

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**MARIANE WEKED MONTEIRO LOPES**

**SÍNTESE E INTERNALIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES MCHC-  
CHLORIN SOBRE *Trichophyton rubrum***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU***

**São José dos Campos, dezembro/ 2024**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**MARIANE WEKED MONTEIRO LOPES**

**SÍNTESE E INTERNALIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES MCHC-  
CHLORIN SOBRE *Trichophyton rubrum***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

**São José dos Campos, dezembro/2024**

# UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

MARIANE WEKED MONTEIRO LOPES

## SÍNTESE E INTERNALIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES MCHC- CHLORIN SOBRE *Trichophyton rubrum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes**

Orientador

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Egberto Munin**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dra. Fernanda Malagutti Tomé**

UNIP – Universidade Paulista

**Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro**

Coordenador

Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, dezembro/2024

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

### **MARIANE WEKED MONTEIRO LOPES**

Mestranda em Engenharia Biomédica pela Universidade Anhembi Morumbi, graduada em Estética e Cosmética pelo Instituto Taubaté de Ensino Superior (ITES). Atua há 8 anos em consultoria e venda de equipamentos eletromédicos e dermocosméticos. Atendimentos clínicos em estética utilizando recursos eletroterápicos.

#### Ficha Catalográfica

L854s Lopes, Mariane Weked Monteiro  
Síntese e internalização de Fotossensibilizadores MCHC-Chlorin sobre Trichopyton rubrum / Mariane Weked Monteiro Lopes – 2024.  
59f.: 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2024.  
Bibliografia: f. 52-59.

1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia Fotodinâmica, 3. Clorina  
4. Fotossensibilizadores não agregativos. 5. Oniconicose,  
I. Título.

CDD 610.28

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Eliana Aparecida Monteiro, Giulia Weked Monteiro Ramos Lopes, Luiz Antônio Lopes e Adjaci Uchôa Fernandes, que tornaram este sonho possível.

## AGRADECIMENTOS

### **Aos meus queridos pais, Eliana e Luiz,**

Vocês são verdadeiros guerreiros, que sempre fizeram o impossível para me apoiar, mesmo diante das maiores dificuldades. Sou eternamente grata por me ensinarem o que realmente importa na vida: caráter e um coração cheio de bondade.

### **À minha irmãzinha Giulia,**

Você é a pessoa mais especial deste mundo. Desde o momento em que nasceu, minha vida ganhou um novo significado. Você me ensinou a ver o mundo com olhos mais simples, amorosos e alegres. É por você que luto todos os dias, acreditando em um futuro mais humano e repleto de esperança.

### **Ao professor Dr. Adjaci Uchôa,**

Você foi muito mais do que um mestre; foi um amigo de alma generosa e uma fonte de inspiração, com sua bondade e sensibilidade sem limites. Nos momentos mais difíceis da minha vida, quando pensei em desistir, foi você quem me deu forças para seguir em frente e realizar o meu sonho.

### **A todo o corpo docente do PPG,**

Sou profundamente grata pelos ensinamentos que vão além da ciência. Cada lição foi uma oportunidade única de aprendizado que transformou a minha vida.

### **Ao coordenador Prof. Dr. Renato Zângaro,**

Agradeço pela confiança e pela oportunidade de ingressar neste programa. Sua empatia, sabedoria e os valiosos ensinamentos que compartilhou comigo serão eternamente lembrados e ecoarão em minha trajetória.

### **À querida Nídia Macedo,**

Sempre tão solícita e disposta a ajudar a todos, seu apoio foi fundamental em muitos momentos.

### **Aos amigos mestrando e doutorando,**

Sou grata por ter cruzado os caminhos de tantos colegas incríveis, em especial Hajar e Letícia, que se tornaram grandes companheiras nesta jornada e tornaram os desafios mais leves e a convivência mais enriquecedora.

### **Aos meus poucos e bons amigos,**

Em especial, à Ana Alice, Ana Paula e Deborah, por estarem sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos. Vocês foram minha fonte de força, me incentivando a seguir meus sonhos e acreditando no meu potencial, mesmo quando eu duvidava de mim mesma.

*“O grande objetivo da ciência é dar à humanidade o poder de transformar o mundo de maneira mais consciente. ”*

- Marie Curie

## RESUMO

### SÍNTESE E INTERNALIZAÇÃO DE FOTOSENSIBILIZADORES MCHC-CHLORIN SOBRE *Trichophyton rubrum*

A onicomicose apresenta desafios terapêuticos significativos devido à dificuldade de erradicação dos fungos, à densa camada de queratina na estrutura ungueal e à limitação da vascularização local, fatores que comprometem a eficácia dos tratamentos tópicos e sistêmicos. Os métodos convencionais, além de falhas terapêuticas, frequentemente causam efeitos colaterais indesejáveis e apresentam baixa adesão devido ao tempo prolongado de tratamento, contribuindo para o aumento da resistência fúngica aos medicamentos. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como uma alternativa promissora, capaz de superar essas limitações. Contudo, o sucesso da técnica depende do desempenho dos fotossensibilizadores empregados. Neste estudo, a reação Diels-Alder entre o éster dimetílico de protoporfirina IX e maleimidas, fornece adutos endo que impedem completamente a autoagregação das clorinas. Dados obtidos por fluorescência, propagação ressonante de luz (RLS), experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e análises cristalográficas por raios X confirmaram a configuração estrutural desses compostos. As clorinas sintetizadas evitam interações de empilhamento  $\pi$  entre macrociclos, apresentando elevado rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi\Delta$ ) e fluorescência ( $\Phi_f$ ). Esses resultados preliminares indicam que essa abordagem sintética pode fornecer uma nova geração de fotossensibilizadores clorínicos não agregativos (MCHC-Chlorin), com grande potencial para aplicações em TFD no tratamento da onicomicose.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica. Onicomicose. Fotossensibilizadores não agregativos. Clorinas.



## ABSTRACT

### SYNTHESIS AND INTERNALIZATION OF MCHC-CHLORIN PHOTOSENSITIZERS ON *Trichophyton rubrum*

Onychomycosis presents significant therapeutic challenges due to the difficulty of eradicating fungi, the dense keratin layer in the nail structure, and the limited local vascularization, factors that compromise the effectiveness of both topical and systemic treatments. Conventional methods, in addition to therapeutic failures, often cause undesirable side effects and have low adherence due to the prolonged treatment time, contributing to the increase in fungal resistance to medications. In this context, Photodynamic Therapy (PDT) emerges as a promising alternative, capable of overcoming these limitations. However, the success of the technique depends on the performance of the photosensitizers used. In this study, the Diels-Alder reaction between dimethyl ester of protoporphyrin IX and maleimides provides endo adducts that completely prevent the self-aggregation of chlorins. Data obtained through fluorescence, resonance light scattering (RLS),  $^1\text{H}$  NMR experiments, and X-ray crystallographic analysis confirmed the structural configuration of these compounds. The synthesized chlorins avoid  $\pi$ -stacking interactions between macrocycles, exhibiting high singlet oxygen quantum yield ( $\Phi\Delta$ ) and fluorescence ( $\Phi_f$ ). These preliminary results suggest that this synthetic approach may provide a new generation of non-aggregating chlorin-based photosensitizers (MCHC-Chlorin), with great potential for PDT applications in the treatment of onychomycosis.

**Keywords:** Photodynamic Therapy. Onychomycosis. Non-aggregative photosensitizers. Chlorines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Lesões ungueais.....	19
Figura 2 - Anverso das colônias de <i>Trichophyton rubrum</i> em Ágar Sabouraud.....	22
Figura 3 - Verso das colônias de <i>Trichophyton rubrum</i> em Ágar Sabouraud.....	22
Figura 4 - Características Microscópicas do <i>Trichophyton rubrum</i> .....	23
Figura 5 Secção longitudinal de um dedo, evidenciando o aparelho ungueal dorsal ....	24
Figura 6 - Mecanismos Tipo I e Tipo II de fotossensibilização, onde BM é biomolécula, FS é fotossensibilizador e Alvos são os sítios biológicos (lipídeos, proteínas, DNA) ...	29
Figura 7 - Profundidade esquemática de penetração tecidual dos diferentes comprimentos de onda. ....	30
Figura 8 - Diagrama de Jablonski .....	31
Figura 9 - Síntese de 1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona.....	38
Figura 10 - Síntese da fenilclorina.....	39
Figura 11 a b- Espectros de RMN em CDCl <sub>3</sub> para a fenilclorina A .....	39
Figura 12 a b - a) Fluorescência do fungo excitado em 340nm e emissão em 450nm; b) Fluorescência através da incorporação do fotossensibilizador MCHC-Chlorin, excitado a 400 nm, emissão a 670 nm.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau centigrado
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
J	Joule
M	Molar
mJ	Milijoule
mL	Mililitro
mW	Miliwatt
nm	Nanômetro
nS	Nanossegundo
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minuto
ATCC	American Type Culture Collection
CDCl	Clorofórmio deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
Fs	Fotossensibilizador

HIV	Virus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LED	Diodo Emissor de Luz
mg	Miligrama
MHZ	Megahertz
RMN H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN13C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
SDA	Ágar Sabouraud-Dextrose
SPP	Espécies
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TCL	Teoria do Campo Ligante
TFD	Terapia Fotodinâmica
TLC	Cromatografia em Camada Fina
TSB	Triptecaseína de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta – visível
MCHC	Monomeric Chlorin at High Concentration (Clorina Monomérica em Alta Concentração)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 ONICOMICOSSES .....	17
<b>2.2 Epidemiologia das Onicomicoses</b> .....	19
2.3 O GÊNERO <i>TRICHOPYTON RUBRUM</i> .....	21
2.4 ANATOMIA UNGUEAL E SUA IMPORTÂNCIA .....	23
2.5 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DAS ONICOMICOSSES .....	24
2.6 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE TRATAMENTO .....	26
2.7 TERAPIA FOTODINÂMICA .....	28
2.8 FOTOSSENSIBILIZADORES .....	31
2.9 FOTOSSENSIBILIZADORES CLORÍNICOS E AUTO- AGREGAÇÃO .....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
3.1 METODOLOGIAS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS .....	34
3.2 SÍNTESES .....	35
<b>3.2.1 Síntese de 1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona (fenilmaleimida)</b> .....	35
<b>3.2.2 Síntese da MCHC–Chlorin</b> .....	36
<b>3.2.3 Linhagem do fungo e meios de cultura</b> .....	36
<b>3.2.4 Cultivo do <i>Trichophyton rubrum</i></b> .....	36
<b>3.2.5 Preparo de <i>Trichophyton rubrum</i> para ensaios <i>in vitro</i></b> .....	37
<b>3.2.6 Microscopia de fluorescência</b> .....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	38
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

Onicomicose é uma infecção fúngica que atinge a lâmina ungueal, causada principalmente por dermatófitos, sendo *Trichophyton rubrum* ou *Trichophyton mentagrophytes* identificados como os patógenos causadores mais frequentes. As leveduras são responsáveis em 5% dos casos e fungos não dermatófitos, responsáveis em 3% dos casos. Caracterizada por tornar as unhas quebradiças, espessas, com excesso ou falta de pigmentação, é considerada uma das dermatoses mais frequentes, representando em torno de 30 a 50% de todas as infecções ungueais (Alberdi; Gómez, 2019).

Por sua grande incidência e prevalência, é classificada como um problema de saúde pública no Brasil. É uma doença multifatorial, fato muitas vezes que passa despercebido e merece atenção em várias frentes sociais e de saúde. Podemos citar como fatores contribuintes para o desenvolvimento da patologia as características do nosso clima, dados demográficos e sociais. Outra problemática, são os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, Diabetes, doenças arteriais periféricas, e a população idosa, que são grupos mais propensos para o desenvolvimento da patologia e principalmente, apresentar formas severas da doença além de dificuldades e restrições ao tratamento. À medida que a onicomicose avança, ela pode afetar a postura, a marcha e a realização de atividades físicas. Os pacientes frequentemente experenciam sintomas como parestesia, dor, desconforto e redução da destreza (Milobratovic, *et al.*, 2013; Scher, 1996).

Seu tratamento é um desafio nas práticas clínicas devido as particularidades da patologia e da região acometida. O lento crescimento das unhas, principalmente a dos pés e por se tratar de uma região não vascularizada, dificulta a penetração dos medicamentos. Os tratamentos convencionais consistem no uso de antifúngicos tópicos ou sistêmicos, dependendo da proliferação da patologia. O tratamento sistêmico pode resultar em uma série de efeitos adversos, como: eritema, cefaleia, hipersensibilidade, possíveis interações medicamentosas e maior propensão a desencadear doenças hepáticas graves devido ao extenso período de tratamento. Além dos efeitos adversos, o longo tempo requerido e alto custo do tratamento contribuem para a baixa adesão do paciente e as falhas terapêuticas são muito comuns devido à resistência do fungo frente a droga utilizada. Por conta destas implicações, os antifúngicos tópicos são os mais utilizados pelos pacientes, porém

apresentam baixa eficácia, justamente por não terem a capacidade de eliminar completamente a infecção. Todas estas problemáticas demonstram que os tratamentos convencionais estão cada vez mais fadados ao insucesso, tornando-se necessário novas modalidades terapêuticas seguras e eficazes, diminuindo as inúmeras desvantagens e grande taxa de reincidência da doença, observada com os antifúngicos comumente utilizados (Alberdi; Gómez, 2019; Martins, *et al.*, 2007).

Por sua vez, a terapia fotodinâmica (TFD), emerge como um recurso promissor para o tratamento e diagnóstico de diversas patologias. A TFD ocorre na presença de 3 elementos básicos: droga fotossensibilizadora; fonte de luz e o oxigênio molecular. O tecido infectado é pré tratado com o fotossensibilizador (Fs) e posterior irradiado localmente com luz de comprimento de onda adequado. A interação destes fatores, leva o Fs ao estado excitado tripleto, interagindo com as células do tecido doente, que, na presença do oxigênio celular circulante, produz espécies reativas de oxigênio (ROS) (Finch; Warshaw, 2007).

