

## **Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da curcumina associada a terapia fotodinâmica sobre espécies do Complexo *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum***

**Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of curcumin associated to photodynamic therapy on species of the Complex *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum***

**Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de la cúrcumina asociada a la terapia fotodinámica en especies del complejo *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum***

Recebido: 30/08/2023 | Revisado: 19/09/2023 | Aceitado: 21/09/2023 | Publicado: 23/09/2023

### **Larissa de Souza Brianezi**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1478-6855>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: [larissabrianezi@hotmail.com](mailto:larissabrianezi@hotmail.com)

### **Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4828-4634>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: [pollyconrado@gmail.com](mailto:pollyconrado@gmail.com)

### **Gabriela Casa Grande De Matos**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3009-7138>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: [gabii.csg@gmail.com](mailto:gabii.csg@gmail.com)

### **Wilker Caetano**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9402-8324>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: [wcaetano@uem.br](mailto:wcaetano@uem.br)

### **Erika Seki Kioshima Cotica**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3290-8577>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: [eskioshima@gmail.com](mailto:eskioshima@gmail.com)

### **Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0116-2189>  
Universidade Estadual de Maringá, Brasil  
E-mail: [psbmendonca@gmail.com](mailto:psbmendonca@gmail.com)

### **Resumo**

O gênero *Fusarium* está entre os agentes patogênicos causadores de onicomicose (OM), e incluído entre os fungos filamentosos não dermatófitos, destacando-se as espécies *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*. Dentre as opções terapêuticas para OM, destaca-se a Terapia Fotodinâmica (TFD), que associada à Curcumina (CUR), mostra-se como uma proposta interessante no contexto antifúngico. O objetivo foi padronizar e avaliar a atividade antifúngica da TFD+CUR sobre isolados clínicos de *Fusarium* spp. A CUR foi fornecida pelo Núcleo de Pesquisa Fotodinâmicos UEM, as cepas de *Fusarium*, foram obtidas de amostras do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas, aprovado pelo comitê de ética (nº2.748.843). Para irradiação utilizou-se LED azul (440nm a 460nm), e a CUR foi utilizada nas concentrações de 50-0,09µmol/L. O inóculo dos isolados foi padronizado na concentração 10<sup>5</sup> UFC/mL. Após incubação de 10, 20 e 30 minutos no escuro com CUR, as placas foram irradiadas em doses: 15, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup>. A ação antifúngica da TFD+CUR foi avaliada qualitativamente e quantitativamente. Analisou-se os resultados pelo programa *GraphPad Prism 5.0*®, com teste *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) e *Tukey*. A melhor combinação antifúngica entre tempo de incubação e fluência da TFD+CUR foi de 10 minutos para pré-irradiação e irradiação de 30 J/cm<sup>2</sup>. Nessas condições foi capaz de inativar 75% dos isolados clínicos testados a partir da concentração de 0.78µmol/L. Os resultados deste estudo mostram que a TFD+CUR foi fungicida e promissora, incentivando outras pesquisas na área da micologia médica.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica; Curcumina; Onicomicose.

### **Abstract**

The *Fusarium* genus is among the pathogens that cause onychomycosis (OM), and is included among the non-dermatophyte filamentous fungi, with the *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* species standing out. Among the therapeutic options for OM, Photodynamic Therapy (PDT) stands out, which, associated with Curcumin (CUR), is an interesting proposal in the antifungal context. The aim was to standardize and evaluate the antifungal activity of

PDT+CUR on clinical isolates of *Fusarium* spp. The CUR was supplied by the UEM Photodynamic Research Center, and the *Fusarium* strains were obtained from samples from the Clinical Analysis Teaching and Research Laboratory, approved by the ethics committee (nº.748.843). Blue LED (440nm to 460nm) was used for irradiation, and CUR was used at concentrations of 50-0.09µmol/L. The inoculum of the isolates was standardized at a concentration of 10<sup>5</sup> CFU/mL. After incubation for 10, 20 and 30 minutes in the dark with CUR, the plates were irradiated at doses of 15, 30 and 45 J/cm<sup>2</sup>. The antifungal action of PDT+CUR was assessed qualitatively and quantitatively. The results were analyzed using the GraphPad Prism 5.0® software, with One-Way Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test. The best antifungal combination of incubation time and fluence of PDT+CUR was 10 minutes for pre-irradiation and 30 J/cm<sup>2</sup> irradiation. These conditions were able to inactivate 75% of the clinical isolates tested from a concentration of 0.78µmol/L. The results of this study show that PDT+CUR was fungicidal and promising, encouraging further research in the field of medical mycology.

**Keywords:** Photodynamic therapy; Curcumin; Onychomycosis.

## Resumen

El género *Fusarium* se encuentra entre los patógenos causantes de onicomicosis (OM), y se incluye entre los hongos filamentosos no dermatofitos, destacando las especies *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*. Entre las opciones terapéuticas para la OM destaca la Terapia Fotodinámica (TFD) que, asociada a la Curcumina (CUR), constituye una interesante propuesta en el contexto antifúngico. El objetivo fue estandarizar y evaluar la actividad antifúngica de la TFD+CUR sobre aislados clínicos de *Fusarium* spp. El CUR fue suministrado por el Centro de Investigación Fotodinámica de la UEM, y las cepas de *Fusarium* se obtuvieron a partir de muestras del Laboratorio de Docencia e Investigación en Análisis Clínicos, aprobadas por el comité ético (nº.748.843). Para la irradiación se utilizó LED azul (440nm a 460nm) y CUR a concentraciones de 50-0,09µmol/L. El inóculo de los aislados se estandarizó a una concentración de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Tras incubar durante 10, 20 y 30 minutos en la oscuridad con CUR, las placas se irradiaron a dosis de 15, 30 y 45 J/cm<sup>2</sup>. La acción antifúngica de TFD+CUR se evaluó cualitativa y cuantitativamente. Los resultados se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 5.0®, con análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de Tukey. La mejor combinación antifúngica de tiempo de incubación y fluencia de TFD+CUR fue de 10 minutos para la pre-irradiación y 30 J/cm<sup>2</sup> de irradiación. Estas condiciones fueron capaces de inactivar el 75% de los aislados clínicos ensayados a partir de una concentración de 0,78µmol/L. Los resultados de este estudio demuestran que la TFD+CUR es fungicida y prometedora, lo que anima a seguir investigando en el campo de la micología médica.

