os tratamentos. Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.2.8 TAXA DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO FUNGO

Para quantificar a taxa de inibição do crescimento após os tratamentos com AMB e IFD, foi utilizado o software ImageJ. Os resultados dos experimentos foram fotografados e feito o upload de cada imagem no programa.

Primeiramente, foi colocada uma escala em cada imagem, visto que se sabe o valor do diâmetro da placa de Petri, que corresponde a 9 cm. Em seguida, utilizou-se a ferramenta de seleção a mão livre para circular a área de crescimento do fungo na placa, por fim, na aba Análise, foi selecionado o item Medidas, para verificar a área que foi circulada.

Sabendo a área de crescimento do crescimento do fungo e a área da placa de Petri, pôde-se calcular a taxa de inibição do crescimento pela seguinte equação:



Figura 15 - Cálculo da área de inibição do crescimento do fungo no software ImageJ. Fonte: Elaborada pela autora

Após calcular a taxa de inibição do crescimento, os dados foram tabulados e analisados no software Origin 2020.

### 4.2.9 MICROSCOPIA CONFOCAL

Imagens de internalização do fotossensibilizador, dano após TFD no fungo foram obtidas por meio de microscopia confocal de fluorescência (Zeiss – modelo LSM 780 invertido) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. Foi utilizado o laser de 2 fótons em 800 nm para excitação e aquisição de dados em dois canais, um entre 400-600 nm (região verde-azul) referente à fluorescência natural do patógeno e outro entre 600-710 nm (região vermelho) referente à fluorescência do PDZ.

### **4.3 RESULTADOS**

# 4.3.1 TAXA DE INIBIÇÃO

# 4.3.1.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM PHOTODITHAZINE

A figura 14 apresenta as taxas de inibição do crescimento *in vitro* de *R. oryzae*, nas fases clara e escura, 24 horas após serem submetidos a diferentes protocolos de Terapia Fotodinâmica utilizando Photodithazine<sup>®</sup> como fotossensibilizador, além dos grupos controle, Anfotericina B e entregando uma fluência de 100 J/cm<sup>2</sup>.



Figura 16 - em A) Taxa de inibição de crescimento obtidas para amostras de *R.oryzae*, na fase clara, submetidos à diferentes protocolos de IFD, em B) Taxa de inibição de crescimento obtidas para amostras de *R.oryzae*, na fase escura, submetidos à diferentes protocolos de IFD.

Os grupos controle, controle luz e controle FS apresentaram valores semelhantes para taxa de inibição do crescimento. Primeiramente foi realizado o teste com o antifúngico AMB, e notou-se que o mesmo apresentou uma boa taxa de inibição do crescimento nas amostras da fase clara do *R. oryzae*, com 67% de inibição, entretanto uma menor eficácia foi observada na

inibição do crescimento das amostras da fase escura, provavelmente devido à uma menor internalização do antifúngico e/ou de mecanismos de resistência do microrganismo, como o sequestro do fármaco nos vacúolos e melanossomas.

A TFD realizada somente com o Photodithazine não se mostrou eficaz na inativação da fase clara e escura do *R.oryzae*, além de apresentar uma resposta de inibição com grande variação intra-grupo de tratamento. A baixa resposta fotodinâmica pode ter sido ocasionada, semelhante à resposta da AMB, por uma pobre internalização do fotossensibilizador ou por sequestro das moléculas nos vacúolos e nos melanossomas. Especialmente no caso dos melanossomas, estudos em melanoma pigmentado já reportaram o efeito protetor da melanina reduzindo a resposta fotodinâmica, principalmente por ser uma biomolécula antioxidante. (54) Um outro grande problema da fase escura de crescimento (55, 56), reside no fato que a melanina é uma molécula que absorve luz na mesma região que os protocolos de TFD são feitos (400-750 nm), o que ocorre então é que a melanina compete com o fotossensibilizador pela absorção de fótons, reduzindo então a ação fotodinâmica.

Durante os primeiros testes, foi verificada a característica altamente hidrofóbica do *R*. *oryzae*, quando da deposição da solução de PDZ, uma gota era formada e baixíssimo espalhamento superficial era observado, ilustrado na figura 17. Assim, os seguintes experimentos foram realizados utilizando-se o SDS para melhorar o espalhamento da superfície e a internalização do FS pelo fungo.



SEM SDS



**COM SDS** 

Figura 17: Espalhamento da gota de água sem SDS e com SDS em amostra do R. oryzae.

Fonte: Elaborada pela autora

## 4.3.1.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM PDZ E SDS

A figura 15 apresenta as taxas de inibição do crescimento *in vitro* de *R. oryzae*, nas fases clara e escura, 24 horas após serem submetidos a diferentes protocolos de Terapia Fotodinâmica utilizando Photodithazine<sup>®</sup> como fotossensibilizador e SDS 0,01%, grupo controle, Anfotericina B e entregando uma fluência de 100 J/cm<sup>2</sup>.



Figura 18 - Taxas de inibição de crescimento obtidas para amostras de *R.oryzae*, nas fases clara e escura, submetidos à TFD utilizando Photodithazine® como agente fotossensibilizador e SDS 0,01%.

Fonte: Elaborada pela autora

Os grupos controle, controle luz, controle SDS e controle FS-SDS apresentaram valores semelhantes para taxa de inibição do crescimento. Nota-se que ao adicionar o surfactante SDS 0,01% há uma melhora na resposta fotodinâmica na fase clara, em comparação com as amostras tratadas somente com o PDZ. Obtendo uma taxa de inativação acima de 30% para 4 protocolos testados, nas concentrações de PDZ de 250 e 500 µg/mL, nos tempos de incubação de 40 minutos e 1 hora, indicando que houve uma melhor internalização do fotossensibilizador nas estruturas do fungo, e consequentemente melhorando a resposta fotodinâmica.

A terapia fotodinâmica realizada com o Photodithazine e SDS 0,01% não se mostrou eficaz na melhora da resposta na fase escura do *R. oryzae*. Existem diferenças que vão ocorrendo ao longo das fases de crescimento do fungo, sendo a perda de água, uma delas evidente e possivelmente tornando o fungo ainda mais hidrofóbico. Uma provável explicação para uma boa resposta na fase clara e uma resposta não eficaz na fase escura utilizando o SDS 0,01% seria que para a fase escura a concentração de 0,01% de SDS ainda não foi suficiente para melhorar a internalização do fotossensibilizador.

A figura 16 apresenta as taxas de inibição do crescimento in vitro de *R. oryzae*, nas fases clara e escura, 24 horas após serem submetidos a diferentes protocolos de Terapia Fotodinâmica utilizando Photodithazine<sup>®</sup> como fotossensibilizador e SDS 0,05%, entregando uma fluência de 100 e 200 J/cm<sup>2</sup>.



Figura 19 -Taxas de inibição de crescimento obtidas para amostras de *R.oryzae*, na fase clara, submetidos à TFD utilizando Photodithazine® como agente fotossensibilizador e SDS 0,05%.