A terapia fotodinâmica vem sendo utilizada no tratamento de onicomicose com fotossensibilizadores convencionais tais como azul de metileno e protoporfirina IX. O efeito fotodinâmico está relacionado a características como: a biodistribuição dos fotossensibilizadores, interações com biomoléculas e organelas específicas e com as propriedades fotofísicas dos mesmos. No entanto, este tratamento está limitado por fatores de agregação. Compostos que apresentam índice elevado de agregação, apresentam fotofísica desfavorável, com baixos rendimentos quânticos de tripleto ( $\tau$ ) e oxigênio singlete ( $\Phi\Delta$ ). Os fotossensibilizadores convencionais apresentam anéis aromáticos com ampla nuvem  $\pi$  e extensa planaridade, sendo todos eles induzidos a auto agregação. A MCHC-Chlorin é um novo fotossensibilizador composto por dois macrociclos ortogonais unidos por um carbono  $sp^3$ . Tal conformação, confere impedimento estérico e conseqüentemente, o impedimento de formação do estado agregado. Assim, tal fotossensibilizador, apresenta sua fotofísica maximizada com elevado rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi\Delta$ ) 0,78 e rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) de 0,16. Estes resultados habilitam MCHC-Chlorin como excelente fotofármaco para tratamentos por terapia fotodinâmica e diagnóstico. Abrindo assim, uma nova janela para o estudo da TFD com o primeiro fotossensibilizador isento de auto agregação. Desta forma, este fotossensibilizador poderá oferecer um tratamento mais eficaz para

onicomicose (Christenson, *et al.*, 2018; Fernandes; Baptista, 2007; Finch; Warshaw, 2007; Martins, *et al.*, 2007).

O objetivo principal deste estudo foi sintetizar e determinar a viabilidade da ação fotodinâmica de MCHC-Chlorin em *Trichophyton rubrum* e, para uma pesquisa mais aprofundado foi proposto o estudo dos seguintes objetivo secundários: (I) Realizar a síntese de fotossensibilizadores derivados de MCHC-Chlorina; (II) Caracterizar a forma estrutural do composto; (III) Caracterizar a fotofísica do composto e; (IV) realizar estudos de incorporação e internalização de fotossensibilizadores derivados de MCHC-Chlorin em *Trichophyton rubrum in vitro*



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ONICOMICOSSES

A palavra "onicomicose" é derivada das palavras gregas *onyx*, que significa unha, e *mykes*, que significa fungo. É uma infecção fúngica comum que afeta as unhas dos dedos das mãos e dos pés. Essa condição pode envolver diversos componentes do aparelho ungueal, como a lâmina ungueal, a matriz e o leito ungueal. A infecção ocorre quando o fungo invade e se prolifera na unha, causando sintomas como descoloração, fragilidade, deformações e, nos casos mais graves, separação da unha do leito ungueal. É a condição mais comum relacionada às unhas, representando cerca de 50% de todos os casos de desordens ungueais, com maior prevalência em adultos.

Os agentes responsáveis incluem leveduras, fungos filamentosos não dermatófitos e dermatófitos, sendo estes últimos os mais comuns, correspondendo a cerca de 90% dos casos de onicomicose, que atinge aproximadamente 25% da população mundial. As leveduras vêm em segundo lugar, seguidas pelos fungos não dermatófitos. Estima-se que entre 10% e 15% da população possa desenvolver onicomicose em algum momento da vida (Fernandes; Baptista, 2007; Banfi, *et al.*, 2004).

Os dermatófitos constituem um grupo especializado de fungos com afinidade queratinofílica, ou seja, degradam a queratina no seu processo de nutrição (Santo, 2014). Este grupo de fungos são filamentosos, e por sua natureza queratinofílica, acometem a camada córnea da epiderme, cabelos e unhas. Estas lesões denominadas dermatofitoses, são clinicamente reconhecidas por seu aspecto circinado, anular e ainda descamação da pele glabra (Elewski, 1998).

Os dermatófitos que causam a *tinea unguium*, dividem-se em gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*. Diferem-se em sua morfologia, esporulação fúngica e microscópica, atribuindo variações e preferências do local de atuação. O gênero *Trichophyton*, em principal o *Trichophyton rubrum*, seguido pelo *Trichophyton mentagrophytes*, têm afinidade por tecidos queratinizados, e devido a sua enorme variação epidemiológica, preferem tecidos como o da unha, tornando-se o gênero mais frequente (Silva, 2013).

Apesar dos fungos dermatófitos serem os maiores causadores da onicomicose, nos últimos anos observa-se um aumento considerável dos não dermatófitos, que até então, eram considerados raros. Dentro de suas espécies há diversos fungos que acometem as unhas, porém apenas uma pequena parte é a causadora, entre elas pode-se citar: *Scopulariopsis.*, *o Acremonium sp.*, *o Aspergillus sp.*, *o Onychocola canadiensis*, entre outras espécies de gênero (Lima, *et al.*, 2009).

As leveduras, apesar de serem consideradas uma microbiota normal, também podem causar patologias, sejam elas primárias ou secundárias, entre as quais pode-se ter o acometimento das unhas e a infecção do leito ungueal. Observa-se como principal causadora as leveduras do gênero *Cândida* (Araujo, *et al.*, 2003).

A onicomicose pode ser classificada em cinco categorias:

1. Subungueal distal/lateral: a qual possui maior ocorrência, tem a propagação do hiponíquio, se alastrando ao leito ungueal, provocando hiperqueratose, onicolise e o espessamento da unha;
2. Subungueal proximal: observa-se a invasão da área sob a cutícula, progredindo para a porção proximal da lâmina, geralmente sua maior proliferação é em pessoas com HIV, e com condições de imunossupressão;
3. Onicodistrofia total: ocorre o espessamento total ocasionado pelo somatório evolutivo das lesões anteriores e pela fragilidade causada com a perda da lâmina ungueal restando apenas fragmentos queratinizados aderidos ao leito ungueal;
4. Branca superficial ou leucomicose: o fungo invade a camada superior da lâmina ungueal, e é reconhecido por suas manchas brancas na face da unha;
5. Onicomicose distrófica com apresentação de paroníquia.

Na figura 1 se pode observar a classificação das onicomicoses causadas por dermatófitos,

Figura 1 - Lesões ungueais



Fonte: Lima; Rêgo e Montenegro (2007, p. 210)

(A) Onicomicose subungueal distal e lateral;

(B) Onicomicose subungueal proximal; (C) Onicomicose distrofica total;

(D) Onicomicose superficial branca ou leucomicose; (E) Onicomicose distrófica

com apresentação de paroníquia.

Para diagnosticar a onicomicose, leva-se em consideração o seu aspecto clínico, se já houve uma precedência, e nas possibilidades de tratamento. Para descobrir o gênero causador é necessário uma série de exames diretos, no cultivo e na identificação do agente etiológico, geralmente com o auxílio de testes bioquímicos, que fazem a diferenciação entre espécies (Santo, 2014).

É importante ressaltar que a onicomicose não é a única patologia onicodistrófica; as bactérias também podem apresentar essa característica e, muitas vezes, estão associadas aos fungos. Quando a população bacteriana supera a proliferação fúngica, pode-se diagnosticar uma onicobacteriose. Esses casos costumam ocorrer em infecções por leveduras e são influenciados por diversos fatores individuais de cada paciente, que favorecem essa interação. As características pessoais impactam diretamente na propagação e na prevalência das espécies fúngicas (Silva, 2013).

## 2.2 Epidemiologia das Onicomicoses

Diversos fatores contribuem para a maior incidência da proliferação de fungos, sendo as condições climáticas o principal deles. O contato e a convivência com animais domésticos, além da água contaminada em piscinas e reservatórios, são algumas das situações que favorecem o surgimento de fungos responsáveis por dermatoses. No Brasil,

a onicomicose fúngica apresenta uma alta taxa de ocorrência. O clima do país, caracterizado por altas temperaturas e elevada umidade, cria condições favoráveis para a proliferação de fungos, com a umidade sendo o fator mais significativo no desenvolvimento dessa patologia (Mendes, 2014).

Com uma umidade de 90% e temperatura de 35°C, a propagação fúngica ocorre em apenas quatro dias. Além dos fatores exógenos, existem condições individuais que contribuem para a propagação, como idade, gênero, doenças e profissão. O envelhecimento da população é um fenômeno notável e frequentemente estudado em relação à saúde, o que gera preocupações, especialmente no contexto da onicomicose, uma patologia que afeta principalmente adultos, especialmente os acima de 60 anos (Christenson, *et al.*, 2018).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da onicomicose podem ser agrupados em várias categorias:

- Características médicas dos pacientes: idade avançada, predisposição genética, alterações nos pés e condições de saúde como diabetes, imunossupressão, insuficiência venosa, doenças arteriais periféricas, câncer e obesidade.
- Doenças dermatológicas: histórico de tinea pedis, psoríase e hiperidrose.
- Fatores externos: lesões nas unhas, falta de higiene adequada, prática de atividades esportivas, exposição ocupacional, tabagismo e uso de calçados fechados (Chanyachailert; Leeyaphan; Bunyaratavej, 2023; Lipner; Scher, 2019).

Indivíduos com doenças como diabetes têm maior predisposição a infecções fúngicas, pois o agente fúngico compromete a barreira natural da camada córnea, que contém ácidos graxos fungistáticos, importantes na defesa contra infecções. O HIV também é uma condição que facilita a ocorrência de onicomicose; pacientes com esse diagnóstico são alvos frequentes do microrganismo, com casos observados em mais de 30% dos pacientes. Devido à sua baixa imunidade, as lesões de onicomicose tendem a ser mais graves, podendo se tornar disseminadas ou até fatais (Foss, *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que a onicomicose é uma doença infecciosa, ou seja, todas as pessoas que têm contato direto estão em risco de contrair a infecção. Os maiores níveis

de contaminação ocorrem em locais públicos, especialmente quando o paciente não recebe o tratamento adequado (Araujo, *et al.*, 2003).

### 2.3 O GÊNERO *TRICHOPYTON RUBRUM*

O fungo dermatófito *Trichophyton rubrum* é amplamente reconhecido como uma das espécies mais relevantes e clinicamente significativas dentro do gênero *Trichophyton*, que inclui diversos fungos responsáveis por infecções cutâneas em humanos e outros animais. Esse fungo destaca-se pela afinidade por pele e unhas, sendo um dos principais agentes causadores de infecções fúngicas dermatofíticas em humanos.

O *T. rubrum* foi inicialmente isolado por Castellani em 1910, em um contexto em que a maioria dos dermatófitos já havia sido identificada. No século XIX, levantou-se a hipótese de que esses fungos poderiam ser os agentes responsáveis pela forma crônica da *tinea corporis*. Posteriormente, o *T. rubrum* se disseminou globalmente, consolidando-se como uma das principais causas de onicomicoses. Estudos genéticos sugerem que a espécie teve origem na África e foi disseminada para a Europa e outros continentes por meio de migrações humanas (Brasch, 2007).

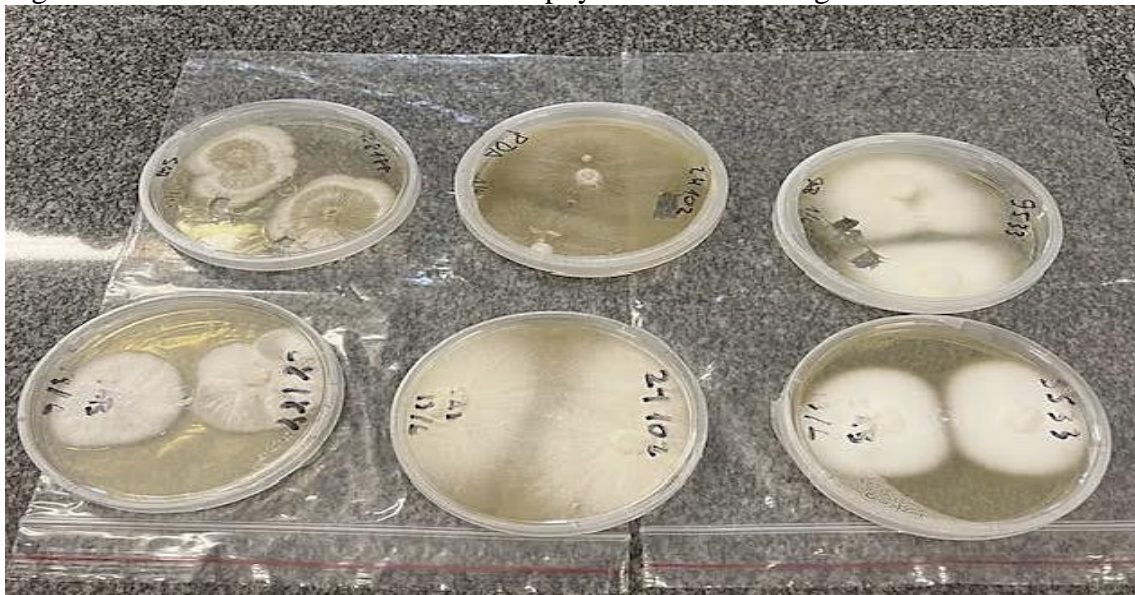
Trata-se de um fungo filamentosos e patogênico, prevalente em micoses como *tinea corporis*, *tinea pedis* e *tinea unguium*. Pertencente ao Reino Fungi, mais especificamente à divisão Ascomycota, suas colônias apresentam coloração branca, com variação fenotípica notável na pigmentação avermelhada na parte inferior das colônias (Santos; Hamdan, 2005; Faergemann; Baran, 2003).

Estudos indicam que o *T. rubrum* é responsável por até 70% de todas as infecções causadas por dermatófitos. No caso específico das onicomicoses, ele é identificado como o agente em 71% dos casos. Dada sua alta prevalência e recorrência após interrupção do tratamento, o conhecimento detalhado sobre o fungo é essencial para estratégias terapêuticas eficazes (Mukherjee, *et al.*, 2003).

A identificação precisa do *T. rubrum* requer análise detalhada, com base em características macroscópicas e microscópicas. As colônias de *Trichophyton rubrum* possuem coloração branca, com textura que varia entre cotonosa (semelhante a algodão) e aveludada (figura 2). O verso das colônias apresenta uma pigmentação avermelhada

com tons púrpura (figura 3), embora também possam ser observadas variações em diferentes tonalidades de castanho (Rodrigues, 2007; Sidrim; Rocha, 2003).

Figura 2 - Anverso das colônias de *Trichophyton rubrum* em Ágar Sabouraud



Fonte: Autora (2024).