**Palabras clave:** Terapia fotodinámica; Curcumina; Onicomicosis.

## 1. Introdução

O gênero *Fusarium*, pertencente ao filo *Ascomycota*, ordem *Hypocreales*, família *Nectacteriaceae*, foi descrito pela primeira vez em 1809 e seu genoma publicado apenas em 2007. Inúmeras espécies foram descobertas, dando origem também a Complexos, que engloba um conjunto de espécies diferenciadas apenas geneticamente, como o Complexo *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* (Crous *et al.*, 2021). Esses Complexos, pertencente ao gênero *Fusarium*, possuem espécies de fungos filamentosos classificados como ambientais, por estarem presente no solo e matéria orgânica, alguns também são capazes de produzir micotoxinas e fatores de virulência, sendo então considerados prejudiciais tanto para agricultura, quanto aos animais e humanos, causando desde infecções cutâneas como ceratites, onicomicose e até infecções sistêmicas, podendo ser fatais em imunocomprometidos (Córdova-Alcántara *et al.*, 2019). A frequência com que essas espécies vem sendo relatadas em infecção fúngica, causada principalmente por espécies desses complexos, indica a importância que deve ser considerada na prática clínica (Thomas *et al.*, 2020).

A onicomicose (OM) pode ser causada principalmente por três grupos de fungos: dermatófitos (DM), leveduras (LEV) e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND), que utilizam a queratina da unha como fonte de energia (Galetti *et al.*, 2015) (Rosa *et al.*, 2017). O gênero *Fusarium* spp. é um agente patogênico comum em casos de onicomicose dentre os fungos filamentosos não dermatófitos, tendo como principais agentes etiológicos as espécies do Complexo *F. solani* e *F. oxysporum* (Conrado *et al.*, 2021). De acordo com a literatura, geralmente a infecção por *Fusarium* spp. em unhas pode levar a distrofia ungueal tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em imunocompetentes (Godoy *et al.*, 2004). A OM, apresenta incidência de até 8% da população mundial, com prevalência global estimada de 5,5%. Em uma revisão feita de casos de

onicomicose causados pelas espécies do gênero *Fusarium*, no período de 1997 a 2021, foi observado que as espécies mais comuns pertenciam ao complexo *Fusarium solani*, responsável por 44,11% dos casos analisados (Uemura *et al.*, 2022).

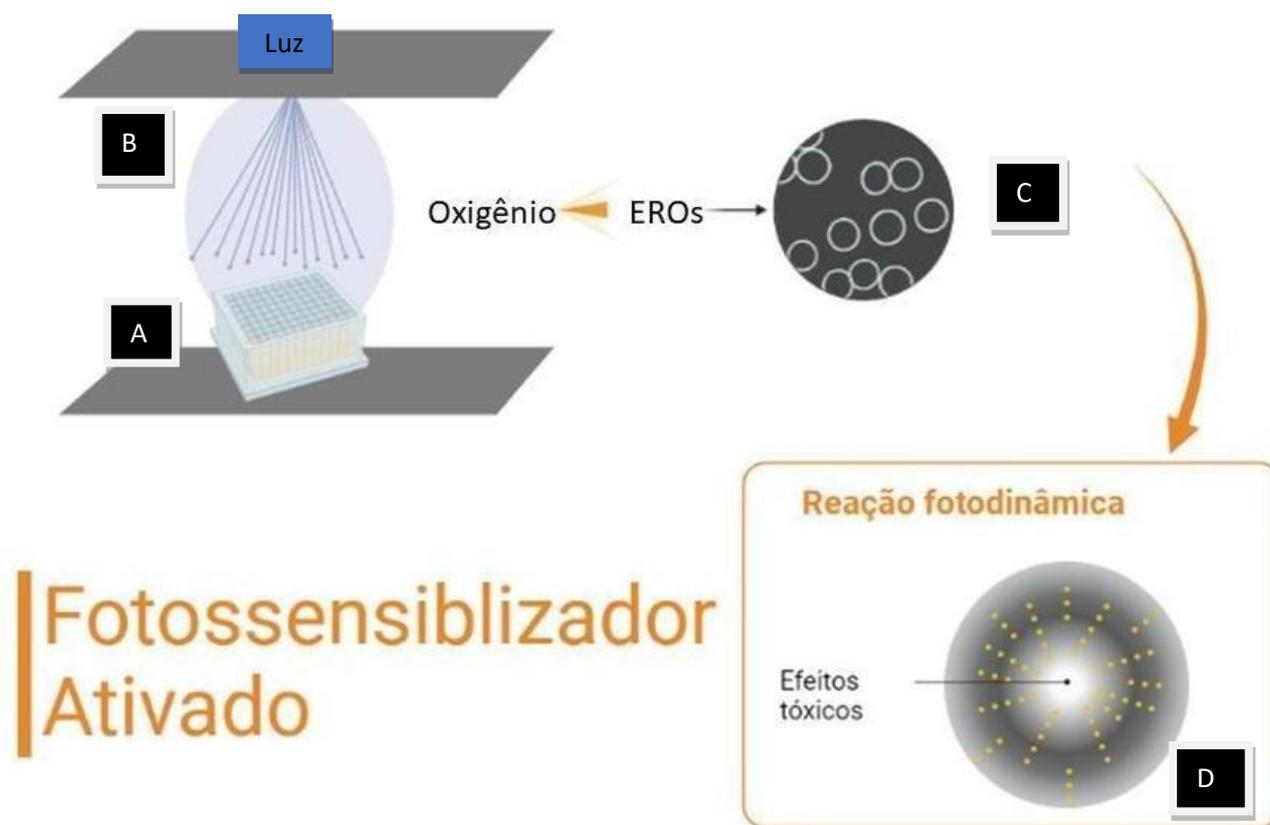
Os casos de OM causados por FFND eram considerados raros, visto que antigamente eram classificados como fitopatógenos exclusivos, mas ao longo dos anos também tem mostrado capacidade de infecção em humanos principalmente pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV), tabagistas, idosos e obesos (Galimberti *et al.*, 2012) (Galletti *et al.*, 2015) (Gupta *et al.*, 2017) (Ghannoum *et al.*, 2000). Os tratamentos convencionais para OM são antifúngicos utilizados por via oral e tópica, sendo que esse último tem ação localizada, mas devido a baixa permeabilidade tem ação limitada, por ser um local pouco vascularizado e altamente queratinizado. Este é um dos motivos que induz a farmacoterapia por via oral, porém tem baixa biodisponibilidade na unha e apresenta ainda muitos efeitos adversos. Grande parte da população é atingida por infecções fúngicas nas unhas e os tratamentos existentes ainda são limitados, com efeitos sistêmicos e considerados lentos. Sendo assim muitos pacientes desistem durante o tratamento, resultando em mais infecções e resistência da espécie.

Diante desse contexto, novas terapias antifúngicas para os casos de OM são cada vez mais almejadas. A Terapia Fotodinâmica (TFD), tem se mostrado uma alternativa terapêutica amplamente estudada para diferentes microrganismos, incluindo agentes fúngicos e também em diferentes tipos de câncer (Yang *et al.*, 2022) (de Paiva *et al.*, 2022) (Gustalik *et al.*, 2022) Dessa forma, surge o interesse em verificar a susceptibilidade antifúngica da TFD mediada por CUR sobre espécies de *Fusarium* spp., gênero que cada vez mais vem se destacando como agente etiológico da OM (Godoy *et al.*, 2004).

