

Camila Guedes Francisco

Avaliação da eficácia de agentes antifúngicos e do tratamento fotodinâmico antimicrobiano em conídios, micélios e biofilmes de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara/SP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Co-orientador: Gilberto Úbida Leite Braga

Araraquara/SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Francisco, Camila Guedes
F818a Avaliação da eficácia de agentes antifúngicos e do tratamento fotodinâmico antimicrobiano em conídios, micélios e biofilmes de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* / Camila Guedes Francisco. – Araraquara : [s.n.], 2020
97 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães
Coorientador: Gilberto Úbida Leite Braga

1. Biofilmes. 2. Fungos filamentosos. 3. *Aspergillus*.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

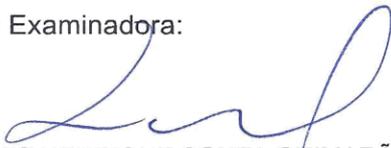
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Avaliação da eficácia de agentes antifúngicos e do tratamento fotodinâmico antimicrobiano em conídios, micélios e biofilmes de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*"

AUTORA: CAMILA GUEDES FRANCISCO

ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

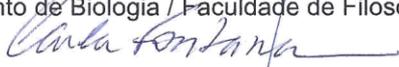
COORIENTADOR: GILBERTO UBIDA LEITE BRAGA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



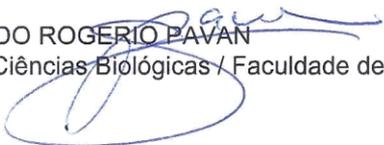
Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto



Prof.^a Dr.^a CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 20 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Camila Guedes Francisco

Nome em citações bibliográficas: FRANCISCO, C. G.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP. Avenida dos Bandeirantes, 3900, Vila Monte Alegre, 14040-901 – Ribeirão Preto/SP – Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2018 – Atual – Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título “Avaliação da eficácia de agentes antifúngicos e do tratamento fotodinâmico antimicrobiano em conídios, micélios e biofilmes de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*”. Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães. Coorientador: Prof Dr. Gilberto Úbida Leite Braga.

2011 – 2015 – Graduação em Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título: Avaliação de óxidos de grafenos em culturas de osteoblastos: uma nova abordagem para o estudo da biomineralização. Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2012 – Biologia Marinha (Carga horária: 36h)

Semana da Ciência e Tecnologia Agropecuária, SECITAP, UNESP, Brasil.

2014 – Filogeografia (Carga horária: 4h)

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UESP, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA/ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2016 – 2016 – Bolsista FAPESP, treinamento técnico TT3
Verdartis – Desenvolvimento Biotecnológico, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

ZANCANELA, DANIELA C.; SIMÃO, ANA MARIA S.; FRANCISCO, **CAMILA G. F.**; DE FARIA, AMANDA N.; RAMOS, ANA PAULA; GONÇALVES, ROGÉRIA R.; MATSUBARA, ELAINE Y.; ROSOLEN, JOSÉ MAURÍCIO; CIANCAGLINI, PIETRO. Graphene oxide and titanium: synergistic effects on the biomineralization ability of osteoblast cultures. JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE. MATERIALS IN MEDICINE (DORDRECHT. ONLINE), v. 27, p. 70-78, 2016.

Apresentação de Trabalhos

FRANCISCO, C. G.; BRAGA, G. U. L.; GUIMARAES, L. H. S. Effect of Anphotericin B and Miconazole on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* biofilms. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

FRANCISCO, C. G.; Zancanela D.C; SIMÃO, A. M. S.; MATSUBARA, E. Y.; ROSOLEN, J. M.; CIANCAGLINI, P. Cell viability of osteoblasts grown in the presence of graphene oxide. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

X Jornada Anual Biológica da UNESP. Jaboticabal-SP, 17 a 21 de outubro de 2011. (Simpósio).

VII CEBIO- COLÓQUIO SOBRE EDUCAÇÃO DA BIOLOGIA. Jaboticabal-SP, 6 a 10 de junho de 2011. (Simpósio).

VIII CEBIO- COLÓQUIO SOBRE EDUCAÇÃO DA BIOLOGIA. 2012. Jaboticabal-SP, 14 a 18 de maio de 2012. (Simpósio).

Nanotecnologia e Saúde. Ribeirão Preto-SP, 9 de dezembro de 2013. (Seminário).

IX Colóquio Sobre Educação da Biologia. Jaboticabal-SP, 3 a 7 de junho de 2013. (Congresso).

XVII Simpósio de Genética. São José do Rio Preto-SP, 29 a 31 de outubro de 2014. (Simpósio).

VII Latin American Postgraduate Program of Biophysics Course. Caxambu-MG, 26 a 27 de agosto de 2014. (Congresso).

30° Congresso Brasileiro de Microbiologia. Maceió- AL, 6 a 9 de outubro de 2019. (Congresso).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, Vera Lúcia, Carlos, Amanda, Caetano e Gabriel, pelo amor incondicional, compreensão e companheirismo.

Agradecimentos

À minha mãe, Vera, por toda sua dedicação e compenheirismo. Ao meu pai, Carlos, por estar ao meu lado, por me fazer rir quando eu mais preciso. Aos dois, obrigada por dividir essa jornada, tem sido um privilégio.

À minha irmã, Amanda Guedes, por estar sempre ao meu lado. Não posso agradecer sua paciência, mas posso agradecer pelo seu apoio.

Aos meus sobrinhos maravilhosos, Gabriel Guedes e Caetano Guedes, por me fazerem rir de felicidade e nervoso. Amo vocês, obrigado por terem nos escolhido. Ao meu cunhado, pela nossa amizade, por ser o companheiro da minha irmã e o guardião dos meus sobrinhos.

Aos meus cachorros, Marley e Bidu, por mostrarem o amor mais puro, verdadeiro e incondicional. É maravilhoso chegar em casa todos dias e ser recebido por esses seres de amor. À minha vó Lourdes e minhas tias e tios, por terem feito da minha infância um momento mágico. Ao meu primo e prima, sempre estarei aqui por vocês.

Ao prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães e ao prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga, pela oportunidade, confiança depositada, pelos ensinamentos, orientações e paciência. Muito obrigada.

Aos amigos do laboratório. Chadia, Luis Felipe, Isabela, Rayza, Pedro, e Fernanda pelo companheirismo, amizade e risadas. Em especial a Chadia, por toda ajuda, ensinamento e, principalmente, a paciência.

Ao Guilherme Brancini, por me auxiliar pacientemente. Aos técnicos Maurício e Fernando pelo auxílio e apoio.

A Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela disponibilidade para a realização desta pesquisa. Aos funcionários do Insitituto de Química de Araraquara, UNESP, por estarem sempre a disposição quando foi necessário.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os fungos filamentosos são microrganismos encontrados em diferentes ambientes atuando como decompositores nos ecossistemas. Contudo, algumas espécies como *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* podem ser agentes causadores de problemas para outros organismos, como plantas e animais, por causarem doenças ou pela produção de metabólitos secundários tóxicos. Assim como a maioria dos microrganismos, fungos filamentosos são hábeis em se desenvolver sobre superfícies, formando biofilmes. Tais biofilmes são estruturas com características particulares como, por exemplo, a tolerância aos agentes antimicrobianos rotineiramente utilizados, dificultando o controle microbiano. Neste contexto, a busca por estratégias alternativas de controle microbiano, como o Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA), principalmente no que se refere aos biofilmes, é um desafio. Embora seja apontada como uma possibilidade promissora para o controle microbiano, até o momento não foram desenvolvidos estudos para avaliar a eficácia do TFDA em biofilmes de fungos filamentosos desenvolvidos sobre suportes inertes. O TFDA consiste na aplicação de uma molécula fotossensibilizadora sobre o microrganismo alvo, que após ser excitada por um comprimento de onda específico, leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo a morte do microrganismo. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de diferentes agentes antifúngicos convencionais (Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio) e do TFDA em conídios, em micélios livres e biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*. As linhagens de *A. fumigatus* e *A. flavus* foram resistentes aos antifúngicos convencionais analisados, sendo mais susceptíveis ao hipoclorito de sódio. A concentração fungicida mínima (CFM) de anfotericina B (>5000 µg/mL), miconazol (>7500 µg/mL) e hipoclorito de sódio (5 mg/mL) para os biofilmes de *A. flavus* evidenciou que os biofilmes são igualmente susceptíveis, quando comparados aos micélios livres, aos antifúngicos usados. O mesmo ocorreu ao utilizar o miconazol e o hipoclorito de sódio no tratamento de biofilmes e micélios livres de *A. fumigatus*, cujo valores de CFM foram respectivamente >7500 µg/mL e 5000 µg/mL. No entanto, os biofilmes de *A. fumigatus* foram mais resistentes a anfotericina B se comparados aos micélios. Os biofilmes das linhagens de *A. fumigatus* e *A. flavus* avaliadas foram resistentes ao TFDA utilizando azul de metileno e novo azul de metileno como fotossensibilizadores, tanto na presença como na ausência de iodeto de potássio. Houve um aumento na atividade catalásica dos biofilmes de *A. fumigatus* após o TFDA.

Palavras-chaves: antifúngico, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, biofilmes fúngicos, Tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFDA).

ABSTRACT

Filamentous fungi are microorganisms found in different environments acting as decomposers in ecosystems. However, some species such as *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*, may be troublemaking agents for other organisms, such as plants and animals, either by causing disease or by the production of toxic secondary metabolites. Like most microorganisms, filamentous fungi are able to grow on surfaces, forming biofilms. Biofilms are structures with particular characteristics as tolerance to routinely used antimicrobial agents, hindering microbial control. In this context, the search for alternative strategies for microbial control, especially on biofilms, such as the Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT), is a challenge. Although it is pointed out as a promising possibility for microbial control, to date, no studies have been developed to evaluate the effectiveness of APDT in biofilms of filamentous fungi developed on inert supports. The APDT consists of the application of a photosensitizing molecule on the target microorganism, which after being excited by a specific wavelength, leads to the formation of reactive oxygen species (ROS), promoting the death of the microorganism. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the efficacy of different conventional antifungal agents (Amphotericin B, Miconazole and sodium hypochlorite) and APDT in the conidia, in the free mycelia and biofilms of *A. flavus* and *A. fumigatus*. The strains of *A. fumigatus* and *A. flavus* were resistant to the conventional antifungals analyzed, being more susceptible to sodium hypochlorite. The minimum fungicidal concentration (MFC) of *A. flavus* biofilms for amphotericin B (> 5000 µg/mL), miconazole (> 7500 µg/mL) and sodium hypochlorite (5000 µg/mL) showed that biofilms were susceptible, as the mycelia, to the antifungals used. The same occurred using miconazole and sodium hypochlorite for the treatment of biofilms and mycelia of *A. fumigatus*, whose MFC values were respectively >7500 µg/mL and 5000 µg/mL. However, *A. fumigatus* biofilms were more resistant to amphotericin B compared to mycelia. The biofilms of *A. fumigatus* and *A. flavus* strains evaluated were resistant to APDT using methylene blue and new methylene blue as photosensitizers, both in the presence and in the absence of potassium iodide. Increase in the catalytic activity of the catalase of *A. fumigatus* biofilms after APDT was observed.

Keywords: antifungals, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, conidia, fungal biofilms, Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia característica do conidióforo.....	17
Figura 2. Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	21
Figura 3. O modelo de desenvolvimento para biofilmes de fungos filamentosos.....	25
Figura 4. Estrutura química da anfotericina B.	28
Figura 5. Estrutura química do Miconazol.....	29
Figura 6. Ação do hipoclorito de sódio sobre os aminoácidos.	31
Figura 7. Esquema das vias fotoquímicas do TFDA.	33
Figura 8. Fotossensibilizadores fenotiazínicos.....	35
Figura 9. Possíveis alvos moleculares das EROS produzdas pelo TFDA	38
Figura 10. Conjunto de 96 LEDs, com emissão 660-650 nm.....	45
Figura 11. Desenvolvimento de <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir do micélio tratado com Anfotericina B.....	46
Figura 12. Desenvolvimento de <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir do micélio tratado com Miconazol.....	48
Figura 13. Desenvolvimento de <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir do micélio tratados com hipoclorito de sódio	49
Figura 14. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA a partir do micélio tratado com Anfotericina B.....	50
Figura 15. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA a partir do micélio tratado com Miconazol.....	51
Figura 16. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA a partir do micélio tratado com hipoclorito de sódio	52
Figura 17. Desenvolvimento de <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir dos biofilmes tratados com Anfotericina B.....	53
Figura 18. Desenvolvimento <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir de biofilmes tratados com Anfotericina B.....	54
Figura 19. Desenvolvimento de <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir de biofilme tratados com Miconazol.....	55
Figura 20. Desenvolvimento de <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir dos biofilmesvtratados com hipoclorito de sódio	56

Figura 21. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA, a partir dos biofilmes tratados com Anfotericina B.....	57
Figura 22. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA a partir dos biofilmes tratados com Miconazol	58
Figura 23. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA a partir de biofilmes tratados com hipoclorito de sódio	60
Figura 24. Desenvolvimento de <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir das suspensões de conídios tratadas com Anfotericina B.....	61
Figura 25. Desenvolvimento <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir das suspensões de conídios tratadas com Miconazol.....	63
Figura 26. Desenvolvimento de <i>A. flavus</i> em meio BDA a partir das suspensões de conídios tratadas com hipoclorito de sódio	64
Figura 27. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA a partir das suspensões de conídios tratadas com Anfotericina B.....	65
Figura 28. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA a partir das suspensões de conídios tratadas com Miconazol.....	67
Figura 29. Desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA a partir das suspensões de conídios tratadas com hipoclorito de sódio	68
Figura 30. Desenvolvimento de biofilmes de <i>A. flavus</i> em meio BDA, após exposição à luz por 1h e 2h, utilizando AM como FS.	70
Figura 31. Desenvolvimento de biofilmes de <i>A. flavus</i> em meio BDA, após exposição à luz por 1h e 2h, utilizando NAM como FS.....	71
Figura 32. Desenvolvimento de biofilmes de <i>A. flavus</i> em meio BDA, após exposição à luz por 2h, utilizando AM como FS	73
Figura 33. Desenvolvimento de biofilmes de <i>A. flavus</i> em meio BDA, após exposição à luz por 2h, utilizando NAM como FS.....	74
Figura 34. Desenvolvimento de biofilmes de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA, após TFDA por 2 h, utilizando AM como FS.....	76
Figura 35. Desenvolvimento de biofilmes de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA, após TFDA por 2 h, utilizando NAM como FS	77
Figura 36. Desenvolvimento de biofilmes de <i>A. fumigatus</i> em meio BDA, após TFDA por por 2h, utilizando AM como FS.....	79
Figura 37. Desenvolvimento de biofilmes de <i>A. flavus</i> em meio BDA, após TFDA por 2 h, utilizando NAM como FS.....	80

Figura 38. Atividade da catalase extraída de biofilmes de *A. flavus* submetidos ao TFDA com azul de metileno e novo azul de metileno como fotossensibilizadores na presença e na ausência de iodeto de potássio 82

Figura 39. Atividade da catalase extraída de biofilmes de *A. fumigatus* submetidos ao TFDA com azul de metileno e novo azul de metileno como fotossensibilizadores na presença e na ausência de iodeto de potássio 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limite Máximo Tolerado (MTS) de micotoxinas em alimentos	23
Tabela 2. Mecanismo de ação de diferentes classes de agentes antifúngicos	27
Tabela 3. Susceptibilidade <i>in vitro</i> de micélios livres de <i>A. flavus</i> aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.....	48
Tabela 4. Susceptibilidade <i>in vitro</i> de micélios livres de <i>A. fumigatus</i> aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.....	51
Tabela 5. Susceptibilidade <i>in vitro</i> de biofilmes de <i>A. flavus</i> aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.....	55
Tabela 6. Susceptibilidade <i>in vitro</i> de biofilmes de <i>A. fumigatus</i> aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.....	58
Tabela 7. Susceptibilidade <i>in vitro</i> de conídios de <i>A. flavus</i> aos agentes antifúngicos Anfoterici-na B, Miconazol e hipoclorito de sódio.....	61
Tabela 8. Susceptibilidade <i>in vitro</i> de conídios de <i>A. fumigatus</i> aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – micrograma

μL – microlitro

μm - micrometro

AFL- aflatoxina

AM- azul de metileno

AMB- anfotericina B

ATP- adenosina trifosfato

BDA – Batata Dextrose Ágar

CFM- concentração fungicida mínima

CIM- concentração inibitória mínima

FS- fotossensibilizador

h- horas

MCZ- miconazol

MEP- matriz extracelular polimérica

mg- miligrama

mg/mL- miligramas por mililitro

mL – mililitro

NaClO- hipoclorito de sódio

NAM- novo azul de metileno

nm – nanômetros

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

p/p- peso por peso

pH – potencial hidrogeniônico

rpm – rotações por minuto

TFDA- tratamento fotodinâmico

antimicrobiano

v/v – volume por volume

μmol – micromol

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Fungos Filamentosos	16
1.2. O gênero <i>Aspergillus</i>	17
1.2.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	18
1.2.2. <i>Aspergillus flavus</i>	20
1.3. Biofilmes Fúngicos.....	24
1.4. Antifúngicos convencionais.....	27
1.4.1. Anfotericina B.....	27
1.4.2. Miconazol.....	29
1.4.3. Hipoclorito de sódio.....	30
1.5. Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA).....	31
1.5.1. Uso do TFDA em fungos filamentosos	36
2. Objetivos	39
2.1. Objetivo geral	39
2.2. Objetivos específicos	39
3. Material e Métodos	39
3.1. Manutenção das linhagens em laboratório e meios de cultivo	40
3.2. Preparação da suspensão de conídios.....	40
3.3. Obtenção dos biofilmes	40
3.4. Tratamento antimicrobiano convencional.....	41
3.4.1. Ação antimicrobiana em conídios.....	41
3.4.2. Ação antimicrobiana em micélios livres	42
3.4.3. Ação antimicrobiana em biofilmes fúngicos.....	43
3.5. Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA).....	43
3.6. Dosagem da atividade da enzima catalase.....	45
4. Resultados e Discussão.....	46
4.1. Ação dos agentes antifúngicos em micélios livres de <i>A. flavus</i>	46
4.2. Ação dos agentes antifúngicos em micélios livres de <i>A. fumigatus</i>	49
4.3. Ação dos agentes antifúngicos em biofilmes de <i>A. flavus</i>	52
4.4. Ação dos agentes antifúngicos em biofilmes de <i>A. fumigatus</i>	56
4.5. Ação dos agentes antifúngicos em conídios de <i>A. flavus</i>	60
4.6. Ação dos agentes antifúngicos em conídios de <i>A. fumigatus</i>	64
4.7. Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA).....	68
4.7.1. TFDA dos biofilmes de <i>A. flavus</i>	68
4.7.2. TFDA dos biofilmes de <i>A. fumigatus</i>	75
4.8. Atividade catalásica dos biofilmes de <i>A. flavus</i> e <i>A. fumigatus</i>	81
5. Conclusões	85
Referências.....	86

1. Introdução

1.1. Fungos Filamentosos

O Reino Fungi abriga microrganismos eucarióticos heterotróficos conhecidos como fungos filamentosos e leveduras. Os fungos filamentosos são encontrados em diferentes ambientes e crescem sobre os mais variados substratos, atuando em diversos processos de reciclagem de nutrientes (WALKER, WHITE, 2017).

Para atuar como decompositores de matéria orgânica, os fungos filamentosos utilizam um arsenal enzimático, que é produzido e secretado para o meio externo, possibilitando a hidrólise de componentes poliméricos em seus constituintes monoméricos, que podem então ser absorvidos (WALKER, WHITE, 2017). Tal característica também permite que alguns fungos causem doenças infecciosas potencialmente fatais em humanos e demais animais, além de causar a infecção e deterioração de diversos vegetais de interesse (PAULUSSEN et al., 2017).

Estruturalmente os fungos filamentosos são constituídos por filamentos cilíndricos conhecidos como hifas, cujo conjunto é denominado de micélio, as quais se desenvolvem por crescimento apical e ramificação. Estas hifas podem invadir e colonizar uma diversidade de substratos, que podem ser inertes, como superfícies de alvenarias, ou bióticos, como tecidos animais e vegetais. Algumas destas hifas são responsáveis pela nutrição, enquanto outras estão associadas à formação de estruturas reprodutoras, a partir das quais são produzidos os conídios. Estes conídios, por sua vez, são originados assexuadamente. Uma vez encontradas condições ambientais favoráveis, os conídios germinam dando origem a um novo organismo (GOW, LATGE, 2017; SEPHTON-CLARK, VOELZ, 2018). A produção de esporos de modo sexuado também é conhecida para muitos fungos filamentosos (PAULUSSEN et al., 2017).

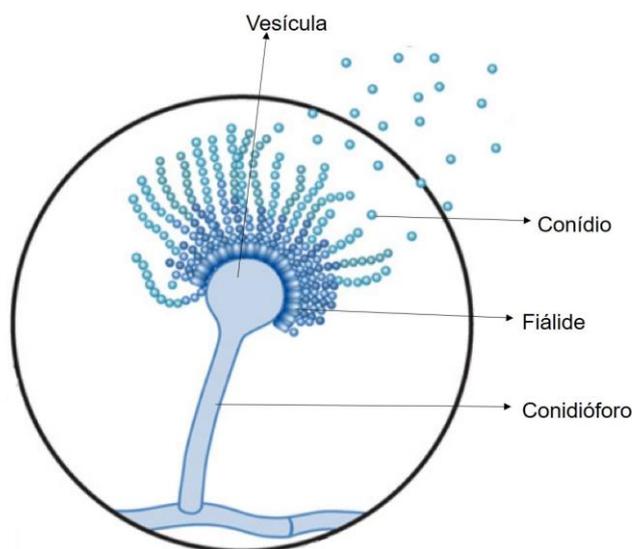
Até o momento, estima-se a existência de aproximadamente 1,5 a 3,8 milhões de espécies de fungos. Contudo, apenas cerca de 120.000 foram descritas, somente cerca de 3% a 8% das espécies estimadas (HAWKSWORTH, LÜCKING, 2017; TRUONG, 2017). Entre as espécies descritas, aquelas pertencentes ao gênero *Aspergillus* merecem destaque, não somente por atuarem como decompositoras, mas também por causarem degradação de alimentos e por serem agentes patogênicos de organismos animais e vegetais (MELLO et al., 2011).

1.2. O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é um grupo cujo nicho ecológico natural é o solo, sendo um dos gêneros mais abundante, constituído por cerca de 350 espécies. Este gênero se destaca por produzir diversas enzimas de interesse biotecnológico, bem como por ocasionar grandes perdas econômicas decorrentes da deterioração e contaminação com micotoxinas de diversas culturas alimentares, ou ainda, como agente etiológico de doenças humanas e de outros animais (KOCSUBÉ et al., 2016).