Figura 3 - Verso das colônias de *Trichophyton rubrum* em Ágar Sabouraud



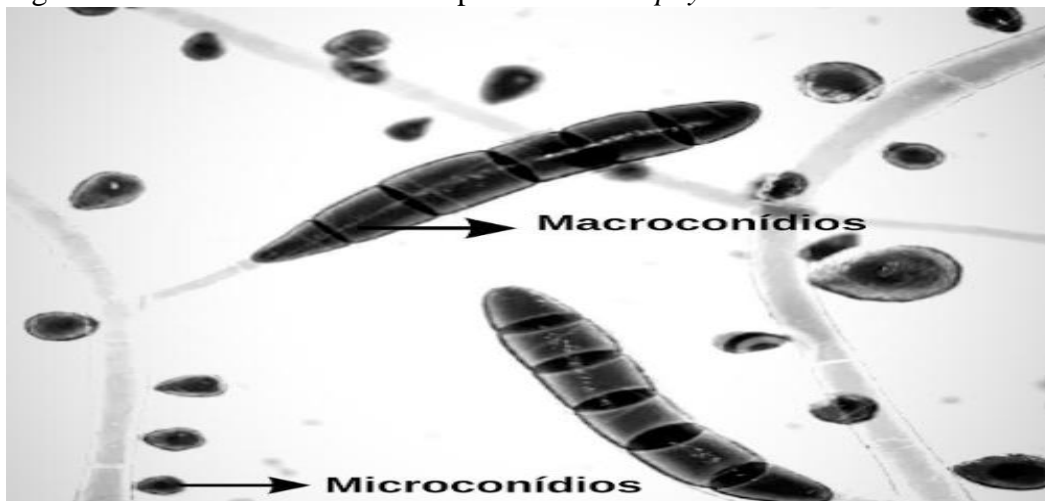
Fonte: Tomé (2024)

O crescimento dessas colônias ocorre em um período de 7 a 14 dias, caracterizado pela presença de pregas radiais que formam uma saliência central. Sob análise microscópica, observa-se hifas septadas e hialinas, microconídios em formato de gota,



dispostos ao longo das hifas ou organizados em cachos, além de macroconídios raros, como demonstra a Figura 4 (Pereira; Mendes; Lima, 2013; Rodrigues, 2007).

Figura 4 - Características Microscópicas do *Trichophyton rubrum*



Fonte: Autora (2024).

#### 2.4 ANATOMIA UNGUEAL E SUA IMPORTÂNCIA

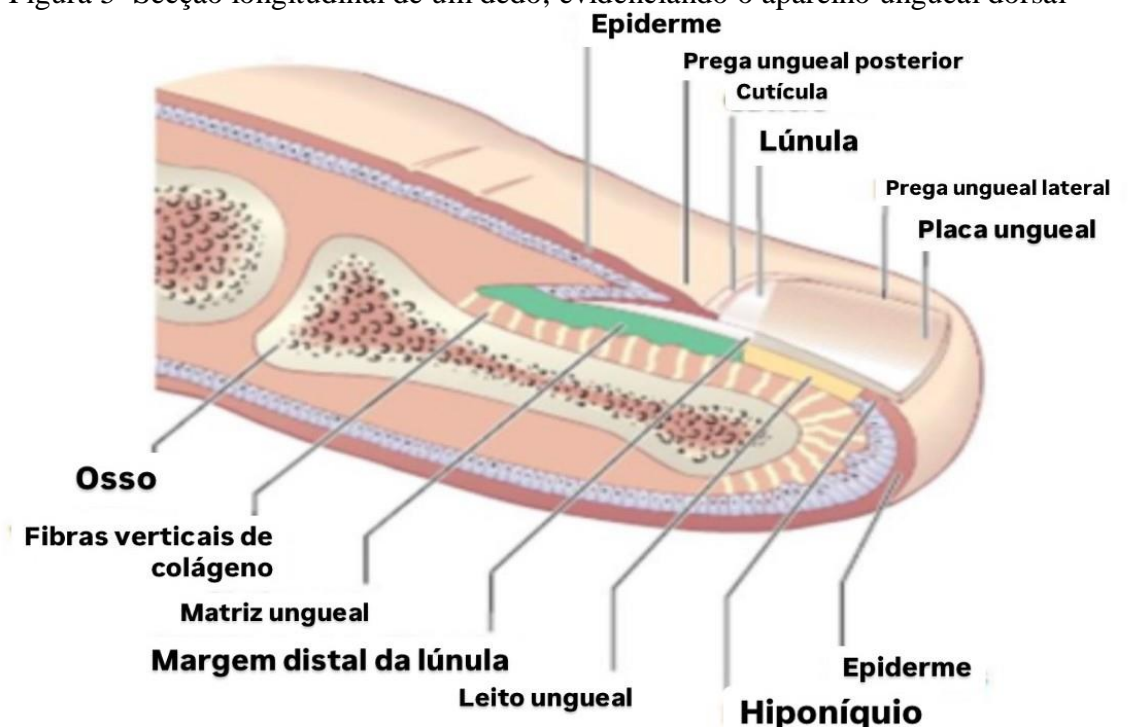
A onicomicose, muitas vezes é negligenciada e reduzida à aparência inestética que ocasiona, porém é causadora de consideráveis efeitos físicos e psicológicos ao paciente, resultando em diversas implicações e deficiências. A anatomia ungueal frequentemente sofre distorções secundárias por conta da patologia, podendo ocasionar dor e maior propensão a queda, principalmente em idosos (Milobratovic, *et al.*, 2013; Scher, 1996).

Além do seu papel estético, a unha protege a falange distal dos dedos, possibilita a apreensão de pequenos objetos. É uma estrutura rígida e ao mesmo tempo flexível, produzida em todo curso da vida do indivíduo pela matriz ungueal (Hay; Baran, 2015; Rich; Scher, 2005).

Como se pode observar na Figura 5, o aparelho ungueal dorsal, evidenciando suas estruturas. A matriz é um tecido germinativo protegido pela dobra ungueal proximal, que adere firmemente à porção proximal da placa ungueal através da cutícula. Contiguamente à dobra proximal, a dobra lateral protege a borda lateral da placa ungueal. A unha não é aderida à matriz, mas adere fortemente ao leito ungueal. Por fim, a banda oncodérmica, ponto de união entre o leito e a placa ungueal, localizada na porção distal da unha, sela o

espaço virtual entre o leito e a placa. A dobra proximal e a banda oncodérmica são as principais barreiras físicas contra agressores externos (fungos, bactérias, vírus, agentes químicos e físicos, entre outros) (Baran; Berker, 2012; Reardon, *et al.* 1999; Zook, 2002).

Figura 5 Secção longitudinal de um dedo, evidenciando o aparelho ungueal dorsal



Fonte: Adaptado de Berker e Baran (2012)

Os agentes causadores da onicomicose promovem ação queratolítica, podendo ser observados, principalmente na forma distal-lateral, ocasionando a onicólise, que é o descolamento entre a lâmina e o leito ungueal. A perda da banda oncodérmica é um fator de grande relevância na patogenia da onicomicose (Hay; Baran, 2015; Milobratovic, *et al.*, 2013; Scher, 1996).

## 2.5 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DAS ONICOMICOSSES

As manifestações clínicas das onicomicoses variam bastante, podendo se apresentar como uma infecção leve ou assintomática. No entanto, é comum que as infecções sejam sintomáticas e durem meses ou até anos. Para o diagnóstico, além do exame clínico, é essencial realizar um teste micológico para identificar o patógeno. Vale ressaltar também, que as onicomicoses fúngicas podem se assemelhar a outras condições,



como líquen plano, psoríase, dermatite crônica e traumas ungueais, além de ser possível a presença de patologias mistas, o que torna o diagnóstico das onicomicoses um verdadeiro desafio. A ideia de que um único agente etiológico é responsável por um caso de onicomicose ainda não é amplamente aceita na prática clínica. Desde os postulados de Koch, formulados no século XIX, a abordagem predominante tem sido priorizar as "culturas puras", em que se isola um único microrganismo para cada infecção. No entanto, esse conceito precisa ser reconsiderado, pois atualmente se sabe que as infecções microbianas podem ser originadas por múltiplos agentes etiológicos simultaneamente (Costa, *et al.*, 2023; Gupta; Simpson, 2013).

Determinar corretamente o agente etiológico através de testes laboratoriais é imprescindível para a eficácia da terapia, visto que cada microrganismo responde de uma forma diferente aos antifúngicos, sendo necessária esta identificação para empregar a terapia correta (Martelozo; Guilhermetti; Svidzinski, 2005).

O exame micológico direto (EMD) e a cultura são considerados o padrão ouro para o diagnóstico das onicomicoses. Esse método envolve a análise de lâminas preparadas com hidróxido de potássio (KOH) a 20%. No entanto, é importante notar que esse exame possui baixa sensibilidade e pode ser demorado. Sua confiabilidade depende da experiência do examinador, e é recomendado realizar coletas sucessivas para aumentar a precisão do diagnóstico. Um novo EMD deve ser feito sempre que o primeiro resultar negativo (Amir; Foering; Jason, 2015; Sidrim, *et al.*, 2008).

Já o exame histomicológico ou clipping utiliza técnicas consolidadas da histopatologia, exigindo apenas o pré-tratamento da amostra ungueal com hidróxido de sódio a 20% para amolecimento. Esse procedimento é considerado simples e prático, e alguns autores o consideram mais preciso do que o exame micológico direto. Contudo, ele não permite a identificação do gênero e da espécie do fungo envolvido e tende a ter um custo mais elevado em comparação aos métodos convencionais (Gianni, *et al.*, 2001; Gupta; Simpson, 2013; Wilsmann-T., *et al.*, 2010).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) ganhou destaque com o surgimento da biologia molecular e por se tratar de um método rápido e de alta sensibilidade. Enquanto a PCR necessita de cerca de 48 horas para o resultado, a cultura necessita em média de quatro a seis semanas. O método vem demonstrando ser viável para o diagnóstico da patologia por fungos dermatófitos, não dermatófitos e leveduras, mas a técnica ainda

carece de protocolos de padronização (Bontems; Hauser; Monod, 2009; Gräser; Czaika; Ohst, 2012; Gupta; Nakrieko, 2014).

Para um diagnóstico inequívoco, a avaliação clínica e micológica deve ser criteriosa. Os fungos não dermatófitos, podem ser meros contaminantes e não caracterizar uma infecção, tornando o diagnóstico das onicomicoses por fungos não dermatófitos um desafio, diferentemente do que ocorre com os fungos dermatófitos. Desta forma, é necessário levar em consideração as alterações clínicas e histórico do paciente, associadas ao exame micológico direto e duas ou mais culturas positivas para o fungo não dermatófito (Schechtman, 2008; Gupta, *et al.*, 2012).

## 2.6 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE TRATAMENTO

Nos casos de onicomicose, o tratamento é realizado com antifúngicos, que podem ser classificados em três tipos de terapia: tópica, sistêmica e combinada. A Terapia Sistêmica é indicada quando uma grande área da matriz ungueal está afetada. Embora seja considerada a mais eficaz, ela apresenta riscos de interações medicamentosas e efeitos colaterais. A Terapia Tópica é indicada quando a matriz ungueal não está comprometida, sendo mais segura e com menos efeitos adversos em comparação à sistêmica. Geralmente, é empregada em casos de onicomicose superficial branca ou quando o tratamento sistêmico é contraindicado, porém, na maioria dos casos não é suficientemente eficaz. Já a Terapia Combinada, consiste na associação dos tratamentos tópicos e sistêmicos, oferecendo os mesmos benefícios da terapia sistêmica, mas com a vantagem de um efeito sinérgico, tornando-a mais eficaz do que o uso exclusivo de antifúngicos orais (Ameen, *et al.*, 2014; Barot, *et al.*, 2013; Warshaw, *et al.*, 2005).

Os principais grupos de antifúngicos sistêmicos usados no tratamento de micoses superficiais e cutâneas incluem os imidazóis (como o cetoconazol), os triazóis (como fluconazol e itraconazol) e as alilaminas (como a terbinafina) (Almeida, *et al.*, 2009).

Pacientes mais vulneráveis a formas graves da doença, são justamente os que exigem maior cuidado e restrições no uso de medicamentos. Antes de iniciar a terapia sistêmica, é recomendado realizar testes de função hepática e, em alguns casos, um hemograma completo antes do uso de terbinafina ou itraconazol. Ao prescrever itraconazol, os médicos devem considerar a realização de um eletrocardiograma,

especialmente em pacientes idosos ou com disfunção cardíaca preexistente. O monitoramento adicional é necessário em populações específicas, pois estudos mostram que a eliminação de terbinafina e itraconazol é significativamente mais lenta em pacientes com cirrose hepática em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, a eliminação de terbinafina é reduzida em pacientes com insuficiência renal. Pacientes que usam fluconazol também devem ser monitorados, uma vez que esses medicamentos estão associados à hepatotoxicidade. Por isso, agentes orais como esses não são recomendados para pacientes com doença hepática crônica ou ativa, e aqueles com disfunção hepática que utilizam terapias orais precisam de monitoramento rigoroso. Pacientes diabéticos, HIV positivos e transplantados também requerem maior atenção e acompanhamento. Além disso, as terapias antifúngicas sistêmicas podem interferir na farmacocinética e farmacodinâmica de outros medicamentos, o que pode resultar em redução da eficácia ou aumento da toxicidade (Almeida, *et al.*, 2009; Gupta, *et al.*, 2019).

No passado, quando os tratamentos antifúngicos não apresentavam resultados, a avulsão cirúrgica total da unha era uma opção, mas atualmente esse procedimento está em desuso devido ao risco de distrofia temporária ou permanente da lâmina ungueal, causada por traumas na matriz ungueal. No entanto, a avulsão parcial ainda é utilizada em alguns casos, permitindo a remoção da área afetada, embora não seja indicada para onicomicose que envolva toda a unha (Almeida, *et al.*, 2009 ).

A dificuldade no tratamento das dermatoses fúngicas do leito ungueal, também está relacionada à estrutura da unha, que, por ser não vascularizada, dificulta a adesão dos medicamentos, tanto tópicos quanto sistêmicos. Essa característica anatômica da unha explica os desafios enfrentados na eficácia dos tratamentos antifúngicos (Chanyachailert; Leeyaphan; Bunyaratavej, 2023).

O tratamento das onicomicoses apresenta taxas de fracasso terapêutico que variam entre 25% em estudos experimentais e até 35% na prática clínica. As principais razões para essas falhas incluem a baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes, que chega a cerca de 52%, e a farmacocinética inadequada dos fármacos para atingir a massa ungueal afetada. Os medicamentos orais têm dificuldade em alcançar as bordas laterais das unhas, enquanto a maioria dos antifúngicos tópicos tem dificuldade em penetrar nas camadas mais profundas da lâmina ungueal. No caso dos tratamentos tópicos, é essencial escolher um veículo adequado que permita uma boa difusão do antifúngico na unha.