Os grupos controle, controle luz, controle SDS e controle FS-SDS apresentaram valores semelhantes para taxa de inibição do crescimento. A análise da taxa de inibição para os diversos

parâmetros empregados com o Photodithazine®, como concentração do fotossensibilizador, tempos de incubação e adição de SDS 0,05%, demonstram a resposta positiva do tratamento com a terapia fotodinâmica em amostras da fase clara do *R. oryzae*. Uma inibição de 94 % no protocolo de 250  $\mu$ g/mL de concentração do PDZ, com 2 horas de incubação e dose de 200 J/cm<sup>2</sup> foi observada e para o protocolo de 2 sessões, obteve-se 98% de inibição do crescimento. Na fase escura, com o protocolo de 500  $\mu$ g/mL de concentração do PDZ, com 2 horas de incubação e dose de 200 J/cm<sup>2</sup> foi observada e para o protocolo de 500  $\mu$ g/mL de concentração do PDZ, com 2 horas de incubação do crescimento. Na fase escura, com o protocolo de 500  $\mu$ g/mL de concentração do PDZ, com 2 horas de incubação e dose de 200 J/cm<sup>2</sup> foi observada uma inibição de 72 %, enquanto para o protocolo de 2 sessões obteve-se 65% de inibição do crescimento. No entanto, ainda uma grande variação da resposta fotodinâmica é observada pelas barras de erro.

As figuras 18 e 19 resume os melhores protocolos avaliados, nas fases clara e escura, Anfotericina B, TFD com PDZ e TFD com PDZ e SDS.



Figura 20 - Taxas de inibição de crescimento obtidas para amostras de *R.oryzae*, na fase clara, para os melhores protocolos avaliados.

Fonte: Elaborada pela autora



Figura 21 - Taxas de inibição de crescimento obtidas para amostras de *R. oryzae*, na fase escura, para os melhores protocolos avaliados.

Visto que a inibição do crescimento do *R. oryzae* não foi de 100% em nenhum dos protocolos, observou-se que 48 horas após o tratamento de todas as amostras o crescimento foi normalizado. Comparando os protocolos aplicados, notamos que a presença do surfactante SDS melhorou a internalização do fotossensibilizador, e consequentemente a resposta fotodinâmica.

Em melanoma há relatos na literatura de que a melanina pode afetar a resposta fotodinâmica, devido a interferência óptica provocada pela melanina, seu efeito antioxidante e sequestro de fotossensibilizador nos melanossomas. (57), Notamos em nossos protocolos que isso provavelmente ocorre com o fungo *R. oryzae*, ao comparar a resposta de TFD da fase clara com a escura.

É evidente que mesmo com os protocolos testados com a clorina em altas concentrações e irradiação com altos valores de fluência não foram suficientes para promover uma inativação fotodinâmica efetiva. Comparando com outros estudos que utilizaram o Photodithazine em fungos filamentosos e no *Pythium insidiosum*, o *R. oryzae* mostra ser um microrganismo mais resistente à terapia fotodinâmica com clorina. Outras estratégias deverão ser testadas para buscar uma melhor resposta, como a seleção de um fotossensibilizador e/ou desenvolvimento de uma formulação com maior afinidade e internalização pelo *R. oryzae*.

#### 4.4.1 MICROSCOPIA CONFOCAL

# 4.4.1.1 INTERNALIZAÇÃO DO PHOTODITHAZINE

A Figura 21 mostra a distribuição do Photodithazine nas hifas e esporângios do *R*. *oryza*e, com 1 hora de incubação para a fase clara e 2 horas de incubação para a fase escura. A fluorescência em vermelho refere-se à emissão de fluorescência do Photodithazine.



Figura 22 - A) e B) Internalização do Photodithazine em amostra de Fase Clara do *R. oryzae*, vistos em Microscopia Confocal de Fluorescência, no aumento de 20x, em C) e D) Internalização do Photodithazine em amostra da Fase Escura do *R. oryzae*, vistos em Microscopia Confocal no aumento de 40x.

Fonte: Elaborada pela autora

Nota-se que, para a fase clara de crescimento do *R. oryzae*, o Photodithazine se distribuiu de forma heterogênea em algumas regiões e homogênea em outras, nas hifas. Esta distribuição de forma heterogênea em algumas regiões pode reduzir a efetividade da terapia fotodinâmica, uma vez que não haverá produção de ROS em de forma abrangente. Este mesmo comportamento foi observado de forma ainda mais evidente na fase escura de crescimento, em que o Photodithazine se distribuiu heterêgeneo em toda a amostra. Adicionalmente, na fase escura é possível observar dois principais padrões de distribuição intracelular do fotossensibilizador, indicados pela seta azul, sendo a) internalização em estruturas intracelulares do tipo vacúolo, lisossomos e melanossomas e pouca dispersão no citosol (figura 21-C) e b) dispersão no citosol e estruturas celulares escuras, possivelmente melanossomas (figura 21-D). Uma distribuição heterogênea do fotossensibilizador, associado ao sequestro do fotossensibilizador em estruturas intracelulares com membrana, resultarão em uma resposta fotodinâmica bastante heterogênea e, portanto, com baixa eficácia. Esses resultados concordam e auxiliam no entendimento da inativação fotodinâmica heterogênea e de menor eficiência na fase escura do crescimento.

# 4.4.1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA COM PHOTODITHAZINE

A figura 22 apresenta as amostras da fase clara do *R. oryzae* após serem submetidas à TFDa (incubação com Photodithazine por 1 h na concentração de 150  $\mu$ g/mL e dose de luz de 100 J/cm<sup>2</sup>).

Figura 23 - Imagens de microscopia confocal de amostras da fase clara do *R. oryzae* submetidos à TFD com o fotossensibilizador Photodithazine na concentração de 150 µg/mL. Em A) e B) imagens de fluorescência, em vermelho é a fluorescência do Photodithazine, no aumento de 63x. Em C) e D) imagens de campo claro, no aumento de 63x.

Fonte: Elaborada pela autora

A partir da figura 21, pode-se observar que a estrutura das hifas mudou após a aplicação do tratamento, como observado nas figuras 7-C) e 21-A), as hifas apresentam estruturas regularmente cilíndricas e após a TFD notamos que essa estrutura mudou, apresentando uma irregularidade na estrutura de sua parede celular, evidência do dano induzido na parede celular. Além disso, pode-se observar que o tratamento não foi capaz de alterar a estrutura das hifas de maneira global. Este resultado está de acordo com o observado anteriormente, em que o patógeno foi capaz de retomar o crescimento após 48 horas. Além disso, nota-se a emissão de fluorescência do Photodithazine, indicando que o fotossensibilizador não foi degradado completamente após a irradiação da TFD, podendo inclusive realizar uma segunda sessão irradiação sem a necessidade de nova administração do fármaco. Esse fato também pode ser

um indício de uma pobre produção de EROs e de oxigênio singleto, uma vez que a fotodegradação dessas moléculas está diretamente relacionada com a presença dessas espécies.