O gênero *Aspergillus* foi primeiramente descrito por Micheli em 1729. Uma característica marcante do grupo é a presença de uma hifa especializada denominada conidióforo, cuja extremidades é caracterizada pelo formato globoso de sua vesícula, onde são encontradas as células cilíndricas, denominadas de fiálides, que produzem os conídios (Figura 1) (BENNETT, 2010; LATGÉ, CHAMILOS, 2019). A morfologia e a cor da estrutura reprodutiva dos conídios variam entre as diversas espécies pertencentes ao gênero, e esta variação juntamente com as características fisiológicas, moleculares e bioquímicas, definem as subdivisões do gênero *Aspergillus* (KOCSUBÉ et al., 2016; WALKER, WHITE, 2017).

Figura 1. Morfologia característica do conidióforo de fungos do gênero *Aspergillus*.



Fonte: Latgé e Chamil (2019), adaptado pela autora.

Entre as diversas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, poucas são responsáveis por ocasionar impactos consideráveis para a saúde humana. Essas espécies estão bem adaptadas ao seu habitat natural, o solo, que é um ambiente hostil e dinâmico. Essas adaptações auxiliam essas espécies a resistir e sobreviver às defesas dos mais diversos hospedeiros (LATGÉ, CHAMILOS, 2019). Das principais espécies causadoras de infecções destacam-se *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* (PAULUSSEN et al., 2017), as quais têm sido alvos de intensa investigação.

1.2.1. *Aspergillus fumigatus*

O *A. fumigatus* é um fungo saprófito que se desenvolve no solo e em material vegetal em decomposição, participando da reciclagem de carbono e nitrogênio. Ele está relacionado a contaminação de diversos produtos como pimenta, ervas, milho, café, feijão, castanha de caju, soja, queijo, carne defumada e frutas. Diversas características permitem que o *A. fumigatus* sobreviva e se desenvolva nesses produtos, incluindo rápida germinação, crescimento em altas temperaturas, baixa concentração de oxigênio e flexibilidade nutricional, caracterizada pela capacidade de utilizar uma variedade de substratos, permitindo que estes microrganismos sobrevivam em diversos tipos de ambientes. *A. fumigatus* produz uma grande variedade de enzimas, entre elas proteases, o que pode ser considerado um dos fatores de virulência quando esta espécie parasita diversos hospedeiros animais e vegetais (BALLARD et al., 2018; VEERDONK et al., 2017; CROFT et al., 2016). Outro fator de virulência é a melanina presente na parede dos conídios de *A. fumigatus*, sendo responsável por pigmentar e proteger os conídios da ação das espécies reativas de oxigênio e da dessecação. Além disso, o tamanho diminuto dos conídios de *A. fumigatus*, que apresentam forma esférica com cerca de 2,5 µm de diâmetro, facilita a dispersão pelo ar no ambiente, o contato e a penetração no tecido hospedeiro. Adicionalmente, evita a depuração mucociliar, penetrando nos alvéolos pulmonares e ocasionando a infecção denominada aspergilose (CROFT et al., 2016; LATGÉ, CHAMILOS, 2019).

Essas características fazem do fungo *A. fumigatus* um importante agente patogênico em populações humanas, demais animais e vegetais. Em humanos, *A. fumigatus* é o fungo invasivo responsável por causar a maioria dos quadros infecciosos (ZHANG et al., 2019). A infecção pode ocorrer não somente pela inalação dos conídios, mas também por rotas alternativas como o uso de materiais médico-hospitalares contaminados, como cateteres, marcapassos e válvulas cardíacas, sobre os quais o

fungo pode desenvolver-se na forma de biofilme (PEREIRA et al., 2002). O quadro infeccioso varia de síndromes alérgicas a aspergilose invasiva (AI). Esta última representa risco de vida ao hospedeiro. A AI é uma das mais graves infecções fúngicas, com alta taxa de letalidade em pacientes imunossuprimidos. Anualmente, estima-se que *A. fumigatus* seja responsável por causar cerca de 200.000 casos de aspergilose, sendo que em cerca de 40% a 50% dos portadores da AI imunocomprometidos chega-se ao óbito (SUGUI et al., 2015).

Por outro lado, a aspergilose não invasiva, em hospedeiros imunocompetentes, de forma geral, desenvolve-se nas mucosas e em formas cutâneas e subcutâneas. Em hospedeiros imunocomprometidos, a aspergilose não invasiva acomete principalmente o pulmão e o sistema nervoso central (SNC), onde ocorre a formação de um aglomerado fúngico. Esse crescimento fúngico desencadeia um processo inflamatório, que em alguns casos desenvolve-se em um quadro assintomático (LATGÉ, CHAMILOS, 2019; SHIVAPRAKASH et al., 2019).

Os antifúngicos convencionais são utilizados para tratar os quadros de aspergilose e as infecções ocasionadas pelo gênero *Aspergillus*. Os antifúngicos azólicos são a base do tratamento das infecções causadas por *A. fumigatus*. Entretanto, ao longo do seu ciclo de vida, o *A. fumigatus* possui diversos mecanismos de resistência, dentre eles, podem ocorrer alterações genéticas, tornando o fungo resistente as terapias com estes antifúngicos (SHISHODIA et al., 2019). Além disso, a composição e a estrutura da parede celular de *A. fumigatus* altera-se com o passar do ciclo de vida, dificultando a ação dos antifúngicos que têm a parede celular como alvo (VEERDONK et al., 2017).

De forma geral, as paredes celulares dos conídios e hifas são compostas por β -1,3-glucano, β -1,4-glucano, proteínas, mananas (galactomanano e galactosaminogalactano), hidrofobinas, melanina e quitina. As alterações composicionais da parede, ao longo do ciclo de vida, ocorrem principalmente nas concentrações de seus constituintes (VEERDONK et al., 2017).

Nos conídios, há uma densa camada composta principalmente por α -1,3-glucano, melanina e hidrofobinas, que garantem sua alta hidrofobicidade. Nas hifas, as concentrações de melanina e hidrofobinas diminuem drasticamente em relação aos conídios, sendo a melanina um importante fator de virulência para a espécie. Além disso, a organização estrutural dos carboidratos presentes na parede dos micélios difere da observada nos conídios (VEERDONK et al., 2017).

1.2.2. *Aspegillus flavus*

Outra espécie de relevância, pertencente ao gênero *Aspergillus*, é o fungo oportunista *A. flavus*, presente principalmente em regiões tropicais e subtropicais ao longo do planeta (RUDRAMURTHY et al., 2019). O *A. flavus* é um fungo saprófito e fitopatogênico, cujos conídios são pigmentados, usualmente, na coloração verde oliva. Essa espécie fúngica desenvolve-se em temperaturas entre 12 e 48°C, estando presente nos mais diversos habitats e ambientes. No entanto, sua temperatura ideal de crescimento é de 37°C e, por isso, *A. flavus* está mais presente em países tropicais, como o Brasil (SHIVAPRAKASH et al., 2019). Este fungo é o segundo maior agente etiológico da aspergilose. No entanto, essa espécie é conhecida principalmente por contaminar sementes e grãos de diversas plantas com micotoxina que, uma vez ingerida, ocasiona uma doença denominada aflatoxicose, que atinge quase todas as espécies animais (RUDRAMURTHY et al., 2019).

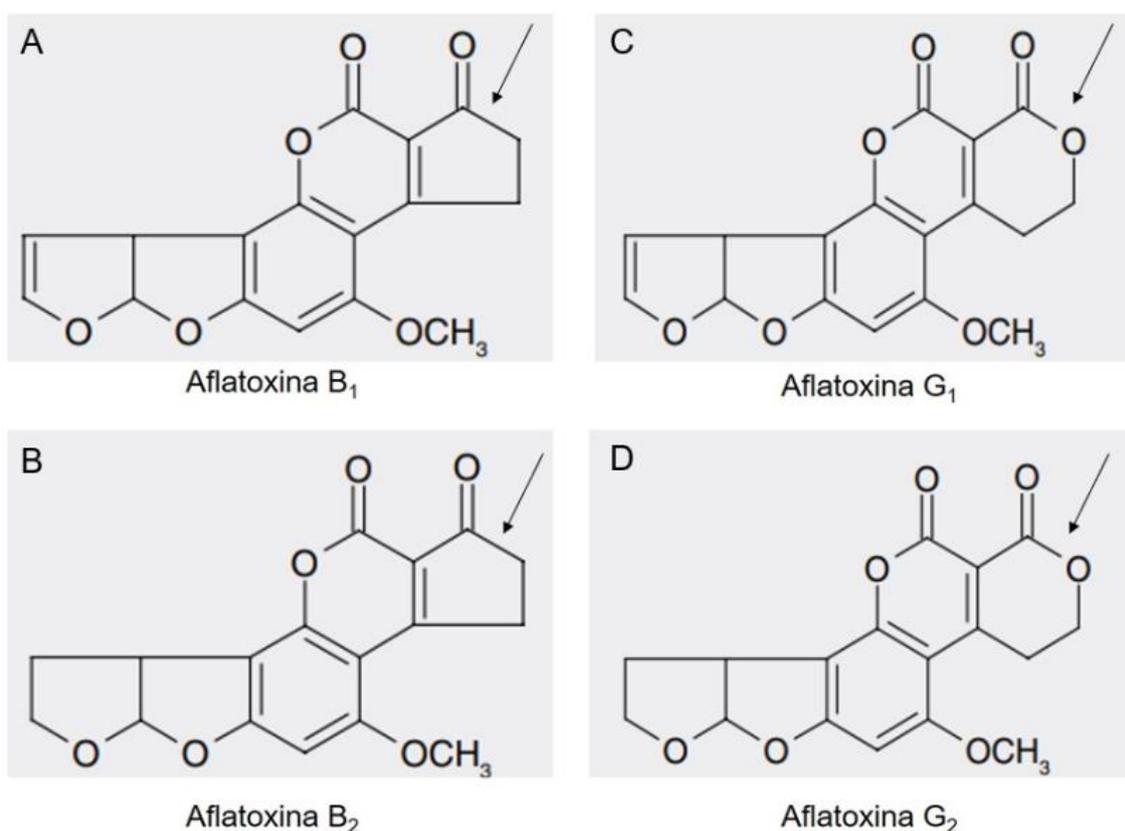
O *A. flavus* desenvolve-se em sementes de importantes culturas comerciais como amendoim, milho, arroz e algodão. A colonização por *A. flavus* pode ocorrer durante a pré-colheita, colheita, armazenamento e transporte, necessitando assim, de diferentes tipos de medidas para o controle de seu desenvolvimento (NIE et al., 2016).

A colonização de grãos e produtos vegetais por *A. flavus* ocasiona a degradação, levando a perda anual de toneladas de alimentos. Durante a degradação, *A. flavus* poderá produzir a micotoxina conhecida como aflatoxina. Essa micotoxina, quando consumida, ocasiona diversos problemas de saúde à espécie humana e outros animais. Devido a este fato, países desenvolvidos inspecionam e controlam rigorosamente os alimentos importados. Para tanto, as *comodities* contaminadas com níveis de micotoxinas superiores aos determinados pela legislação dos diversos países, são descartados. No entanto, há uma legislação mais branda para o descarte dos alimentos contaminados, em países em desenvolvimento, devido ao problema com a disponibilidade de alimentos, permitindo o maior consumo de aflatoxina (WEAVER et al., 2017).

A síntese de micotoxinas, que são metabólitos secundários, é estimulada por determinados fatores ambientais, como temperatura (13 a 37°C), pH (2 a >8) e altas concentrações de oxigênio e, portanto, a presença e a concentração dessas substâncias em produtos vegetais irão variar conforme a distribuição geográfica e o clima local. A presença das aflatoxinas é facilmente detectável, pois essas substâncias são fluorescentes, sendo que a aflatoxina B1 emite fluorescência azul e as aflatoxinas

do grupo G emitem fluorescência verde (ADEBO et al., 2017; ADEYEYE, 2016). Entre as micotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* destacam-se as aflatoxinas do tipo B₁, B₂, G₁ e G₂. A produção da aflatoxina B₁ é a mais preocupante por ser essa a micotoxina mais potente (ADEBO et al., 2017). As estruturas químicas cíclicas das aflatoxinas são semelhantes. A aflatoxina B possui em sua molécula um anel de ciclopentano (indicado pelas setas na Figura 2A e B), enquanto a aflatoxina G possui um anel de lactona (indicado pelas setas na Figura 2C e D) (DE OLIVEIRA, CORASSIN, 2014).

Figura 2. Estrutura química das aflatoxinas B₁ (A), B₂ (B), G₁ (C) e G₂ (D).



Fonte: De Oliveira, Corassin (2014). Adaptado pela autora.

As aflatoxinas são potentes hepatotoxinas com ação mutagênica e carcinogênica. Agem ainda como imunossupressoras, além de estarem ligadas a problemas reprodutivos em animais (COPPOCK et al., 2018). Além do fígado, outros órgãos podem ser afetados, como o rim, o baço e o pâncreas (IAMANAKA, 2013).

O consumo de produtos de origem animal ou vegetal contaminados com aflatoxinas, como o leite e a carne, causam a contaminação direta, ao consumir o produto contaminado, ou a contaminação indireta, ao consumir subprodutos e derivados contaminados, provocando a aflatoxicose (COPPOCK et al., 2018). O consumo de aflatoxina gera uma grande preocupação na comunidade científica e médica, devido a gravidade do quadro clínico e ao fato de que não há um tratamento específico para a aflatoxicose, o tratamento é realizado por meio do controle dos sintomas e doenças ocasionados. O controle da contaminação de alimentos deve ser realizado por meio da prevenção do crescimento do *A. flavus*, visto que, não há métodos efetivos e viáveis para a descontaminação de aflatoxinas (RAJASERAN et al., 2018).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu em 22 de fevereiro de 2011 a legislação para fixar o nível de contaminação máximo permitido para micotoxinas (Tabela 1), que deve ser seguido por empresas e produtores que importem, produzam, distribuam e comercializem diversas categorias de bebidas, alimentos e matérias primas, como amendoim, café e cereais, a fim de evitar o consumo excessivo destas toxinas pela população brasileira.

Embora a prevenção da contaminação das culturas alimentares com *A. flavus* e aflatoxinas seja realizada de diferentes formas, o melhoramento genético das plantas e a adoção de boas práticas agronômicas têm sido boas opções (WEAVER et al., 2016; ADEYEYE, 2016).

Tabela 1. Limite Máximo Tolerado (LMT) de micotoxinas presentes em diversas categorias alimentares estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2011.

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Aflatoxina M1	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão- doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta), <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada) <i>Zingiber officinale</i> (gengibre), <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20	

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011), adaptado pela autora.

1.3. Biofilmes Fúngicos

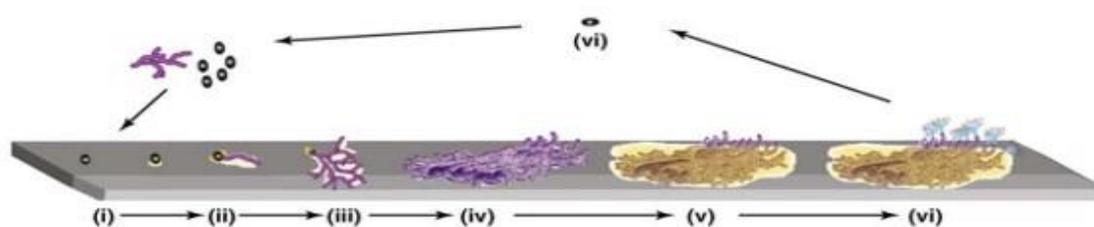
Beuvais e Latgé (2015) demonstraram que *A. fumigatus* e *A. flavus* são capazes de crescer em superfícies inanimadas, como equipamentos médico-hospitalares, formando biofilmes (HARDING et al., 2009). Os biofilmes fúngicos são comunidades complexas, compostas por hifas, que estão firmemente aderidas a uma superfície sólida, que pode ser biótica ou abiótica. As células dos biofilmes são firmemente aderidas entre si, mas individualmente não tem sua morfologia alterada. Uma das características mais relevante dos biofilmes é a presença de uma espécie camada que envolve o biofilme, denominada matriz extracelular polimérica (MEP), constituída de polissacarídeos, proteínas e lipídios. Esta matriz é permeada por canais que possibilitam a transferência de substâncias e permitem a comunicação entre as células ali presentes (BORGHI, BORGO, MORACE, 2016).

Na natureza, o biofilme é a forma de crescimento predominante entre os microrganismos, e a grande maioria é heterogênea, composta por duas ou mais espécies. O processo de formação de biofilmes por fungos filamentosos difere do observado em outros microrganismos, como bactérias e leveduras, devido as diferenças morfológicas e de desenvolvimento entre estes organismos. Durante a fase de crescimento do biofilme, os fungos filamentosos desenvolvem-se por fragmentação de hifas e por esporulação, diferindo das bactérias e leveduras, que crescem por brotamento e fissão, embora algumas leveduras sejam dimórficas e possam mudar seu crescimento para filamentoso durante a colonização de uma superfície. Além disso, os fungos filamentosos produzem hifas invasivas que se expandem além da interface líquido/ar, ou então produzem estruturas especializadas para penetrar os tecidos do hospedeiro e, assim, esporular e ainda obter nutrientes (HARDING et al., 2009).

Com base nessas diferenças, um modelo de seis passos para a formação de biofilmes por fungos filamentosos foi proposto. Primeiramente, o esporo fúngico estabelece um contato físico com a superfície a ser colonizada, iniciando-se a germinação e a secreção de substâncias adesivas. O próximo estágio refere-se à formação da microcolônia por meio do alongamento apical e ramificação das hifas, as quais irão se espalhar sobre o substrato formando uma camada única. É neste estágio que ocorre o início da formação da matriz extracelular polimérica, promovendo a forte adesão da colônia à superfície sólida. Na sequência, ocorre a formação de uma rede micelial compacta de hifas e a formação de canais que facilitam as trocas gasosas e de calor e a distribuição de nutrientes. Nessa fase, a MEP constitui uma espessa camada, que envolve e prote-

ge o biofilme em formação. O próximo estágio é caracterizado pela formação de estruturas reprodutivas. Por fim, ocorre a dispersão por meio da liberação de conídios ou pela fragmentação de hifas, reiniciando o processo de formação de biofilmes (Figura 3) (HARDING et al., 2009).

Figura 3. O modelo de desenvolvimento para biofilmes de fungos filamentosos inclui os seguintes estágios: i) adsorção de conídios à superfície, ii) adesão inicial à superfície, iii) formação de microcolônias I, iv) formação de microcolônias II ou maturação inicial v) maturação ou desenvolvimento reprodutivo e vi) dispersão ou fase planctônica.



Fonte: Harding et al. (2009), adaptada pela autora.

A matriz extracelular polimérica (MEP) é constituída, principalmente, por proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios. A composição, concentração e distribuição dos constituintes da MEP varia conforme a espécie fúngica. A MEP do *A. fumigatus* é composta por galactomanano, α -1,3-glucano, proteínas, polióis, DNA e melanina. Os galactomananos estão situados na parede celular, enquanto o α -1,3-glucano está situado essencialmente próximo a superfície das hifas (MITCHELL, ZARNOWSKI, ANDES, 2016).

A MEP de *A. fumigatus* é composta por diversos tipos proteicos, dos quais podem ser citados a dipeptidil peptidase V, catalase B, ribotoxina e, principalmente, hidrofobinas. Acredita-se que estas últimas possuam papel fundamental na adesão e, portanto, estão diretamente relacionadas à efetividade de formação dos biofilmes (MITCHELL, ZARNOWSKI, ANDES, 2016).

Reichhardt e colaboradores (2015) avaliaram a composição da MEP de biofilmes de *A. fumigatus* desenvolvidos *in vitro*, em meio líquido RPMI 1640 e em meio sólido. O grupo observou que a MEP era constituída por aproximadamente 40% de proteínas, 43% de polissacarídeos, até 14% de lipídios e 3% de compostos aromáticos, como a melanina. Em diversos estudos anteriores, a composição da MEP de biofilmes de *A. fumigatus* desenvolvidos *in vitro* foi altamente semelhante a composição da MEP de biofilmes *in vivo* (BORGHI, BORGIO, MORACE, 2016).

O desenvolvimento microbiano na forma de biofilmes confere algumas vantagens a estes microrganismos, tais como maior resistência ao estresse biológico, a radiação UV, alterações de pH, ao choque osmótico, dessecação e aos agentes antifúngicos. A resistência dos biofilmes é multifatorial, e abrange sua alta complexidade estrutural e a presença da MEP, que impede a penetração de diversas moléculas e dos agentes antifúngicos em regiões mais profundas do biofilme, inviabilizando suas ações (FANNING, MITCHELL, 2012).

A heterogeneidade metabólica do biofilme, garantida pela presença de células em vários estágios de desenvolvimento, e a superexpressão das bombas de efluxo e de alvos antifúngicos, dificultam a ação de diferentes agentes antifúngicos. A resistência mediada pelas bombas de efluxo é essencial nas primeiras fases de desenvolvimento dos biofilmes, em que a MEP ainda está em processo de formação (BORGHI, BORGO, MORACE, 2016).

Nas últimas décadas, uma grande parcela de microrganismos patogênicos tornou-se resistentes aos agentes antimicrobianos convencionais. A resistência aos antifúngicos pode causar o aumento na prevalência de infecções, contaminação de alimentos e equipamentos médico-hospitalares, incluindo cateteres, marcapassos, válvulas cardíacas e implantes mamários (KAUR, SINGH, 2013; WILLIAMS et al., 2016).

Neste contexto, é de suma importância o desenvolvimento de novas técnicas que superem a resistência dos biofilmes fúngicos e, ao mesmo tempo, não levem ao desenvolvimento de nova resistência microbiana. Alguns agentes antifúngicos comumente utilizados são ineficientes no controle de contaminações e infecções causadas por biofilmes de fungos do gênero *Aspergillus* e, de modo geral, quando ativo, a concentração mínima do agente antifúngico para inativar o biofilme é maior se comparada a necessária para inativar a forma planctônica (KAUR, SINGH, 2013). Entre as diferentes alternativas que têm sido investigadas nos últimos anos, o Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA) vem mostrando-se uma opção promissora (BALTAZAR et al., 2015).

É de grande relevância destacar que a densidade fúngica e a robustez dos biofilmes está diretamente relacionada com a eficiência das terapias antifúngicas em biofilmes (FANNING, MITCHELL, 2012). Para este estudo os biofilmes foram desenvolvidos em suportes inertes de polietileno. Após a formação, de forma geral, os biofilmes possuíam as dimensões de 12,6 mm x 10 mm x 1 mm, constituindo assim, estruturas complexas e robustas, divergindo dos biofilmes citados na literatura que são formados

para os testes antifúngicos. Nestes casos, os biofilmes são desenvolvidos no fundo das placas de 96 poços, e, portanto, possuem menor dimensão e são notavelmente menos densos e robustos que os utilizados no presente estudo.