Quanto aos antifúngicos orais, estudos indicam que medicamentos como itraconazol, fluconazol e terbinafina conseguem penetrar e se depositar na lâmina ungueal, mas há diferenças entre eles que exigem regimes de administração distintos (intermitentes ou contínuos) e variações na duração do tratamento (Chanyachailert; Leeyaphan; Bunyaratavej, 2023).

Após dois anos de uso de antifúngicos, há relatos de perda de eficácia, geralmente devido à mutação microbiana. Com o uso prolongado do medicamento, ocorre uma "seleção" natural entre os microrganismos, favorecendo as espécies que possuem mecanismos de resistência aos fármacos. Isso destaca a importância de desenvolver alternativas terapêuticas capazes de prevenir a persistência e recorrência da patologia (Silva, 2013).

## 2.7 TERAPIA FOTODINÂMICA

No final do século XX, Oscar Raab e seu professor observaram que o paramécio, um tipo de protozoário, morria rapidamente quando exposto à luz na presença do corante acridina. Após realizarem mais experimentos, constataram que a reação dependia da combinação de corante, oxigênio e luz. A partir dessas descobertas, introduziram o termo "terapia fotodinâmica".

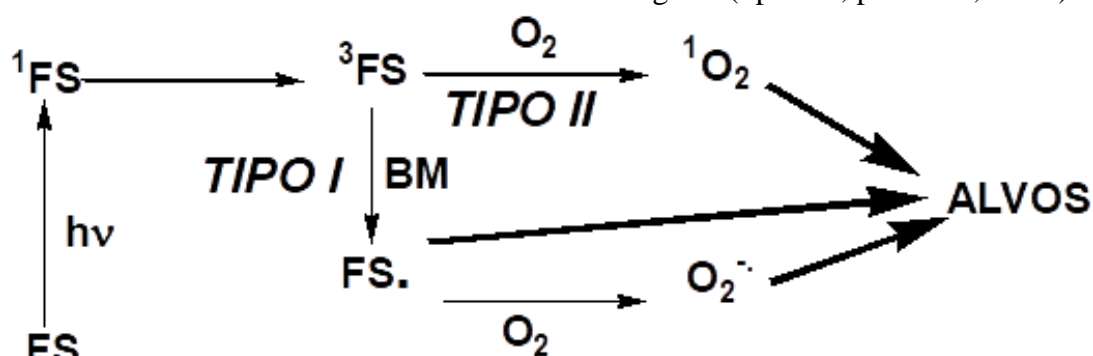
Quando ativado pela luz, o fotossensibilizador reage com o oxigênio presente nas células, desencadeando interações que podem afetar moléculas vizinhas de duas maneiras (Depry, *et al.*, 2015; Issa; Manela-Azulay, 2010), conforme demonstrado na figura 6:

- Reação do tipo I - Produção de radicais livres devido à transferência de elétrons ou hidrogênio: A ativação do fotossensibilizador desencadeia uma cascata de reações oxidativas, mediadas por processos radicalares, que resultam na morte celular. No estado excitado tripleto (T1), o fotossensibilizador transfere energia para o tecido-alvo, promovendo a formação de radicais livres e ânions por meio da transferência de hidrogênios ou elétrons. Esses radicais interagem com o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), que retorna ao seu estado energético inicial, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), como os superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), no ambiente intracelular (Zhang, *et al.*, 2018);

- Reação do tipo II - Produção de oxigênio singleto, por transferência de energia ao oxigênio: quando irradiado, o fotossensibilizador alcança o estado excitado singleto e, por meio de cruzamento intersistema com inversão de spin, transita para o estado excitado tripleto. Este estado possui um maior tempo de vida, permitindo a transferência de energia para moléculas de oxigênio por meio de seções de choque, resultando na formação de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), uma espécie altamente reativa e oxidante (Kwiatkowski, *et al.*, 2018).

Ambas as reações podem levar a morte celular e destruição do tecido doente (Fernandes, *et al.*, 2007).

Figura 6 - Mecanismos Tipo I e Tipo II de fotossensibilização, onde BM é biomolécula, FS é fotossensibilizador e Alvos são os sítios biológicos (lipídeos, proteínas, DNA)



Fonte: Autora (2024)

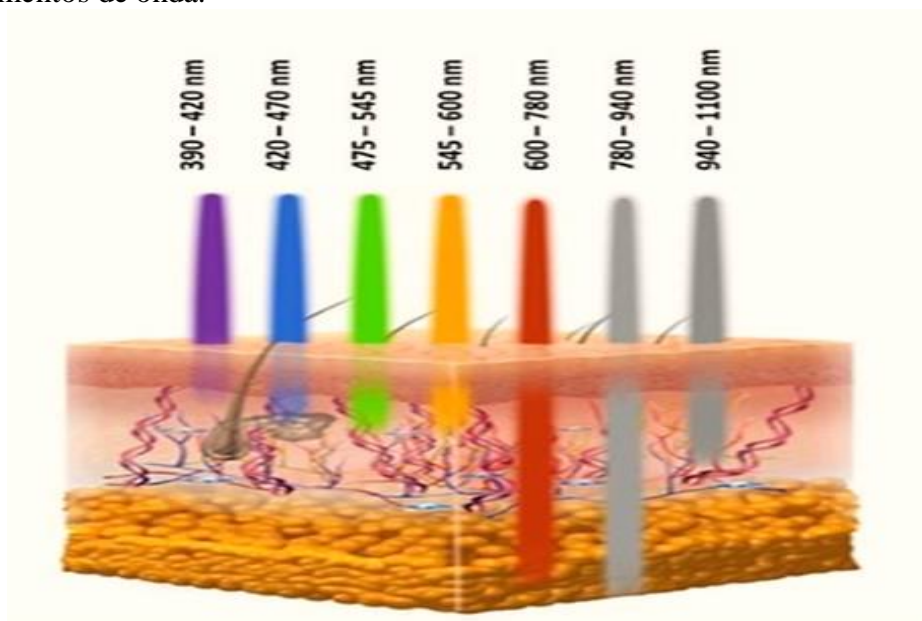
A terapia fotodinâmica ocorre apenas na presença de três elementos essenciais: oxigênio, luz e fotossensibilizador. A interação desses fatores torna o tecido-alvo sensível à luz, desde que sejam utilizados comprimentos de onda capazes de serem absorvidos pelos fotossensibilizadores, resultando em uma resposta fototóxica, geralmente mediada por dano oxidativo. Quando ativados pela luz, os fotossensibilizadores geram espécies reativas de oxigênio (EROs), que, no ambiente biológico, promovem a inativação das células-alvo (Ribeiro, *et al.*, 2011).

Um aspecto crucial na Terapia Fotodinâmica é a capacidade do fotossensibilizador de ser ativado por comprimentos de onda com maior penetração no tecido biológico. Fotossensibilizadores que absorvem na região do vermelho e do infravermelho próximo permitem alcançar tecidos mais profundos, possibilitando o tratamento de lesões maiores

e mais profundas, garantindo que a ação ocorra na camada tecidual necessária para a eficácia do tratamento (Issa; Boechat, 2016).

Na figura 7, podemos observar os comprimentos de onda e a capacidade de penetração tecidual que cada um possui:

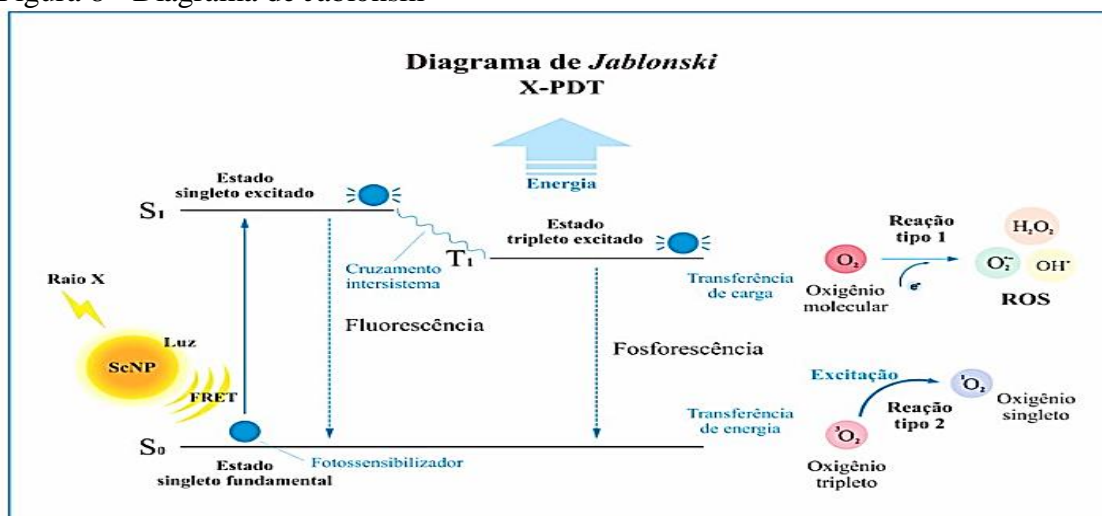
Figura 7 - Profundidade esquemática de penetração tecidual dos diferentes comprimentos de onda.



Fonte: IBRAMED (2018)

Entre os fotossensibilizadores com essas características, destacam-se grupos como as clorinas. Conforme ilustrado no diagrama de Jablonski (Figura 8), os processos de desativação das moléculas ocorrem de forma simultânea e competitiva. Por isso, é fundamental avaliar a contribuição de cada processo, ou seja, o rendimento quântico de cada etapa. Um bom fotossensibilizador deve apresentar uma alta eficiência no cruzamento intersistema, com elevado rendimento quântico no estado tripleto e na geração de oxigênio singleto. Outros fatores também desempenham um papel crucial na eficácia de um fotossensibilizador, a capacidade de se acumular no tecido doente e uma precisa citolocalização, são aspectos fundamentais para um bom desempenho (Sant'Ana, 2018).

Figura 8 - Diagrama de Jablonski



Fonte: Lovatto *et al.* (2023)

## 2.8 FOTOSSENSIBILIZADORES

Ao longo das últimas décadas, diversos estudos têm sido conduzidos com o propósito de aprimorar a eficácia e a seletividade dos fotossensibilizadores. Algumas pesquisas focaram no desenvolvimento de fotossensibilizadores capazes de absorver energia em comprimentos de onda mais longos, facilitando uma penetração mais profunda da luz e, conseqüentemente, atingindo tecidos localizados em maiores profundidades. Outras investigações buscaram otimizar a entrega e a interação desses compostos com sistemas biológicos. O objetivo ideal é que o fotossensibilizador se concentre preferencialmente no tecido alvo e seja rapidamente eliminado dos tecidos saudáveis (Fernandes, *et al.*, 2007).

Os fotossensibilizadores podem ser classificados com base em algumas estruturas principais, como porfirinas, clorinas, cianinas e diversos corantes, incluindo azul de toluidina, azul de metileno, azul de dimetileno, rosa bengal e hipericina. Além disso, eles são organizados em gerações de acordo com suas capacidades funcionais: a primeira e a segunda geração já são amplamente conhecidas. Há também uma terceira geração em desenvolvimento, composta por fotossensibilizadores de segunda geração modificados e associados a carreadores de medicamentos e outras moléculas (Mfouo-Tynga, *et al.*, 2021).

Os fotossensibilizadores de primeira geração, geralmente compostos por derivados de porfirinas, começaram a ser utilizados comercialmente na década de 1970.

O Photofrin, um fotossensibilizador de primeira geração composto por um complexo de oligômeros de porfirina, foi aprovado para uso clínico em diversos países da Europa, América e Ásia, além de estar sendo estudado para o tratamento de outras condições malignas e não malignas. Entretanto, seu uso apresenta algumas limitações, como a fotossensibilidade prolongada da pele e a baixa absorção de luz vermelha (Davia, *et al.*, 2021; Mfouo-Tynga, *et al.*, 2021).

A segunda geração de fotossensibilizadores foi criada para superar algumas limitações da primeira geração, como a sensibilidade prolongada da pele, a baixa seletividade pelos tecidos doentes e a fraca absorção na região do espectro responsável pela fotoativação, especialmente fora da faixa ideal no vermelho. Para ser classificado como fotossensibilizador de segunda geração, um composto precisa atender a critérios específicos: apresentar baixa toxicidade na ausência de luz, não induzir fotossensibilidade prolongada, possuir propriedades fotofísicas adequadas, ter uma formulação simples, apresentar farmacocinética favorável, possibilitar uma análise completa de seus componentes e mostrar alta afinidade e penetração no tecido alvo, com mínima interação com tecidos saudáveis (Mfouo-Tynga, *et al.*, 2021; Singh, *et al.*, 2015).

## 2.9 FOTOSSENSIBILIZADORES CLORÍNICOS E AUTO- AGREGAÇÃO

A clorina é considerada um fotossensibilizador de segunda geração promissor, surgido nos anos 1990, concomitantemente ao avanço da era da resistência microbiana. Pertencente à classe das substâncias tetrapirrólicas e derivada das porfirinas, a clorina se distingue pela redução de um dos seus anéis pirrólicos, o que altera a simetria e a conjugação da molécula (Ko; Yun; Kang, 2007).

Essa modificação resulta em uma forte absorção na região do vermelho do espectro UV-Visível, devido ao deslocamento de sua banda Q. As clorinas, frequentemente obtidas a partir da saturação de uma dupla ligação no sistema macrocíclico das porfirinas, apresentam características únicas que, apesar das semelhanças com as porfirinas, as tornam especialmente adequadas para aplicações na Terapia Fotodinâmica (TFD), graças às alterações estruturais causadas pela redução de um anel pirrólico (Pérez-Laguna, *et al.*, 2017; Ribeiro, *et al.*, 2007).



As clorinas e seus derivados são amplamente utilizados como fotossensibilizadores (FS) devido à sua absorção na faixa do espectro visível. Essas moléculas destacam-se por apresentarem um estado de excitação tripleto com vida longa, eficiente fototoxicidade e alta seletividade ao tecido doente (Pérez-Laguna, *et al.*, 2017). Além disso, possuem baixa toxicidade, pois são facilmente eliminadas dos tecidos e fluidos sanguíneos. Outro ponto relevante é sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) de forma eficiente por meio da absorção de fótons. Esses compostos porfirínicos apresentam padrões intracelulares variados, localizando-se predominantemente em lisossomos e mitocôndrias devido à sua estrutura lipofílica (Davia, *et al.*, 2021; Singh, *et al.*, 2015).