Ela é caracterizada por ser seletiva para a célula alvo, não invasiva e geralmente de baixo custo. A atividade é composta por três componentes: fotossensibilizador (FS) ou corante, oxigênio e fonte de luz, com comprimento de onda específico para cada FS promovendo reações fotoquímicas. Anteriormente a irradiação é feito o tempo de incubação do fotossensibilizador e o microrganismo no escuro, nesse tempo ocorre a absorção do fotossensibilizador pelas células alvo em que durante a irradiação ocorre a excitação do FS no alvo, produzindo espécies reativas de oxigênio (Ribeiro *et al.*, 2022).

Conforme a Figura 1 o mecanismo inicia pela excitação da luz sob o FS que reagem na presença do oxigênio, ocorrendo a transferência de elétrons do FS, transferindo a energia e gerando radicais livres. Estes por sua vez, interagem com componentes celulares ocasionando alterações da permeabilidade celular, provocando morte por via necrose ou apoptose (Krieger-Liszky, 2005).

**Figura 1** - Reação da Terapia Fotodinâmica.



A-Microplaca de 96 poços, B- Luz azul irradiando a placa, C- Poço da placa com células fúngicas, D- efeitos tóxicos dentro da célula fúngica.  
Fonte: Autoria própria.

A Figura 1 elaborada acima representa a TFD, em A uma microplaca de 96 poços, B sendo irradiada na parte superior pelo LED que dissipa a luz azul sobre a placa. Em C é ampliada a imagem do poço dessa placa, a qual contém o fungo e o fotossensibilizador, que na presença de oxigênio, ativa o fotossensibilizador e faz com que haja a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que permeiam essas células fúngicas, ocorrendo então a reação fotodinâmica representada em D, gerando efeitos tóxicos e consequentemente a morte dessas células.

O espectro de absorção do FS mediante irradiação pela fonte de luz é uma das características mais importantes a serem analisadas, mediante a transferência de elétrons ocasionado com a fotoativação do FS, gerando a reação fotodinâmica. Ressalta-se que cada FS possui um pico de absorção de luz específico. É necessário considerar também, a capacidade de penetração da luz, visto que a luz tem a capacidade de interação com o alvo (Castano *et al.*, 2004). Dessa forma, é de extrema relevância considerar as características físicas e químicas do FS e da fonte de luz como parâmetros para TFD. Consequentemente, para a escolha do FS deve ser levado em conta a baixa toxicidade, capacidade de seletividade e permeação, alta estabilidade química e fotoativação por comprimento de onda específica (Perussi, 2007).

No contexto dos FS, a curcumina (CUR) tem se destacado nos últimos anos. Trata-se de uma substância de cor amarelo-ouro extraída de rizomas de *Curcuma longa*, conhecida popularmente como açafrão da terra. A curcumina é um pigmento que compõe um dos princípios ativos da *Curcuma longa*, é um pó insolúvel na água e no éter etílico, mas solúvel no etanol e no DMSO (dimetilsulfóxido) (Andrade *et al.*, 2013). Ela era utilizada na antiguidade na culinária e para tratamentos medicinais. Contudo, na literatura há relatos da CUR com atividade de forma isolada e também no contexto da TFD, e atualmente é considerada um FS promissor (Goel *et al.*, 2008).

A fotoativação da CUR ocorre na faixa de coloração de luz ultravioleta, no comprimento de onda entre 300 a 500nm. Esta faixa de comprimento de onda é caracterizada com menor penetração tecidual, porém com alta energia, sendo ideal para patologias superficiais como, por exemplo, a OM. Em relação à atividade antifúngica, a CUR com TFD demonstrou alta eficácia quando comparado a medicamentos convencionais já existentes (Martins *et al.*, 2009).

É de grande importância o estudo com a terapia fotodinâmica, que atualmente tem desenvolvido novas formulações com características aperfeiçoadas, por maior seletividade frente às células e ou tecidos-alvo, para assim permitir uma melhor efetividade no tratamento. Essa esfera de pesquisa engloba alto desenvolvimento, tanto na pesquisa clínica como no desenvolvimento de novos agentes fototerapêuticos cada vez mais eficazes e seletivos. Diante disso, faz-se necessário estudos com o fotossensibilizador CUR para ação antifúngica no gênero *Fusarium* nas espécies mais recorrentes de onicomiose no Brasil, como *F. solani* e *F. oxysporum*.

## 2. Metodologia

### 2.1 Delineamento do estudo

Este trabalho trata-se de uma pesquisa experimental (Koche, 2011), com delineamentos *in vitro* sobre a padronização da atividade antifúngica da Terapia Fotodinâmica (TFD) associada à Curcumina (CUR) sobre cepas de *Fusarium* spp.

### 2.2 Materiais e Métodos

#### Fotossensibilizador

A CUR foi fornecida pelo Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para os ensaios, a CUR foi diluída seriadamente (1:2) em 10 diferentes concentrações que variaram de 50 - 0,09  $\mu\text{mol/L}$ .

#### Fonte de Luz

Foi utilizado um diodo emissor de luz (LED), de cor azul, com potência de 17  $\text{mW/cm}^2$ , desenvolvida pelo Laboratório de Físico-Química da Universidade Estadual de Maringá, em comprimento de onda entre 440nm a 460nm, com a finalidade de ativar o fotossensibilizador. As condições de irradiação foram padronizadas realizando os ensaios de TFD em doses de 15, 30, e 45  $\text{J/cm}^2$ .

#### Obtenção dos Microrganismos

As cepas de *Fusarium solani* e *F. oxysporum*, foram obtidas a partir de isolados clínicos no campus da Universidade Estadual de Maringá, aprovado pelo comitê de ética (nº2.748.843), coletadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) e processadas no Laboratório de Micologia Médica. Os isolados clínicos utilizados, foram identificadas por métodos moleculares com base nos genes ITS e EF (Conrado *et al.*, 2021), como espécies do gênero *Fusarium* e agrupadas dentro dos seus respectivos complexos. As espécies desses isolados no presente estudo foram denominados de: ISO 1 (*Fusarium oxysporum*), ISO 2 (*Fusarium keratoplasticum*), ISO 3 (*Fusarium keratoplasticum*), ISO 4 (*Fusarium keratoplasticum*), ISO 5 (*Fusarium falciforme*), ISO 6 (*Fusarium solani sensu stricto*), ISO 7 (*Fusarium oxysporum*), e ISO 8 (*Fusarium oxysporum*). Os isolados foram cultivados em meio de cultura *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). A cepa de referência *Candida albicans* ATCC 90028 foi incluída para garantir o controle de qualidade nos ensaios de susceptibilidade antifúngica.