1.4. Antifúngicos convencionais

Os antifúngicos são moléculas capazes de combater as infecções fúngicas, por meio de sua ação fungicida, ocasionando a morte dos fungos, ou sua ação fungistática, reduzindo o crescimento fúngico. Um dos primeiros antifúngicos produzido, por volta de 1958, foi a anfotericina desoxicolato, apresentando potente ação antifúngica sobre uma variedade de fungos, no entanto, possuía alta toxicidade renal (NETT, ANDES, 2016). Após 50 anos da produção da anfotericina desoxicolato, iniciou-se o desenvolvimento de uma nova geração de agentes antifúngicos com menor efeito adverso, como os triazóis e equinocandinas. Os antifúngicos possuem diferentes alvos, mecanismos de ação (Tabela 2) e interações com outros medicamentos (GRANINGER, DIAB-ELSCHAHAWI, PRESTER, 2019).

Tabela 2. Mecanismo de ação de diferentes classes de agentes antifúngicos.

Classe	Agente antifúngico	Mecanismo de ação
Poliênicos	Anfotericina B Nistatina	Os antifúngicos ligam-se ao ergosterol, formando poros na membrana e levando ao efluxo de cátions e a morte celular.
Azóis	Fluconazol Miconazol Voriconazol Intraconazol	Inibem a biossíntese de ergosterol, levando ao acúmulo de esteróis tóxicos e danificando a membrana celular.
Equinocandinas	Caspofungina Micafungina Anidulafungina	Inibem a enzima β -1,3-glucano sintase, impedindo a formação de glucano que é um componente essencial da parede celular.

Fonte: (Graninger, Diab-Elschahawi, Prester, 2019), adaptado pela autora (2019).

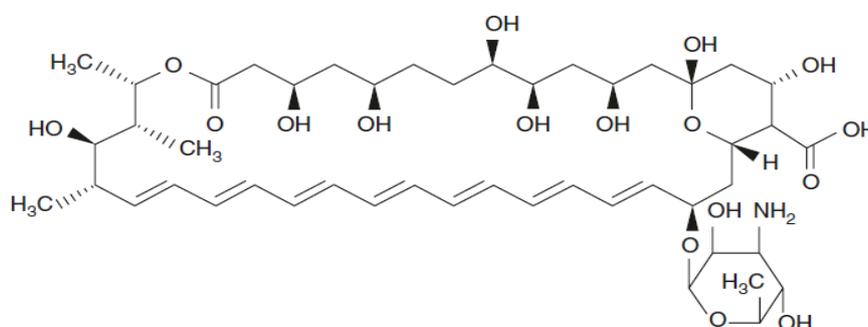
1.4.1. Anfotericina B

A anfotericina B (AMB) é um antifúngico pertencente a classe dos poliênicos, que são produzidos pela bactéria *Streptomyces nodosus*. Atualmente, dos antifúngicos poliênicos, somente a AMB está comercialmente disponível para o tratamento de infec-

ções sistêmicas, mas existem diversas formulações disponíveis. A AMB é um dos antifúngicos mais potentes, possuindo atividade contra diversas espécies de leveduras e fungos filamentosos (NETT, ANDES, 2016).

A AMB (Figura 4) é uma substância anfotérica, que pode comportar-se como um ácido ou como uma base. Em altas concentrações a AMB possui efeito nefrotóxico, no entanto, em geral, a AMB em baixas concentrações possui efeito antifúngico satisfatório. Formulações lipídicas da AMB foram desenvolvidas para minimizar seus efeitos adversos quando utilizada em maiores concentrações e são atualmente amplamente utilizadas (GRANINGER, DIAB-ELSCHAHAWI, PRESTER, 2019).

Figura 4. Estrutura química da anfotericina B.



Fonte: (Graninger, Diab-Elschahawi, Prester, 2019), adaptado pela autora.

A AMB age essencialmente na membrana plasmática fúngica (MCCRTHY; O'SHAUGHNESSY; WALSH, 2017), a qual possui em sua estrutura o ergosterol, que é o principal esterol da membrana plasmática dos fungos. O ergosterol desempenha o papel de regulador da fluidez da membrana, garantindo sua integridade e a permeabilidade. Ao se ligar ao ergosterol, a AMB causa a formação de poros aquosos na membrana, formando uma estrutura semelhante à de um barril, com interior hidrofílico e exterior hidrofóbico. Esses canais alteram a permeabilidade da membrana, provocando o vazamento e a perda de íons potássio e demais constituintes citoplasmáticos essenciais. Para compensar a perda desses íons, ocorre o influxo de prótons, levando a acidificação citoplasmática, o que poderá ocasionar a precipitação de componentes citoplasmáticos, ocorrendo a ruptura da membrana e consequente morte celular (MCCRTHY; O'SHAUGHNESSY; WALSH, 2017). O dano celular induzido pela AMB é ocasionado, não apenas pela formação de canais, mas também por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidro-

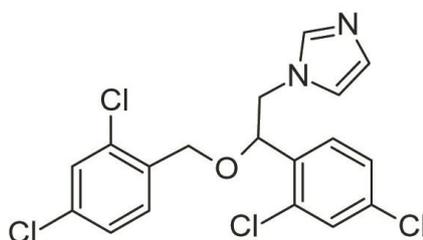
gênio, que levam a morte celular por meio da peroxidação de lipídios da membrana (MCCRTHY; O'SHAUGHNESSY; WALSH, 2017).

1.4.2. Miconazol

Os antifúngicos da classe dos azóis são divididos em duas subclasses, baseado no número de átomos de hidrogênio presentes no anel azólico. Os imidazóis (clotrimazol, cetoconazol, miconazol) possuem dois nitrogênios no anel azólico e triazóis (flucanazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol) possuem três nitrogênios no anel azólico. Os primeiros antifúngicos azólicos produzidos foram o cetoconazol e o miconazol (Figura 5). Esses antifúngicos apresentam alta toxicidade se utilizados de modo sistêmico. Por outro lado, o cetoconazol e o miconazol são extensivamente utilizados topicamente (NETT, ANDES, 2016).

De modo geral, o MCZ em baixas concentrações (0,01 µg/mL) possui atividade fungistática, e em maiores concentrações possui atividade fungicida contra diferentes linhagens fúngicas (PIÉRARD et al., 2012).

Figura 5. Estrutura química do Miconazol.



Fonte: Kelemen et al. (2018), adaptado pela autora.

O MCZ possui dois tipos distintos de mecanismo de ação, interferindo na biossíntese de ergosterol, além de ocasionar o acúmulo de EROS, resultando em dano oxidativo e a morte celular (BARASH, GRIFFIN 2008). A biossíntese do ergosterol é interrompida pelo MCZ por meio da inibição de uma enzima denominada 14 α -lanosterol dismutase, cuja função é a síntese do ergosterol a partir do lanosterol. A inibição da 14 α -lanosterol dismutase ocasiona o acúmulo de diversos esteróis metilados e a depleção do ergosterol da célula fúngica. Com isso, ocorre o rompimento das membranas fúngicas, pois elas se tornam permeáveis e fluídas (PIÉRARD et al., 2012).

Quanto ao dano oxidativo, o MCZ inibe a atividade das enzimas peroxidase e catalase. Essas enzimas são responsáveis por degradar os radicais peróxido e peróxi-

do de hidrogênio, respectivamente. Ao ocorrer a inibição da peroxidase e da catalase, ocorre o aumento das concentrações intracelulares de EROS, provocando a oxidação e a degradação de organelas e de diversos alvos moleculares, levando a morte celular. A ação do MCZ pela inibição das enzimas do arsenal antioxidante é independente da ação do MCZ pela inibição da síntese de ergosterol, podendo ocorrer simultaneamente ou separadamente (PIÉRARD et al., 2012).

1.4.3. Hipoclorito de sódio

Diferentemente dos antifúngicos AMB e MCZ, que são utilizados no tratamento de infecções fúngicas invasivas e tópicas, o hipoclorito de sódio é amplamente utilizado como agente desinfetante e sanitizante de superfícies, equipamentos e objetos residenciais, industriais e hospitalares. As soluções comerciais de hipoclorito de sódio (NaClO), possui a concentração de 2,0 a 2,5 p/p, em que a cada 100g de solução há de 2,0 a 2,5g de NaClO. O NaClO na presença de água possui a tendência de formar o hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido hipoclorídrico (HOCl). Como mostrado abaixo:



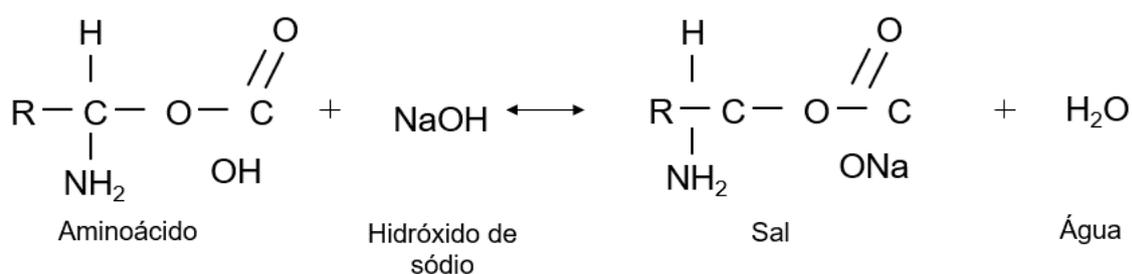
Agentes oxidantes fortes, como o NaClO, são capazes de desorganizar a estrutura da bicamada lipídica, alterando a sua permeabilidade, gerando desequilíbrio osmótico e dano intracelular. O NaClO também promove a inibição enzimática devido a intensa ação oxidante do cloro livre, que irá oxidar irreversivelmente os grupos sulfidrilos presentes na estrutura das enzimas (Figura 6) como, por exemplo, aquelas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da fosforilação oxidativa, diminuindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) (HAN et al., 2018).

O NaClO ainda possui atividade sobre os aminoácidos (Figura 6), devido a formação de cloroaminas, pelas reações de neutralização e cloroaminação. Inicialmente, a partir do NaClO em água, ocorre a formação do ácido hipocloroso (HOCl) e do hidróxido de sódio (NaOH). Em seguida, a reação de cloroaminação se inicia com a neutralização dos aminoácidos pelo NaOH, formando água e sal, bem como ocorrendo a liberação dos íons hidroxil (OH[•]). Após a reação de neutralização dos aminoácidos, o ácido hipocloroso (HOCl) atua como um solvente, liberando o cloro, que se liga ao grupo amino dos aminoácidos livres ou em proteínas, formando cloroaminas, afetando o metabolismo celular (GRAÇA, 2014; ESTRELA et al., 2002).

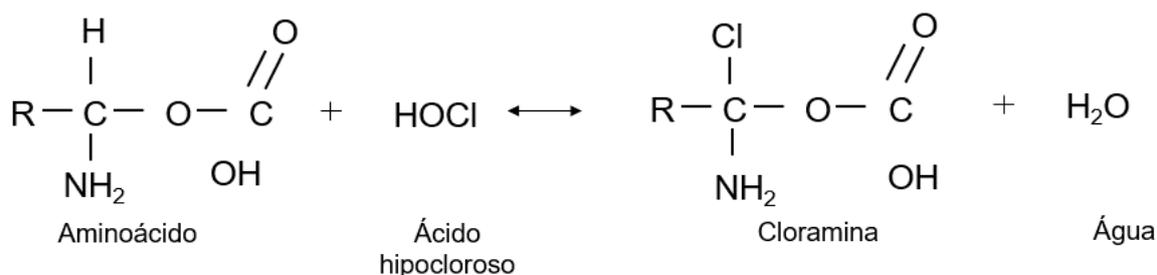
O cloro livre, um dos compostos antimicrobianos do hipoclorito de sódio, é uma molécula apolar, cuja região hidrofóbica poderá ser repelida pelas regiões hidrofílicas da parede celular, aumentando assim a resistência do fungo ao hipoclorito de sódio (GOW; LATGE; MUNRO, 2017). O cloro livre é consumido durante a reação de cloroaminação. Portanto, para que ocorra a atividade antifúngica do NaClO por meio da ação do cloro livre na solução é necessário que o NaClO seja renovado durante o processo antimicrobiano, principalmente se usado em pequenos volumes ou para eliminar estruturas resistentes como biofilmes (GRAÇA, 2014).

Figura 6. Ação do hipoclorito de sódio sobre os aminoácidos.

A) Reação de neutralização de aminoácidos



B) Reação de cloroaminação



Fonte: Estrela et al. (2002), adaptado pela autora.

1.5. Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA)

É de suma importância o estudo de novas técnicas terapêuticas devido ao aumento da resistência aos agentes antifúngicos convencionais e a redução da velocidade de descoberta e, conseqüentemente da produção de novos compostos antifúngicos. Neste contexto, o tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFDA) é uma das técnicas promissoras. A descoberta da inativação fotodinâmica de microrganismos ocorreu, acidentalmente, em 1900, pelo estudante de medicina Oskar Raab, que observou a morte do protista *Paramecium* spp. quando tratados com o corante acridina e expostos à luz.

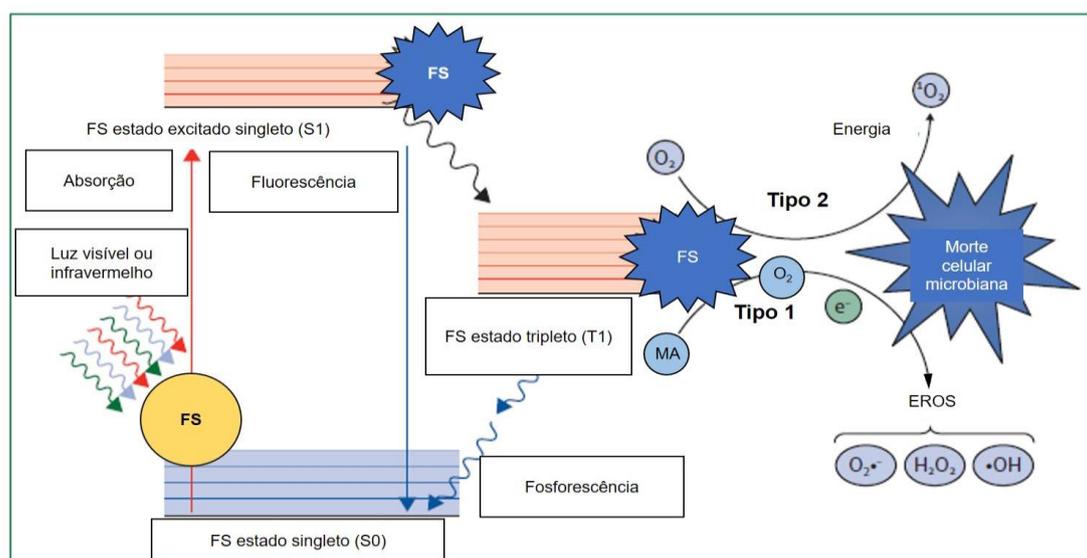
Por volta de 1970, o TFD passou a ser utilizado em terapias anticâncer e é utilizado clinicamente há cerca de 26 anos (BALTAZAR et al., 2015; ST. DENIS et al., 2011). A redescoberta do TFD com o objetivo antimicrobiano só ocorreu no início dos anos noventa devido a emergência de microrganismos resistentes aos antifúngicos convencionais. O tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFDA) é uma eficiente alternativa aos antifúngicos convencionais, que pode levar à morte bactérias, vírus, protistas e fungos (CIEPLIK et al., 2018; BALTAZAR et al., 2015).

O princípio de ação do TFDA baseia-se na associação de três componentes: uma molécula não tóxica, que usualmente é um corante, conhecida como fotossensibilizador (FS), a luz no comprimento de onda específico para excitar o FS e o oxigênio molecular (CIEPLIK et al., 2018). O objetivo do TFDA é inativar, seletivamente, um microrganismo alvo, sem causar danos ao tecido do hospedeiro (DIOGO et al., 2017; CIEPLIK et al., 2018).

O FS em seu estado fundamental (S_0), é denominado FS estado singleto. O FS no estado S_0 possui seus elétrons em spins opostos, no orbital de baixa energia. Com a aplicação de luz, no pico de absorção do FS, ocorre a absorção de um fóton, fazendo com que, um dos elétrons do FS seja impulsionado para o orbital de alta energia, mantendo o seu spin. O FS pode então, passar do estado singleto fundamental (S_0) para o estado singleto excitado (S_1) (Figura 7), que é uma molécula instável de vida curta (WAINWRIGHT et al., 2017; BALTAZAR et al., 2015).

O spin do elétron excitado poderá sofrer a inversão, neste caso, o FS passa a ter seus spins com elétrons paralelos, passando a ser denominado de FS de estado tripleto (T_1), que é uma molécula mais estável, de maior tempo de vida. O FS no estado T_1 , poderá transferir sua energia (via tipo 2) ou seu elétron (via tipo 1) para moléculas adjacentes, formando as espécies reativas de oxigênio (EROS) que ocasionarão a morte do microrganismo (WAINWRIGHT et al., 2017; BALTAZAR et al., 2015).

Figura 7. Esquema das vias fotoquímicas do TFDA, incluindo o diagrama de Jablonski. O FS (S_0) absorve um fóton, formando o estado excitado singleto (S_1), que irá passar por uma transição eletrônica formando o FS no estado tripleto (T_1) interagindo com o oxigênio por duas vias: Tipo 1, por meio de uma molécula aceptora (MA) ocorre a transferência de elétrons do T_1 resultando na geração de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot OH$. No Tipo 2, o T_1 transfere a energia diretamente para o O_2 levando a formação de 1O_2 excitado. As EROS geradas reagem rapidamente com a parede celular, membranas lipídicas, peptídeos e ácidos nucleicos. O FS retorna ao seu estado inicial após este ciclo, pronto para absorver um novo fóton e gerar EROS adicionais.



Fonte: WAINWRIGHT et al. (2017), adaptado pela autora.

Na via do Tipo 1, os elétrons do FS no estado tripleto (T_1) são transferidos para uma molécula aceptora (MA) circundante (Figura 7), ocasionando a formação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), podendo ocorrer a desmutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é a molécula precursora dos radicais hidroxilas ($\cdot OH$), que são altamente reativas (CIEPLINK et al., 2015). As EROS formadas pela via do Tipo 1 ocasionam a oxidação de diversas macromoléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. O radical hidroxila é o mais reativo das EROS produzidas pela via do Tipo 1. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) poderá oxidar o ferro (Fe^{2+}), provocando a quebra das ligações oxigênio-oxigênio do H_2O_2 , produzindo $\cdot OH$. O peróxido de hidrogênio é removido por meio da ação da catalase, que formará água e oxigênio. Já os radicais hidroxilas, não são removidos enzimaticamente, mas podem ser eliminados por ação de antioxidantes, como a glutatona (ST. DENIS et al., 2011).

Na via do Tipo 2, ocorre a transferência de energia do FS do estado tripleto diretamente para o oxigênio molecular em seu estado fundamental (3O_2), levando a for-

mação do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (CIEPLINK et al., 2015), que irá interagir com os alvos moleculares de forma distinta da ação das EROS formadas pela via do Tipo 1. O $^1\text{O}_2$ é altamente reativo, capaz de oxidar diversos constituintes e organelas celulares, atuando sobre as duplas ligações, regiões ricas em enxofre e em compostos aromáticos, ocasionando a morte celular. O $^1\text{O}_2$ não pode ser degradado enzimaticamente, mas pode ser eliminado por agentes antioxidantes (ST. DENIS et al., 2011).

Após a transferência de energia e elétrons, o FS volta ao seu estado fundamental (S_0), podendo absorver um novo fóton de energia. Devido a este fato, uma única molécula de FS poderá produzir diversas moléculas de EROS (CIEPLINK et al., 2015). Assim, o TFDA é extremamente vantajoso, apresentando poucos efeitos colaterais ao organismo hospedeiro, além de não elicitar resistência microbiana. Embora promissor, o TFDA possui alguns pontos negativos se comparado ao uso de agentes antifúngicos convencionais, como não funcionar na ausência de luz (GONZALES et al., 2017).

A efetividade do TFDA depende de alguns fatores como, por exemplo, tipo de microrganismo alvo, FS, fonte luminosa, tempo de exposição e dose total de luz. Com relação ao FS, é importante que possua algumas características como ser quimicamente puro, ser capaz de gerar oxigênio singleto (preferencialmente) ou outras espécies reativas de oxigênio, ser foto estável, ser seletivo para célula alvo, não ter toxicidade no escuro e inativar o microrganismo alvo (DE OLIVEIRA, 2015).

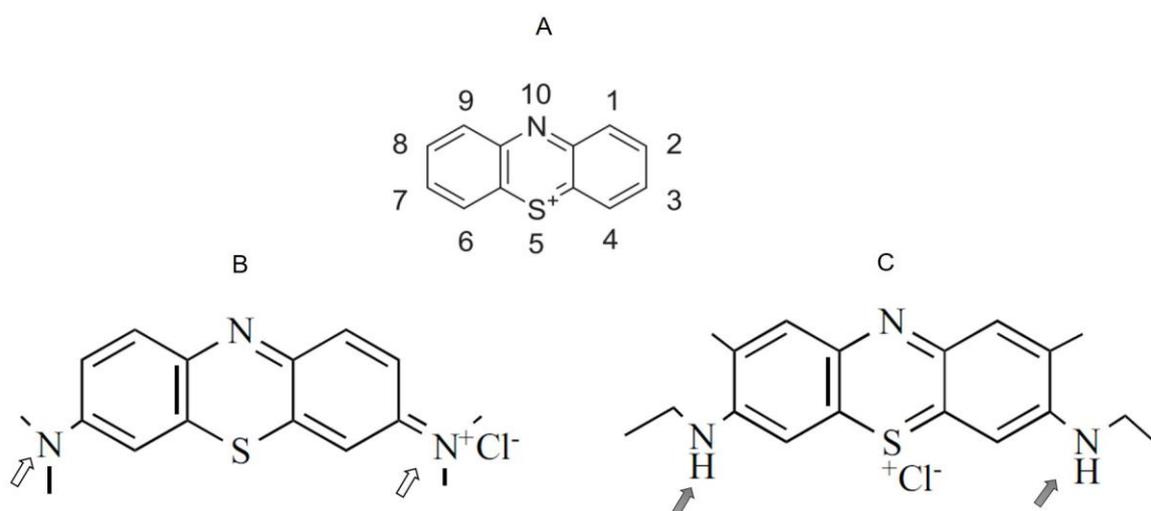
Diferentes tipos de FS têm sido utilizados no TFDA. Nos últimos 21 anos, houve o desenvolvimento de novas classes de FS, com melhores propriedades fotodinâmicas e químicas (CIEPLINK et al., 2015; BALTAZAR et al., 2015). Algumas características são necessárias para que uma molécula seja utilizada como FS, como solubilidade em água, mínima toxicidade no escuro, baixo potencial mutagênico e alta estabilidade química, especialmente em temperatura ambiente. Além disso, o FS deverá se acumular-se preferencialmente no microrganismo alvo e ser rapidamente eliminado pelo hospedeiro após a administração. Ao ser excitado, o FS deverá ter um bom rendimento de produção de EROS. Por fim, a sua síntese deverá ser simples e de fácil disponibilidade (KWIATKOWSKI et al., 2018; BALTAZAR et al., 2015).