A figura 26 apresenta as amostras da fase escura do *R. oryzae* submetidos à TFDa, utilizando-se o Photodithazine na concentração de 150  $\mu$ g/mL, 1 hora de incubação e, dose de luz de 100 J/cm<sup>2</sup>.





Figura 24 - Imagens de microscopia confocal de amostras da fase escura do *R. oryzae* submetidos à TFD com o fotossensibilizador Photodithazine na concentração de 150 μg/mL. Em A) e B) imagens de fluorescência, em vermelho é a fluorescência do Photodithazine, no aumento de 20x. Em C) imagem de campo claro, no aumento de 63x.

Fonte: Elaborada pela autora

A partir da figura 22, podemos observar uma mudança na morfologia da estrutura das hifas, como foi observado para a fase clara, é possível notar também que houve a ruptura de

algumas hifas, como representado pela seta 2, e extravasamento e deposição de material amorfo após a TFD, como representado pela seta 1. Da mesma forma que na fase clara, pode-se observar que o tratamento não foi capaz de inativar todas as hifas. Este resultado está de acordo com o observado anteriormente, em que o patógeno foi capaz de retomar o crescimento após 48 horas. Além disso, observa-se emissão de fluorescência do Photodithazine, indicando que nem todo o composto foi degradado após a TFD.

#### 4-5 DISCUSSÃO

O fungo *R. oryzae* foi pouco estudado na literatura com relação a sua estrutura celular e tratamentos com antifúngicos ou alternativos. A Terapia Fotodinâmica apresenta algumas vantagens quando comparada aos antifúngicos. Uma delas é o improvável desenvolvimento de resistência pelos microrganismos, uma vez que a TFD é sítio-inespecífica, sendo todas as estruturas celulares alvos potenciais para oxidação, como por exemplo, lipídios insaturados, enzimas e proteínas. (60), Neste presente trabalho, optou-se por iniciar os estudos de Inativação Fotodinâmica nas hifas, que é a forma que o patógeno se encontra em infecções. As hifas são morfologicamente mais complexas comparada aos conídios, elas são organizadas em estruturas tridimensionais e ramificadas, além de apresentarem parede celular espessa. Todas estas características dificultam a ação de qualquer agente antimicrobiano, como por exemplo, pode reduzir a internalização do fotossensibilizador.

As taxas de inibição do crescimento do *R. oryzae* revelam o potencial da terapia fotodinâmica, principalmente quando foi utilizado o PDZ em associação com o SDS 0,05%. As doses de luz de 100 e 200 J/cm<sup>2</sup> utilizadas neste estudo, quando comparadas com estudos de TFD em outros microrganismos, podem ser consideras ligeiramente altas, entretanto, este fato é justificado devido a complexidade da estrutura do patógeno, tanto da composição e estrutura da parede celular, como pelo posicionamento das hifas que formam um micélio, fazendo com que o fotossensibilizador fosse utilizado em uma concentração mais alta e, consequentemente, uma maior dose de luz foi requerida.

Nos testes iniciais, a TFD foi aplica com o Photodithazine na ausência de SDS, o que acarretou a necessidade de se utilizar altas concentrações deste FS para que ocorresse a inibição do crescimento. Entretanto, quando o Photodithazine é usado em altas concentrações ocorre a formação de agregados que não são ativos para a TFD, reduzindo assim, a eficácia fotodinâmica. Além disso, foi observada uma alta hidrofobicidade da cultura fúngica, o que
dificultava a internalização do FS. Desta forma, os testes posteriores foram aplicados associando-se o PDZ com o surfactante SDS.

Os ensaios em que a TFD foi mediada pelo PDZ em associação com SDS 0,01% demonstraram uma crescente melhora quando se comparado aos protocolos usando somente PDZ. Na fase clara, notou-se que menores concentrações de PDZ obtiveram uma melhor resposta, novamente indicando que em altas concentrações o PDZ se agrega. Na fase escura mesmo com o uso de SDS 0,01% a inativação fotodinâmica não foi eficaz, provavelmente essa não foi uma concentração de SDS suficiente para melhorar a internalização do fotossensibilizador e, como observado na microscopia confocal, esta fase de crescimento possui melanina, o que afeta na resposta fotodinâmica.

Quando foi utilizado SDS 0,05% juntamente com o PDZ foram obtidos melhores resposta de inativação microbiana, com uma ótima taxa de inibição do crescimento. Na fase clara, obteve-se uma inibição de 94 % usando-se 250 µg/mL de PDZ, 2 horas de incubação e dose de luz de 200 J/cm<sup>2</sup>. Para o protocolo de 2 sessões de PDT obteve-se 98% de inibição do crescimento, mostrando que o SDS 0,05% foi mais adequado e possibilitou uma melhor internalização do fotossensibilizador. Para a fase escura, foi observada uma resposta positiva na inibição do crescimento, sendo obtida uma inibição de 72 % com 500 µg/mL de PDZ, 2 horas de incubação e dose de luz de 200 J/cm<sup>2</sup>. Para o protocolo de 2 sessões, 65% de inibição do crescimento foi observada. A menor resposta da PDT na fase escura do crescimento pode ser explicada pelas características desse fungo, em que o fotossensibilizador se distribuiu de forma mais heterogênea ao longo das hifas, há a presença da melanina que compete pela absorção de fótons e atrapalha a TFD.

Observamos em nossos ensaios com o *R. oryzae* que a adição do surfactante SDS ao PDZ melhorou a internalização do fotossensibilizador e a resposta da TFD, há relatos na literatura que a adição desse surfactante a um FS para a realização da TFD apresenta uma resposta superior na inativação fotodinâmica em biofilmes de *S. aureus* e *S. mutans.* (59), (60)

Foram realizados ensaios com a Anfotericina B para efeitos comparativos com a PDT. O mecanismo de ação da AMB pode ser dividido nos efeitos causados na membrana celular e nos efeitos intracelulares que induzem ao estresse oxidativo. O efeito na membrana celular é baseado na sua interação com o ergosterol, que é um esteroide essencial da membrana celular de fungos, causando a formação de poros na membrana que resultam na perda de sua integridade e rápido extravasamento de potássio e outros íons, causando a morte celular. O outro mecanismo é a indução do estresse oxidativo, sendo responsável pelo seu efeito antimicrobiano. Estudos revelam que a AMB induz o estresse oxidativo celular e o aumento na formação de radicais livres, evidenciado também pela expressão dos genes de stress celular, por mecanismos ainda não completamente conhecidos. (61–63), Para o grupo testado com AMB foi observado que as taxas de inibição das amostras tratadas com AMB foram inferiores em comparação com a TFD. No estudo de Chabrier-Roselló *et al.* (64), em 2008, demonstrou-se a diminuição da atividade metabólica de *C. albicans* submetida à TFD foi maior em relação as amostras tratadas com AMB. No estudo Soares, B *et al* (65), em 2011, utilizando *Cryptococcus gattii*, demonstrou que a TFD é eficaz na inibição, sem causar toxicidade celular ou resistência, quando comparada a tratamento com antifúngicos.