## **2.2.1 Padronização da terapia fotodinâmica com curcumina para avaliação da susceptibilidade antifúngica de células planctônicas de *Fusarium solani* e *F. oxysporum***

### **Crescimento do microrganismo**

As cepas de espécies do Complexo *Fusarium solani* e *F. oxysporum*, foram cultivadas em meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA), incubadas na temperatura de 25°C durante 7 dias. O micélio fúngico foi raspado em solução salina 0,85% estéril, posteriormente filtrado com algodão por meio de uma seringa, para obtenção apenas de conídios, que posteriormente foram analisados no microscópio óptico Nikon eclipse E200. Com a câmara de Neubauer, o inóculo foi ajustado para concentração  $1 \times 10^5$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias) de conídios.

### **Controle Escuro**

O controle escuro (CE) foi realizado em uma placa de 96 poços, a partir da concentração de 100  $\mu\text{mol/L}$ . Foram feitas diluições seriadas 1:2 da CUR em água destilada estéril (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 e 0.09  $\mu\text{mol/L}$ ), sendo adicionado 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição do FS. Posteriormente, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do inóculo padrão e incubado no escuro, durante 10 minutos a 25°C, sem irradiação. Como controle, foi utilizado o controle positivo (C+) contendo o fungo e o fotossensibilizador na ausência de luz, sendo 100  $\mu\text{L}$  do inóculo padrão e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. Posteriormente, foram plaqueadas 10  $\mu\text{L}$  de cada concentração para analisar a concentração fungicida mínima (CFM). Para análise quantitativa foi retirado alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de cada concentração, e transferidas em duplicata para placas de PDA, estocadas na temperatura de 25°C por 48h, o resultado foi apresentado em  $\log_{10}$  UFC/mL comparado ao C+.

### **Avaliação da padronização TFD+CUR sobre 2 isolados de *Fusarium spp.***

Para padronização foi utilizado um isolado de cada complexo (ISO 1 e ISO 2), totalizando duas cepas. Em uma placa de 96 poços, foram realizadas diluições 1:2 da CUR em água destilada estéril nas concentrações (50-0.09  $\mu\text{mol/L}$ ), adicionado 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição do FS, juntamente com 100  $\mu\text{L}$  do inóculo padrão. Também foi feito um controle claro (CC) contendo 100  $\mu\text{L}$  do inóculo e 100  $\mu\text{L}$  de salina para controle do crescimento fúngico. E foram testados no tempo de pré-incubação no escuro 10, 20 ou 30 minutos em 25°C, e irradiadas no LED azul a potência 15,20 e 30  $\text{J/cm}^2$  de fluência e 17  $\text{mW/cm}^2$  em comprimento de onda entre 440nm a 460nm, a fim de verificar melhor atividade da TFD+CUR. A ação antifúngica da TFD+CUR foi avaliada pela CFM representadas após tempo de incubação de 48h a 25°C.

### **Avaliação do efeito antifúngico da TFD+CUR sobre 8 isolados de *Fusarium spp.***

A avaliação foi realizada após a padronização dos tempos de incubação no escuro, e fluência da luz aplicada. A validação da atividade da TFD+CUR foi realizada em 8 isolados clínicos descritos nos tópicos acima. As análises realizadas foram qualitativas, pela CFM, e quantitativas UFC/mL. Para isso, em uma placa de 96 poços, foi realizado diluições 1:2 da CUR em água destilada estéril nas concentrações (50-0.09  $\mu\text{mol/L}$ ), adicionado 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição do FS, juntamente com 100  $\mu\text{L}$  do inóculo padrão. Também foi utilizado como controle o (CC). A ação antifúngica da TFD+CUR foi avaliada pela contagem de células fúngicas viáveis UFC/mL. Para isso, diluições seriadas foram realizadas e alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas em duplicata em PDA, e incubadas na temperatura de 25°C por 24-48h, o resultado foi apresentado em  $\log_{10}$  UFC/mL.

## Análises Estatísticas

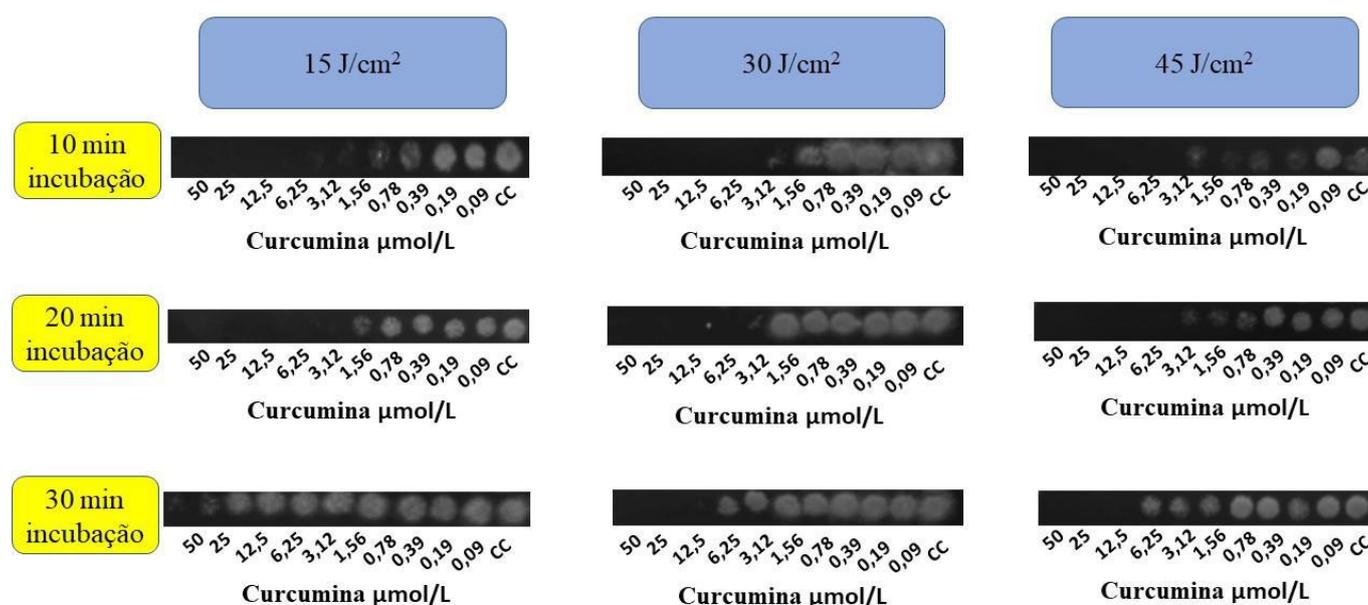
Os resultados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism 5.0*<sup>®</sup>, com análise estatística pelo teste *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* e teste Tukey, para avaliar a atividade antifúngica comparado ao controle (fungo na ausência da atividade da TFD+CUR).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Padronização da TFD+CUR

As Figuras 2 e 3 demonstram a padronização da atividade antifúngica TFD+CUR, com dois isolados, em três tempos de pré-incubação 10, 20 e 30 minutos e três doses de irradiação 15, 30 e 45 J/cm<sup>2</sup> para cada tempo, em diferentes concentrações de CUR. Esses isolados foram denominados ISO 1, espécie pertencente ao Complexo *Fusarium oxysporum*, representado na Figura 2 e ISO 2 do Complexo *Fusarium solani*, representado na Figura 3.