Atualmente há diferentes classes de FS disponíveis, sendo alguns de origem natural como os cumarínicos e outros sintéticos, como as porfirinas, os xantenos, como o rosa de bengala (RB), e os corantes fenotiazínicos, que incluem o azul de metileno (AM), o novo azul de metileno (NAM) e o azul de tuluidina (TBO), e ainda as bacterioclorinas e ftalocianinas (DE OLIVEIRA, 2015).

O azul de metileno (AM) foi o primeiro FS fenotiazínico a ser produzido, por Heinrich Caro, por volta do ano 1870. Assim como outros FS fenotiazínicos, o AM é estruturalmente formado por 3 anéis aromáticos, com grupos laterais auxocromo, que ao serem ligados aos cromóforos alteram a intensidade e comprimento de onda de absorção. Possuem uma carga positiva e rendimento quântico de oxigênio singleto abaixo de 0,5 (CIEPLINK et al., 2015).

O AM (Figura 8) possui intensa absorção de luz na região vermelha do espectro (λ_{\max} = 660 nm em solução aquosa), e transfere eficientemente a energia absorvida para outras moléculas circundantes. Uma vez excitada, a molécula de AM em seu estado fundamental singleto passa para um estado excitado tripleto, o qual transfere elétrons para moléculas circundantes, levando a formação de espécies reativas de oxigênio. No caso em que o oxigênio é o acceptor de elétrons, forma-se o ânion superóxido (O_2^-). Quando este ocorre com moléculas associadas à membrana, tem-se a formação de superóxido lipídico e conseqüente dano a membrana. O AM pode ser administrado em altas concentrações sem que haja toxicidade grave (WAINWRIGHT, MCLEAN, 2017; CIEPLINK et al., 2015).

Figura 8. Fotossensibilizadores fenotiazínicos, estrutura química base (A), azul de metileno (B) e novo azul de metileno (C).



Fonte: Yin e Hamblin (2015); Wainwright, McLean (2017), adaptado pela autora.

O novo azul de metileno (NAM), é um fenotiazínico tricíclico plano, derivado do AM, com absorção máxima na região vermelha do espectro (λ_{\max} = 630 nm). O NAM possui bom rendimento de EROS, porém possui problemas de toxicidade quando utili-

zado em altas concentrações. O NAM exibe em sua composição uma 2,8-dimetilação, permitida devido aos auxocromos amino (Figura 8, indicados pela seta preta) (WAINWRIGHT, MCLEAN, 2017). O NAM é rotineiramente utilizado em coloração e possui baixa toxicidade no escuro, quando utilizado em baixas concentrações, podendo ser utilizado também como FS. Em estudos anteriores o NAM exibiu alta fototoxicidade e alta atividade fotobactericida (LÓPEZ et al., 2016).

Existem diversos relatos na literatura sobre o uso eficiente dos fotossensibilizadores AM e NAM no tratamento fotodinâmico de suspensões de conídios de fungos filamentosos e leveduras. De Menezes e colaboradores (2014) avaliaram o efeito de diferentes FS fenotiazínico em fungos filamentosos, tendo observado diferença entre os valores de CIM do AM obtidos para *Colletotrichum acutatum* (50-200 μM), *C. gloiosporioides* (75 a 200 μM) e *A. nidulans* (50 a 100 μM). Os pesquisadores também avaliaram a eficiência do NAM para *C. acutatum* (10 a 50 μM), *C. gloiosporioides* (10 a 50 μM) e *A. nidulans* (12,5 a 25 μM). Rodrigues et al. (2013) descreveram a eficácia do AM no tratamento fotodinâmico de conídios de cinco espécies de *Candida*, dentre elas *C. albicans*, com valores de CIM variando de 2,5 a 5 μM .

Relatos recentes indicam que o TFDA pode ser potencializado pela adição de diversos sais inorgânicos, como o iodeto de potássio (KI), que na presença de fotossensibilizadores, como o AM e NAM, produzem espécies reativas adicionais as produzidas pelos FS no decorrer do TFDA. Durante o processo, ocorre a formação de espécies reativas de iodo, que são altamente tóxicas, entretanto possuem tempo de vida muito curto, atuando somente em moléculas que estão próximas. O iodo livre é estável e possui maior tempo de vida, no entanto possui baixo efeito tóxico. As EROS produzidas pelas espécies reativas de iodo irão oxidar diversos alvos moleculares, juntamente com as EROS produzidas pelo TFDA, levando a morte celular (HUANG et al., 2018).

1.5.1. Uso do TFDA em fungos filamentosos

Os fungos filamentosos também são suscetíveis aos efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio, as quais podem atuar na membrana celular. O dano celular decorre principalmente da ação das EROS sobre macromoléculas, tais como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e açúcares (VASCONCELOS et al., 2007). Para combatê-las, os fungos possuem mecanismos de defesa antioxidante, seja por via enzimática (peroxidases, catalases e superóxido dismutases) ou por via não enzimática (glutathiona, tire-

doxina e poliaminas, entre outras) (COTINGUIBA et al., 2015). A exposição destes fungos a diferentes condições de estresse, como o estresse oxidativo induzido pelo TFDA, vem sendo associada ao aumento da síntese de enzimas antioxidantes, as quais podem ser usadas como biomarcadores (VASCONCELOS et al., 2007).

Apesar de ainda reduzidos, estudos relacionados ao uso do TFDA para eliminação de fungos filamentosos têm sido realizados. Gonzales et al. (2017) demonstraram que o TFDA foi eficaz para inibir a germinação e reduzir a viabilidade de conídios de *Colletrichum abscissum* em *Citrus sinensis*. Giroldo et al. (2009) e De Carvalho et al. (2009) verificaram que o TFDA com AM possui efetividade de até 90% sobre *Candida albicans*. Gilaberte et al. (2014) utilizaram o TFDA com AM e NAM, para o controle de *Sporothrix schenckii* em pacientes com esporotricose. Gonzales et al. (2010) avaliaram a eficácia do TFDA com AM para a inativação de conídios de *Aspergillus nidulans*. Neste caso, o TFDA inativou 99,7% dos conídios e, atrasou a germinação dos conídios sobreviventes.

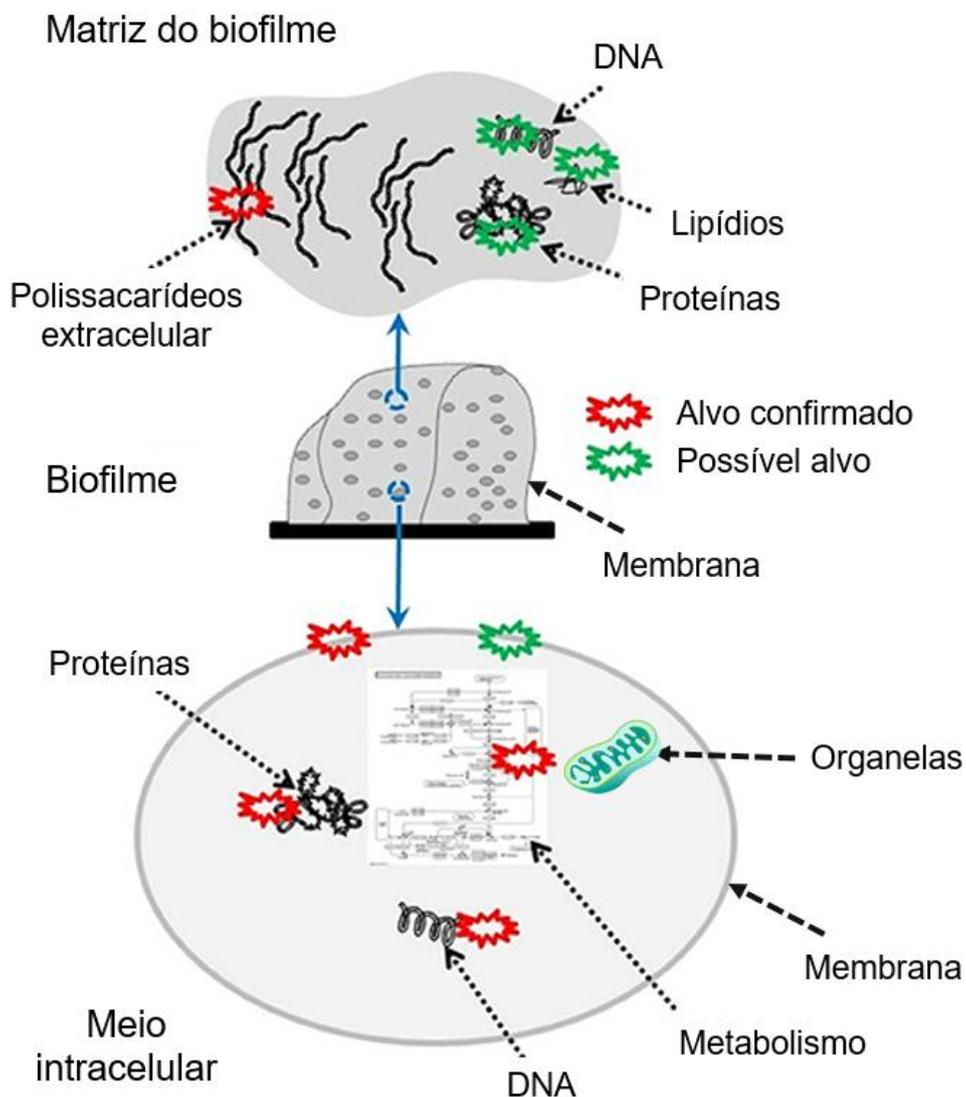
Amescua et al. (2017) analisaram a eficácia do TFDA com o FS rosa bengala, *in vitro* e *in vivo*, em *Fusarium keratoplasticum*, isolado de pacientes com ceratite e que não respondiam ao tratamento com antifúngicos convencionais. *In vitro* houve a inibição completa do fungo e, *in vivo*, somente após duas sessões de TFDA.

Apesar de diversos trabalhos terem descrito a efetividade do TFDA em fungos filamentosos, até o presente momento nenhum estudo foi realizado utilizando biofilmes de fungos filamentosos desenvolvidos sobre suporte inerte de polietileno. A efetividade do TFDA em biofilmes foi mais comumente reportada para bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* (PROCHNOW, 2016) e *Enterococcus faecalis* (POURHAJIBAGHER, 2016), e leveduras, como *Candida albicans* (DOVIGO et al., 2011).

Segundo Hu et al. (2018), a ação da TFDA sobre os biofilmes fúngicos pode ocorrer de duas formas. Em uma delas o FS liga-se aos componentes poliméricos da matriz do biofilme (como polissacarídeos). Na outra, o FS irá penetrar a matriz do biofilme e entrará em contato com as células fúngicas, atuando na superfície celular ou no interior das células (Figura 9). Em qualquer uma dessas situações o FS leva a produção das EROS que atuam sobre diferentes alvos. O acúmulo e a ação das EROS, sobrecarregam as defesas antioxidantes do biofilme, ocasionando o colapso da matriz e a morte das células microbianas. A ligação ou a penetração do FS, deve ocorrer antes do

início da exposição a luz, para que as EROS possam ser produzidas, ocasionando os danos na membrana celular, ácidos nucleicos e lipídios (HU et al., 2018).

Figura 9. Possíveis alvos moleculares das EROS, produzidas pelo TFDA, como o DNA, lipídios, proteínas e polissacarídeos.



Fonte: Hu et al. (2018), adaptado pela autora.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a eficácia de diferentes agentes antifúngicos convencionais e do TFDA na viabilidade de conídios, e em micélios livres e biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições de cultivo para obtenção dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus* em suporte inerte de polietileno;
- Avaliar a eficácia dos agentes antifúngicos miconazol, anfotericina B e hipoclorito sódico em conídios, micélios livres e biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*;
- Avaliar a eficácia do TFDA em biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus* utilizando os fotossensibilizadores fenotiazínicos azul de metileno (AM) e novo azul de metileno (NAM), na presença e na ausência de iodeto de potássio (KI);
- Avaliar a atividade da catalase (CAT) dos biofilmes fúngicos submetidos ao TFDA em comparação com os biofilmes não tratados.

3. Material e Métodos

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP – USP) e no Laboratório de Fotobiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP – USP), com a co-orientação do Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga.

3.1. Manutenção das linhagens em laboratório e meios de cultivo

Os fungos filamentosos *A. fumigatus* e *A. flavus*, selecionados para este trabalho, foram obtidos de amostras de solo e estão estocados na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da FFCLRP – USP. As matrizes fúngicas foram mantidas de acordo com o protocolo de Castellani (1939). Quando necessário, passaram por repiques, sendo cultivadas em tubos de ensaio inclinados, contendo 10 mL de meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Ágar), previamente autoclavados por 20 min (121°C; 1,5 atm). Após repique, as culturas foram mantidas a 30°C por 7 dias, sendo em seguida utilizadas ou armazenadas a 4°C por até 30 dias.

3.2. Preparação da suspensão de conídios

As suspensões de conídios de *A. fumigatus* e de *A. flavus* foram preparadas pela adição de água destilada estéril aos cultivos desenvolvidos em meio BDA, conforme descrito acima, com posterior raspagem da superfície com o auxílio de uma alça de platina estéril. Após a raspagem, as suspensões de conídios foram filtradas em gaze estéril para a remoção dos micélios. A concentração de conídios em cada suspensão foi determinada utilizando-se o contador de células automático TC20 (BioRad), sendo a concentração final ajustada para 10^6 conídios/mL.

3.3. Obtenção dos biofilmes

O protocolo de obtenção de biofilmes utilizado foi adaptado á partir do protocolo descrito por Sato, Jorge, Guimarães (2016). Foram utilizadas telas de polietileno como suporte inerte para fixação e desenvolvimento dos microrganismos em microplacas de 24 poços. As telas foram cortadas em pedaços com dimensões 1cm x 1cm, lavadas com água destilada, secas e mantidas sob luz ultravioleta por 20 min.

Em seguida, para a adesão dos conídios, as telas foram inseridas nos poços das microplacas, contendo 1mL de suspensão de conídios (10^6 conídios/mL) e mantidas a 30°C, sob agitação de 50 rpm por 90 min. Após este período, a suspensão de conídios foi removida com o auxílio de uma pipeta e as telas foram submetidas a duas lavagens consecutivas com 1 mL de água destilada estéril (45 min cada), sob agitação (50 rpm), para remoção dos conídios não aderidos.

Após 90 min de lavagem, os suportes foram transferidos para uma microplaca estéril contendo 1,5 mL de meio Khanna (KHANNA et al., 1995) (Anexo 1), adicionado de glicose (2% m/v) como fonte de carbono, sendo mantidos a 30°C sob agitação (50 rpm) por 36 h para desenvolvimento dos biofilmes de *A. flavus* e 48 h para os biofilmes de *A. fumigatus*.

Os biofilmes foram medidos com um auxílio de um paquímetro, antes e após ao início do tratamento dos biofilmes com os antifúngicos convencionais. As medidas dos biofilmes foram determinadas descontando-se as dimensões do suporte, e realizadas após 12, 24 e 36h de desenvolvimento em estufa a 30°C, após o tratamento. A dimensão média dos biofilmes anterior ao tratamento foi de aproximadamente 12,6 mm × 10,0 mm × 1 mm.

3.4. Tratamento antimicrobiano convencional

Foram avaliadas as ações de diferentes agentes antifúngicos convencionais (Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito sódio), em diferentes concentrações, em conídios em suspensão, micélios livres e biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*. Todos os ensaios foram realizados com réplicas biológicas.

3.4.1. Ação antimicrobiana em conídios

Para avaliar a eficácia dos agentes antifúngicos, as suspensões de conídios foram preparadas como descrito no item 2.2.

Em uma microplaca de 96 poços, contendo 100 µL de suspensão de conídios, foram adicionados os agentes antifúngicos, separadamente, em diferentes concentrações (Anfotericina B: 4 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,01 µg/mL e 0,005 µg/mL; Miconazol: 3,75 µg/mL, 0,71 µg/mL, 0,13 µg/mL, 0,026 µg/mL; hipoclorito sódio: 8,33 µg/mL, 5 µg/ mL, 2,77 µg/ mL, 1,47 µg/ mL). Logo após a adição dos antifúngicos, a placa foi mantida em estufa a 37°C, por 24, 48, e 72 h. Após incubação, amostras das suspensões tratadas foram colocadas sobre meio BDA solidificado para avaliar o crescimento fúngico. Os cultivos em meio BDA foram mantidos em estufa a 30°C por 48 h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela menor concentração de cada agente capaz de inibir o crescimento do fungo.

3.4.2. Ação antimicrobiana em micélios livres

Para analisar a eficiência dos antifúngicos em micélios livres não foi possível utilizar as diretrizes estabelecidas por instituições reguladoras como a Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) ou European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), uma vez que as normativas são direcionadas para testes em conídios. Portanto, para este estudo, foi elaborado um protocolo adaptado para realizar testes antifúngicos em micélios. Em uma microplaca de 24 poços, contendo 1,5 mL de meio Khanna, foi inoculado 1 mL da suspensão de conídios (10^6 conídios/mL). A placa foi mantida em shaker a 30°C, sob agitação de 50 rpm por 36h, para a germinação dos conídios e desenvolvimento dos micélios.

Após o período de desenvolvimento, foram adicionados os antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio, separadamente, em diferentes concentrações. Para Anfotericina B utilizou-se para *A. flavus* 5000 µg/mL, 2500 µg/mL, 1250 µg/mL e 620 µg/mL. Para *A. fumigatus*, foram utilizados 1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL. As concentrações de Miconazol utilizadas foram de 7500 µg/mL, 3750 µg/mL, 1880 µg/mL e 940 µg/mL e de hipoclorito sódio de 6660 µg/mL, 5000 µg/mL, 3320 µg/mL e 1660 µg/mL de cloro livre, para ambos os fungos.

Em seguida, os cultivos foram mantidos sob agitação a 30°C por 48 h, para a ação dos antifúngicos. Posteriormente, para avaliar a manutenção do metabolismo fúngico, foram adicionados 0,002 µg/mL de resazurina, cuja coloração roxa é alterada para rosa quando reduzida a resorufina pelo metabolismo fúngico.

Além disso, amostras dos micélios tratados foram lavadas em água destilada estéril, para remoção dos antifúngicos, inoculadas em meio BDA solidificado e mantidas em estufa a 37°C, para avaliar o crescimento fúngico após os tratamentos. Registros do crescimento foram realizados após 12, 24 e 36h de incubação.

A determinação da CIM foi realizada considerando os resultados da metabolização da resazurina e do crescimento em meio BDA. A CIM foi determinada pela menor concentração do agente em que não houve a metabolização da resazurina e que tenha ocorrido o crescimento fúngico em meio BDA ou em que houve a metabolização da resazurina e crescimento fúngico reduzido. A CFM foi determinada pela menor concentração do agente em que não houve a metabolização da resazurina e nem crescimento fúngico em meio BDA.

3.4.3. Ação antimicrobiana em biofilmes fúngicos

O tratamento dos biofilmes com os antifúngicos convencionais, iniciaram-se posteriormente ao período de formação dos biofilmes, cerca de 36 h para *A. flavus* e 48 h para *A. fumigatus*, conforme descrito anteriormente.

As concentrações utilizadas de Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio (cloro livre) foram as mesmas utilizadas no tratamento dos micélios livres para cada linhagem fúngica.

A análise da eficiência dos agentes antifúngicos em biofilmes, foi realizada conforme descrito para os micélios livres, ou seja, por meio de inoculação em meio BDA para avaliar o crescimento fúngico e pela adição de resazurina para verificação da viabilidade celular. A CIM foi determinada pela menor concentração do agente em que não houve a metabolização da resazurina e que tenha ocorrido o crescimento do biofilme em meio BDA ou em que houve a metabolização da resazurina e o crescimento reduzido do biofilme em meio BDA. A CFM foi determinada pela menor concentração do agente em que não houve a metabolização da resazurina e nem crescimento do biofilme em meio BDA.

3.5. Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA)

Os TFDA foram realizados com biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*, obtidos como descrito anteriormente, utilizando os fotossensibilizadores azul de metileno (AM) e novo azul de metileno (NAM), em diferentes concentrações (AM: 17 µg/mL, 8,4 µg/mL, 3,3 µg/mL, 1,7 µg/mL e 0,8 µg/mL; NAM: 25 µg/mL, 13 µg/mL, 5 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL).

Para cada FS foram preparadas duas placas com as mesmas concentrações dos FS. Uma das placas foi mantida na ausência de luz (-L), e a outra foi exposta à luz (+L), com emissão entre 600 e 650 nm e irradiância de 14 mW cm⁻², sob agitação de 100 rpm, por 1 h. A fluência ao final do período de exposição foi de aproximadamente 50 J/cm². A iluminação foi fornecida por uma matriz de 96 LEDs, com pico de emissão em 631 nm. A matriz foi feita no instituto de Química da USP de Ribeirão Preto, utilizando LED redondo Cree ® de 5 mm modelo número LC503UHR1- 15Q-Q, CREE Inc., Durham, NC, EUA (Rodrigues et al., 2012). As medições de luz foram realizadas usando uma sonda de irradiância (CC-3-UV, Ocean Optics, EUA) parafusada na extremidade de uma fibra óptica acoplada a um espectrorradiômetro USB (Ocean Optics, Dune-

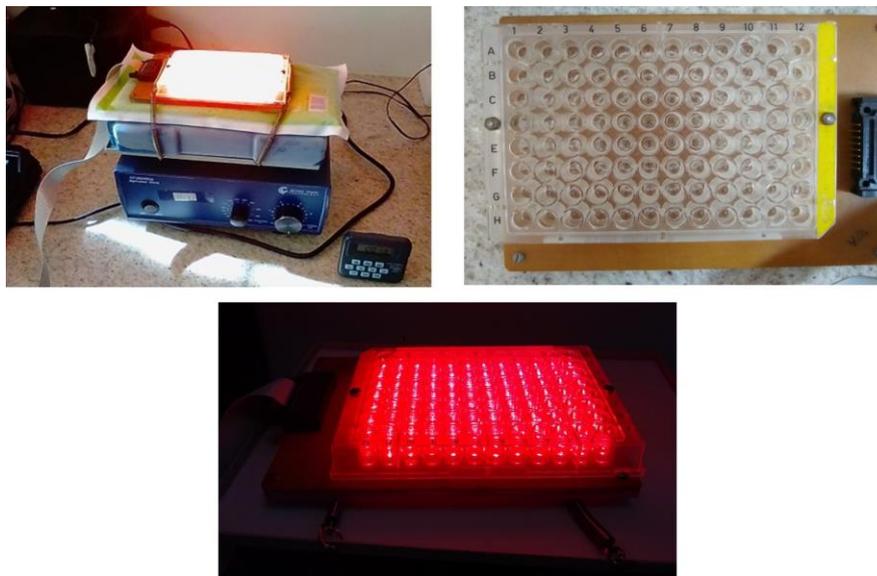
din, FL, EUA). A luz foi medida no interior do poço, no nível da amostra, para reduzir a interferência da placa plástica), conforme descrito anteriormente por Rodrigues et al. (2012) (Figura 10). Após os primeiros experimentos com biofilmes de *A. flavus* o tempo de exposição à luz foi estendido para 2 h (100 J/cm²).