No entanto, a maioria dos medicamentos fotossensíveis, incluindo as clorinas utilizadas na terapia fotodinâmica, possuem algumas limitações como a auto-agregação. Devido à ampla nuvem eletrônica e planicidade dos cromóforos, ocorre uma forte interação entre as nuvens  $\pi$ . Esta interação ( $\pi \rightarrow \pi$ ) desabilita o estado excitado por níveis vibracionais, o que induz a auto agregação. Os compostos não são fotoestáveis e em soluções simples, bem como em ambientes complexos, os fotossensibilizadores sofrem degradação diminuindo sua absorbância inicial e intensidade de fluorescência, comprometendo sua eficácia (Ko, *et al.*, 2007).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 METODOLOGIAS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- **Ressonância Magnética Nuclear (RMN):** Os espectros de RMN foram determinados em um equipamento BRUKER 500MHz e em um Varian 300MHz e inspecionados com a ajuda do software Mestre-C (versão 5.0).
- **Espectrofotômetro (UV-Visível):** Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-240-PC) em cubetas de quartzo com caminhos ópticos de 0,4 e 1,0cm e as densidades óticas do microrganismo em estudo foram obtidas através de um espectrofotômetro Micronal (B 582) ericubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0cm.
- **Equipamento de detecção de oxigênio singlete por emissão no Infravermelho Próximo:** O oxigênio singlete foi caracterizado através do seu decaimento no infravermelho próximo (a 1270nm) e o espectro de emissão registrado de 1200 a 1320nm.
- **Agitador orbital:** as amostras depositadas nas placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano utilizadas para o estudo do fotossensibilizador foram agitadas durante 05 minutos em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil).
- **Câmara de fluxo laminar:** foi utilizada durante a manipulação do microrganismo.
- **Microscópio de Fluorescência Confocal LSM 510 (Zeiss):** foi utilizado para captura das imagens de internalização do fotossensibilizador.
- **Sistema Diodo Laser:** Como fonte de luz foi utilizado um equipamento diodo laser da marca Laser Line, modelo PLD-1/50, com comprimento de onda de 660nm, operando a uma potência de 50mW, área de emissão de 0,04cm<sup>2</sup> em dose de 100J

A caracterização estrutural foi determinada por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, os espectros foram registrados em um espectrômetro tipo Bruker 500 a 513MHz e 125,77MHz. Os espectros foram obtidos em CDCl<sub>3</sub> (Aldrichi ou Acros) utilizando TMS como referência interna. Os deslocamentos estão determinados em partes por milhão (ppm):  $\delta$ .

Os espectros de massa foram obtidos com alta resolução (quatro casas decimais) por injeção direta em elétron spray, em um MicroTOF Ic Bruker Daltonics, Capillary: 4000V, Nebulizer.

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-240-PC) em cubetas de quartzo com caminhos óticos de 0,1 e 1,0cm.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Spex (Fluorolog 0,81m) em modo ângulo reto, com as 4 fendas (2 de excitação e 2 de emissão) ajustadas com aberturas em 5mm. A excitação foi realizada em 500nm, com absorção ajustada para valores menores que 0,1.

O oxigênio singlete foi caracterizado através do seu decaimento no infravermelho próximo (a 1270nm) e espectro de emissão registrado de 1200 a 1320nm. A quantificação foi realizada através dos transientes de emissão em 1270nm, em um equipamento composto por um laser Nd-YAG Continuum Surelite III pulsado em 532nm, com tempo de duração de pulso de 5ns e energia  $\leq 5\text{mJ/pulso}$ ; um monocromador e uma fotomultiplicadora (PMT) Hamamatsu modelo R5509 resfriada a  $-80^\circ\text{C}$ ; um sistema de detecção composto por uma placa de aquisição rápida modelo Becker & Hickl GmbH MAS - 300. O sistema foi montado pela *Endinburg Analytical Instruments*.

## 3.2 SÍNTESES

### 3.2.1 Síntese de 1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona (fenilmaleimida)

A uma solução de 3mg (0,03mol) de anidrido maleico em 40,0mL de éter etílico, em banho de gelo, adicionou-se 3mol de anilina dissolvida em éter etílico. O precipitado formado, o ácido amiânico, foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. Uma solução de 0,24g (0,0014mol) de acetato de sódio anidro e 30ml de anidrido acético foi preparada e deixada em banho de óleo ( $=70^\circ\text{C}$ ) seguido da adição do ácido amiânico obtido da reação de adição da amina ao anidrido maléico. A reação foi acompanhada por TLC. Após o término,  $\geq 12$  horas, a maleimida resultante foi precipitada em água e gelo, com intensa agitação, em seguida foi filtrado a vácuo e lavado com água. Após a secagem o produto foi purificado em coluna, usando sílica gel (230-70 mesh) como suporte e

diclorometano/acetato de etila como fase móvel. Após a cromatografia a maleimida foi cristalizada e caracteriza por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e massa de alta resolução.

### 3.2.2 Síntese da MCHC–Chlorin

A Clorina foi sintetizada a partir de fenilmaleimida e Protoporfirina IX dimetil ester (Pp IX Ester), através da reação de Diels-Alder em um reator selado, usando tolueno anidro como solvente, e atmosfera inerte. O sistema foi mantido em banho de óleo por um período de 12 horas a 120°C. A reação foi monitorada por TLC e UV-Vis em 666nm (banda de clorina). Após o término a reação foi purificada em coluna cromatográfica com sílica gel (Across 0,060-0,200mm 60Å) usando CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 25:1 como fase móvel. Por este processo foi isolado o produto, e recuperado o excesso de reagentes. O produto da reação, dois isômeros (A e B), foram separados por TLC preparativa em placas de 20cm (0,2mm de diâmetro) de sílica gel marca Across, 2-25um 60 A, usando CHCl<sub>3</sub>/AcOEt. 25:1 como fase móvel. A caracterização dos isômeros em clorinas de anel A e anel B, foi realizada de forma inequívoca por RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT 135). Todos os produtos obtidos foram caracterizados por espectrometria de massa de alta resolução, por injeção direta em eletro spray.

### 3.2.3 Linhagem do fungo e meios de cultura

Para determinação da atividade antifúngica dos fotossensibilizadores foi empregada a cepa da espécie *Trichophyton rubrum* ATCC (*American Type Culture Collection*) 28188.

Para o cultivo foram empregados os meios Agar Sabouraud-Dextrose (ASD) e meio líquido Triptecaseína de Soja (TSB).

### 3.2.4 Cultivo do *Trichophyton rubrum*

A cepa de *Trichophyton rubrum* foi cultivada em meio ASD, incubado a 28°C por sete dias, para o crescimento das colônias. Deste cultivo foi retirado o micélio e cultivado em placas em meio líquido TSB.

### **3.2.5 Preparo de *Trichophyton rubrum* para ensaios *in vitro***

Após o cultivo de *T. rubrum* em meio TSB por 72 horas o meio foi centrifugado (4.000 rpm por 5 minutos) para lavagem das células fúngicas. O sobrenadante foi desprezado e o material celular precipitado foi ressuspenso em solução de NaCl (0,5%) esterilizada e novamente centrifugado (4.000 rpm por 5 minutos). Este procedimento foi repetido 5 vezes para garantir a assepsia da amostra. Após a 5ª lavagem, os conídios foram ressuspenso em tubo de ensaio estéril contendo 1 ml de solução salina e agitado em vórtex por 1 minuto. Esta suspensão foi diluída em solução de NaCl estéril (0,5%) e homogeneizada em vórtex.

### **3.2.6 Microscopia de fluorescência**

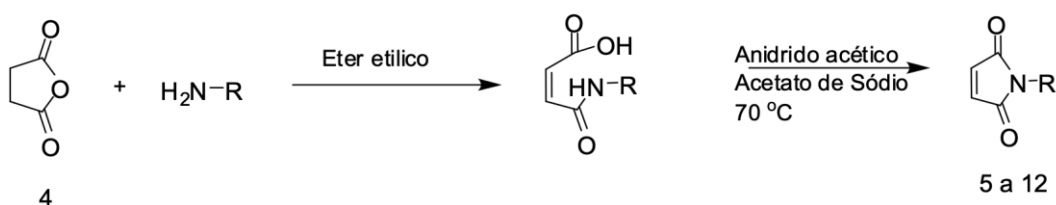
Para o estudo foram utilizadas culturas em meio TSB de *T. rubrum* obtidas após incubação de 6 horas, a 28°C com MCHC-Chlorin na concentração de 10µM. Após a incubação, a amostra foi centrifugada (150 rpm) e em seguida foram retiradas alíquotas da suspensão, depositadas em lâminas de vidro e cobertas com lamínulas para observação em microscópio de fluorescência (ZEISS AXIOVERT 200), usando objetiva de 40X. As imagens foram registradas em uma câmera Canon Power Shot G10.

## 4 RESULTADOS

### A. Síntese de 1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona (fenilmaleimida)

A fenilmaleimida foi sintetizada com rendimento global de 74%, e caracterizada de forma inequívoca por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O esquema reacional está representado na figura 9.

Figura 9 - Síntese de 1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona



Fonte: Autora (2024)

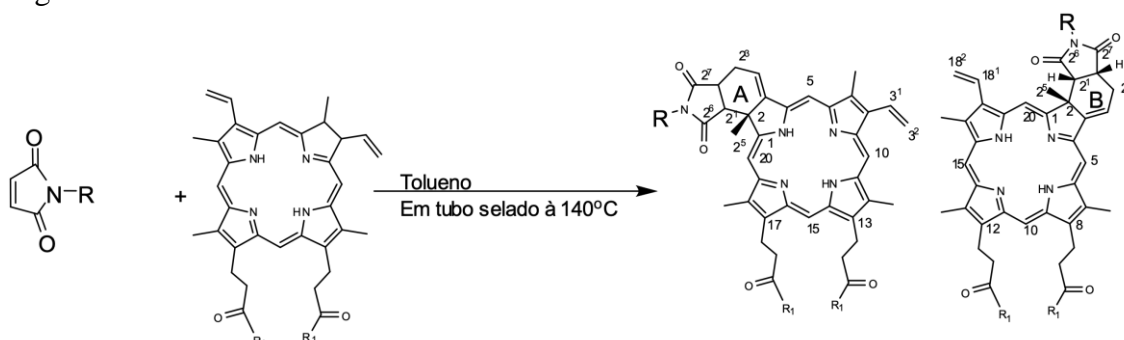
Espectro RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz),  $\delta(\text{ppm})$ : 6.84. (s br, H-2, H-3 vinyl group) 7.33-7.38(m, H-7, H-8 and H-9) 7.45-7.48 (m, H-6 e H-10). NMR  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.77 MHz)

$\delta(\text{ppm})$ :126.03 (2C, C-6 e C-10); 127.93 (C-8); 129.11 (2C, C-7 e C-9); 131.17 (c-5); 134.16 (2C, C-2 e C-3) e 169.47 (2C, C-1 e C-4) HPLC-MS, m/z para  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_2$  calculada 174.0550 foi determinada em 174,0582. O pico base em 206,0827 é referente a abertura do anel imida, e a adição de metanol durante o processo de análise.

### B. Síntese de MCHC-Chlorin

Foi obtida através da ciclo adição (4 + 2) -reação de Diels–Alder - reação já conhecida para obtenção de clorinas. A fenilclorina (clorina de anel A) e (clorina de anel B) foram obtidos pelo processo ilustrado na figura 10, purificados por cromatografia em coluna usando gel de sílica como suporte. Os isômeros foram separados por TLC preparativa. A técnica oferece uma separação perfeita das clorinas de Anel A e B. Em ambas as técnicas, foi utilizado como fase móvel clorofórmio/acetato de etila nas proporções 25:1, conforme figura 10.

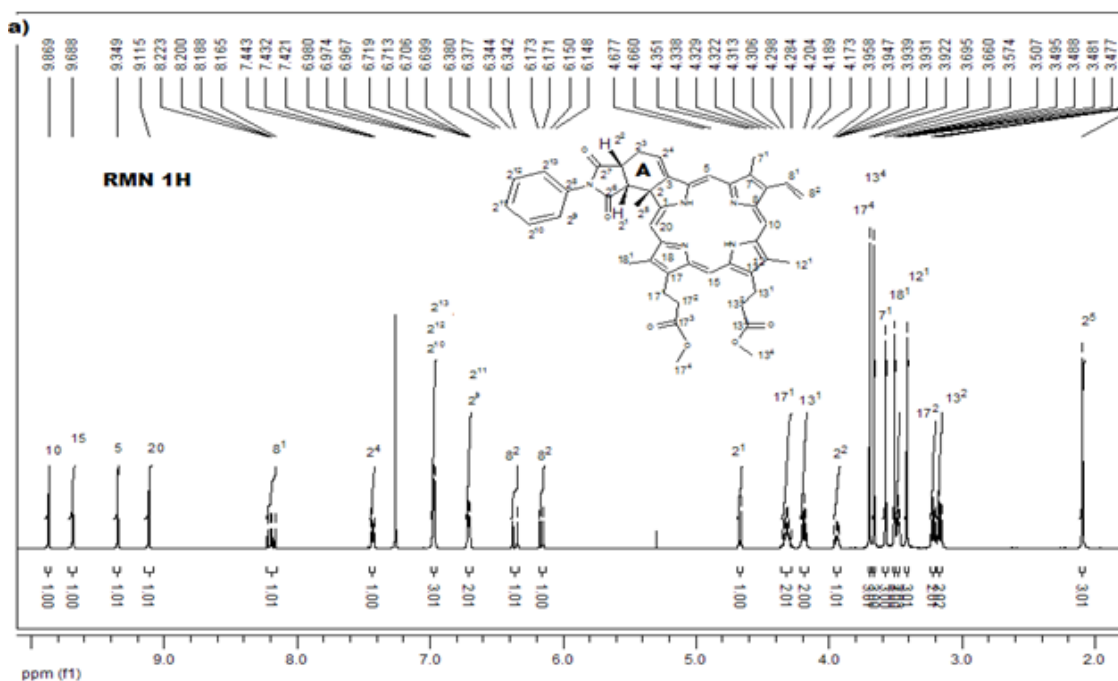
Figura 10 - Síntese da fenilclorina

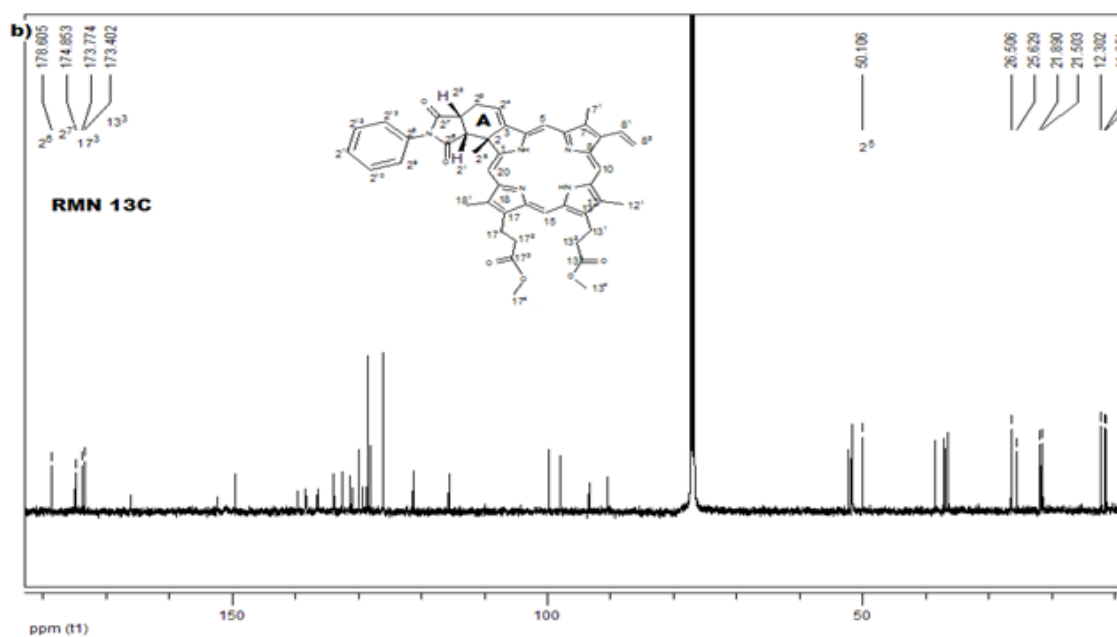


Fonte: Autora (2024).