Os resultados dos ensaios de TFD feitos com o R. oryzae utilizando Photodithazine e Photodithazine associado com o SDS são coerentes com os já obtidos na literatura para outros fungos utilizando somente o PDZ, como a Candida albicans e Candida guilliermondii. (52), (53), (66), (67) Nos estudos de Dovigo et al (53), do ano de 2013, foi estudada a inativação fotodinâmica mediada por PDZ contra C. albicans, C. glabrata e C. tropicalis, na forma planctônica e em biofilme. Na condição de planctônica as concentrações de PDZ testadas foram 25, 50 e 75 µg/mL, e fluência de 18, 25,5 e 37,5 J/cm<sup>2</sup>. Na condição de biofilme as concentrações de PDZ testadas foram 75, 100 e 125 µg/mL, e fluência de 18, 25,5 e 37,5 J/cm<sup>2</sup>. Para os dois casos o tempo de incubação foi de 20 minutos. Para C. albicans na forma planctônica, ocorreu completa inibição do crescimento com os protocolos de 50 e 75 µg/mL de PDZ, com fluência de 37,5 J/cm<sup>2</sup>, e para 75 µg/mL de PDZ com fluência de 25,5 J/cm<sup>2</sup>. Para a forma planctônica de C. glabrata foi observada uma redução de 4,3 log<sub>10</sub>, no protocolo 75 µg/mL de PDZ com fluência de 37,5 J/cm<sup>2</sup>. Por fim, para a forma planctônica de C. tropicalis ocorreu uma redução de 5,6 log<sub>10</sub>, no protocolo 75 µg/mL de PDZ com fluência de 37,5 J/cm<sup>2</sup>. No estudo de Dovigo et al., o biofilme de Candida teve significativa redução na atividade metabólica, tendo o maior percentual para o protocolo de 125 µg/mL de PDZ e fluência de 37,5 J/cm<sup>2</sup>. Para C. albicans, houve redução de 62,1% na atividade metabólica dos biofilmes, enquanto reduções de 76,9% e 76,0% foram observadas para C. glabrata e C. tropicalis, respectivamente. Todas as Candida spp. avaliadas mostraram viabilidade reduzida após a exposição a TFD quando comparado aos grupos de controle em  $0,9, 1,4, e 1,5 \log_{10}$  para C. albicans, C. tropicalis, e C. glabrata, respectivamente.

Nos estudos de Tan *et al.* (68), de 2019, foram realizados ensaios de TFD em células planctônicas e em biofilme de *Candida auris*, o FS utilizado foi o azul de metileno, variando as concentrações de 8, 16 e 32  $\mu$ g/mL e fluência de 12 J/cm<sup>2</sup> para a cultura planctônica e 24 J/cm<sup>2</sup> para o biofilme. Os resultados desse estudo mostraram que não houve crescimento em células

planctônicas e em biofilme houve redução de 7,2  $log_{10}$ , sendo uma inibição de 100% do crescimento. Em nossos estudos conseguimos uma inativação semelhante na fase clara do *R*. *oryzae*, de 98% de inibição do crescimento após duas sessões de TFD com 250 µg/mL de PDZ e SDS 0,05%.

Os ensaios de internalização do PDZ confirmam a afinidade do composto por regiões específicas das estruturas do *R. oryzae*. As amostras apresentaram fluorescência na região da parede, membranas celulares e estruturas intracelulares. Notou-se que em algumas regiões da hifa não houve fluorescência, indicando regiões que são com alta absorção de luz, provavelmente devido a presença de melanina.

O efeito da TFD observado no microscópio confocal mostra de como a importância da localização do fotossensibilizador nas estruturas influencia diretamente no efeito fotodinâmico causado no patógeno. Como notou-se uma internalização heterogênea em algumas estruturas da fase clara do *R. oryzae,* observou-se uma mudança morfológica nas estruturas das hifas, sendo algumas inativadas e outras não. Para a fase escura ocorreu o mesmo. Por isso, houve recuperação do crescimento após 48 horas dos ensaios.

As taxas de inibição do crescimento *in vitro* do *R. oryzae* obtidas com a terapia fotodinâmica comprovaram o potencial da TFD na inativação do patógeno.

CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO *in* vitro DE *Rhizopus oryzae* NA FASE DE CONÍDIOS

# CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE O CRESCIMENTO *in* vitro DE *Rhizopus oryzae* NA FASE DE CONÍDIOS

## 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a IFD em suspensão de esporos assexuais (conídios) utilizando o PDZ

### 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Rhizopus oryzae

A cepa do *R. oryzae* (CFP 0781) foi doada pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e armazenada a 4°C em meio sólido de Ágar Dextrose de Batata (PDA).

#### 5.2.2 PREPARO DA AMOSTRA

### 5.2.2.1 SUSPENSÃO DE CONÍDIOS

Em colaboração com a professora Marcia von Zeska Kress e a técnica Ludmilla Tonani, da USP Ribeirão Preto, aprendemos o protocolo de suspensão de conídios e adaptamos para nossas amostras. Para o preparo da suspensão de conídios, foram adicionados 3 mL de PBS na placa de PDA com o fungo cultivado por 48 horas. Com o auxílio de uma pipeta, o PBS é coletado e despejado na placa diversas vezes até obter uma solução escura, que corresponde aos conídios que foram liberados da cultura. Então, esta suspensão de conídios é filtrada para completa separação dos conídios das hifas.

O processo de filtragem foi realizado com lã de vidro como filtro. Para isso, a lã de vidro é inserida no interior de uma seringa, então, a suspensão de conídios é transferida para esta seringa e filtrada. A suspensão filtrada é despejada em um tubo Eppendorf, como mostrado na figura. Esse processo é realizado em 5 placas de PDA contendo o *R. oryzae*, para se obter a concentração ideal de conídios para realizar os testes de inativação.



Figura 25 - Esquema do preparo e filtragem da suspensão de conídios Fonte: Elaborada pela autora

# 5.2.2.2 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

Após a filtragem, foi realizada a contagem de conídios em uma câmara de Neubauer. Antes da contagem, foi realizada uma diluição seriada até a quarta diluição, como mostrado na figura.



Figura 26 - Esquema da diluição seriada da suspensão de conídios Fonte: Elaborada pela autora

Após a diluição, 10 µL da diluição 0 foram colocados em um lado da câmara para a contagem, do outro lado foi colocada a diluição 1 para ser realizada a contagem.



Figura 27 - Contagem de Unidade Formadora de Colônias (UFC) na Câmara de Neubaeur Fonte: Elaborada pela autora

O processo de contagem foi feito da seguinte forma:

• Caso de contagem nos 4 quadrantes:

$$X = \frac{n^{\circ} \operatorname{contado} x \operatorname{10}^{n} x \operatorname{10}^{4}}{4} \operatorname{UFC/mL}$$

• Caso de contagem no quadrante central:

$$X = n^{\circ} contado x 10^n x 10^4 \text{ UFC/ mL}$$

Sendo: n = número de diluição;  $10^4$  o fator da câmara de Neubauer.