Na metade do tempo de tratamento, os biofilmes das placas +L e -L, foram virados para que ambos os lados fossem expostos as mesmas condições experimentais.

Após a adição dos FS, as duas placas, foram mantidas na ausência de luz, para que ocorresse a absorção de FS pelo biofilme. Este tempo de incubação com o FS, foi inicialmente estabelecido em 30 min, conforme experimentos anteriores realizados com conídios, pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fotobiologia e Genética de Microrganismos do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP.

Ao final do tempo de tratamento, com o auxílio de uma pipeta, o meio de cultivo contendo os FS foi cuidadosamente retirado. Após a remoção do meio, os biofilmes foram lavados com 1 mL de água destilada estéril, em três ciclos de lavagem consecutivos, para a remoção do FS, finalizando o tratamento. Logo após os três ciclos de lavagem, foi adicionado 1mL de meio Khanna e 0,002 µg/mL de resazurina, e os biofilmes foram incubados a 30°C por 90 min. Após este período, os biofilmes foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA solidificado e incubados em estufa a 30°C para acompanhamento do crescimento fúngico por diferentes períodos (12, 24 e 36 h).

Figura 10. Conjunto de 96 LEDs, com emissão 660-650 nm e irradiância de 14 mW cm⁻², montados sob uma microplaca de 96 poços.



Fonte: Autora.

3.6. Dosagem da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada a partir dos biofilmes submetidos ou não ao TFDA. Os biofilmes foram removidos do suporte com o auxílio de pinça e estilete. Após a remoção do suporte, os biofilmes foram macerados com areia previamente tratada com ácido clorídrico, em gral de porcelana mantido em banho de gelo e, posteriormente, ressuspensão em 6 mL solução tampão fosfato de potássio 100 mmol.L⁻¹, pH 7,5. Após a maceração, os extratos foram centrifugados a 9681 × g por 10 min. O sobrenadante obtido, contendo a enzima CAT, foi utilizado como fonte enzimática e o pellet foi descartado.

A determinação da atividade da CAT foi realizada por meio da quantificação do consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) presente no meio reacional, conforme descrito por Sperotto (2014). O consumo do H₂O₂ foi acompanhado em espectrofotômetro, com leitura a 240 nm.

Para a reação foram utilizados 700 µL de solução tampão fosfato de potássio 100 mmol.L⁻¹, pH 7,5, 250 µL de peróxido de hidrogênio (50 mM) e 50 µL de extrato enzimático. Para o branco da solução foi utilizado 750 µL de solução tampão fosfato de potássio pH 7,5 e 250 µL de peróxido de hidrogênio. O branco da solução foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. O cálculo do consumo do peróxido de hidrogênio, foi realizado utilizando o ϵ de 0,0054 µmolmL⁻¹ cm⁻¹.

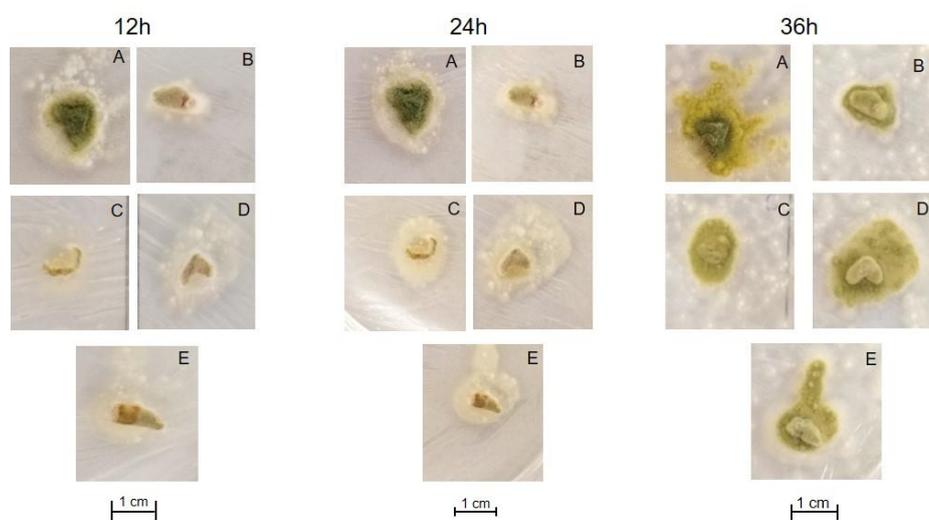
4. Resultados e Discussão

4.1. Ação dos agentes antifúngicos em micélios livres de *A. flavus*

Inicialmente foi avaliada a ação da AMB sobre micélios livres de *A. flavus* desenvolvidos em microplacas de 24 poços, como descrito no item 2.4.2. Após o tratamento dos micélios livres foi possível constatar que ocorreu redução expressiva na metabolização da resazurina, quando utilizada a concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$ de antifúngico. A metabolização da resazurina, pelos micélios tratados com as demais concentrações do antifúngico foi inferior, se comparada a metabolização do micélio não tratado, indicando um possível efeito fungistático da AMB.

No Anexo 2 (Tabela 1), são apresentadas as medidas dos raios das colônias obtidas a partir do desenvolvimento dos micélios tratados e não tratados com AMB. De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que ocorreu o crescimento fúngico em todas as concentrações avaliadas. Entretanto, tal crescimento foi menor para os micélios tratados com as duas maiores concentrações do antifúngico (Figura 11), principalmente se considerado o crescimento com até 24 h de incubação, evidenciando o efeito fungistático da AMB sobre micélios livres de *A. flavus*, como já apontado pela redução da metabolização da resazurina.

Figura 11. Desenvolvimento de *A. flavus* em meio BDA a partir do micélio não tratado com antifúngico (A), e micélios tratados com Anfotericina B nas concentrações de 5000 $\mu\text{g/mL}$ (B); 2500 $\mu\text{g/mL}$ (C); 1250 $\mu\text{g/mL}$ (D); 620 $\mu\text{g/mL}$ (E), após 12 h, 24 h e 36 h de incubação em estufa a 30°C.



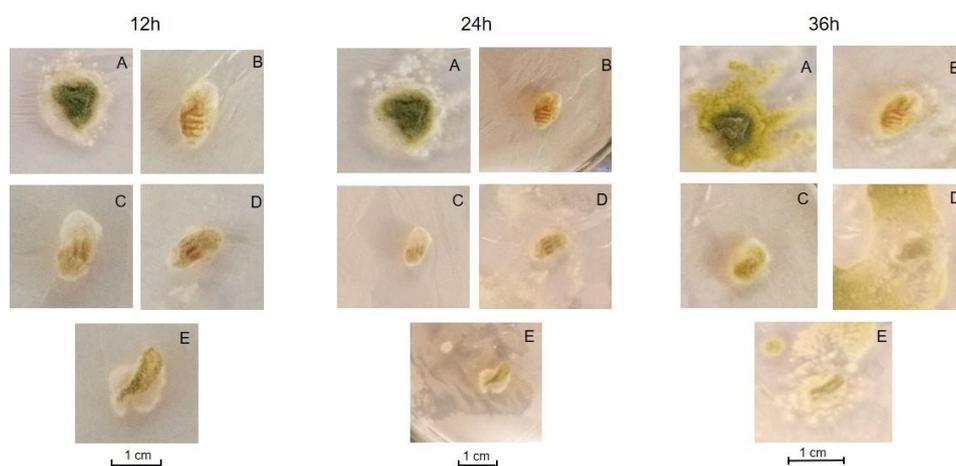
Fonte: Autora.

A AMB é um agente antifúngico utilizado para tratar infecções fúngicas invasivas, sendo eficaz contra uma grande parcela de fungos que causam doenças em humanos (MCCRTHY; O'SHAUGHNESSY; WALSH, 2017). De acordo com KHODAVAISY et al. (2016), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da AMB para isolados clínicos de *A. flavus* é de 0,25 a 8 µg/mL, sendo o MIC₉₀ 1 µg/mL. No presente trabalho, a CIM da AMB para o micélio livre da linhagem de *A. flavus* usada neste estudo foi de 2500 µg/mL (Tabela 3). É importante destacar que o protocolo utilizado neste estudo difere daquele usado por KHODAVAISY e colaboradores. Neste estudo, optou-se por utilizar meio de cultivo mais rico em nutrientes, para mimetizar determinadas condições encontradas na natureza, em que há maior disponibilidade de nutrientes. Além disso, a densidade fúngica utilizada foi superior ao comumente mencionado em outros estudos. Essas condições podem, portanto, explicar as diferenças de CIM encontradas. Além disso, o *A. flavus* geralmente é susceptível ao tratamento com AMB, entretanto o aumento da resistência a este agente vem sendo descrito na literatura para testes *in vitro* e *in vivo* (MCCRTHY; O'SHAUGHNESSY; WALSH, 2017).

No caso do MCZ, houve a metabolização da resazurina pelos micélios submetidos ao tratamento em todas as concentrações do agente, sendo esta semelhante a metabolização dos micélios não tratados. A análise do crescimento em meio BDA (Figura 12) indicou uma possível ação fungistática do agente, uma vez que houve a inibição da esporulação dos micélios tratados com 7500 e 3750 µg/mL de antifúngico e o crescimento foi menor se comparado ao crescimento dos micélios que não passaram pelo tratamento (Tabela 2 do Anexo 2).

Geißel et al. (2018), através do teste de disco-difusão, ao utilizar 10 µg/disco de MCZ, inibiram o desenvolvimento de *A. flavus*. O tratamento foi realizado a 31°C por 48 h. Houve a redução do crescimento dos micélios da linhagem de *A. flavus* avaliada neste estudo quando utilizada a concentração mínima de 3750 µg/mL de MCZ (Tabela 3).

Figura 12. Desenvolvimento de *A. flavus* em meio BDA a partir do micélio não tratado com o agente antifúngico (A), e micélios tratados com Miconazol nas concentrações de 7500 µg/mL (B); 3750 µg/mL (C); 1880 µg/mL (D); 940 µg/mL (E), após 12 h, 24 h e 36 h de incubação em estufa a 30°C.



Fonte: Autora.

Tabela 3. Susceptibilidade *in vitro* de micélios livres de *A. flavus* aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.

	Concentrações µg/mL	CIM µg/mL	CFM µg/mL
Anfotericina B	620 – 5.000	2.500	> 5.000
Miconazol	940 – 7.500	3.750	> 7.500
Hipoclorito de sódio	1.660 – 6.660	1.660	5.000

Fonte: Autora.

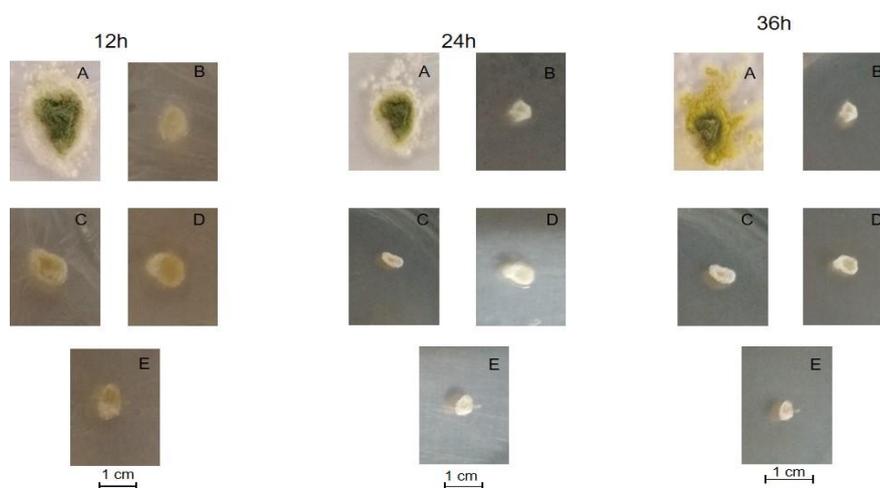
Após o teste antifúngico com hipoclorito de sódio foi possível constatar a ação antifúngica do agente quando utilizado 6660 µg/mL e 5000 µg/mL de cloro livre, em que não ocorreu a metabolização da resazurina, indicando o possível efeito fungicida nestas concentrações. Tal ação foi reduzida com a diminuição da concentração do agente antifúngico. Ainda assim, é possível afirmar que, a metabolização da resazurina foi inferior nas demais concentrações de hipoclorito de sódio utilizada, se comparada aos controles.

A ação antifúngica do hipoclorito de sódio foi confirmada pela análise do desenvolvimento fúngico em meio BDA (Figura 13 e Tabela 1 do Anexo 3). O

desenvolvimento dos micélios tratados foi inibido, em todas as concentrações utilizadas do agente, por todo o período da análise.

Madrid et al. (2013) relataram a eficiência do hipoclorito de sódio no controle do desenvolvimento de micélios de *A. flavus*. Os valores de CIM e da concentração fungicida mínima (CFM) foram obtidos utilizando 8% de hipoclorito de sódio. Desta forma, a CIM obtida neste trabalho para micélios livres de *A. flavus* foi de 6,66% (1660 $\mu\text{g/mL}$ de cloro livre) e a CFM de 20% (5000 $\mu\text{g/mL}$ de cloro livre) (Tabela 3). Os fabricantes deste agente indicam o uso de 4% para a obtenção de uma ação antifúngica eficiente.

Figura 13. Desenvolvimento de *A. flavus* em meio BDA a partir do micélio não tratado com o agente antifúngico (A), e micélios tratados com hipoclorito de sódio nas concentrações de cloro livre de 6660 $\mu\text{g/mL}$ (B); 5000 $\mu\text{g/mL}$ (C); 3320 $\mu\text{g/mL}$ (D); 1660 $\mu\text{g/mL}$ (E), após 12 h, 24 h e 36 h de incubação em estufa a 30°C.



Fonte: Autora.

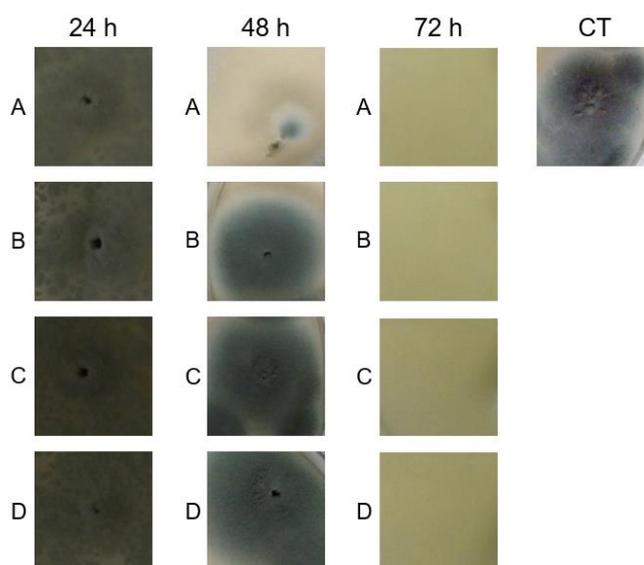
4.2. Ação dos agentes antifúngicos em micélios livres de *A. fumigatus*

Diante dos resultados obtidos nos experimentos com *A. flavus*, optou-se por iniciar as avaliações da eficácia da AMB sobre micélios livres de *A. fumigatus* utilizando concentrações de 1000 a 1 $\mu\text{g/mL}$.

Considerando o tratamento efetuado por 24 h, houve o crescimento em meio BDA (Figura 14) e a metabolização da resazurina pelos micélios tratados em todas as concentrações de AMB utilizadas. Por outro lado, quando o período de tratamento foi estendido para 48 h, não ocorreu a metabolização da resazurina pelos micélios quando

usadas as concentrações de 1000 a 10 $\mu\text{g/mL}$ de AMB, indicando o efeito fungistático deste agente em micélios de *A. fumigatus*, o que foi parcialmente confirmado pela inibição do crescimento dos micélios tratados em meio BDA com 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 14. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA a partir dos micélios tratados com Anfotericina B nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (A); ,100 $\mu\text{g/mL}$ (B); 10 $\mu\text{g/mL}$ (C); 1 $\mu\text{g/mL}$ (D) e na ausência de agente antifúngico (CT), por 24 h, 48 h e 72 h.



Fonte: Autora.

Em período superior de tratamento (72 h), não houve o crescimento em meio BDA e nem a metabolização da resazurina em todas as concentrações de AMB utilizadas, indicando uma ação fungicida do agente, sendo os valores de CIM e de CFM estimados em 1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4), semelhante ao obtido por Khodavaisy et al. (2016) para o uso de AMB sobre micélios de *A. fumigatus*, com CIM₉₀ de 1 $\mu\text{g/mL}$. Fica evidenciado assim, a importância do tempo de tratamento para a obtenção do efeito fungicida do agente.

Tabela 4. Susceptibilidade in vitro de micélios livres de *A. fumigatus* aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.

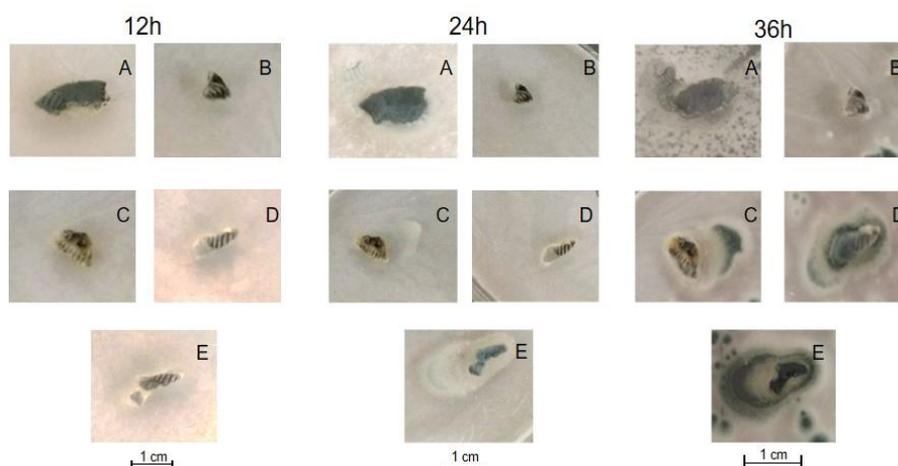
	Concentrações μg/mL	CIM μg/mL	CFM μg/mL
Anfotericina B	1 – 1.000	1	1
Miconazol	940 – 7.500	3.750	> 7.500
Hipoclorito de sódio	1.660 – 6.660	3.320	5.000

Fonte: Autora.

A eficiência do MCZ sobre micélios livres de *A. fumigatus* foi também avaliada. A metabolização da resazurina foi inferior em todas as concentrações de MCZ analisadas, se comparada a metabolização dos micélios que não passaram pelo tratamento.

O MCZ foi eficiente no controle do desenvolvimento dos micélios por até 24 h de incubação (Figura 15), utilizando a concentração mínima de 1880 μg/mL (Tabela 4). Após este período, houve o controle do crescimento, utilizando somente a menor concentração do agente (3750 μg/mL) (Tabela 2 do Anexo 2), indicando um efeito fungistático.

Figura 15. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA a partir do micélio não tratado com o agente antifúngico (A), e micélios tratados com Miconazol nas concentrações de 7500 μg/mL (B); 3750 μg/mL (C); 1880 μg/mL (D); 940 μg/mL (E), após 12 h, 24 h e 36 h de incubação em estufa a 30°C.

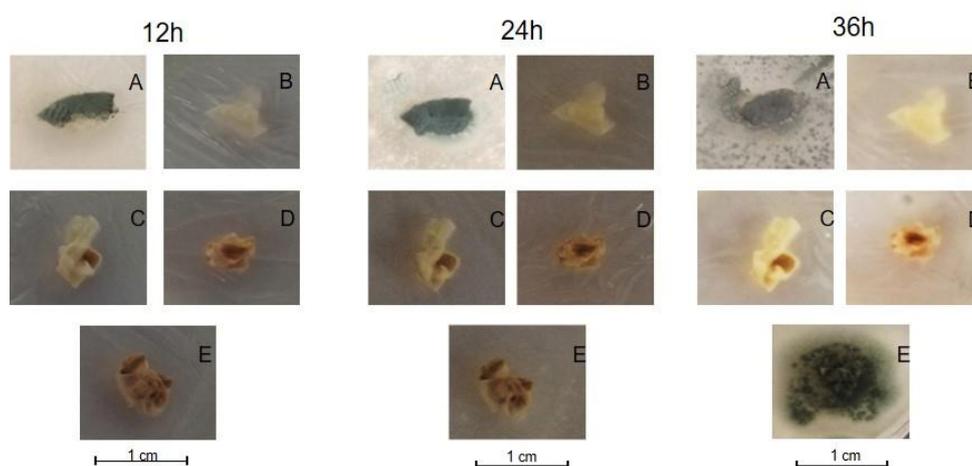


Fonte: Autora.

Não houve a metabolização da resazurina pelos micélios de *A. fumigatus* tratados com hipoclorito de sódio, ao utilizar 6660 $\mu\text{g/mL}$ e 5000 $\mu\text{g/mL}$ de cloro livre. Nas demais concentrações de hipoclorito de sódio, a metabolização da resazurina foi inferior ao observado para o micélio não tratado.

O desenvolvimento dos micélios em meio BDA, após tratamento, foi inibido por todo o período de análise, utilizando a concentração mínima de 3320 $\mu\text{g/mL}$ de antifúngico (Tabela 4), demonstrando o possível efeito fungicida do hipoclorito de sódio (Figura 16 e Tabela 1 do Anexo 3). No entanto houve, mesmo que reduzida, a metabolização da resazurina ao utilizar esta concentração do agente. Portanto a CFM para a linhagem analisada foi de 5000 $\mu\text{g/mL}$. Considerando os dados obtidos, com 36 h de incubação após o tratamento, o valor do CIM estimado foi de 3320 $\mu\text{g/mL}$, considerando o crescimento em meio BDA e a metabolização da resazurina (Tabela 4).

Figura 16. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA a partir do micélio não tratado com o agente antifúngico (A), e micélios tratados com hipoclorito de sódio nas concentrações de cloro livre de 6660 $\mu\text{g/mL}$ (B); 5000 $\mu\text{g/mL}$ (C); 3320 $\mu\text{g/mL}$ (D); 1660 $\mu\text{g/mL}$ (E), após 12 h, 24 h e 36 h de incubação em estufa a 30°C.



Fonte: Autora.

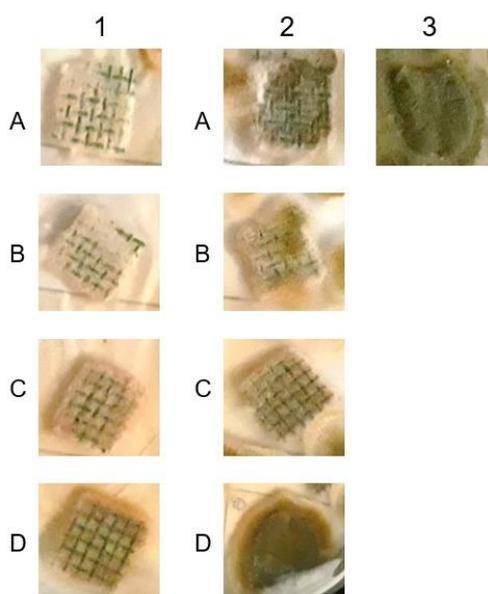
4.3. Ação dos agentes antifúngicos em biofilmes de *A. flavus*

Os ensaios com biofilmes de *A. flavus* foram realizados utilizando-se os mesmos agentes antifúngicos que os utilizados nos ensaios com o micélio livre. Contudo, no primeiro teste antifúngico em biofilmes de *A. flavus*, em que se utilizou menores concentrações de AMB e MCZ, foi possível observar que houve a manutenção

da metabolização da resazurina, indicando a possível ineficiência destes agentes, nas concentrações utilizadas, para inibir o metabolismo fúngico.