A MCHC-Chlorin foi obtida pela primeira vez por Uchoa A.F. et al em 2011 (JOC 2011). Este processo oferece como inovação a obtenção de compostos com estruturas rígidas.

A fenilclorina A foi isolada na mancha inferior, com R<sub>f</sub> de 0,38. A caracterização estrutural foi realizada de forma inequívoca por RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DPET 135) e 2D (COSY, NOESY, HMBC e HSQC) e massa de alta resolução, HPLC-massa. Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C são apresentados na figura 11a e b, para a caracterização inequívoca também foram determinados os espectros, gCosy, gnoesy, gHSQC, gHMBC, e DEPT 135.

Figura 11 a b- Espectros de RMN em CDCl<sub>3</sub> para a fenilclorina A



Fonte: Autora (2024)

a)  $^1\text{H}$  a 500.13 MHz em  $\text{CDCl}_3$

b)  $^{13}\text{C}$  a 125.77 MHz

A fenilclorina B foi isolada na mancha superior e apresenta  $R_f$  de 0,54. A caracterização estrutural foi realizada de forma análoga à fenilclorina A, por RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DPET 135) e 2D (COSY, NOESY, HMBC e HSQC) e massa de alta resolução, HPLC-massa. Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são apresentados na figura 12a e b. Também foram determinados os demais espectros gCosy, gnoesy, gHSQC, gHMBC, DEP T135.

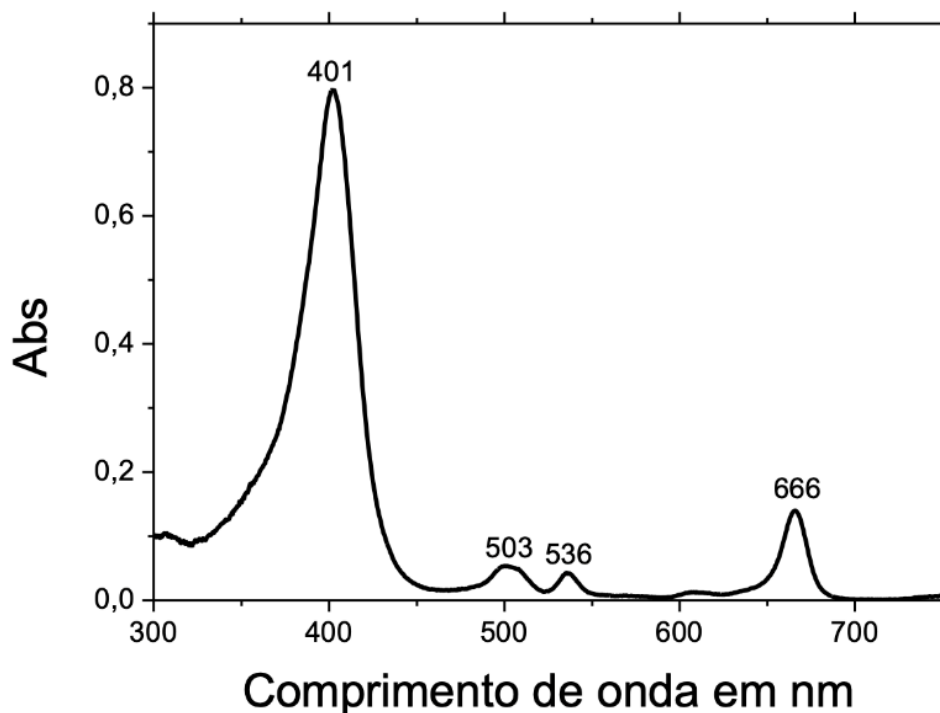




### C. Caracterização Fotofísica

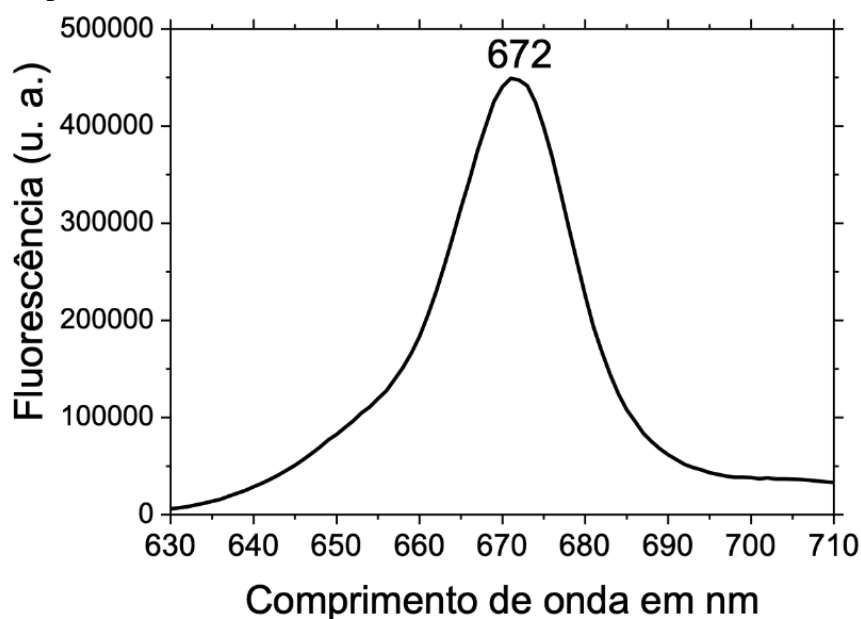
Os espectros UV-Vis e de emissão fluorescente foram obtidos para ambos os compostos em clorofórmio e metanol. As curvas espectrais coincidem para os dois compostos, tanto no espectro de absorção (UV-Vis) quanto no espectro de emissão (fluorescência). O espectro de absorção está apresentado no gráfico 1, enquanto o espectro de emissão fluorescente é apresentado no gráfico 2.

Gráfico 1 – Espectro por UV-Vis da MCHC-Chlorin obtido em metanol.



Fonte: Autora (2024)

Gráfico 2 - Espectro de emissão fluorescente da MCHC-Chlorin obtido em metanol

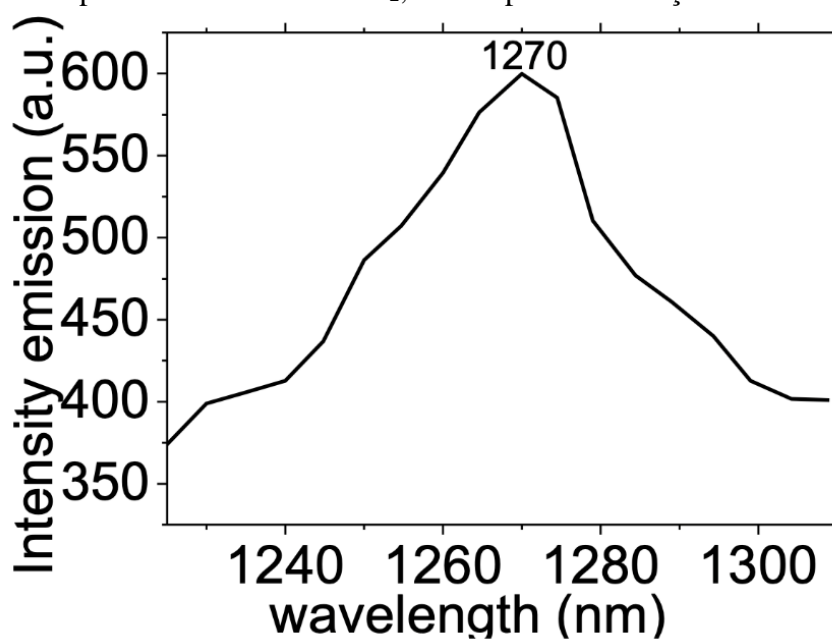


Fonte: Autora (2024)

#### D. Emissão de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ )

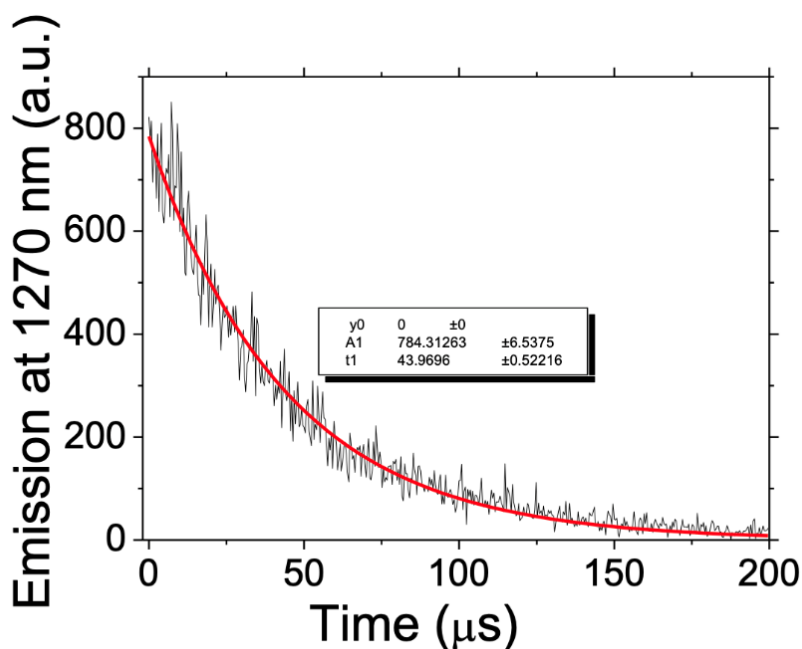
A emissão de oxigênio singlete  $^1\text{O}_2$  foi determinada em soluções de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  na proporção 9:1. Para a quantificação, utilizou-se como referência o oxigênio singlete gerado pela fotoexcitação do azul de metileno, um fotossensibilizador eficaz, cujo rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_\Delta$ ) é bem estabelecido para esse solvente. Os transientes de emissão das amostras e do padrão foram registrados a partir da excitação do composto a 532 nm, utilizando as mesmas condições experimentais (laser, densidade óptica, solvente e aberturas de fenda). A geração do oxigênio singlete foi confirmada por meio da observação do seu espectro de emissão característico. O gráfico 3 apresenta o espectro de emissão de  $^1\text{O}_2$  gerado pela clorina A.

Gráfico 3 - Espectro de emissão de  $^1\text{O}_2$ , obtido por fotoexcitação da Clorina A.



Fonte: Autora (2024)

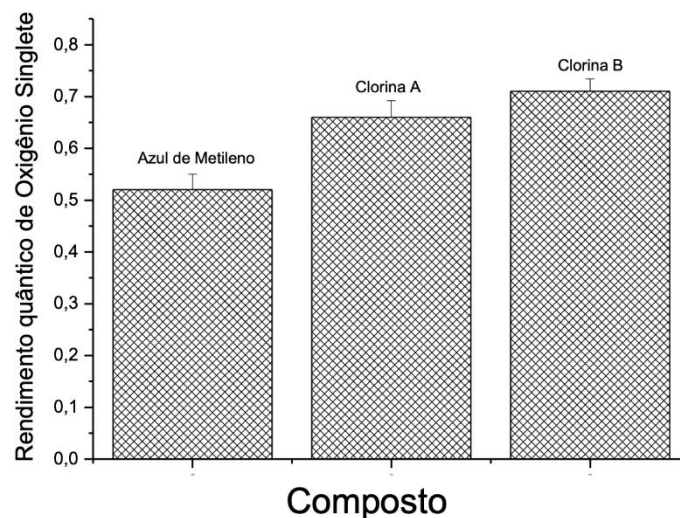
O tempo de vida da espécie ( $^1\text{O}_2$ ) é outra forma de caracterização, sendo determinado por meio do ajuste exponencial da curva de decaimento (gráfico 4). Esse valor está em conformidade com o tempo de vida esperado para  $^1\text{O}_2$  na mistura de solventes  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  na proporção 9:1.

Gráfico 4 - Transiente de decaimento de  $^1\text{O}_2$ , obtido por fotoexcitação da clorina A

Fonte: Autora (2024)

Os resultados obtidos para a Clorina A (gráficos 3 e 4) foram semelhantes aos da Clorina B. Esses dados proporcionam uma caracterização clara da espécie, formada por transferência de energia do estado triplete das novas clorinas para o oxigênio molecular dissolvido na solução, evidenciando o potencial desses compostos como fotossensibilizadores.

Para ambas as clorinas (A e B), assim como para o padrão, os transientes foram obtidos em triplicata, e a média aritmética foi calculada para a determinação do rendimento quântico ( $\Phi\Delta$ ) de oxigênio singlete, conforme apresentado no gráfico 5.

Gráfico 5 - Rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$ , determinado para os compostos clorínicos

Fonte: Autora (2024)

Para a quantificação, utilizou-se como referência o valor inicial do transiente,  $T = 5 \mu\text{s}$  (momento próximo à excitação do laser), registrado em uma escala de tempo reduzida ( $0,05 \mu\text{s}$ ). Esses dados foram empregados na determinação do rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  a partir da fotoexcitação dos compostos. Os rendimentos quânticos de oxigênio singlete foram  $0,66 \pm 0,032$  para a Clorina A e  $0,71 \pm 0,024$  para a Clorina B. Vale ressaltar que esses valores estão dentro da margem de erro, indicando uma tendência levemente superior para o isômero B. Esses resultados são apresentados no gráfico 5.