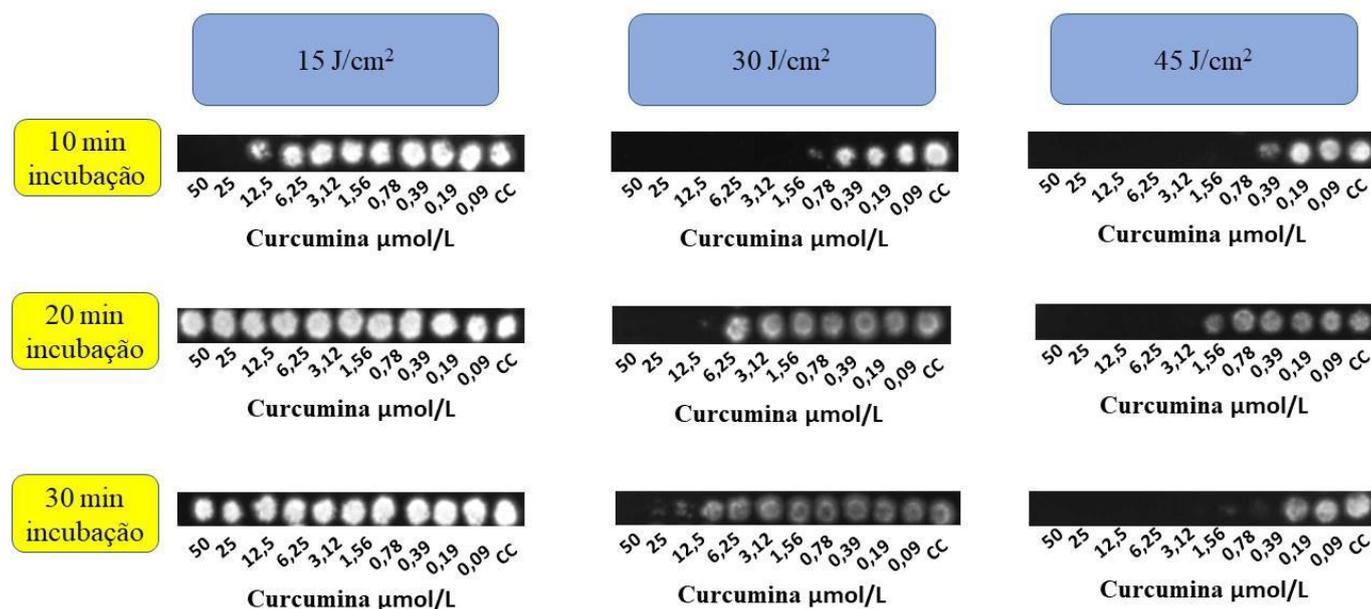
**Figura 2** - Padronização da atividade da terapia fotodinâmica associada a determinadas concentrações de curcumina utilizando isolado clínico de *Fusarium oxysporum* (ISO 1).



CC- controle claro -células fúngicas na ausência da curcumina e presença da luz. Fonte: Autoria própria.

A Figura 2 representa os diferentes tempos de incubação 10, 20 e 30 min, e doses de irradiação 15, 30, e 45 J/cm<sup>2</sup>, avaliados para *F. oxysporum*. As concentrações de curcumina estão indicadas abaixo 50 – 0,09, sendo mais efetiva quando não há aparecimento de crescimento fúngico, comparando-se sempre ao CC. É possível observar que no tempo de incubação de 10 min a partir da concentração de 3,12 μmol/L obteve-se concentração fungicida, ou seja, ausência de crescimento fúngico para todas fluências testadas. O controle claro (CC) é utilizado para comparar qualitativamente com as demais concentrações, pois contém apenas o fungo sem a presença de FS. A Figura 3 também nos mostra que para aumentar o tempo de incubação entre as células fúngicas e a CUR não é tão eficiente quanto aumentar a fluência de luz. É compreensível esse resultado uma vez que o aumento da fluência da luz, aumenta os fótons disponíveis para melhor fotoativar a CUR e melhorar seu desempenho fungicida.

**Figura 3** - Padronização da atividade da terapia fotodinâmica associada a determinadas concentrações decurcumina utilizando isolado clínico de *Fusarium keratoplasticum* (ISO 2).



CC controle claro – células fúngicas na ausência da curcumina e presença da luz. Fonte: Autoria própria.

A Figura 3 representa os diferentes tempos de incubação 10, 20 e 30 min, e doses de irradiação 15, 30, e 45 J/cm<sup>2</sup>, avaliados para *F. keratoplasticum*. O crescimento fúngico é demonstrado de acordo com cada concentração de CUR indicada abaixo, juntamente com o controle claro (CC). Para a espécie *F. keratoplasticum*, o padrão foi semelhante ao de *F. oxysporum* (Figura 2), onde o aumento da fluência foi mais representativo do que o tempo de incubação.