Na Figura 17 é possível observar que, apesar dos biofilmes terem metabolizado a resazurina, houve lento crescimento em meio BDA, evidenciando o efeito fungistático da AMB e do MCZ nas concentrações utilizadas, sendo as menores concentrações (0,24 $\mu\text{g/mL}$ e 0,02 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 5), respectivamente, as mais efetivas em biofilmes de *A. flavus*. Diante dos resultados obtidos, as concentrações dos agentes antifúngicos foram reajustadas, objetivando encontrar uma concentração cujo efeito fungicida fosse obtido.

Figura 17. Desenvolvimento de *A. flavus* em meio BDA a partir dos biofilmes tratados com Anfotericina B (coluna 1) nas concentrações de 125 $\mu\text{g/mL}$ (A1); 15,6 $\mu\text{g/mL}$ (B1); 1,95 $\mu\text{g/mL}$ (C1); 0,24 $\mu\text{g/mL}$ (D1) e Miconazol (coluna 2) nas concentrações de 125 $\mu\text{g/mL}$ (A2); 1,56 $\mu\text{g/mL}$ (B2); 0,02 $\mu\text{g/mL}$ (C2); 0,0002 $\mu\text{g/mL}$ (D2), e na ausência destes agentes (coluna 3), após 48 h de incubação.



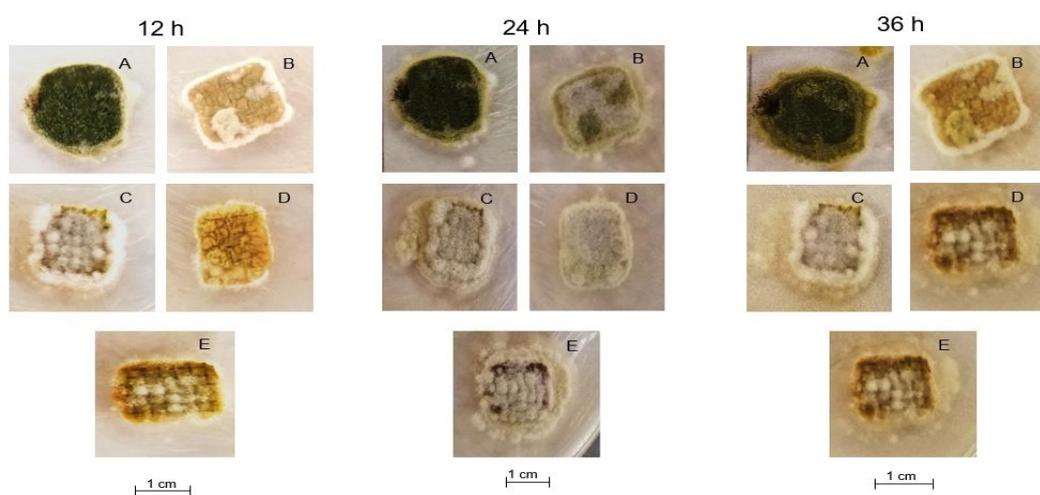
Fonte: Autora.

Ao utilizar maiores concentrações de AMB (5000 a 620 $\mu\text{g/mL}$), foi possível observar que houve a metabolização reduzida da resazurina pelos biofilmes de *A. flavus* submetidos ao tratamento. Adicionalmente, ocorreu o atraso do crescimento dos biofilmes tratados quando inoculados em meio BDA (Figura 18 e Tabela 3 do Anexo 2), se comparados aos biofilmes não tratados. Além disso, a AMB inibiu a esporulação dos

biofilmes tratados na concentração mínima de 620 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 5), por até 36 h de desenvolvimento em meio BDA.

Ellis (2002) afirma que a CIM₉₀ de AMB para micélios livres de *A. flavus*, ou seja, concentração onde 90% dos isolados fúngicos são inibidos, foi de 2 $\mu\text{g/mL}$. O CIM para de biofilmes de *A. flavus* utilizados neste estudo foi de 0,24 $\mu\text{g/mL}$. Ramage et al. (2011) citam que os biofilmes são mais resistentes ao tratamento com os agentes antifúngicos se comparados as suas células planctônicas. Uma das características que torna os biofilmes mais resistentes é a presença da matriz extracelular, a qual dificulta a difusão do antifúngico. Neste caso, maiores concentrações do antifúngico são necessárias para se obter o controle do crescimento (Ramage et al., 2011).

Figura 18. Desenvolvimento *A. flavus* em meio BDA a partir de biofilmes não tratados com o agente antifúngico (A) e de biofilmes tratados com Anfotericina B nas concentrações de 5000 $\mu\text{g/mL}$ (B); 2500 $\mu\text{g/mL}$ (C); 1250 $\mu\text{g/mL}$ (D); 620 $\mu\text{g/mL}$ (E), em estufa a 30°C.

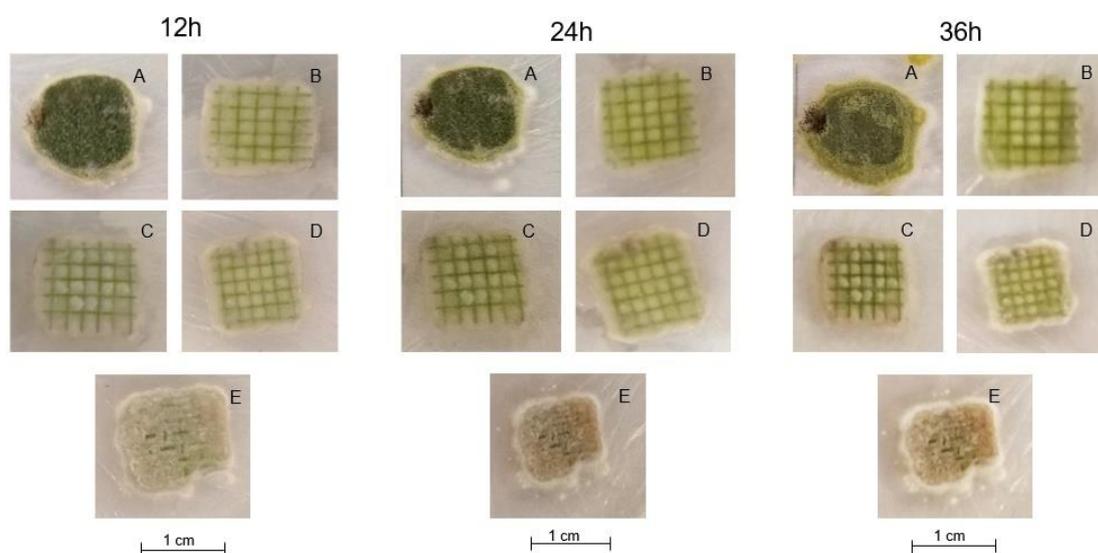


Fonte: Autora.

Após o tratamento dos biofilmes com MCZ, observou-se que ocorreu a metabolização da resazurina em todas as concentrações do antifúngico empregadas, evidenciado que o agente não foi capaz de inibir o metabolismo dos biofilmes de *A. flavus*. Os biofilmes que passaram pelo tratamento com 7500 $\mu\text{g/mL}$ e 3750 $\mu\text{g/mL}$ de MCZ não se desenvolveram quando cultivados em meio BDA por até 36 h (Figura 19 e Tabela 4 do Anexo 2). Adicionalmente, ocorreu a redução do crescimento dos biofilmes tratados com 1880 $\mu\text{g/mL}$ e 940 $\mu\text{g/mL}$ de miconazol, se comparados aos biofilmes não tratados, indicando assim, o efeito fungistático do agente nos biofilmes. O MCZ inibiu a

esporulação dos biofilmes tratados, por todo o período de análise. Portanto, considerando os resultados obtidos com os dois testes antifúngicos, a CIM do miconazol para biofilmes de *A. flavus* foi de 0,02 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 5).

Figura 19. Desenvolvimento de *A. flavus* em meio BDA a partir de biofilme não tratado com agente antifúngico (A), e biofilmes tratados por 48 h com Miconazol nas concentrações de 7500 $\mu\text{g/mL}$ (B); 3750 $\mu\text{g/mL}$ (C); 1880 $\mu\text{g/mL}$ (D); 940 $\mu\text{g/mL}$ (E), em estufa a 30°C.



Fonte: Autora.

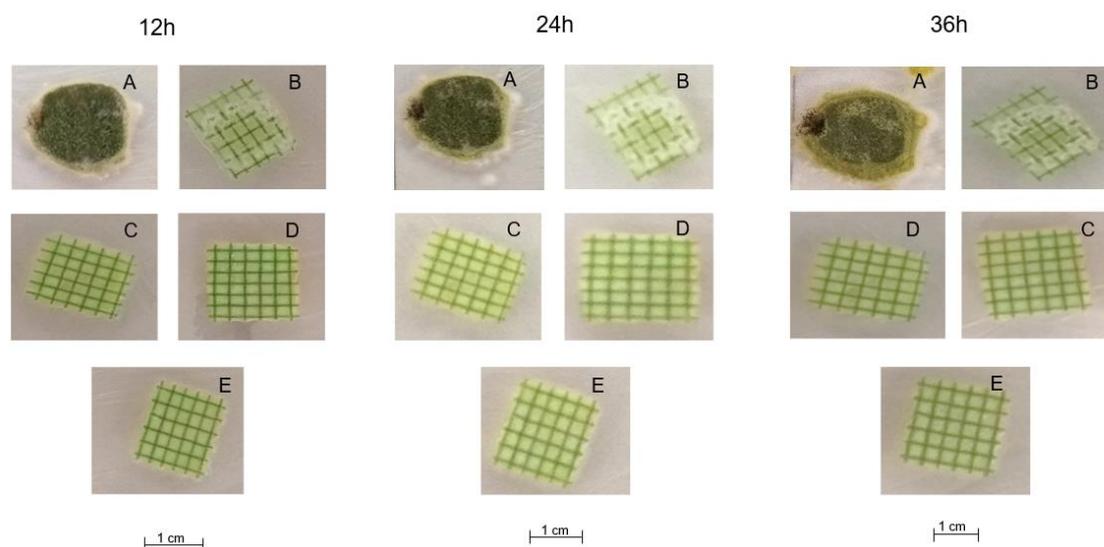
Tabela 5. Susceptibilidade *in vitro* de biofilmes de *A. flavus* aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.

	Concentrações utilizadas $\mu\text{g/mL}$	CIM $\mu\text{g/mL}$	CFM $\mu\text{g/mL}$
Anfotericina B	0,24 - 125	0, 24	> 5.000
	620 - 5.000		
Miconazol	0,0002 - 125	0,02	> 7.500
	940 - 7.500		
Hipoclorito de sódio	1.660 - 6.660	1.660	5.000

Fonte: Autora.

Quando considerada a ação do hipoclorito de sódio, foi possível constatar a ação antifúngica do agente, visto que não ocorreu a metabolização da resazurina quando utilizadas as duas maiores concentrações do agente. Na Figura 20 e na Tabela 6 do Anexo 3, é possível constatar que houve a inibição do crescimento e da esporulação dos biofilmes tratados com o hipoclorito de sódio, estabelecendo assim, o valor de CFM de 5000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 5); nas demais concentrações houve lento crescimento fúngico, indicando um possível efeito fungistático (CIM 1660 $\mu\text{g/mL}$) do agente nestas concentrações. Como mencionado anteriormente, de acordo com o fabricante, o efeito antifúngico do hipoclorito de sódio é obtido com o uso de 4% (v/v). É interessante notar que, para os biofilmes utilizados, o volume mínimo do agente em que houve o atraso no desenvolvimento foi de 150 μL , cerca de 6,6%, valor superior ao recomendado pelos fabricantes do agente. Segundo De Freitas et al. (2011), o hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) possui atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *Candida* sp.

Figura 20. Desenvolvimento de *A. flavus* em meio BDA a partir dos biofilmes não tratados com o agente antifúngico (A) e biofilmes tratados com hipoclorito de sódio nas concentrações de cloro livre de 6660 $\mu\text{g/mL}$ (B); 5000 $\mu\text{g/mL}$ (C); 3320 $\mu\text{g/mL}$ (D); 1660 $\mu\text{g/mL}$ (E), incubadas em estufa por 12 h, 24 h e 36 h.



Fonte: Autora.

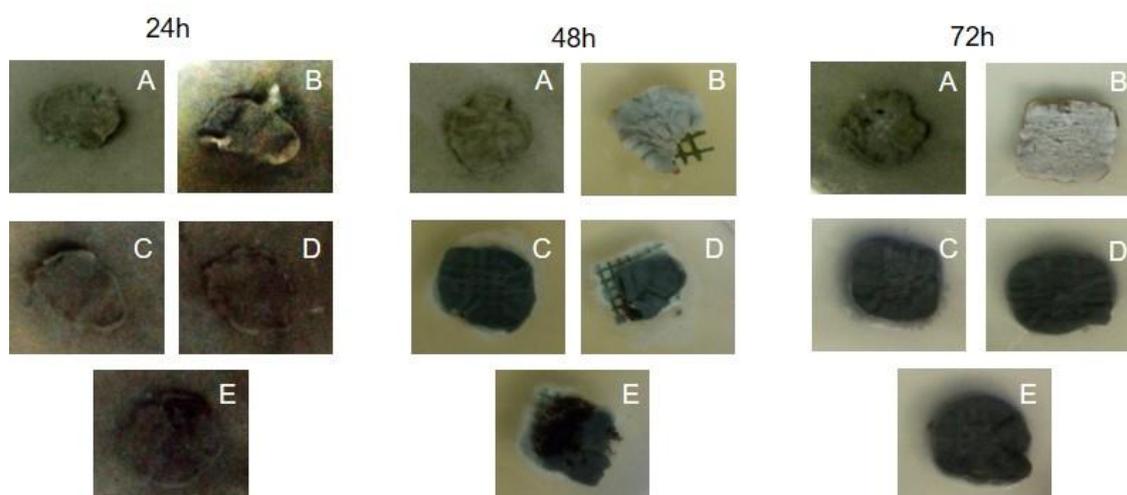
4.4. Ação dos agentes antifúngicos em biofilmes de *A. fumigatus*

Observou-se que ocorreu a metabolização da resazurina pelos biofilmes após o tratamento com todas as concentrações da AMB, com 24 h e 48 h de tratamento. No

entanto, quando o tratamento foi estendido para 72 h, não ocorreu a metabolização da resazurina pelos biofilmes de *A. fumigatus* na concentração de 1000 µg/mL de AMB, evidenciando o possível efeito antifúngico do agente nesta concentração.

Na Figura 21 é possível observar que ocorreu um considerável crescimento, em meio BDA, dos biofilmes tratados com AMB por 24 h. Entretanto, quando o período de tratamento foi estendido para 48 h e 72 h, não houve crescimento significativo dos biofilmes, principalmente quando utilizado 1000 µg/mL de AMB. A esporulação do biofilme foi inibida, ao utilizar 1000 µg/mL do agente. Segundo Mowat et al. (2007), o valor da CIM para AMB em biofilmes de *A. fumigatus* é de 32 µg/mL. O valor da CIM obtido para a AMB em biofilmes da linhagem de *A. fumigatus* aqui utilizada foi de 1 µg/mL e de 1000 µg/mL para a CFM (Tabela 6).

Figura 21. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA, a partir dos biofilmes não tratado com o agente antifúngico (A), e biofilmes tratados com Anfotericina B nas concentrações de 1000 µg/mL (B); 100 µg/mL (C); 10 µg/mL (D); 1 µg/mL (E), por 24 h, 48 h e 72 h de tratamento.



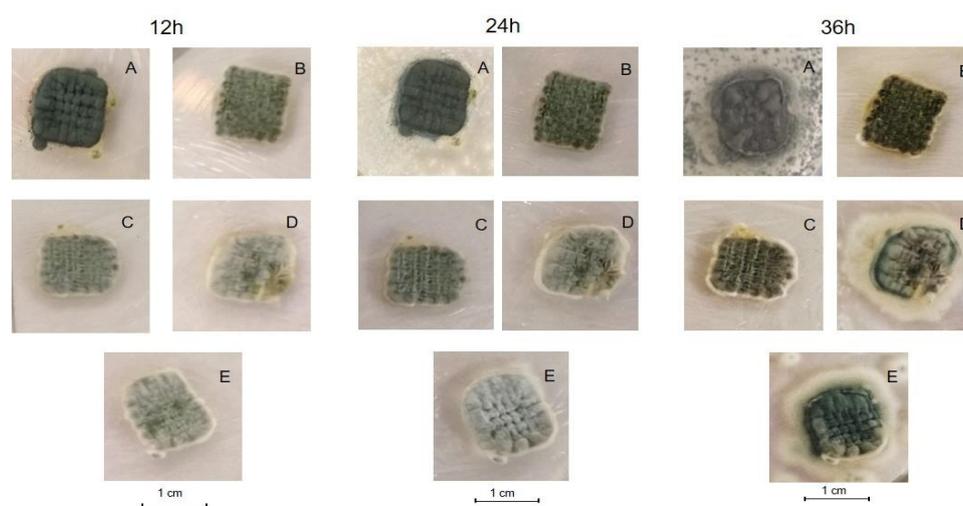
Fonte: Autora.

Considerando o uso do MCZ, houve a metabolização da resazurina pelos biofilmes de *A. fumigatus* tratados com todas as concentrações do agente. Na Figura 22 e Tabela 4 do Anexo 2, é possível verificar que o crescimento em meio BDA dos biofilmes tratados foi menor se comparado ao crescimento do biofilme não tratado. No entanto, com 36 h de incubação, o crescimento foi menor somente utilizando as duas

maiores concentrações do agente. Tais resultados indicam a ação fungistática do MCZ, com valor da CIM de 3750 µg/mL (Tabela 6).

Segundo Shishodia, Tiwari, Shankar (2019), os biofilmes de *Aspergillus* spp. possuem uma resistência temporária aos agentes antifúngicos devido a presença da matriz extracelular, sendo esta, uma barreira para a ação do antifúngico. A matriz extracelular dos biofilmes de *A. fumigatus* auxilia a junção das hifas para formar a estrutura do biofilme, o que permite aumentar a resistência aos antifúngicos. Esses autores ainda observaram a resistência de biofilmes de *A. fumigatus* aos antifúngicos convencionais, incluindo o MCZ (SHISHODIA, TIWARI, SHANKAR, 2019).

Figura 22. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA a partir dos biofilmes não tratado com o agente antifúngico (A), e biofilmes tratados com Miconazol nas concentrações de 7500 µg/mL (B); 3750 µg/mL (C); 1880 µg/mL (D); 940 µg/mL (E), incubadas em estufa por 12 h, 24 h e 36 h.



Fonte: Autora.

Tabela 6. Susceptibilidade *in vitro* de biofilmes de *A. fumigatus* aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.

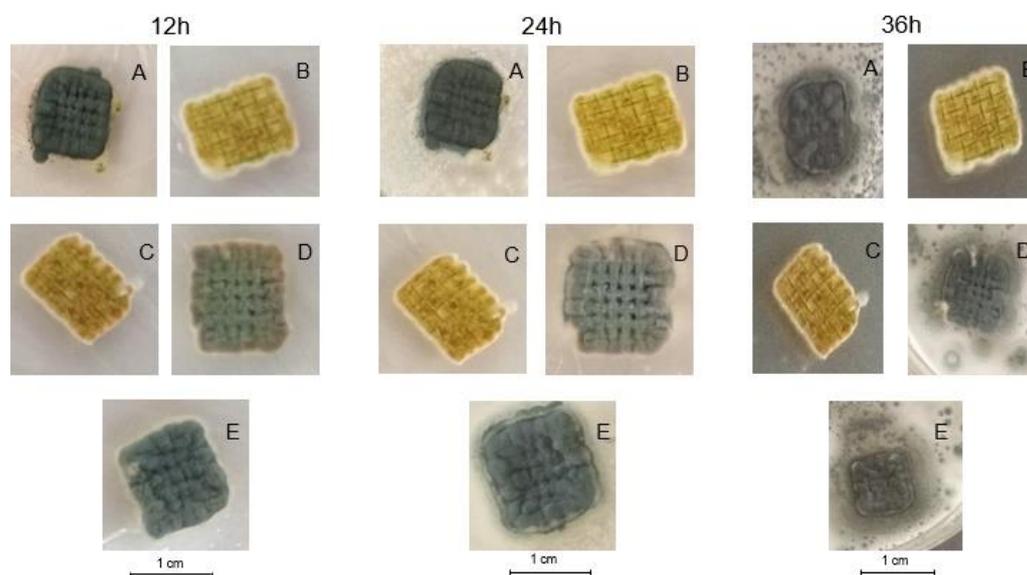
	Concentrações µg/mL	CIM µg/mL	CFM µg/mL
Anfotericina B	1 – 1.000	1	1.000
Miconazol	940 – 7.500	3.750	> 7.500
Hipoclorito de sódio	1.660 – 6.660	5.000	5.000

Fonte: Autora.

Os tratamentos dos biofilmes de *A. fumigatus* com o hipoclorito de sódio foram realizados com concentrações de cloro livre disponível entre 6660 µg/mL a 1660 µg/mL. Foi possível observar que não ocorreu a metabolização da resazurina utilizando 6660 µg/mL e 5000 µg/mL. Além disso, a metabolização foi menor, nas duas menores concentrações do antifúngico, se comparadas aos biofilmes não tratados, evidenciando o efeito antifúngico do agente e a sua eficiência para inibir o metabolismo dos biofilmes de *A. fumigatus*.

Estes resultados foram confirmados pela análise do crescimento dos biofilmes tratados em meio BDA (Figura 23 e na Tabela 6 do Anexo 3). Desta forma, ocorreu inibição do desenvolvimento fúngico e, conseqüentemente, da esporulação, quando empregadas concentrações de 6660 µg/mL e 5000 µg/mL do agente. Sendo assim, a CFM para o hipoclorito de sódio para biofilmes de *A. fumigatus* foi de 5000 µg/mL. O desenvolvimento dos biofilmes tratados com 3320 µg/mL e 1660 µg/mL foi inibido por até 24 h de incubação, entretanto após 36h de incubação, o crescimento do biofilme foi inibido utilizando somente a concentração de 5000 µg/mL, sendo estimado o valor de CIM e CFM de 5000 µg/mL (Tabela 6). Como citado anteriormente, uma das características dos biofilmes que os tornam mais resistentes aos antifúngicos é a presença da matriz extracelular (SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019). O hipoclorito de sódio, por meio do cloro ativo e da alteração do pH, tem como um dos alvos justamente a matriz extracelular, podendo atuar como um excelente agente antifúngico para biofilmes (ESTRELA et al., 2002).