Para realização dos experimentos, foi utilizada a placa de 96 poços. A concentração da suspensão de conídios é padronizada a  $10^6$  e  $10^7$  conídios por poço, sendo que o volume (X) foi preparado conforme o número de amostras a serem testadas em cada ocasião. Para os experimentos foi utilizada a diluição 0.



Figura 28 - Esquema de preparo da placa de 96 poços para os experimentos.

Fonte: Elaborada pela autora

## 5.2.3 ANFOTERICINA B

A partir das amostras preparadas, conforme descrito em 2.2.2 foram feitos testes com AMB na concentração de 125  $\mu$ g/mL e tempo de incubação de 1 hora. Para isso, foram adicionados 100  $\mu$ L de AMB por poço e 100  $\mu$ L da suspensão fúngica, totalizando 200  $\mu$ L por poço, de suspensão de conídios e AMB.



Figura 29 - Esquema de incubação de 100 uL de AMB por poço Fonte: Elaborada pela autora

Após o tratamento das amostras, todas as amostras foram diluídas até a diluição 4 e semeadas em duplicata pelo método da gota, que consiste em gotas de 10 µL em placas de Petri com meio de cultura PDA suplementado com 0,15g/L de ácido deoxicólico. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 14 horas para a realização da contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).



Figura 30 - Plaqueamento pelo método da gota, das diluições 0 até 4.

Fonte: Elaborada pela autora

#### 5.2.4 FOTOSSENSIBILIZADOR

As amostras preparadas, conforme descrito em 2.2.2, foram incubadas com o FS. Para este estudo, também foi selecionado o Photodithazine® (PDZ – Moscou, Rússia), sendo testadas duas concentrações e 3 tempos de incubação, descritos na tabela X. Assim, foram adicionados 100  $\mu$ L do fotossensibilizador PDZ em 100  $\mu$ L de amostra, totalizando 200  $\mu$ L por poço.



Figura 31 - Esquema de incubação de 100 uL de FS por poço Fonte: Elaborada pela autora

### 5.2.5 FONTE DE LUZ

Foi utilizado um dispositivo de luz LED centrado a 660 nm para realizar IFD, com potência de 50 mW/cm<sup>2</sup> e foi entregue uma fluência de 100 J/cm<sup>2</sup>. Foi utilizado o mesmo dispositivo usado para a inativação em hifas.

# 5.2.6 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Para avaliar a ação fotodinâmica em conídios, foram variadas as concentrações de FS e tempos de incubação. Os parâmetros usados estão na tabela 1.

Protocolo	[PDZ] (µg/mL)	Tempo de incubação	Iluminação (J/cm <sup>2</sup> )
Controle	0	0	0
Controle luz	0	2h	100
<b>Controle FS</b>	250	2h	100
1	25	30 min, 1h e 2h	100
2	62,5	30 min, 1h e 2h	100
3	125	30 min, 1h e 2h	100
4	250	30 min, 1h e 2h	100

Tabela 5 - Parâmetros de IFD para suspensão de conídios utilizando PDZ

Fonte: Elaborada pela autora

Após o tratamento das amostras, todas as amostras foram diluídas até a diluição 4 e semeadas em duplicata pelo método da gota, que consiste em gotas de 10 µL em placas de Petri com meio de cultura PDA suplementado com 0,15g/L de ácido deoxicólico. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 14 horas para a realização da contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

#### **5.3 RESULTADOS**

Na fase de conídios do *R. oryzae* uma forma encontrada para avaliar o crescimento desse fungo foi através do uso do meio de cultura de PDA com ácido deoxicólico, que inibe o crescimento das hifas, e permite a contagem da unidade formadora de colônias, comparando a contagem das amostras tratadas e controle. A fase de conídios é a fase do ciclo de vida que ocorre a contaminação humana, por isso se faz necessário observar a resposta fotodinâmica na forma infectante. Foi realizada análise estatística utilizando ANOVA seguida de Tukey ( $\alpha =$ 0,05), para comparar o controle com as amostras tratadas.

5.3.1 INATIVAÇÃO

## 5.3.1.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM PDZ

A figura 32 apresenta a redução do crescimento *in vitro* de *R. oryzae*, na fase de conídios, 14 horas após serem submetidos a diferentes protocolos de Terapia Fotodinâmica utilizando Photodithazine<sup>®</sup> como fotossensibilizador, grupos controle, controle luz e Anfotericina B, entregando uma fluência de 100 J/cm<sup>2</sup>.



Figura 32 - Taxas de redução de crescimento obtidas para amostras de suspensão de conídios de *R.oryzae*, submetidos à diferentes tempos de incubação com o fotossensibilizador PDZ na concentração de em A) 25 μg/mL, em B) 62,5 μg/mL, em C) 125 μg/mL e em D) 250 μg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora

Primeiramente foi realizado o teste com o antifúngico AMB, e notou-se que houve uma redução de 0,6 log do crescimento do conídio. Para o controle luz, houve uma redução de 0,5 log. Para o controle FS, em todas as concentrações de PDZ utilizada a redução não foi maior que 0,5 log. Indicando que não houve morte significativa tanto para o controle luz, controle FS, quanto para o ensaio com AMB.

Observando a figura 32-A) para o protocolo de 25  $\mu$ g/mL de concentração de PDZ, nota-se que com 1 hora de incubação de PDZ obtivemos uma melhor resposta fotodinâmica, com uma redução de 1,5 log<sub>10</sub> do crescimento do fungo. Nesse protocolo não houve diferença estatística entre os grupos controle, controle luz e controle FS. Houve diferença estatística entre os grupos controle e AMB (p = 0, 04), controle e 30 minutos de incubação (p = 0,002), controle e 1 hora de incubação (p = 0,001) e controle e 2 horas de incubação (p = 0,003).

Para o protocolo de 62,5 μg/mL de concentração de PDZ, como representado na figura 32-B) a melhor resposta foi observada com 1 hora de incubação de PDZ obtendo uma redução de 1,1 log<sub>10</sub> do crescimento do fungo. Nesse protocolo não houve diferença estatística entre os grupos controle, controle luz, controle FS, AMB e os grupos TFDa, porém mesmo não havendo diferença estatística entre esses grupos, houve diferença numérica entre o grupo controle e os grupos TFDa.

A partir da figura 32-C) para o protocolo de 125  $\mu$ g/mL de concentração de PDZ, podemos notar que com 2 horas de incubação de PDZ houve redução de 1,7 log<sub>10</sub> do crescimento do fungo. Nesse protocolo houve diferença estatística entre todos os grupos comparado ao controle: luz (p = 0,0004), FS (p = 0,002), AMB (p = 0,00008), 30 minutos de incubação (p = 0,00001), 1 hora de incubação (p = 0,000004) e 2 horas de incubação (p = 0,000003).

Por fim, observando a figura 32-D) para o protocolo de 250 µg/mL de concentração de PDZ a melhor resposta foi com 30 minutos de incubação de PDZ houve redução de 1,4 log<sub>10</sub> do crescimento do fungo. Nesse protocolo não houve diferença estatística entre os grupos controle, controle luz e controle FS. Houve diferença estatística entre os grupos controle e AMB (p = 0, 02), controle e 30 minutos de incubação (p = 0,001), controle e 1 hora de incubação (p = 0,001) e controle e 2 horas de incubação (p = 0,002).