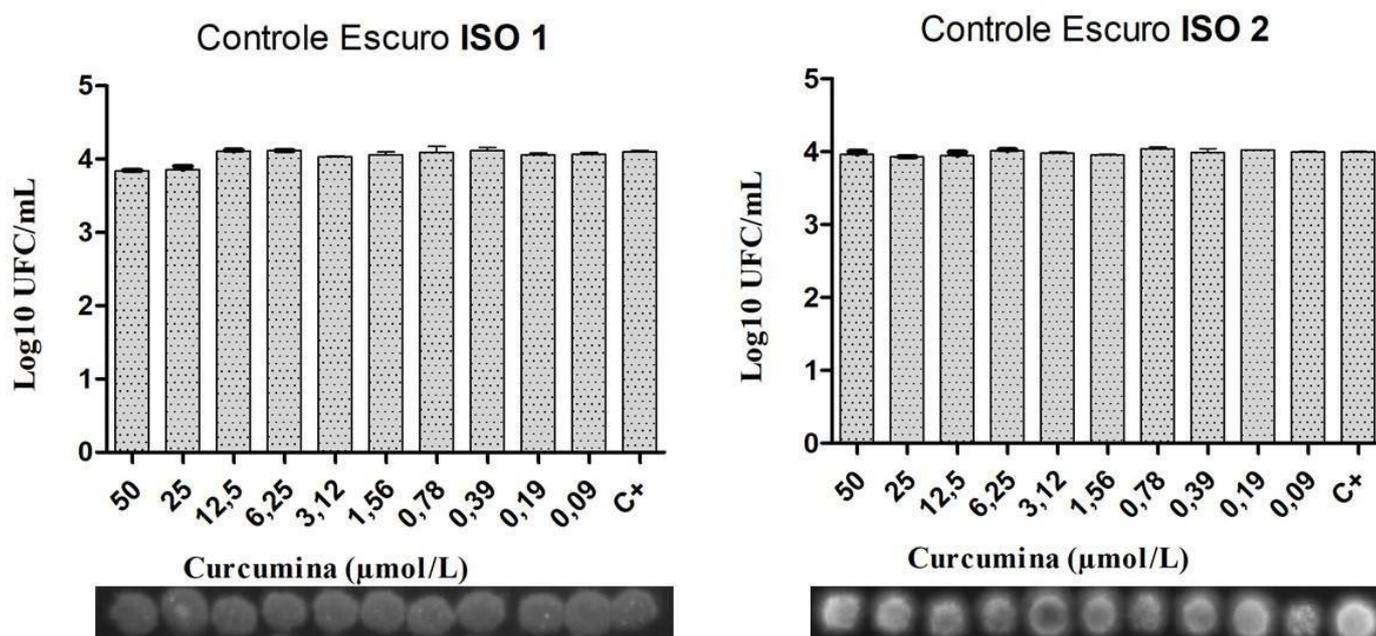
Existem diversos estudos que realizam a padronização para encontrar uma menor dose de irradiação e menores tempos de incubação. Um estudo utilizou *Candida albicans*, com tempos de incubação de 5 a 20 min e doses de até 37J/cm<sup>2</sup> em células planctônicas e biofilme, o qual foi demonstrado o espectro de absorção em tempos diferentes de irradiação e ressaltou a diminuição da capacidade da curcumina absorver a luz conforme o tempo de irradiação aumenta, ocorrendo fotobranqueamento, ou seja, a degradação dessas moléculas (Dovigo *et al*, 2011). Esses resultados estão condizentes com os resultados obtidos neste estudo na padronização, em que conforme o tempo aumenta de contato com a CUR, sua eficácia diminui como fotossensibilizador.

A ação da TFD+CUR em ambos os isolados clínicos de *Fusarium* spp. foi capaz de inibir o crescimento fúngico, com concentrações mais baixas de CUR no tempo de incubação de 10 minutos, comparado ao tempo de 20 e 30 minutos, o qual teve inibição total em concentrações mais altas de CUR (50 µmol/L). Em relação a dose de irradiação de 30 e 45 J/cm<sup>2</sup> apresentaram resultados muito próximos de concentrações com inibição fúngica eficiente. Ao considerar o tempo, dose e concentração, o tempo de incubação de 10 minutos e irradiação de 30 J/cm<sup>2</sup> foram aparentemente mais significativos, visto que é avaliado a menor dose possível com um melhor tempo de incubação que apresente inibição fúngica satisfatória. Dessa forma, para avaliar e validar a atividade antifúngica da TFD+CUR em diferentes isolados clínicos de *Fusarium*, foi utilizado o tempo de incubação de 10 minutos e fluência de 30 J/cm<sup>2</sup>.

### 3.2 Avaliação da TFD+CUR

Inicialmente analisamos se as concentrações avaliadas de CUR tem atividade isoladamente sobre os isolados fúngicos testados. A Figura 4 demonstra as análises qualitativas e quantitativas, sendo esse último realizado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e transformadas em logaritmo decimal. O CE foi realizado apenas com o fungo e o fotossensibilizador, incubados no tempo padronizado de 10 minutos, sem irradiação, a fim de avaliar apenas a ação da CUR sobre as células planctônicas dos isolados ISO 1 e ISO 2, juntamente com o controle positivo (C+) para garantir que a curcumina não tem ação sobre o crescimento do fungo.