Figura 23. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA a partir de biofilmes não tratados com o agente antifúngico (A), e de biofilmes tratados com hipoclorito de sódio nas concentrações de 6660 µg/mL (B); 5000 µg/mL (C); 3320 µg/mL (D); 1660 µg/mL (E), incubados em estufa por 12 h, 24 h e 36 h.

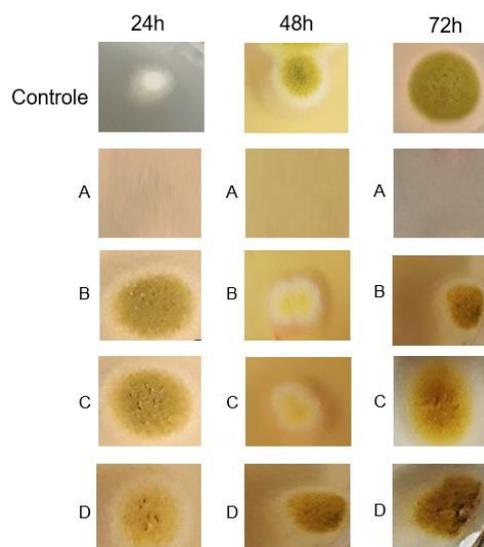


Fonte: Autora.

4.5. Ação dos agentes antifúngicos em conídios de *A. flavus*

Na Figura 24 é possível observar a inibição do desenvolvimento de *A. flavus* a partir das suspensões de conídios tratados com 4 µg/mL de AMB para todos os períodos de tratamento. Nas menores concentrações do agente, o tempo de tratamento influenciou a culturabilidade dos conídios, visto que o tamanho das colônias foi inferior com 48h e 72h de tratamento. No entanto, não houve redução na concentração mínima necessária para inibir a culturabilidade dos conídios tratados, ao estender o tempo de tratamento. Segundo Borman et al. (2017), a CIM de AMB para conídios de *A. flavus* é 1 µg/mL.

Figura 24. Desenvolvimento de *A. flavus* em meio BDA a partir das suspensões de conídios não tratados com o agente antifúngico, com 24 h de incubação em estufa e de suspensões de conídios tratadas com Anfotericina B nas concentrações de 4 µg/mL (A); 0,2 µg/mL (B); 0,01 µg/mL (C); 0,005 µg/mL (D), por 24 h, 48 h e 72 h de tratamento.



Fonte: Autora.

Tabela 7. Susceptibilidade *in vitro* de conídios de *A. flavus* aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.

	Concentrações µg/mL	CIM		
		24h de tratamento µg/mL	48h de tratamento µg/mL	72h de tratamento µg/mL
Anfotericina B	0,005 - 4	4	0,2	0,2
Miconazol	0,026 - 3,75	3,75	0,13	0,13
Hipoclorito de sódio	1,45 - 8,33	1,47	1,47	1,47

Fonte: Autora.

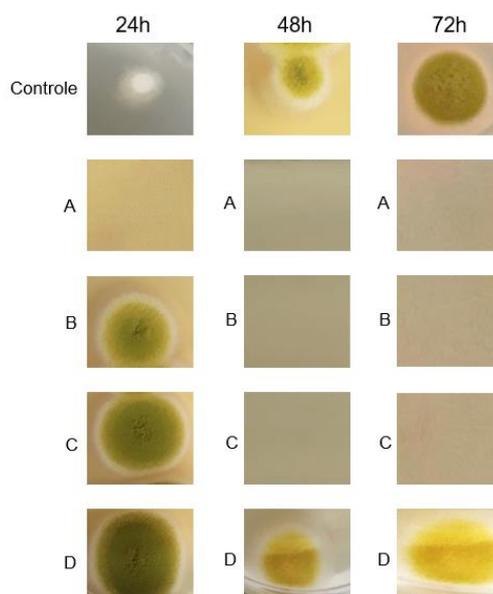
Após os tratamentos foi possível constatar que os micélios livres (CIM de 2.500 µg/mL e CFM > 5.000 µg/mL) foram mais resistentes a AMB, se comparados aos conídios (CIM de 0,2 µg/mL) e aos biofilmes (CIM de 0,24 µg/mL e CFM > 5000 µg/mL) tratados por 48 h se considerados os valores de CIM.

O efeito do MCZ nos conídios de *A. flavus* (Figura 25) variou em função do tempo de tratamento. A eficiência do antifúngico foi menor com 24 h de tratamento, com o valor de CIM de 3,75 µg/mL. Contudo, quando o período foi estendido para 48 h e 72 h, o tratamento foi mais eficiente, reduzindo o valor de CIM para 0,13 µg/mL (Tabela 7). Segundo Hagiwara et al. (2018), a CIM do MCZ para micélios livres de *A. flavus* varia de 2 a 8 µg/mL.

A maior resistência dos conídios fúngicos aos antifúngicos, se comparados aos micélios, pode ser explicada pela presença de uma camada externa da parede celular, constituída por proteínas altamente hidrofóbicas, denominadas hidrofobinas. O MCZ possui natureza hidrofóbica, facilitando sua difusão através de membranas, mas não pela parede do esporo, sendo repelido pelas regiões hidrofóbicas criadas pelas hidrofobinas (GOW; LATGE; MUNRO, 2017).

Além disso, a melanina, outro constituinte da parede dos conídios fúngicos, lhes confere proteção contra espécies reativas de oxigênio e lise celular. A melanina também possui a habilidade de se ligar a moléculas de alguns antifúngicos e neutralizá-los. O MCZ é responsável por inibir enzimas oxidativas e peroxidativas presentes na membrana, favorecendo a ação de espécies reativas de oxigênio. Contudo, na presença da melanina as espécies reativas não podem atuar eficientemente, ficando os conídios protegidos (GOW; LATGE; MUNRO, 2017).

Figura 25. Desenvolvimento, após 24 h, de *A. flavus* em meio BDA a partir das suspensões de conídios não tratados com o agente antifúngico e tratados com Miconazol nas concentrações de 3,75 µg/mL (A); 0,71 µg/mL (B); 0,13 µg/mL (C); 0,026 µg/mL (D), por 24 h, 48 h e 72 h de tratamento.

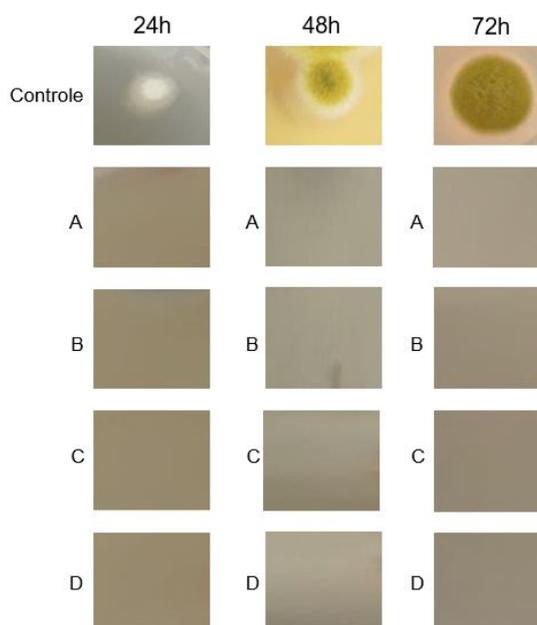


Fonte: Autora.

Ao observar resultados obtidos com tratamento dos micélios livres, biofilmes e suspensão de conídios de *A. flavus* com MCZ, foi possível constatar, considerando os valores de CIM, que os micélios (CIM de 37500 µg/mL e CFM > 7500 µg/mL) foram mais resistentes ao MCZ se comparado a suspensão de conídios (CIM de 0,13 µg/mL) e aos biofilmes (CIM de 0,02 µg/mL e CFM > 7500 µg/mL).

Analisando a inibição do crescimento fúngico em meio BDA a partir de conídios de *A. flavus* tratados com o hipoclorito de sódio (Figura 26), é possível observar a eficiência deste agente no controle da culturabilidade dos conídios. O valor de CIM obtido para o agente nas suspensões de conídios foi de 1,47 µg/mL (6%). Diferentemente do que houve com os outros agentes utilizados, o hipoclorito de sódio inibiu o desenvolvimento dos conídios com apenas 24 h de tratamento na menor concentração do agente utilizada.

Figura 26. Desenvolvimento de *A. flavus* em meio BDA a partir das suspensões de conídios não tratados com o agente antifúngico, com 24 h de incubação em estufa e de suspensões de conídios tratadas com hipoclorito de sódio nas concentrações de 8,33 µg/mL (A); 5 µg/mL (B); 2,77 µg/mL (C); 1,47 µg/mL (D), por 24 h, 48 h e 72 h de tratamento.



Fonte: Autora.

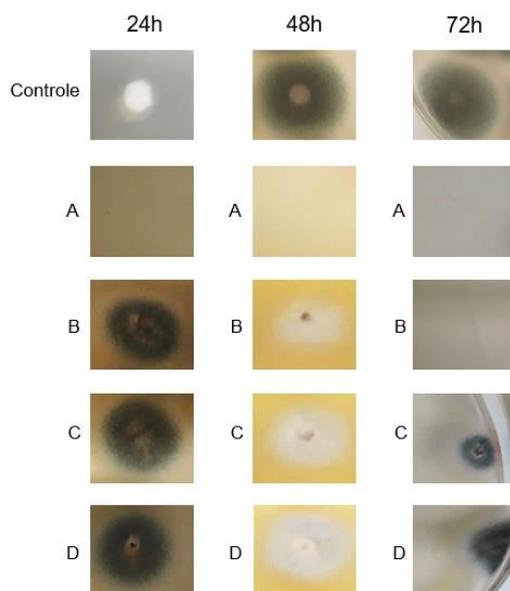
Ao comparar os resultados obtidos para o tratamento dos micélios livres, dos biofilmes e da suspensão de conídios de *A. flavus* com o hipoclorito de sódio, foi possível constatar que os biofilmes (CIM de 1660 µg/mL e CFM de 5000 µg/mL) foram igualmente resistentes ao hipoclorito de sódio se comparados aos micélios (CIM de 1660 µg/mL e CFM de 5000 µg/mL) para ambos CIM e CFM, e aos conídios (CIM de 1,47 µg/mL).

4.6. Ação dos agentes antifúngicos em conídios de *A. fumigatus*

Analisando o desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA, a partir de conídios tratados com AMB por 48 h e 72 h (Figura 27), é possível observar que o crescimento foi menor, em todas as concentrações do agente utilizadas se comparado ao observado a partir de conídios não tratados. Com 24 h e 48 h de tratamento, houve o controle do desenvolvimento fúngico utilizando somente a maior concentração da AMB, sendo o valor de CIM de 4 µg/mL. O maior tempo de tratamento elevou a eficiência da AMB em conídios de *A. fumigatus*, reduzindo os valores de CIM para 0,2 µg/mL com 72

h de tratamento. Segundo Borman et al. (2017), a CIM para AMB sobre conídios de *A. fumigatus* foi 1 µg/mL.

Figura 27. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA a partir das suspensões de conídios não tratados (controle) e tratadas com Anfotericina B nas concentrações de 4 µg/mL (A); 0,2 µg/mL (B); 0,01 µg/mL (C); 0,005 µg/mL (D), por 24 h, 48 h e 72 h de tratamento.



Fonte: Autora.

Ao analisar os resultados obtidos com tratamento dos micélios livres, biofilmes e suspensão de conídios de *A. fumigatus* com AMB, foi possível constatar que os biofilmes (CIM de 1 µg/mL e CFM de 1000 µg/mL) foram mais resistentes se comparados aos micélios livres (CIM de 1 µg/mL e CFM de 1 µg/mL) e aos conídios (CIM de 0,2 µg/mL), se considerados os valores das CIM.

Tabela 8. Susceptibilidade *in vitro* de conídios de *A. fumigatus* aos agentes antifúngicos Anfotericina B, Miconazol e hipoclorito de sódio.

	Concentrações µg/mL	CIM		
		24h de tratamento µg/mL	48h de tratamento µg/mL	72h de tratamento µg/mL
Anfotericina B	0,005– 4	4	4	0,2
Miconazol	0,026 – 3,75	0,71	0,71	0,71
Hipoclorito de sódio	1,47– 8,33	1,47	1,47	1,47

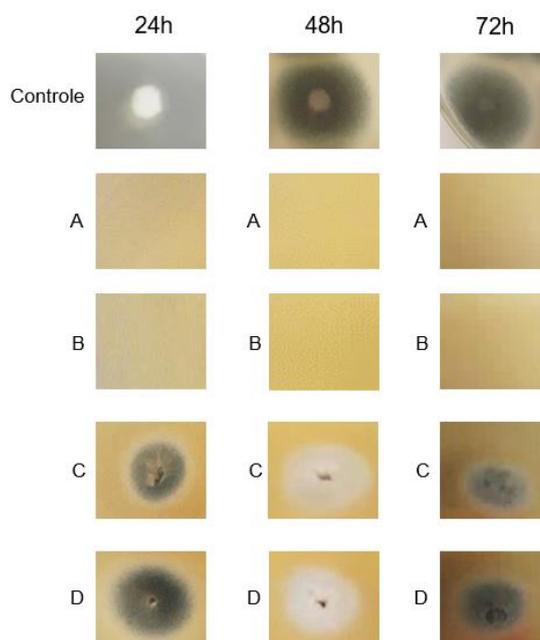
Fonte: Autora.

A ação do MCZ, em diferentes concentrações, em conídios de *A. fumigatus* foi também avaliada (Figura 28). Houve crescimento fúngico em meio BDA a partir do inóculo das suspensões de conídios tratadas com o agente nas concentrações de 0,13 µg/mL e 0,026 µg/mL. O aumento no tempo de tratamento não elevou a eficiência do MCZ, não ocorrendo redução da concentração necessária para inibir a culturabilidade dos conídios tratados, estabelecendo a CIM de 0,71 µg/mL (Tabela 8).

Segundo Pontes e colaboradores (2020) a CIM do miconazol em conídios de *A. fumigatus* é superior a 16 µg/mL, valor superior ao obtido neste estudo. Assim, cabe ressaltar as diferenças de protocolos adotados. Pontes e colaboradores utilizaram as diretrizes estabelecidas pela CLSI, em que os conídios permanecem em contato direto com o agente antifúngico por todo o tempo de análise. No protocolo estabelecido para o presente estudo, os conídios permaneceram em contato direto com o MCZ por até 72 h, e após esse período, uma amostra dos conídios tratados foi transferida para meio BDA e, portanto, nesta etapa os conídios não estão em contato direto com o antifúngico.

Após comparar os resultados obtidos com tratamento dos micélios livres, biofilmes e suspensão de conídios de *A. fumigatus* com o MCZ, foi possível constatar que os biofilmes (CIM de 37500 µg/mL e CFM de > 7500 µg/mL) foram igualmente resistentes ao MCZ se comparados aos micélios (CIM de 3750 µg/mL e CFM de > 7500 µg/mL), ambos mais resistentes que os conídios (CIM de 0,71 µg/mL).

Figura 28. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA a partir das suspensões de conídios não tratadas (controle) e tratadas com Miconazol nas concentrações de 3,75 µg/mL (A); 0,71 µg/mL (B); 0,13 µg/mL (C); 0,026 µg/mL (D), por 24 h, 48 h e 72 h de tratamento.



Fonte: Autora.

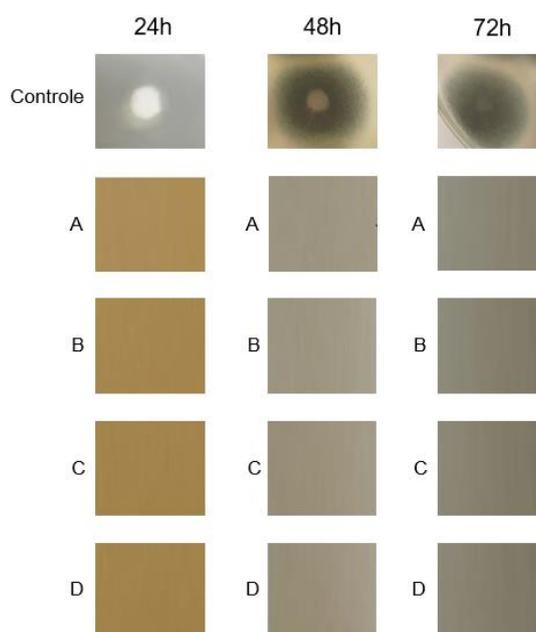
Assim como o ocorrido com o tratamento de micélios livres e biofilmes, o hipoclorito de sódio foi eficiente no controle da culturabilidade dos conídios, inibindo o desenvolvimento do fungo *A. fumigatus* (Figura 29), em todas as concentrações do agente utilizada, já com 24h de tratamento, com valor de CIM de 1,47 µg/mL (Tabela 8). Desta forma, fica caracterizada a ação fungicida do hipoclorito de sódio sobre os conídios em suspensão.

É interessante destacar a ampla utilização de hipoclorito de sódio como agente antimicrobiano para esterilizar superfícies inanimadas. Além disso, o agente é amplamente utilizado na endodontia, na assepsia de canais radiculares. Clinicamente, a concentração sugerida é de 0,5 a 6% (v/v), de modo que o agente tenha atividade antimicrobiana e não cause danos ao tecido circundante (ESTRELA et al., 2002). A CIM de hipoclorito de sódio para os conídios da linhagem utilizada neste trabalho foi de 6%, concentração no limite indicado para o uso clínico. Nesta concentração, o agente também poderá ser utilizado na assepsia de objetos inanimados, como em ambientes hospitalares, residenciais e industriais.

Ao analisar resultados obtidos com tratamento dos micélios livres, biofilmes e suspensão de conídios de *A. fumigatus* com hipoclorito de sódio, foi possível constatar

que os biofilmes (CIM de 5000 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 5000 $\mu\text{g/mL}$) foram mais resistentes ao hipoclorito de sódio se comparados aos micélios livres (CIM de 3320 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 5000 $\mu\text{g/mL}$) e aos conídios (CIM de 1,47 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 29. Desenvolvimento de *A. fumigatus* em meio BDA a partir das suspensões de conídios não tratadas (controle) e tratadas com hipoclorito de sódio nas concentrações de 8,33 $\mu\text{g/mL}$ (A); 5 $\mu\text{g/mL}$ (B); 2,77 $\mu\text{g/mL}$ (C); 1,47 $\mu\text{g/mL}$ (D), por 24 h, 48 h e 72 h de tratamento.



Fonte: Autora.

4.7. Tratamento Fotodinâmico Antimicrobiano (TFDA)

4.7.1. TFDA dos biofilmes de *A. flavus*

De forma geral, as condições empregadas para o tratamento fotodinâmico dos biofilmes de *A. flavus*, utilizando os FS AM e NAM, por diferentes períodos de exposição a luz (1h e 2h), foram ineficientes para a inativação completa dos biofilmes. Contudo, foi possível verificar que houve uma pequena redução na metabolização da resazurina pelos biofilmes tratados com 17 $\mu\text{g/mL}$ de AM e 25 $\mu\text{g/mL}$ de NAM e expostos a luz por 2h, se comparados aos biofilmes não tratados com o FS. Foi observada a metabolização da resazurina pelos biofilmes que foram tratados com os FS, mas que não foram expostos a luz.

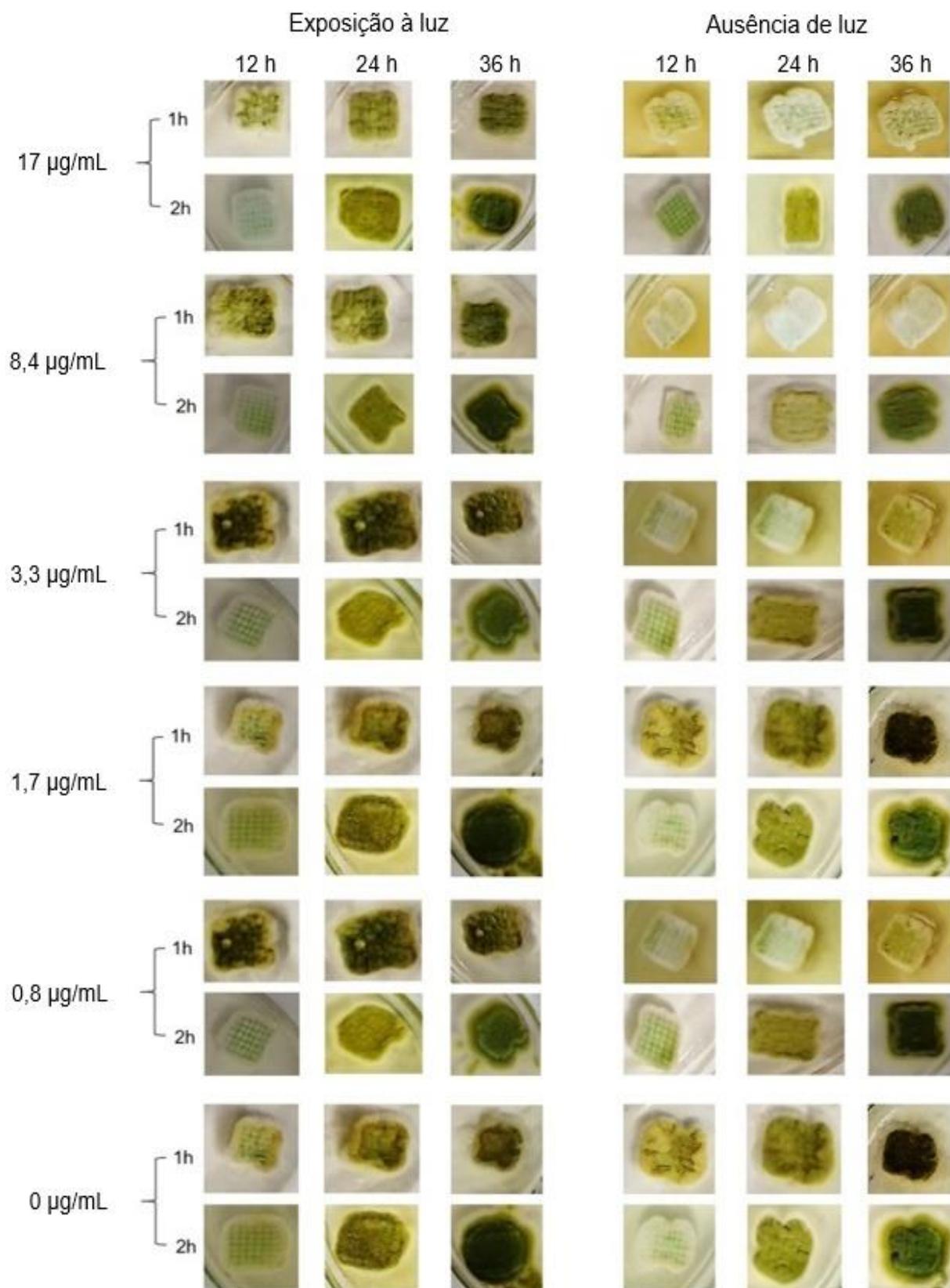
Os biofilmes de *A. flavus* tratados e não tratados foram transferidos para meio BDA, sendo os crescimentos acompanhados e registrados após 12 h, 24 h e 36 h de

incubação a 30°C (Figuras 30 e 31). Houve o desenvolvimento de todos os biofilmes que receberam FS, expostos ou não a luz. Além disso, não houve diferenças significativas no crescimento dos biofilmes se comparados os resultados obtidos com o uso do AM (Figura 30) e do NAM (Figura 31). De Carvalho et al. (2019) relataram a inibição de 70-74% do desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans* utilizando 20 µg/mL de AM como FS. Gonzales et al. (2010) avaliaram a eficiência do TFDA utilizando FS fenotiazínicos, incluindo o AM, sobre os conídios de *Aspergillus nidulans*, constatando o efeito fungicida do TFDA sobre o fungo ao reduzir expressivamente a germinação.