### 5.4 DISCUSSÃO

Após os resultados positivos em hifas de *R. oryzae*, demos continuidade aos nos nossos ensaios agora em conídios, que são a forma de contaminação do patógeno.

Analisando nossos resultados, vimos uma resposta fotodinâmica semelhante para as quatro concentrações utilizadas de PDZ, sendo a melhor redução de 1,7 log do crescimento do *R. oryzae* com 2 horas de incubação do PDZ no protocolo de concentração de 25  $\mu$ g/mL do fotossensibilizador. Notou-se que em todos os protocolos de TFD de conídios de *R. oryzae* houve uma significativa redução do microrganismo.

Há um único trabalho na literatura de TFD contra conídios de *R. oryzae*, nos estudos de Lui *et al* (71), do ano de 2019, foi utilizado com FS o azul de metileno em suspensão de conídios. Foram testadas as concentrações de FS de 8  $\mu$ g/mL, 16  $\mu$ g/mL e 32  $\mu$ g/mL e tempo de incubação de 2 horas e iluminação de 12 J/cm<sup>2</sup> – 100 mW/cm<sup>2</sup>, conseguindo uma redução de 1,1 log<sub>10</sub>, 2,2 log<sub>10</sub> e 4,3 log<sub>10</sub> no crescimento, respectivamente para cada concentração de FS. Em nossos ensaios utilizando outro FS, que foi o PDZ, observamos uma resposta um pouco inferior, nosso melhor protocolo foi utilizando a concentração de PDZ de 125  $\mu$ g/mL, em que observamos uma redução de 1,7 log<sub>10</sub> do crescimento da suspensão de conídios do *R. oryzae*. No estudo de Lui *et al.*, foi utilizado o dobro da irradiância (100 mW/cm<sup>2</sup>) quando comparado aos nossos protocolos, esse fator pode ter contribuído para o aumento da resposta fotodinâmica visto nesse ensaio.

Nos estudos de Gonzales *et al.* (70), do ano de 2009, foram realizados ensaios de TFD em suspensão de conídios de *Metarhizium anisopliae* e *Aspergillus nidulans*, utilizando os fotossensibilizadores Azul de Metileno e Azul de Toluidina, nesse estudo foi observado que com o aumentou das concentrações de FS, houve um aumento na eficiência da TFD até uma concentração ótima, depois ocorreu uma redução abrupta na eficiência do processo a partir de então. Esse tipo de redução, pode ser atribuído principalmente ao bloqueio da luz causado pelo excesso de FS. Foi notado algo semelhante em nosso estudo, em que houve uma redução máxima na concentração de 125 µg/mL de PDZ, porém em uma concentração maior de 250 µg/mL a redução foi inferior.

Nos estudos de Sierra-Garcia *et al.* (73), do ano de 2022, foram realizados ensaios de TFD em suspensão de conídios de *Fusarium oxysporum* utilizando pela ação de derivados catiônicos de clorina, com concentrações de 5, 15, 25 e 100 µM e dose total de luz de 45, 90, 135 e 180 J/cm<sup>2</sup>. Com a ação do tiopiridínio clorina foi observada inativação completa nas condições 15 µM de concentração de FS, e fluência de 45 J/cm<sup>2</sup>. No caso da metoxipiridinio clorina, foi necessária uma concentração maior de FS de 100 µM e fluência de 90 J/cm<sup>2</sup> para ocorrer a inativação completa.

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

### CAPÍTULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme observado nas imagens de Microscopia Confocal, o fungo *R. oryzae* apresenta hifas cilíndricas e alongadas, com um diâmetro médio de 10-15  $\mu$ m, esporângios com um diâmetro médio variando entre 50-70  $\mu$ m, observou-se também a presença de esporos com diâmetro entre 10-20  $\mu$ m. As hifas apresentam uma parede celular relativamente espessa, com cerca de 1,5  $\mu$ m. Pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão pudemos observar a parede celular espessa e uma grande quantidade de ultraestruturas celulares, vacúolos, melanossomas e membranas celulares. Todos esses fatores implicam na complexidade do patógeno, dificultando a internalização do fotossensibilizador e consequente a resposta fotodinâmica.

No estudo *in vitro* nas hifas de *R. oryzae* podemos observar que o uso somente do Photodithazine não apresentou uma resposta fotodinâmica eficaz, fato provavelmente relacionado a hidrofobicidade do fungo. Por isso, foi-se necessário adicionar um surfactante para melhorar a internalização do FS. Os protocolos com o uso do PDZ e SDS 0,01% apresentaram uma breve melhora na resposta na fase clara, porém na fase escura a resposta não foi eficaz, indicando que essa concentração de 0,01% de SDS ainda não foi suficiente para melhorar a internalização. Com o protocolo de PDZ e SDS 0,05% obtivemos uma ótima resposta fotodinâmica, com uma inibição do crescimento, na fase clara, de 94% com 1 sessão de TFD e 98% de inibição no protocolo de 2 sessões. Na fase escura foi observado uma inibição de 72% com o protocolo de 1 sessão e para 2 sessões uma inibição de 65%.

O Photodithazine apresentou uma distribuição heterogênea em algumas regiões de hifa e homogênea em outras, na fase clara de crescimento, podendo reduzir a efetividade da TFD. Na fase escura o PDZ se distribuiu de forma bem heterogênea nas hifas. Implicando em uma resposta fotodinâmica não tão eficaz. Os danos após TFD foram observados na Microscopia Confocal, e foi possível notar danos na morfologia das hifas, observou-se também que houve a ruptura de algumas hifas e extravasamento e deposição de material amorfo. Como o tratamento não foi capaz de inativar todas as hifas, o patógeno foi capaz de retomar o crescimento após 48 horas.

No estudo *in vitro* nos conídios de *R. oryzae,* que são a forma de contaminação do patógeno, observamos que houve uma significativa redução do microrganismo, com uma redução 1,7 log<sub>10</sub> no crescimento, representando 26% de uma taxa de morte do microrganismo.

Os protocolos testados nas diferentes fases do crescimento do *R. oryzae* apresentaram somente uma resposta parcial, sendo que na fase clara os valores mais altos de inibição do crescimento foram obtidos. Os resultados apresentados demonstram o potencial do uso da TFDa para o controle do crescimento do *R. oryzae*, no entanto a otimização do protocolo e possível associação com outros tratamentos antimicrobianos deverá ser investigados.

## REFERÊNCIAS

1 BAKER, R. E. et al. Infectious disease in an era of global change. Nature Reviews Microbiology, v. 20, n. 4, p. 193–205, Apr. 2022. DOI: 10.1038/s41579-021-00639-z.

2 GAYNES, R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 5, p. 849–853, May 2017. DOI: 10.3201/eid2305.161556.

3 BENNETT, J. W.; CHUNGT, K.-T. Alexander Fleming and the discovery of Penicillin. *Advances in Applied Microbiology*, v. 49, p. 163, 2001. DOI: 10.1016/s0065-2164(01)49013-7.