**Figura 4** - Efeito do fotossensibilizador Curcumina sem irradiação sobre as células planctônicas de *Fusarium* spp.

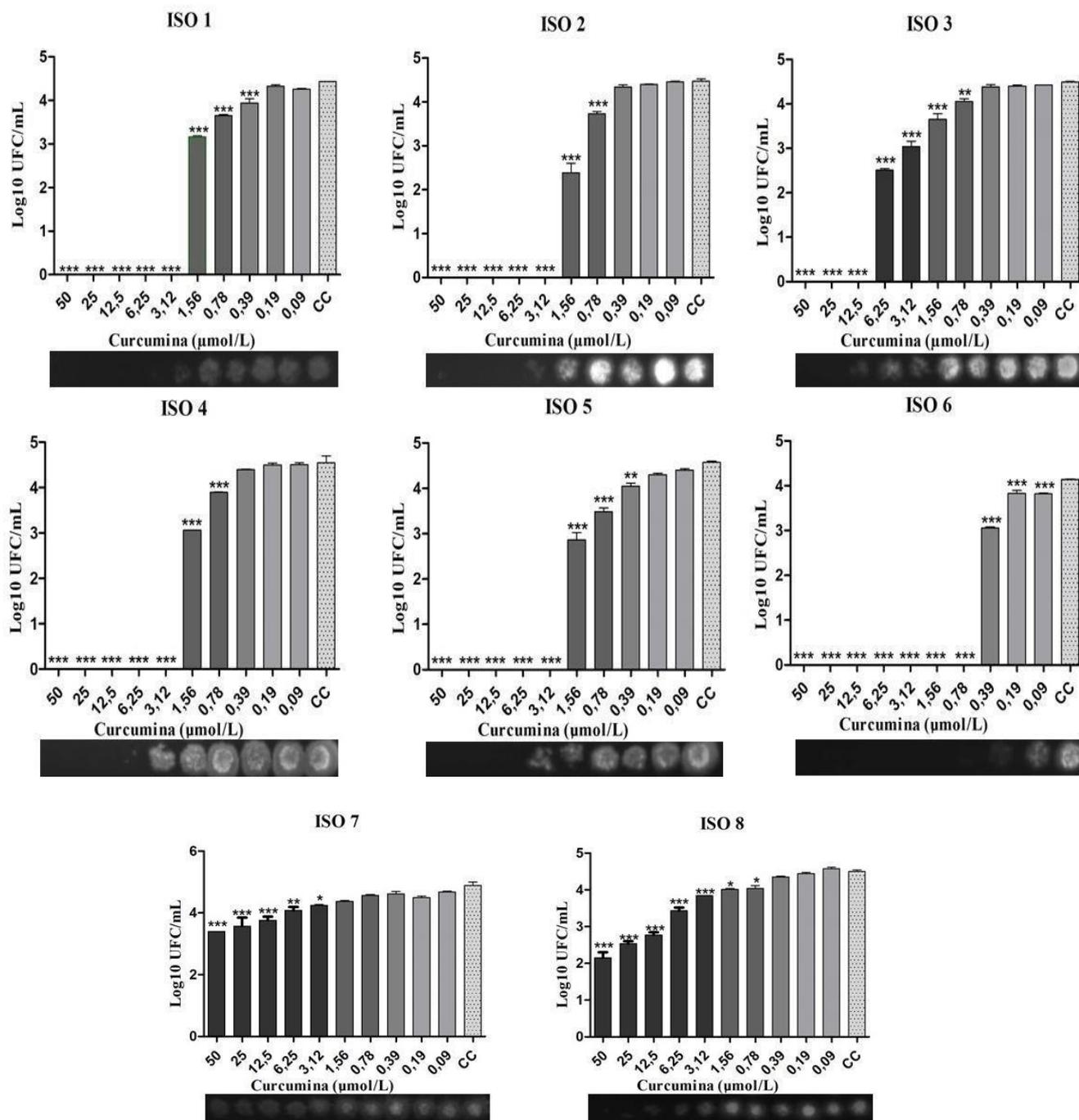


C+ controle positivo – células fúngicas na ausência de curcumina e da luz. Fonte: Autoria própria.

Foi possível observar na Figura 4 que a ação da CUR incubada com as células fúngicas por 10 minutos, não foi suficiente para inibir o crescimento fúngico, sendo este semelhante ao C+. Este resultado foi demonstrado quantitativamente visto pelos gráficos e a análise logarítmica das unidades formadoras de colônias, onde o número de células fúngicas foi semelhante ao C+ em todas as concentrações de CUR avaliadas. E adicionalmente pela avaliação quantitativamente pelos *spots* de crescimento semelhante ao C+.

A Figura 5 mostra os resultados da TFD+CUR sobre diferentes isolados fúngicos de *Fusarium*, utilizando como parâmetros 10 minutos de incubação com a CUR e fluência de 30 J/ cm<sup>2</sup>. As marcações em asteriscos demonstram o padrão significativo entre os resultados analisados comparado com o CC. As análises qualitativas e quantitativas, foram realizadas com 8 isolados, ISO 1, ISO 2, ISO 3, ISO 4, ISO 5, ISO 6, ISO 7, ISO 8.

**Figura 5** - Atividade antifúngica da Terapia Fotodinâmica associada a Curcumina sobre isolados clínicos de *Fusarium* spp.



CC: controle claro – células fúngicas na ausência da curcumina e presença da luz. Fonte: Autoria própria.

Cerca de 75% dos isolados clínicos analisados tiveram inibição do crescimento fúngico em alguma concentração de CUR testada. De acordo com a Figura 5, a sensibilidade dos isolados clínicos à TFD+CUR variou nas concentrações de 0,78 a 12,5 μmol/L com atividade fungicida, ou seja, concentrações que foram capazes de inibir completamente o crescimento fúngico, comparando-se ao CC. Somente o ISO 7 e 8 não tiveram redução total em concentrações de CUR testadas. Por outro lado, observa-se que 12,5 μmol/L foi capaz de inibir o crescimento fúngico em 1log<sub>10</sub> UFC/mL. Demonstrando um perfil fungistático da TFD+CUR, sendo um padrão de ação semelhante aos azóis disponíveis no mercado. Estes fármacos possuem atividade fungistática (inibição do crescimento fúngico), quando compara-se com as células fúngicas sem ação do fármaco.

Os resultados obtidos neste estudo, corroboram com artigos realizados com TFD e CUR sobre diferentes espécies de fungos filamentosos causadores de OM, que em baixas concentrações de CUR e baixo tempo de incubação e com doses baixas de irradiação, mostrando efeito de fotoinativação, reforçando que a TFD é uma alternativa de inibir *in vitro* o crescimento fúngico, indicando uma possibilidade de usar a CUR para um tratamento eficaz em OM (Silva *et al.*, 2022).

Estudos demonstram que a CUR sozinha não afeta a viabilidade dos microrganismos (Cusicanqui Méndez *et al.*, 2018). De acordo com resultados obtidos no presente estudo, a curcumina realmente não apresentou toxicidade no escuro para o fungo, pois quando incubado isoladamente, sem irradiação, não inibiu o crescimento de unidades formadoras de colônias e nas diferentes concentrações de curcumina, o log foi muito próximo ao controle (C+).

A CUR possui características insolúveis em água, no entanto é possível solubilizar em etanol e DMSO, substância considerada tóxica para o tecido vivo. Sendo assim, foi preparado soluções estoques com concentrações muito reduzidas de DMSO e diluições em água destilada para o experimento. Desse modo, na padronização o tempo de incubação de 30 min não inibiu tanto como no tempo de 10 e 20 min. Essa solução utilizada no experimento é considerada aquosa, podendo gerar agregados da CUR quando incubada por mais tempo, já que esta é insolúvel, prejudicando então a permeação nas células planctônicas. Ademais, a CUR é instável na presença de luz e em pH maior que 8, podendo ser modificada na sua estrutura e não mais absorver o comprimento de onda, impedindo sua ação terapêutica. (Tonesen *et al.*, 1985). Diante disso, a CUR em uma solução apolar, para gerar interações intermoleculares, como um óleo, ou por exemplo o glicerol, que interage com água também, com finalidade de melhorar a solubilização da CUR (Carvalho *et al.*, 2015).

Existem novas formulações realizadas com nanopartículas poliméricas, que já demonstraram eficácia na solubilidade da CUR e o efeito antimicrobiano da TFD, em estudos já publicados com espécies do gênero *Candida* (Trigo Gutierrez *et al.*, 2017) (Santos *et al.*, 2022). Essas formulações poderiam ser testadas em espécies de fungos filamentosos como perspectivas futuras.

De acordo com estudos publicados, utilizando a TFD e CUR sobre fungos filamentosos, utilizando células planctônicas de *Fusarium*, tiveram uma redução completa da espécie *Fusarium oxysporum* em todas as concentrações de CUR (600 a 1000  $\mu$ /mol) e dose de luz (72 a 96 J/cm<sup>2</sup> de 6 a 8 minutos de irradiação) utilizadas (Al-Asmari, 2017). Nossos resultados corroboram com o autor Al-Asmari, (2021), o qual obteve capacidade de inibição fúngica, utilizando diferentes concentrações de CUR. Dose e tempo de irradiação, e com isolados clínicos de várias espécies do Complexo *Fusarium oxysporum* e Complexo *Fusarium solani*.

#### 4. Considerações Finais

A TFD+CUR demonstrou eficaz atividade antifúngica, uma vez que foi capaz de inibir o crescimento fúngico da maioria dos isolados clínicos de *Fusarium* testados. Possivelmente, as concentrações de CUR testadas, foram fotoativadas gerando compostos reativos e tóxicos às células fúngicas, levando à morte celular. Trata-se de uma técnica de baixo custo e fácil aplicação com boas perspectivas na área da micologia médica. E diante desses resultados e como perspectivas futuras, a fim de enriquecer e triar os mecanismos da TFD+CUR em ação antifúngica, é necessário a realização de mais estudos para adaptar as técnicas, com o intuito de encontrar uma formulação que possibilite melhor solubilidade da CUR, garantindo que toda concentração testada será fotoativada melhorando a atividade antifúngica.