Além disso, foi verificado que ambos os compostos apresentam rendimentos quânticos superiores aos do padrão azul de metileno. Estes dados contrastam com os encontrados na literatura para a vectroporfirina e as clorinas anfifílicas, onde o rendimento quântico da clorina de anel B é aproximadamente metade do valor obtido para a clorina de anel A.

O valor de  $\Phi\Delta$  é considerado elevado, o que indica que a principal via de desativação desses fotossensibilizadores ocorre por colisão com oxigênio molecular. A soma das vias de desativação é representada pela equação 1. Ao somar as duas principais vias de desativação do estado excitado dessas moléculas (fluorescência e colisão com  $\text{O}_2$ ), e subtrair esse total de 1 (conforme a equação 2), observa-se que as demais possíveis rotas de decaimento são de menor magnitude. A soma de  $\Phi_f + \Phi\Delta$  aproxima-se de 1.

$$\Phi_{\Delta} + \Phi_f + \Phi_{others} = 1 \quad \text{Equação 1}$$

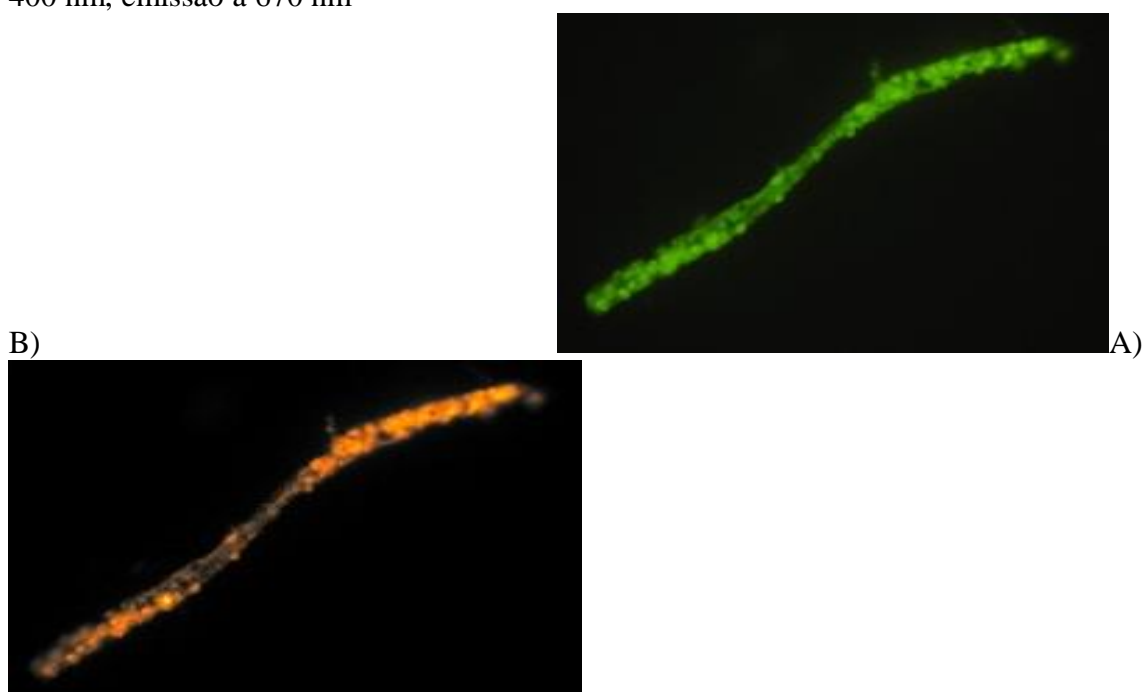
$$\Phi_{others} = 1 - \Phi_{\Delta} - \Phi_f \quad \text{Equação 2}$$

Esses fatores podem ser explicados pela alta rigidez dessas clorinas, o que, para algumas moléculas, resulta em outros decaimentos de magnitude desprezível.

### E. Internalização do composto na membrana celular do fungo

A incorporação da MCHC-Chlorin em *T. rubrum* foi observada por microscopia de fluorescência, observada em vermelho ( $\approx 670$  nm), referindo-se à emissão de Clorina. Esta, foi observada em hifas e conídios, sendo perfeitamente diferenciada da fluorescência natural da espécie, que emite 450 nm quando irradiada no ultravioleta. A Figura 4 mostra a fluorescência por emissão de fluoróforos endógenos e MCHC-Chlorin incorporados em hifas de *T. rubrum*. Como demonstra a Figura 12a e b

Figura 12 a b - a) Fluorescência do fungo excitado em 340nm e emissão em 450nm; b) Fluorescência através da incorporação do fotossensibilizador MCHC-Chlorin, excitado a 400 nm, emissão a 670 nm



Fonte: Autora (2024).

Imagens com uma objetiva de 100x.

## 5 DISCUSSÃO

Na última década, a Terapia Fotodinâmica (TFD) evoluiu de um método experimental para uma abordagem consolidada na prática terapêutica dermatológica. No caso das onicomicoses, verificou-se diversos benefícios comparado à terapia antimicrobiana convencional, principalmente pelo fato de demonstrar ser improvável o desenvolvimento de resistência ao fungo, pois os produtos da fotoativação, como o oxigênio singlete e outros tipos de radicais livres, atuam *in situ* e afetam uma ampla gama de alvos, indo de encontro aos achados em outros estudos. Outro fato relevante é a ausência de efeitos colaterais e adversos relatados na TFD, diferentemente do que ocorre com a terapêutica convencional, onde estes são uma das principais causas da baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes (Alberdi; Gómez, 2019; Uchoa, *et al.*, 2011).

Todavia, uma das áreas de pesquisa essenciais para aprimorar e expandir o uso da Terapia Fotodinâmica (TFD) é o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. A eficácia da TFD depende não apenas da geração de oxigênio singlete, mas também da capacidade do fotossensibilizador de se integrar adequadamente ao tecido doente. Um fotossensibilizador eficaz deve interagir bem com os sistemas biológicos, especialmente com as membranas celulares. Portanto, criar substâncias que facilitem essa interação é crucial para o avanço de fotossensibilizadores mais eficazes (Ko, *et al.*, 2007; Ortiz; Avram; Wanner, 2014).

É de grande importância que o Fs atenda a um conjunto de propriedades gerais para ser considerado uma droga comercialmente viável e eficaz na sua ação terapêutica, na literatura encontramos as principais características que um Fs deve possuir: 1) Absorção na janela fototerapêutica (600-800 nm); 2) características fotofísicas favoráveis: alto rendimento quântico de formação de tripletes de oxigênio singlete e pequena constante de supressão destes; 3) Baixa citotoxicidade no escuro; 4) Farmacocinética favorável e fácil eliminação pelo organismo, evitando fotossensibilidade prolongada. 5) Formulação definida, permitindo estabelecer a relação entre a estrutura e a atividade; 6) Solubilidade em meio fisiológico, facilitando a aplicação da droga; 7) Facilidade de obtenção em escala industrial, com boa reprodutibilidade e custos reduzidos; 8) Permeabilidade em tecido e seletividade; maior afinidade no tecido doente em relação ao tecido saudável (Ko, *et al.*, 2007; Simplicio; Maionchi; Hioka, 2002).



Atualmente, diversos compostos com potencial para terapia fotodinâmica (TFD) estão sendo estudados. No entanto, alguns problemas foram identificados no uso dos fotossensibilizadores de primeira geração, como os complexos de oligômeros de porfirina, incluindo a fotossensibilidade prolongada da pele e a baixa absorção de luz vermelha, que limita a penetração nos tecidos.

Os fotossensibilizadores de segunda geração apresentam períodos de fotossensibilização mais curtos, comprimentos de onda de ativação mais longos e, conseqüentemente, são ativados em camadas mais profundas dos tecidos. Além disso, oferecem maiores rendimentos de oxigênio singlete e maior seletividade. As clorinas, em particular, possuem bandas de absorção nas regiões do vermelho e do infravermelho próximo, o que possibilita uma melhor penetração da luz nos tecidos, tornando esses fotossensibilizadores opções promissoras para a terapia fotodinâmica. (Davia, *et al.*, 2021; Ko, *et al.*, 2007; Ortiz; Avram; Wanner, 2014; Sternberg; Dolphin; Brückner, 1998).

Entretanto, a maioria dos medicamentos fotossensíveis, incluindo as clorinas, que são usados na TFD possuem o fator limitante da auto-agregação. A agregação do composto reduz significativamente sua capacidade de gerar oxigênio singlete devido às fortes interações entre macrocíclicos aromáticos, ao extenso sistema  $\pi$  conjugado e à planaridade dos cromóforos. Essas interações intermoleculares do tipo Van der Waals levam à autoagregação. Além disso, os fotossensibilizadores não são fotoestáveis e, em soluções simples ou ambientes complexos, sofrem degradação, resultando na diminuição de sua absorbância inicial e da intensidade de fluorescência (Gupta; Dwarakanath; Jain, 2003; Rotomskis, *et al.*, 1998).

Uma maneira de resolver esta problemática, é a síntese de uma nova classe de Fs clorínicos que não sejam autoagregativos, já que a interação com as membranas celulares pode concentrar Fs e deslocar o equilíbrio monômetro/agregado por conta da forte interação entre sistemas  $\pi$  dos macrociclos poliaromáticos, sobretudo, no ambiente biológico, onde existe maior dificuldade em controlar tais eventos. Assim, a estratégia mais eficaz consiste em prevenir a agregação diretamente no tecido-alvo, utilizando moléculas cuja estrutura molecular impeça essa formação.

A agregação desativa o estado excitado das moléculas, resultando na diminuição da capacidade de gerar oxigênio singlete, estados tripletos e rendimentos quânticos de

fluorescência, o que compromete a eficácia do processo de fotossensibilização. Com esse objetivo, vários autores têm sugerido o uso de grupos periféricos volumosos para reduzir e otimizar a interação entre solvente e soluto. A reação de Diels-Alder, descrita aqui, entre o éster dimetílico de protoporfirina IX e fenil maleimidas, tem sido empregada para induzir uma adição endo por estabilização orbital secundária. Essa abordagem resulta em fotossensibilizadores com substituintes mais volumosos e um núcleo menor, permitindo a síntese de novas moléculas de clorinas com uma estrutura não planar e rígida do tipo "L", que demonstram a capacidade de impedir completamente a agregação, mesmo em altas concentrações, além de garantir a afinidade e a internalização na membrana celular do fungo (Boyle; Dolphin, 1996; Ko, *et al.*, 2007; Lopes; Veiga; Uchoa, 2022; Taniguchi; Lindsey, 2017).

Esse fato foi confirmado pela alta solubilidade dos compostos em solventes de diferentes polaridades. Ensaio biológicos preliminares indicam uma excelente permeabilidade da MCHC-Chorina em *T. rubrum*. A fluorescência em 670 nm confirma a incorporação e internalização da MCHC-Chorina nesse fungo, viabilizando a terapia com este novo fotossensibilizador. Embora processos semelhantes tenham sido observados com outros fotossensibilizadores, este se destaca por sua fotofísica otimizada, apresentando um rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi\Delta$ ) de 0,71 e um rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) de 0,16.

## 6 CONCLUSÃO

A obtenção da MCHC-Chlorin, nova classe de fotossensibilizadores clorínicos isentos de auto-agregação, abre uma nova janela para o desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica e fotodiagnóstico. A ausência de auto-agregação, apresenta vários ganhos, dentre eles: melhor solubilidade por maximização da interação solvente/soluto, fotofísica otimizada, com excelente  $\Phi\Delta$  e  $\Phi_f$  e excelente permeabilidade nas hifas de *Trichophyton rubrum*, o qual foi comprovado por microscopia de fluorescência.

## REFERÊNCIAS

- ALBERDI, E.; GÓMEZ, C. Efficiency of methylene blue mediated photodynamic therapy versus intense pulsed light in the treatment of onychomycosis in the toe-nails. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, Copenhagen, v. 35, n. 2, p. 69-77, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30168611/>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- ALMEIDA, L. M. M., *et al.* Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 249-55, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000300006>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- AMEEN, M., *et al.* British Association of Dermatologists guidelines for the management of onychomycosis. **The British journal of dermatology**, Oxford, v. 171, p. 937-958, 2014. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2133](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2133). Acesso em: 8 fev. 2024.
- AMIR, I.; FOERING, K. P.; JASON, B. Revisiting office-based direct microscopy for the diagnosis of onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 72, n. 5, p. 909-10, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/01909622>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- ARAÚJO, A. J. G. *et al.* Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000300006>. Acesso em: 7 fev. 2024.
- BANFI, S., *et al.* Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford, v. 12, n. 18, p. 4853-4860, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15336264/>. Acesso em: 15 mai. 2024.
- BARAN, R.; BERKER, D. Science of the Nail Apparatus. *In*: BARAN, R., *et al.* **Diseases of the Nails and their management**. Hoboken: Wiley-Blacwell, 2012.
- BAROT, B. S., *et al.* Drug Delivery to the Nail: Therapeutic Options and Challenges for Onychomycosis. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, New York, v. 31, n. 6, p. 459-494, 2013. Disponível em: <http://www.begellhouse.com/journals/critical-reviews-in-therapeutic-drug-carrier-systems.html>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- BONTEMS, O.; HAUSER, PM.; MONOD, M. Evaluation of a polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. **The British journal of dermatology**, Oxford, v. 161, n. 4, p. 791-796, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19558597/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

BOYLE, R.W.; DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochemistry and photobiology**, Augusta, v. 64, n. 3, p. 469-485, 1996. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1751-1097](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1751-1097). Acesso em: 9 fev. 2024.

BRASCH, J. *Var. raubitschekii of Trichophyton rubrum* as a cause of tinea in Germany. **Mycoses**, Berlin, v. 50, n. 2, p. 2-5, 2 ago. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01423.x>. Acesso em: 8 fev. 2024.

CHANYACHAILERT, P.; LEEYAPHAN, C.; BUNYARATAVEJ, S. Cutaneous Fungal Infections Caused by Dermatophytes and Non-Dermatophytes: An Updated Comprehensive Review of Epidemiology, Clinical Presentations, and Diagnostic Testing. **Journal of fungi**, Basel, v. 9, n. 6, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/journals/?term=101671827>. Acesso em: 18 mai. 2024.