4 LIGON, B. L. Penicillin: its discovery and early development. Seminars in Pediatric Infectious Diseases, v. 15, n. 1, p. 52–57, 2004. DOI: 10.1053/j.spid.2004.02.001.

5 MURRAY, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, v. 399, n. 10325, p. 629–655, Feb. 2022. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

6 O' NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016. Disponível em: <u>https://amr-review.org/sites/default/files/160518\_Final%20paper\_with%20cover.pdf</u>. Acesso em: 23 jan. 2021.

7 HAVLICKOVA, B.; CZAIKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, v. 51, Suppl. 4, p. 2-15, 2008. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x.

8 GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia*, v. 166, n. 5-6, p. 353, Nov. 2008. DOI: 10.1007/s11046-008-9109-0.

9 SELARKA, L. *et al.* Mucormycosis and COVID-19: an epidemic within a pandemic in India. *Mycoses*, v. 64, n. 10, p. 1253–1260, Oct. 2021. DOI: 10.1111/myc.13353.

10 QIAO, J. *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of superficial mycoses: An evidence-based evaluation. *Mycopathologia*, v. 170, n. 5, p. 339–343, Nov. 2010. DOI: 10.1007/s11046-010-9325-2.

11 FERNÁNDEZ-GUARINO, M.; JAÉN-OLASOLO, P. Photodynamic therapy in mycosis fungoides. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, v. 104, n. 5, p. 393–399, June 2013. DOI: 10.1016/j.adengl.2012.11.017.

12 MORIYA, T. *et al.* Molecular cloning of endo-β-D-1,4-glucanase genes, rce1, rce2, and rce3, from *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 5, p. 1749–1756, Mar. 2003. DOI: 10.1128/JB.185.5.1749-1756.2003.

13 BATTAGLIA, E. *et al.* Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. *BMC Genomics*, v. 12, n.38, Jan. 2011. DOI: 10.1186/1471-2164-12-38.

14 LECOINTE, K. *et al.* Polysaccharides cell wall architecture of mucorales. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1–8, Mar. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00469.

15 NICHOLAS, R. O.; WILLIAMS, D. W.; HUNTER, P. A. Investigation of the value of  $\beta$ -glucan-specific fluorochromes for predicting the  $\beta$ -glucan content of the cell walls of zoopathogenic fungi. *Mycological Research*, v. 98, n. 6, p. 694–698, June 1994. DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80419-X.

16 DE LIRA MOTA, K. S. *et al.* Antifungal activity of thymus vulgaris l. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules*, v. 17, n. 12, p. 14418–14433, Dec. 2012. DOI: 10.3390/molecules171214418.

17 ANDRIANAKI, A. M. *et al.* Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, Dec. 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-05820-2.

18 KWON, J. H. *et al.* Soft rot of *Rhizopus oryzae* as a postharvest pathogen of banana fruit in Korea. *Mycrobiology*, v. 40, n. 3, p. 214–216, 2012. DOI: 10.5941/MYCO.2012.40.3.214.

19 LONDOÑO-HERNÁNDEZ, L. *et al. Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, v.257, p.110-127, Sept. 2017. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.012.

20 GNANESH, B. N. *et al.* Molecular phylogeny, identification, and pathogenicity of *Rhizopus oryzae* associated with root rot of mulberry in India. *Journal of Applied Microbiology*, v. 131, n. 1, p. 360–374, July 2021. DOI: 10.1111/jam.14959.

21 HELAL, G. A. *et al.* Studies on cellulases of some cellulose-degrading soil fungi. *Archives of Microbiology*, v. 204, n. 1, Jan. 2022. DOI: 10.1007/s00203-021-02705-9.

22 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.* Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241. Acesso em: 03 nov. 2022.

23 EL-GHANY, T. M. A.; EL-SHEIKH, DR. H. H. *Mycology*. Foster City: OMICS Group eBooks, 2016. Disponível em: <u>https://www.researchgate.net/profile/Tarek-Abdelghany/publication/326205285\_Mycology/links/5b9179db299bf147391f8bb9/Mycology</u>.pdf. Acesso em: 23 Jan. 2021.

24 HARDING, M. W. *et al.* Can filamentous fungi form biofilms? *Trends in Microbiology*, v. 17, n. 11, p. 475–480, Nov. 2009. DOI: 10.1016/j.tim.2009.08.007.

25 DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 4, n. 10, 2014. DOI: 10.1101/cshperspect.a019729.

26 LIU, S. *et al.* Filamentous fungal biofilms: Conserved and unique aspects of extracellular matrix composition, mechanisms of drug resistance and regulatory networks in Aspergillus fumigatus. *Biofilms and Microbiomes Nature Research*, v.8, n.38, Dec. 2022. DOI: 10.1038/s41522-022-00347-3.

27 FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 2. p. 109–118, Feb. 2011. DOI: 10.1038/nrmicro2475.

28 HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, p.95-108, Feb. 2004. DOI: 10.1038/nrmicro821.

29 ZHENG, D.; TAYLOR, G. T.; GYANANATH, G. Influence of laminar flow velocity and nutrient concentration on attachment of marine bacterioplankton. *Biofouling*, v. 8, n. 2, p. 107–120, Oct.1994, DOI: 10.1080/08927019409378266.

30 RIJNAARTS, H. H. M. *et al.* Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Applied And Environmental Microbiology*, v.59, n.10, p.3255, Oct.1993. DOI: <u>10.1128/aem.59.10.3255-3265.1993.</u>

31 BITAR, D. et al. Increasing Incidence of Zygomycosis (Mucormycosis), France, 1997–2006. Emerging Infectious Diseases, v. 15, n. 9, p. 1395–1401, Sept. 2009. DOI: 10.3201/eid1509.090334.

32 SKIADA, A. *et al.* Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: Guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica*, v. 98, n. 4, p. 492–504, 2013. DOI: 10.3324/haematol.2012.065110.

33 RODEN, M. M. *et al.* Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, n. 5, p. 634–653, Sept. 2005. DOI: 10.1086/432579.

34 SUNDARAM, N. et al. Mucormycosis in COVID-19 patients. Indian Journal of Ophthalmology, v. 69, n. 12, p. 3728–3733, Dec. 2021. DOI: 10.4103/ijo.IJO\_1316\_21.

35 STEINBRINK, J. M.; MICELI, M. H. Mucormycosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.35, p.435-452, June 2021. DOI: 10.1016/j.idc.2021.03.009.

36 IBRAHIM, A. S. *et al. Rhizopus oryzae* adheres to, is phagocytosed by, and damages endothelial cells in vitro. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 2, p. 778–783, Feb. 2005. DOI: 10.1128/IAI.73.2.778-783.2005.

37 MAARTENS, G.; WOOD, M. J. The clinical presentation and diagnosis of invasive fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 28, Suppl. A, p. 13–22, 1991. DOI: 10.1093/jac/28.suppl\_a.13.