#### Referências

Al-Asmari, F., Mereddy, R., & Sultanbawa, Y. (2017). A novel photosensitization treatment for the inactivation of fungal spores and cells mediated by curcumin. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 173, 301–306.

- Andrade, M. C., Ribeiro, A. P., Dovigo, L. N., Brunetti, I. L., Giampaolo, E. T., Bagnato, V. S., & Pavarina, A. C. (2013). Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Archives of oral biology*, 58(2), 200–210.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279–293.
- Carvalho, D. M., Takeuchi, P.K., Geraldine, R. M., Moura, C. J., Carneiro, J.E.S., & Santos, A.P.M. (2015). Assessing Curcumin Solubility in Food-Grade Solvents. *Revista Processos Químicos*, 9 (17), 23-26.
- Conrado, P. C. V., Sakita, K. M., Arita, G. S., Gonçalves, R. S., Cesar, G. B., Caetano, W., Hioka, N., Voidaleski, M. F., Vicente, V. A., Svidzinski, T. I. E., Bonfim-Mendonça, P. S., & Kioshima, E. S. (2021). Hypericin-P123-photodynamic therapy in an ex vivo model as an alternative treatment approach for onychomycosis caused by *Fusarium* spp. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 35, 102414.
- Córdova-Alcántara, I. M., Venegas-Cortés, D. L., Martínez-Rivera, M. Á., Pérez, N. O., & Rodríguez-Tovar, A. V. (2019). Biofilm characterization of *Fusarium solani* keratitis isolate: increased resistance to antifungals and UV light. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 57(6), 485–497.
- Crous, P. W., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K. A., Schroers, H. J., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Bensch, K., Kema, G. H. J., Lamprecht, S. C., Cai, L., Rossman, A. Y., Stadler, M., Summerbell, R. C., Taylor, J. W., Ploch, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., & Thines, M. (2021). *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in mycology*, 98, 100116.
- Cusicanqui Méndez, D. A., Gutierrez, E., José Dionisio, E., Afonso Rabelo Buzalaf, M., Cardoso Oliveira, R., Andrade Moreira Machado, M. A., & Cruvinel, T. (2018). Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 24, 102–108.
- De Paiva, A. C. M., Ferreira, M. D. C., & da Fonseca, A. S. (2022). Photodynamic therapy for treatment of bacterial keratitis. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 37, 102717.
- Dos Santos, D. D. L., Besegato, J. F., de Melo, P. B. G., Junior, J. A. O., Chorilli, M., Deng, D., Bagnato, V. S., & de Souza Rastelli, A. N. (2022). Effect of curcumin-encapsulated Pluronic® F-127 over duo-species biofilm of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Lasers in medical science*, 37(3), 1775–1786.
- Dovigo, L. N., Pavarina, A. C., Ribeiro, A. P., Brunetti, I. L., Costa, C. A., Jacomassi, D. P., Bagnato, V. S., & Kurachi, C. (2011). Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochemistry and photobiology*, 87(4), 895–903.
- Galletti, J., Negri, M., Grassi, F. L., Kioshima-Cotica, É. S., & Svidzinski, T. I. (2015). *Fusarium* spp. is able to grow and invade healthy human nails as a single source of nutrients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 34(9), 1767–1772.
- Galimberti, R., Torre, A. C., Baztán, M. C., & Rodríguez-Chiappetta, F. (2012). Emerging systemic fungal infections. *Clinics in dermatology*, 30(6), 633–650.
- Ghannoum, M. A., Hajjeh, R. A., Scher, R., Konnikov, N., Gupta, A. K., Summerbell, R., Sullivan, S., Daniel, R., Krusinski, P., Fleckman, P., Rich, P., Odom, R., Aly, R., Pariser, D., Zaiac, M., Rebell, G., Leshner, J., Gerlach, B., Ponce-De-Leon, G. F., Ghannoum, A., & Elewski, B. (2000). A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(4), 641–648.
- Godoy, P., Nunes, F., Silva, V. et al. (2004) Onychomycosis Caused by *Fusarium Solani* and *Fusarium Oxysporum* In São Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 157, 287–290.
- Goel, A., Kunnumakara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*, 75(4), 787–809.
- Gupta, A. K., Versteeg, S. G., & Shear, N. H. (2017). Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, *Epidemiology, and Treatment*. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 21(6), 525–539.
- Gustalik, J., Aebischer, D., & Bartusik-Aebischer, D. (2022). Photodynamic therapy in breast cancer treatment. *Journal of applied biomedicine*, 20(3), 98–105.
- Koche, J. C. (2011). *Fundamentos de metodologia científica*. Petrópolis: Vozes.
- Krieger-Liszskay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56, 411.
- Martins, C. V., da Silva, D. L., Neres, A. T., Magalhães, T. F., Watanabe, G. A., Modolo, L. V., Sabino, A. A., de Fátima, A., & de Resende, M. A. (2009). Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(2), 337–339.
- Perussi, J. R. (2007). *Inativação fotodinâmica de microrganismos*. *Química Nova*, 30(4), 988–994.
- Ribeiro, M., Gomes, I. B., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2022). Photodynamic therapy and combinatory treatments for the control of biofilm-associated infections. *Letters in applied microbiology*, 75(3), 548–564.
- Rosa, P. D., Heidrich, D., Corrêa, C., Scroferneker, M. L., Vettorato, G., Fuentesfria, A. M., & Goldani, L. Z. (2017). Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Fusarium* isolates in onychomycosis. *Mycoses*, 60(9), 616–622.
- Thomas, B., Audonnet, N. C., Machouart, M., & Debourgogne, A. (2020). *Fusarium* infections: Epidemiological aspects over 10 years in a university hospital in France. *Journal of infection and public health*, 13(8), 1089–1093.
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (1985). Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 180(5), 402–404.
- Trigo Gutierrez, J. K., Zanatta, G. C., Ortega, A. L. M., Balastegui, M. I. C., Sanitá, P. V., Pavarina, A. C., Barbugli, P. A., & Mima, E. G. O. (2017). Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PLoS one*, 12(11), e0187418.

Uemura, E. V. G., Barbosa, M. D. S., Simionatto, S., Al-Harrasi, A., Al-Hatmi, A. M. S., & Rossato, L. (2022). Onychomycosis Caused by *Fusarium* Species. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 8(4), 360.

Yang, Z., Liu, C., Xiong, H., & Shi, D. (2022). Photodynamic therapy, a promising treatment approach for cutaneous infectious granulomas. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 39, 102952.