CHRISTENSON, JK., *et al.* Challenges and Opportunities in the Management of Onychomycosis. **Journal of Fungi**, Basel, v. 4, n. 3, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30042327/>. Acesso em: 21 fev. 2024.

COSTA, P. S., *et al.* In Vitro and Ex Vivo Biofilm-Forming Ability of *Rhinocladiella similis* and *Trichophyton rubrum* Isolated from a Mixed Onychomycosis Case. **Journal of Fungi**, Basel, v. 9, n. 7, p. 696, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof9070696>. Acesso em: 15 mar. 2024.

DAVIA, K., *et al.* A porphyrin–ruthenium photosensitizer as a potential photodynamic therapy agent. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 11, n. 5, p. 584-586, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138770030800083X>. Acesso em: 6 fev. 2024.

DEPRY, J. *et al.* Phototherapy-related ophthalmologic disorders. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 33, n. 2, p. 247-255, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.017>. Acesso em: 6 fev. 2024.

ELEWSKI, B. E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and manangement. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 415-429, 1998. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/journals/?term=8807282>. Acesso em: 18 mai. 2024.

FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 149, n. 65, p. 1-4, 2003. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2133](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2133). Acesso em: 6 fev. 2024.

FERNANDES, A. U.; BAPTISTA, M. S. Terapia fotodinâmica: Mecanismos e perspectivas de desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. **Jornal Brasileiro de Laser**, v. 1, p. 10-22, 2007;11.

FINCH, J. J.; WARSHAW, E. M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. **Dermatology Therapy**, Copenhagen, v. 20, n. 16, p. 31-46, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17403258/>. Acesso em: 6 fev. 2024.

FOSS, N. T. *et al.* Dermatoses em pacientes com diabetes mellitus. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 4, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-89102005000400024>. Acesso em: 8 abr. 2024.

GIANNI, C., *et al.* Usefulness of Histological Examination for the Diagnosis of Onychomycosis. **Dermatology**, [S.l.], v. 202, n. 4, p. 283-208, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11455138/>. Acesso em: 16 out. 2024.

GRÄSER, Y.; CZAIKA, V.; OHST, T. Diagnostic PCR dermatophytes – an overview. *Journal of the German Society of Dermatology*, Berlin, v. 10, n. 10, p. 721-725, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23013298/>. Acesso em: 16 out. 2024.

GUPTA, A. K., *et al.* Global perspectives for the management of onychomycosis. *International Journal of Dermatology*, [S.l.], v. 58, n. 10, p. 1118-1129, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30585300/>. Acesso em: 6 fev. 2024.

GUPTA, A. K., *et al.* Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment. *Journal of American Academy of Dermatology*, [S.l.], v. 66, n. 3, p. 494-502, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19558597/>. Acesso em: 8 fev. 2024.

GUPTA, A. K.; NAKRIEKO, K. A. Molecular Determination Of Mixed Infections of Dermatophytes and Nondermatophyte Molds in Individuals with Onychomycosis. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, Washington, v. 104, n. 4, p. 330-336, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24960191/>. Acesso em: 8 fev. 2024.

GUPTA, A. K.; SIMPSON, F. C. Diagnosing onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 31, n. 5, p. 540-543.75, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000400016>. Acesso em: 6 fev. 2024.

GUPTA, S.; DWARAKANATH, B. S.; JAIN, V. Cellular uptake, localization and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in human glioma and squamous carcinoma cell lines. **Journal of photochemistry and photobiology**, Lausanne, v. 69, n. 2, p. 107-120, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-photochemistry-and-photobiology-b-biology>. Acesso em: 6 fev. 2024.

HAY, R. J.; BARAN, R. Why should we care if onychomycosis is truly onychomycosis? **The British journal of dermatology**, v. 172, n. 2, p. 313-322, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25660677/>. Acesso em: 6 set. 2024.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011>. Acesso em: 22 fev. 2024.

- ISSA, M.; BOECHAT, M. Photodynamic therapy in Brazil: 10 years of history. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, [S.l.], v. 8, p. 17–22, 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201683102>. Acesso em: 6 mar. 2024.
- KO.; Y.; YUN, K.; KANG, M. K. L. Synthesis and in vitro photodynamic activities of water-soluble fluorinated tetrapyridylporphyrins as tumor photosensitizers. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, Oxford, v. 15, n. 17, p. 2789-2794, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X07002661>. Acesso em: 22 out. 2024.
- KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy: mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 106, p. 1098-1107, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>. Acesso em: 22 out. 2024.
- LIMA K. M. *et al.* Espécies e suscetibilidade antifúngica in vitro de leveduras isoladas em unhas de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. **Revista Ciências Médicas**, Campinas, v. 18, n. 2, 2009. Disponível em: <https://periodicos.puc-campinas.edu.br/cienciasmedicas/article/view/646>. Acesso em: 9 fev. 2024.
- LIMA, K. M.; RÊGO, R. S. M.; MONTENEGRO, F. Diagnósticos clínicos e laboratoriais das onicomioses. **News Lab**, [S.l.], v. 83, p. 186–196, 2007. Disponível em: <https://www.saudedireta.com.br/docsupload/1340450173art02.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- LIPNER, S.R.; SCHER, R. K. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 80, n. 4, p. 835-851, 2019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/01909622>. Acesso em: 10 mai. 2024.
- LOPES, M. W. M.; VEIGA, H. C. G.; UCHOA, A. F. Síntese e Internalização de Fotossensibilizadores de Clorina-MCHC em *Trichophyton rubrum* - Um Estudo Preliminar. In: MARQUES, J. L. B., *et al.* (eds) **IX Congresso Latino-Americano de Engenharia Biomédica e XXVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**. CLAIB CBEB 2022. IFMBE Proceedings, v. 99, 2022. Springer, Cham. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-031-49404-8\\_57](https://doi.org/10.1007/978-3-031-49404-8_57). Acesso em: 6 nov. 2024.
- LOVATTO, C. G.; TOBIAS, F.S.; FAGAN, S. B. Terapia fotodinâmica ativada por raios X por intermédio de nanopartículas cintiladoras: revisão integrativa. **Revista Portuguesa de Oncologia**, [S.l.], 2023. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/376033452\\_TERAPIA\\_FOTODINAMICA\\_A\\_TIVADA\\_POR\\_RAIOES\\_X\\_POR\\_INTERMEDIO\\_DE\\_NANOPARTICULAS\\_CINTILADORAS\\_REVISAO\\_INTEGRATIVA\\_Revista\\_Portuguesa\\_de\\_Oncologia\\_Sociedade\\_Portuguesa\\_de\\_Oncologia\\_-\\_SPO](https://www.researchgate.net/publication/376033452_TERAPIA_FOTODINAMICA_A_TIVADA_POR_RAIOES_X_POR_INTERMEDIO_DE_NANOPARTICULAS_CINTILADORAS_REVISAO_INTEGRATIVA_Revista_Portuguesa_de_Oncologia_Sociedade_Portuguesa_de_Oncologia_-_SPO). Acesso em: 1 abr. 2024.
- MARTELOZO, I.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. Ocorrência de onicomiose em Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Science**, Maringá, v. 27, n. 2, 2005. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3072/307223952012.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2024.

MARTINS, E. A. *et al.* Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 596-598, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000500022>. Acesso em: 12 fev. 2024.

MENDES, S. **Infecções fúngicas e dermatologia**: a função do farmacêutico no apoio à terra. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014. Disponível em: [https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4853/1/PPG\\_21552.pdf](https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4853/1/PPG_21552.pdf). Acesso em: 6 fev. 2025.

MFOUO-TYNGA, I. S., *et al.* Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S.l.], v. 34, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33453423/>. Acesso em: 14 set. 2024.

MILOBRATOVIC, D., *et al.* Quality of life in patients with toenail onychomycosis. **Mycoses**. Berlin, v. 56, n. 5, p. 543-551, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23496237/>. Acesso em: 6 set. 2024.

MUKHERJEE, P.K., *et al.* Clinical *Trichophyton rubrum* Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.l.], v. 47, n. 1, p. 82-86, jan. 2003. American Society for Microbiology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.47.1.82-86.2003>. Acesso em: 6 set. 2024.

OLIVEIRA, D. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, [S.l.], v. 7 n. 1, 2015. Disponível em: <https://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/937>. Acesso em: 6 fev. 2024.

ORTIZ, A. E.; AVRAM, M. M.; WANNER, M. A. A Review of Lasers and Light for the Treatment of Onychomycosis. **Lasers in Medicine Science**, [S.l.], v. 46, n. 2, p. 117-124, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24375507/>. Acesso em: 4 mai. 2024.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, E. O. Investigation on mechanism antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Micology**, Campina Grande. v. 51, n. 5, p. 507-513, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23181601/>. Acesso em: 8 mai. 2024.

PÉREZ-LAGUNA, V., *et al.* Bactericidal Effect of Photodynamic Therapy, Alone or in Combination with Mupirocin or Linezolid, on *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 31, n. 8, p.1002, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01002>. Acesso em: 14 mai. 2024.

REARDON, C. M., *et al.* The surface anatomy of the germinal matrix of the nail bed in the finger. **The journal of hand surgery : journal of the British Society for Surgery of the Hand**, Edinburgh, v. 24, n. 5, p. 531-533, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/02667681>. Acesso em: 8 mai. 2024.



RIBEIRO, C. M., *et al.* Photodynamic inactivation of oral paracoccidiodomycosis affecting woman with systemic lupus erythematosus: An unusual case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S.l.], v. 17, n. 1, pp. 160-163, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.12.006>. Acesso em: 12 fev. 2024.

RIBEIRO, M. S., *et al.* Laser em Baixa Intensidade. In: MAIO, M. (Org.). **Tratado de Medicina Estética**. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, 2011. Disponível em: <https://www.ipen.br/biblioteca/2011/17988.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2024.

RICH, P.; SCHER, R. K. Nail Anatomy and Basic Science. In: RICH, P. **An Atlas of Diseases of the Nail**. New York: Parthenon Publishing, 2005, p 1-4.

RODRIGUES, E. R. **Estudo da ação de extratos vegetais de *Pothomorphe umbellata* E drogas antifúngicas sobre linhagens de *Trichophyton rubrum* e análise da expressão proteica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-. Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

ROTOMSKIS, R., *et al.* Phototransformation of sensitizers: 3. Implications for clinical dosimetry. **Lasers Medical Science**, [S.l.], v. 13, n. 4, p. 271–278, 1998. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s101030050007>. Acesso em: 18 mai. 2024.

SANT'ANA, E. **Fotobiomodulação e aplicabilidades em estética**. 1. ed. São Paulo: Triall Editorial, 2018.

SANTO, R. B. D. E. **Estudo De Casos De Pacientes Portadores De Onicomiose Tratados Com Laser Nd: YAG 1.064 Nm**. Dissertação (Mestrado em Doenças Infeciosas)- Universidade Federal Do Espírito Santo, Espírito Santo, 2014. Disponível em: <https://docplayer.com.br/3566207-Estudo-decasos-de-pacientes-portadores-de-onicomiose-tratados-com-laser-nd-yag-1-064-nm.html>. Acesso em: 6 fev. 2024.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal Of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/journals/?term=7505564>. Acesso em: 12 mai. 2024.

SCHECHTMAN, R. C. Nondermatophytic Filamentous Fungi Infection in South America Reality or Misdiagnosis? **Dermatologic clinics**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 271-283, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19558597/>. Acesso em: 6 set. 2024.

SCHER, R. K. Onychomycosis: a significant medical disorder. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 35, n. 3 (Part 2), S2–S5, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8784302/>. Acesso em: 11 mai. 2024.

SIDRIM, J. J. C., *et al.* Successive Mycological Nail test for Onychomycosis: A Strategic Diagnose to Improve Efficiency. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 333-337, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000400016>. Acesso em: 9 set. 2024.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, J. F. G.; **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A, 2004.

SILVA, A. P. D. **Inativação dos micro-organismos causadores da onicomiose por terapia fotodinâmica** - estudo in vitro e clínico. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-30042013-142038/pt-br.php>. Acesso em: 6 fev. 2024.

SILVA, A. P. D. **Inativação dos micro-organismos causadores da onicomiose por terapia fotodinâmica - estudo in vitro e clínico**. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-30042013-142038/pt-br.php>. Acesso em: 6 fev. 2024.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, Campinas, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500016>. Acesso em: 13 mar. 2024.

SINGH, S., *et al.* Glycosylated Porphyrins, Phthalocyanines, and Other Porphyrinoids Diagnostics and Therapeutics. **Chemical Reviews. American Chemical Society**, [S.l.], v. 115, n. 18, p. 10261–306, 2015. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.5b00244>. Acesso em: 17 abr. 2024.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Tetrahedron. **Science Direct**, [S.l.], v. 54, n. 17, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/tetrahedron/vol/54/issue/17>. Acesso em: 15 jun. 2024.

TANIGUCHI, M.; LINDSEY, J. Synthetic chlorins, possible surrogates for chlorophylls, prepared by derivatization of porphyrins. **Chemical reviews**, Easton, v. 117, n. 2, p. 344-535, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-031-49404-8\\_57](https://doi.org/10.1007/978-3-031-49404-8_57). Acesso em: 19 set. 2024.

TOMÉ, R. Trichophyton Rubrum. **Atlas Micologia**, Coimbra, 2012. Disponível em: <https://atlasmicologia.blogspot.com/2012/01/trichophyton-rubrum.html>. Acesso em: 21 out. 2024.

UCHOA, A. F., *et al.* Chlorin Photosensitizers Sterically Designed To Prevent Self-Aggregation. **The Journal of Organic Chemistry**, [S.l.], v. 76, n. 21, p. 8824–8832, 2011. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jo201568n>. Acesso em: 6 fev. 2024.

WARSHAW, E. M., *et al.* Pulse versus continuous terbinafine for onychomycosis: a randomized, doubleblind, controlled trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 53, n. 4, p. 578-84, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/01909622>. Acesso em: 6 set. 2024.

WILSMANN-T., D., *et al.* New reasons for histopathological nail-clipping examination in the diagnosis of onychomycosis. **ournal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 235-237, 2010. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1468-3083](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1468-3083). Acesso em: 2 mai. 2024.

ZHANG, Y. *et al.* A case series pilot study on the combination of 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy (ALA-PDT) for treatment of vitiligo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 4, p. 539-545, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187014>. Acesso em: 11 fev. 2024.

ZOOK, E. G. Anatomy and physiology of the perionychium. **Hand Clinics**, Philadelphia, v. 18, n. 4, 553-559, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/07490712>. Acesso em: 21 set. 2024.