38 CHAMILOS, G.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 47, n. 4, p. 503–509, 2008. DOI: 10.1086/590004.

39 SINGH, A. K. *et al.* Mucormycosis in COVID-19: a systematic review of cases reported worldwide and in India. *Diabetes & Metabolic Syndrome:* clinical research & reviews, v. 15, n. 4, p. 102146, July 2021. DOI: 10.1016/j.dsx.2021.05.019.

40 TOMASELLI, F. *et al.* Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung cancer-a clinical pilot study. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 28, n. 5, p. 399–403, June 2001. DOI: 10.1002/lsm.1067.

41 KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of Dental Research*, v. 86, n. 8, p. 694–707, Aug. 2007. DOI: 10.1177/154405910708600803.

42 HAMBLIN, M.R., *et al.* Polycationic photosensitizer conjugates: Effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.v.49, n.6, p.941-951, June 2002.DOI: 10.1093/jac/dkf053.

43 COSTA, L; CARVALHO, C.M.B; FAUSTINO, M.A.F.; NEVES, M.G.P.M.S, TOMÉ JPC, TOMÉ AC. Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: Influence of light parameters. *Photochemical and Photobiological Sciences, n.8,* 2010. DOI: 10.1039/c0pp00051e

44 LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. Berlin: Springer, 2006.

45 T ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Medical Physics*, v. 35, n. 7, 2008. DOI: 10.1118/1.2937440.

46 NUNEZ, S. C. *Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica*. 2007. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. DOI: 10.11606/T.85.2007.tde-29112007-172514.

47 PIRES, L. *et al.* Photodynamic therapy in *Pythium insidiosum* - an *in vitro* study of the correlation of sensitizer localization and cell death. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, Jan. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085431.

48 QUISHIDA, C. C. C. Estudo da eficácia da terapia fotodinâmica, mediada pelos fotossensibilizadores photodithazine ® e curcumina, sobre biofilmes multi-espécies formados por Streptococcus mutans, Candida albicans e Candida glabrata. 2013. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

49 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, July 2004. DOI: 10.1021/jm040074b.

50 MIRONOV, F.; NIZHNIK, A. N.; NOCKEL, A. Y. Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v.4, n.3, p.297, Jan. 1990. DOI: 10.1016/1011-1344(90)85035-u

51 DE FRANÇA, B. M. *et al. In vitro* studies of antitumor effect, toxicity/cytotoxicity and skin permeation/retention of a green fluorescence pyrene-based dye for pdt application.

*Photochemistry and Photobiology*, v. 97, n. 2, p. 408–415, Mar. 2021. DOI: 10.1111/php.13335.

52 CORRÊA, J. C. Fotodegradação do Photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser. 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Oct. 2006. DOI: 10.11606/D.75.2006.tde-18012007-113259.

53 ALVES, F. *et al.* Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Medical Mycology*, v. 57, n. 5, p. 609–617, July 2019. DOI: 10.1093/mmy/myy083.

54 STRAKHOVSKAIA, M. G. *et al.* The photodynamic inactivation of *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Mikrobiologia*, v. 71, n. 3, p. 349–53, 2002.

55 DOVIGO, L. N. *et al.* Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*, v. 29, n. 9, p. 1057–1067, Oct. 2013. DOI: 10.1080/08927014.2013.827668.

56 PIRES, L. *et al.* Dual-agent photodynamic therapy with optical clearing eradicates pigmented melanoma in preclinical tumor models. *Cancers*, v. 12, n. 7, p. 1–17, July 2020. DOI: 10.3390/cancers12071956.

57 BELLANGER, A. P. *et al.* Statin concentrations below the minimum inhibitory concentration attenuate the virulence of *rhizopus oryzae*. *Journal of Infectious Diseases*, v.214, n.1, p.114-121, July 2016. DOI: 10.1093/infdis/jiw090.

58 CHONGKAE, S. *et al.* Production of melanin pigments in saprophytic fungi in vitro and during infection. *Journal of Basic Microbiology*, v. 59, n. 11, p. 1092–1104, Nov. 2019. DOI: 10.1002/jobm.201900295.

59 HAMBLIN, M. R. *et al.* Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. *Biological Chemistry*, v. 394, n. 2, p. 239, 2013.DOI: 10.1515/hsz-2012-0228.

60 STRAKHOVSKAYA, M. G. *et al.* Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. *Biochemistry and Biophysics*, v. 384, p. 155–8, 2002. DOI: 10.1023/a:1016072130789.

61 ALVES, F. *et al.* Strategies to improve the antimicrobial efficacy of photodynamic, sonodynamic, and sonophotodynamic therapies. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 53, n. 8, p. 1113–1121, Oct. 2021. DOI: 10.1002/lsm.23383.

62 GERALDE, M. C. et al. Enhancement of the photodynamic therapy effect on streptococcus mutans biofilm. Journal of Physical Science and Application, v. 4, n. 2, p. 107, 2014.

63 MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, p.286. Aug, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00286.

64 LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 68, n. 2, p. 151, July 2005. DOI: 10.1007/s00253-005-1955-9.

65 BRANCO FILIPPIN, F.; CANES SOUZA, L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, 2006. DOI: 10.1590/S1516-93322006000200003.

66 CHABRIER-ROSELLÓ, Y. *et al.* Respiratory deficiency enhances the sensitivity of the pathogenic fungus *candida* to photodynamic treatment. *Photochemistry & Photobiology*, v. 84, n. 5, p. 1141-1148, 2008. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00280.x.

67 SOARES, B. M. *et al. Cryptococcus gattii*: in vitro susceptibility to photodynamic inactivation. *Photochemistry and Photobiology*, v. 87, n. 2, p. 357–364, 2011. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2010.00868.x.

68 DIAS, L. M. *et al.* Successive applications of antimicrobial photodynamic therapy effects the susceptibility of *Candida albicans* grown in medium with or without fluconazole. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 32, p.10218, Dec.2020. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102018.

69 ALVES, F. *et al.* Virulence factors of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*, v. 32, n. 4, p. 815–826, 2017. DOI: 10.1007/s10103-017-2177-y.

70 TAN, J. *et al.* Inhibitory effects of photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida auris*. *Mycopathologia*, v. 184, n. 4, p. 525–531, Aug. 2019. DOI: 10.1007/S11046-019-00352-9.

71 LIU, Z. *et al.* Effects of photodynamic inactivation on the growth and antifungal susceptibility of *Rhizopus oryzae. Mycopathologia*, v. 184, n. 2, p. 315–319, Apr. 2019. DOI: 10.1007/s11046-019-00321-2.

72 GONZALES, F. P. *et al.* Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with Methylene Blue and Toluidine Blue. *Photochemistry and Photobiology*, v. 86, n. 3, p. 653-661, 2010. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2009.00689. x.

73 I SIERRA-GARCIA, I. N.; CUNHA, Â.; LOURENÇO, L. M. O. In vitro photodynamic treatment of *Fusarium oxysporum* conidia through the action of thiopyridinium and methoxypyridinium chlorins. *Journal of Photochemistry and Photobiology* A: chemistry, v. 432, p. 114081, Nov. 2022. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2022.114081.