A eficiência do TFDA está diretamente relacionada a permeabilidade, proximidade e ligação do FS ao fungo no momento da exposição a luz e à produção de EROS, uma vez que essas moléculas possuem tempo de vida curto, e por isto, devem estar próximas ao microrganismo alvo. Como já dito anteriormente, uma das características que tornam os biofilmes mais resistentes é a presença de sua matriz extracelular polimérica, sendo responsável por impedir e/ou dificultar a penetração dos FS no biofilme, inviabilizando a ação das EROS nas células mais profundas dos biofilmes (Hu et al., 2018).

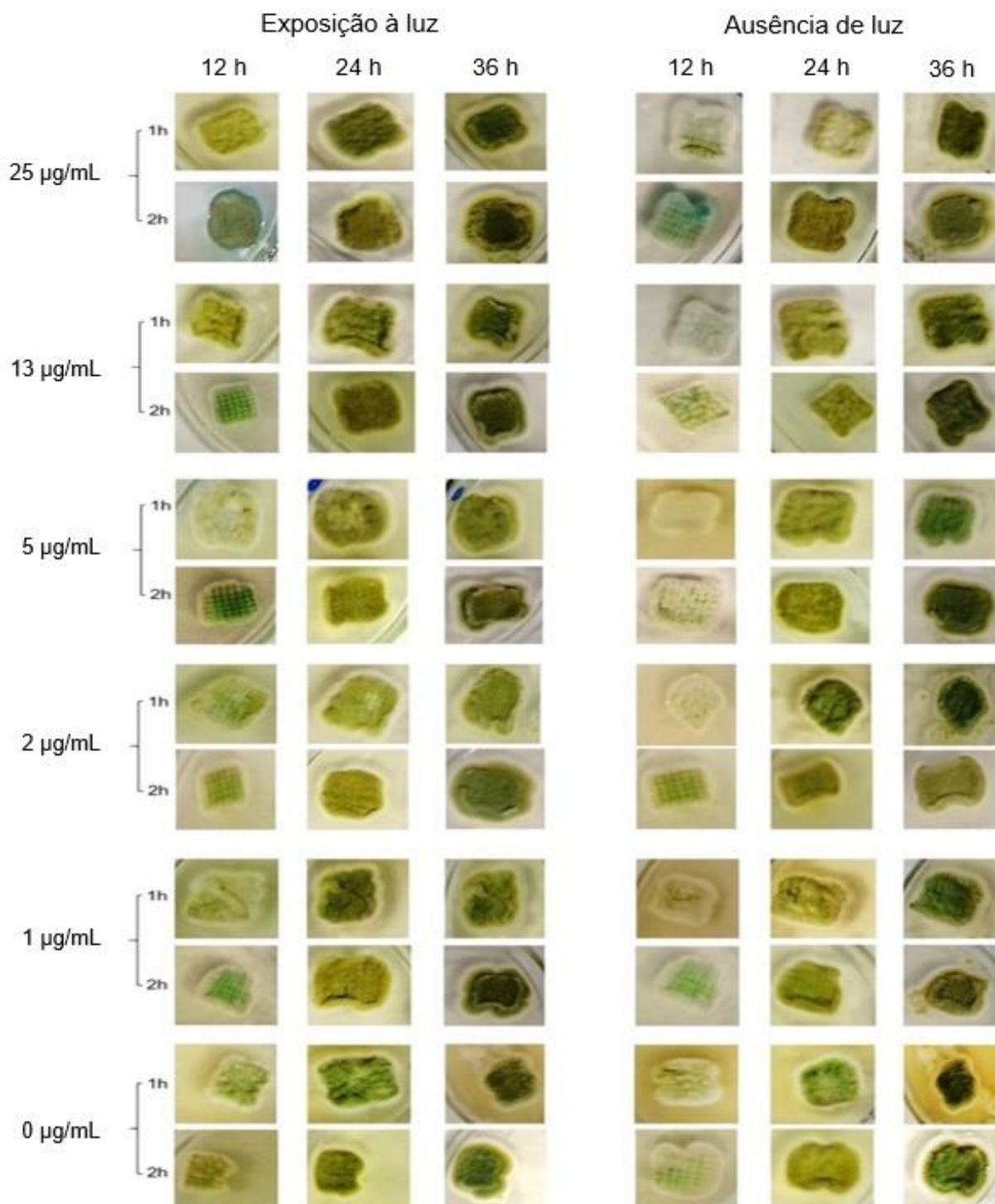
O processo do TFDA em biofilmes se inicia com a ligação do fotossensibilizador na matriz do biofilme, seguida pela sua difusão e ligação à superfície celular fúngica ou a penetração no interior celular, dependendo do FS utilizado. O NAM, por exemplo, age intracelularmente (HU et al., 2018). A barreira da matriz extracelular dificulta a penetração dos FS nos biofilmes, o que pode explicar a ineficiência do TFDA sobre os biofilmes, nas condições utilizadas. O tempo de incubação dos biofilmes com os FS antes da exposição à luz foi de trinta minutos e pode não ter sido suficiente para que os FS se difundissem pela matriz e alcançassem as células fúngicas dispostas mais profundamente nos robustos biofilmes.

Figura 30. Desenvolvimento de biofilmes de *A. flavus* em meio BDA, após exposição à luz por 1h e 2h, utilizando AM como FS em diferentes concentrações e na ausência de iluminação. Após o tratamento, os biofilmes foram incubados em estufa a 30°C por 12 h, 24 h e 36h.



Fonte: Autora.

Figura 31. Desenvolvimento de biofilmes de *A. flavus* em meio BDA, após exposição à luz por 1h e 2h, utilizando NAM como FS em diferentes concentrações e na ausência de iluminação. Após o tratamento, os biofilmes foram incubados em estufa a 30°C por 12 h, 24 h e 36h.



Fonte: Autora.

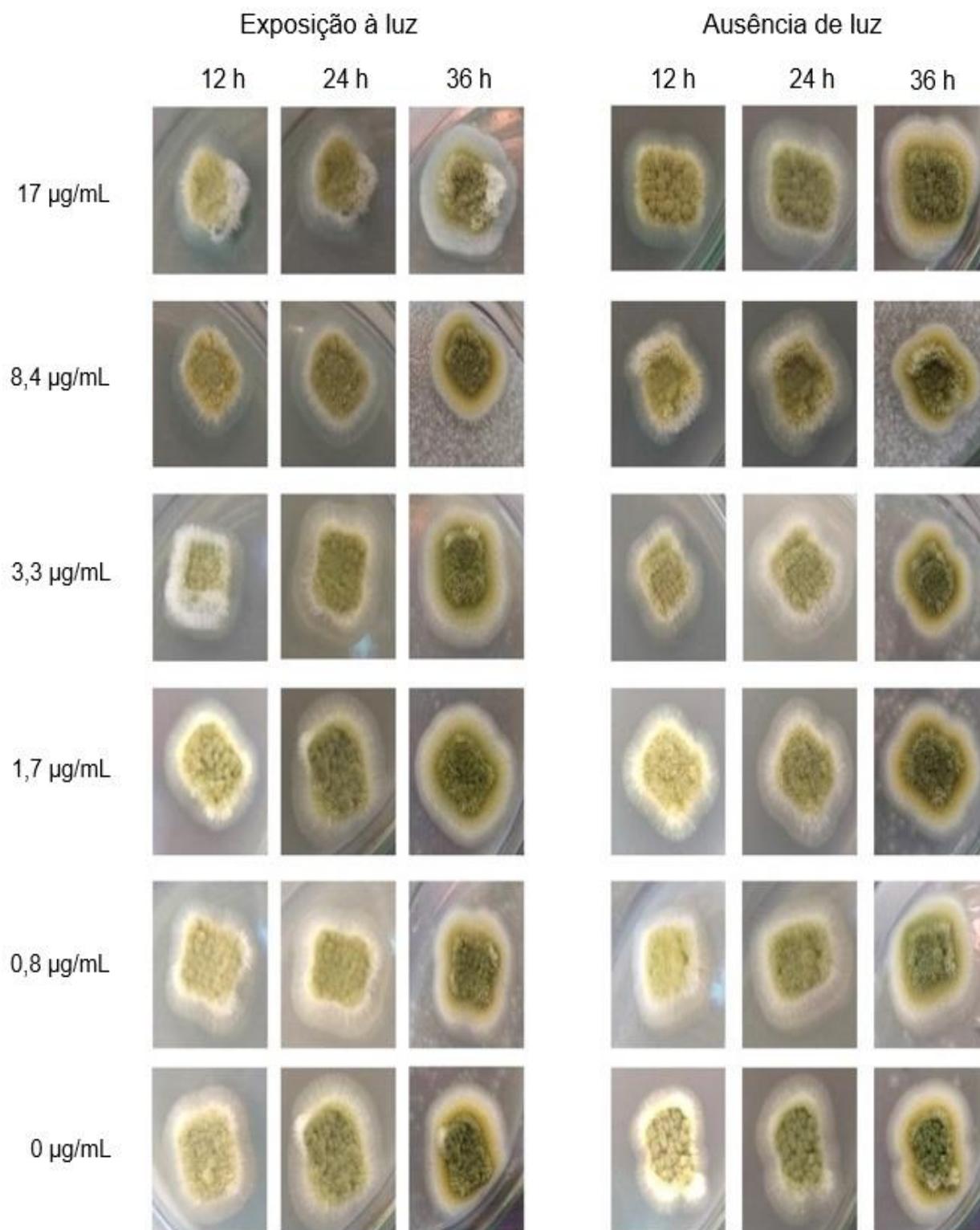
De acordo com Hamblin (2017), a eficiência do TFDA pode ser melhorada pela adição de sais inorgânicos, como o iodeto de potássio (KI). Isso pode levar a produção de espécies reativas de iodeto. Por esta razão, e diante dos resultados obtidos até este momento, optou-se por utilizar 100 mM de KI em conjunto com o AM e o NAM, com 1 h de incubação e 2 h de exposição a luz.

A resazurina foi metabolizada tanto pelos biofilmes não tratados quanto pelos biofilmes submetidos ao tratamento fotodinâmico na presença de KI. Contudo, a metabolização da resazurina pelos biofilmes tratados foi inferior se comparada aos controles. Comparando-se o uso dos FS NAM e AM, a metabolização da resazurina foi menor com a utilização do primeiro. Além disso, não houve diferenças significativas na metabolização da resazurina pelos biofilmes tratados com diferentes concentrações de FS.

Nas Figuras 32 e 33 estão apresentados os desenvolvimentos dos biofilmes em meio BDA após o TFDA na presença de KI. É possível constatar, que apesar de ter havido uma redução na metabolização da resazurina, o crescimento fúngico em meio BDA foi semelhante ao obtido para biofilmes não tratados, evidenciando que o TFDA suplementado com KI não foi eficiente no controle do crescimento dos biofilmes de *A. flavus*.

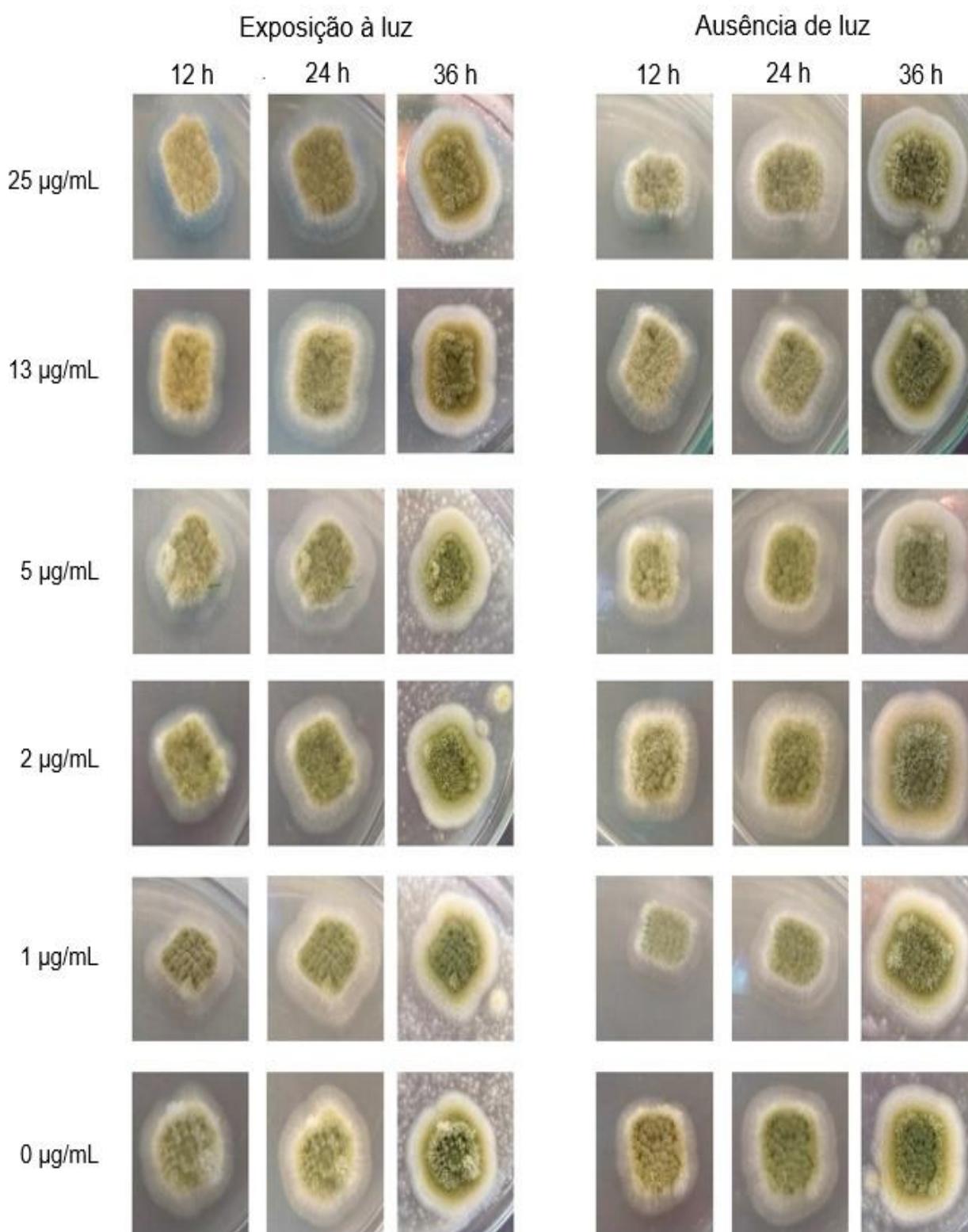
Zhang e colaboradores (2015) avaliaram a eficiência do TFDA utilizando fulerenos catiônicos como FS, assim como o AM e NAM, adicionado de KI (10 mM), com fluência entre 0 e 120 W/cm², sobre a suspensão de conídios de *C. albicans*, tendo observado o aumento (1-2 logs) na eficiência do controle do desenvolvimento fúngico. Contudo, o TFDA sobre biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*, utilizando o AM e NAM, com fluência de 50,01 W/cm² e 100,02 W/cm², respectivamente, não foi eficiente no controle do desenvolvimento dos biofilmes, nas condições empregadas.

Figura 32. Desenvolvimento de biofilmes de *A. flavus* em meio BDA, após exposição à luz por 2h, utilizando AM como FS em diferentes concentrações e na ausência de iluminação, adicionado de 100 mM de iodeto de potássio (KI), e mantidos em estufa a 30°C por 12 h, 24 h e 36 h.



Fonte: Autora.

Figura 33. Desenvolvimento de biofilmes de *A. flavus* em meio BDA, após exposição à luz por 2h, utilizando NAM como FS em diferentes concentrações, e na ausência de iluminação, adicionado de 100 mM de iodeto de potássio (KI), e mantidos em estufa a 30°C por 12 h, 24 h e 36 h.



Fonte: Autora.

4.7.2. TFDA dos biofilmes de *A. fumigatus*

Os biofilmes de *A. fumigatus* submetidos ao TFDA utilizando AM e NAM como FS, assim como os biofilmes tratados com os FS, mas não foram expostos à luz, foram capazes de metabolizar a resazurina. No entanto, a metabolização da resazurina pelos biofilmes tratados com o NAM foi significativamente menor do que os biofilmes tratados com AM. Adicionalmente, a metabolização da resazurina foi menor quando utilizadas maiores concentrações dos FS.

Nas Figuras 34 e 35 é possível observar o desenvolvimento dos biofilmes de *A. fumigatus* tratados, após 12, 24 e 36 h de incubação a 30°C. Nota-se que o desenvolvimento em meio BDA dos biofilmes tratados foi semelhante em todos os períodos registrados, evidenciando que o TFDA nas condições experimentais utilizadas não foi eficiente para inativar ou retardar o desenvolvimento dos biofilmes, ainda que a metabolização da resazurina tenha sido menor, ao utilizar-se as maiores concentrações de FS.

Javed e colaboradores (2014) relataram, em uma revisão bibliográfica, a eficiência do TFDA no controle do desenvolvimento de diversas linhagens de *Candida* spp., incluindo biofilmes desenvolvidos *in vitro*, ao utilizar diferentes FS, utilizando o AM como FS. É interessante destacar que a grande maioria dos dados disponíveis na literatura são de biofilmes desenvolvidos em placas de 96 poços, com superfície lisa, de fácil contato com o FS. O suporte utilizado nesse trabalho, tela de polietileno, possui estrutura entrelaçada tridimensional, ficando em meio líquido após adesão dos esporos, condição esta que mimetiza as condições que ocorrem *in vivo*, fator que dificulta o contato do biofilme com o FS afetando, conseqüentemente, a eficiência do controle do desenvolvimento dos biofilmes.

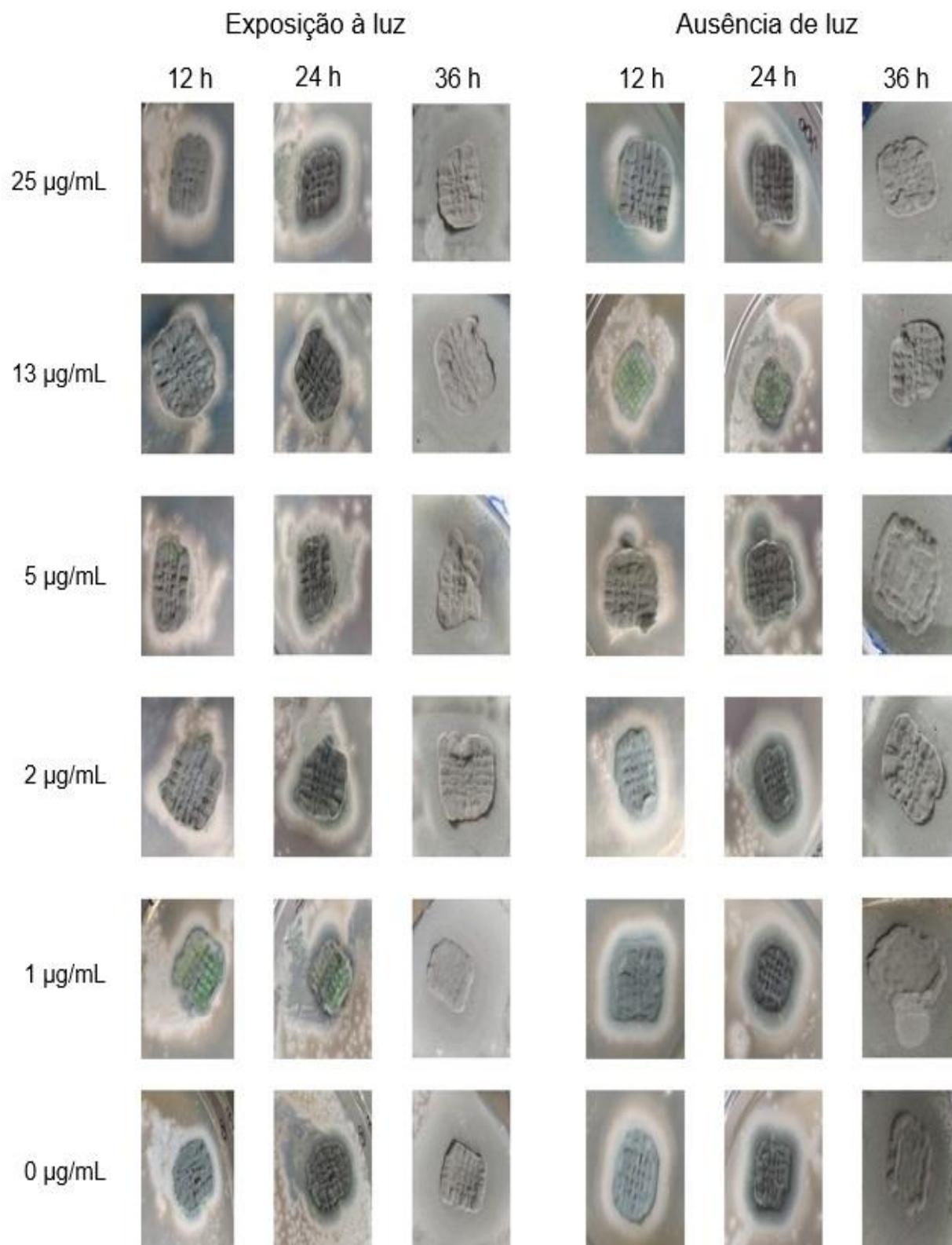
Diante dos resultados obtidos, optou-se por realizar um novo experimento de TFDA com biofilmes de *A. fumigatus*, utilizando as mesmas condições experimentais, mas com a adição de KI, em conjunto com a adição dos FS, antes de ocorrer a irradiação.

Figura 34. Desenvolvimento de biofilmes de *A. fumigatus* em meio BDA, após TFDA por 2 h, utilizando AM como FS em diferentes concentrações. Após o tratamento, os biofilmes foram mantidos em estufa a 30°C e o desenvolvimento avaliado após 12h, 24h e 36 h.



Fonte: Autora.

Figura 35. Desenvolvimento de biofilmes de *A. fumigatus* em meio BDA, após TFDA por 2 h, utilizando diferentes concentrações de NAM como FS. Após o tratamento os biofilmes foram mantidos em estufa a 30°C e desenvolvimento avaliado após 12 h, 24 h e 36 h.



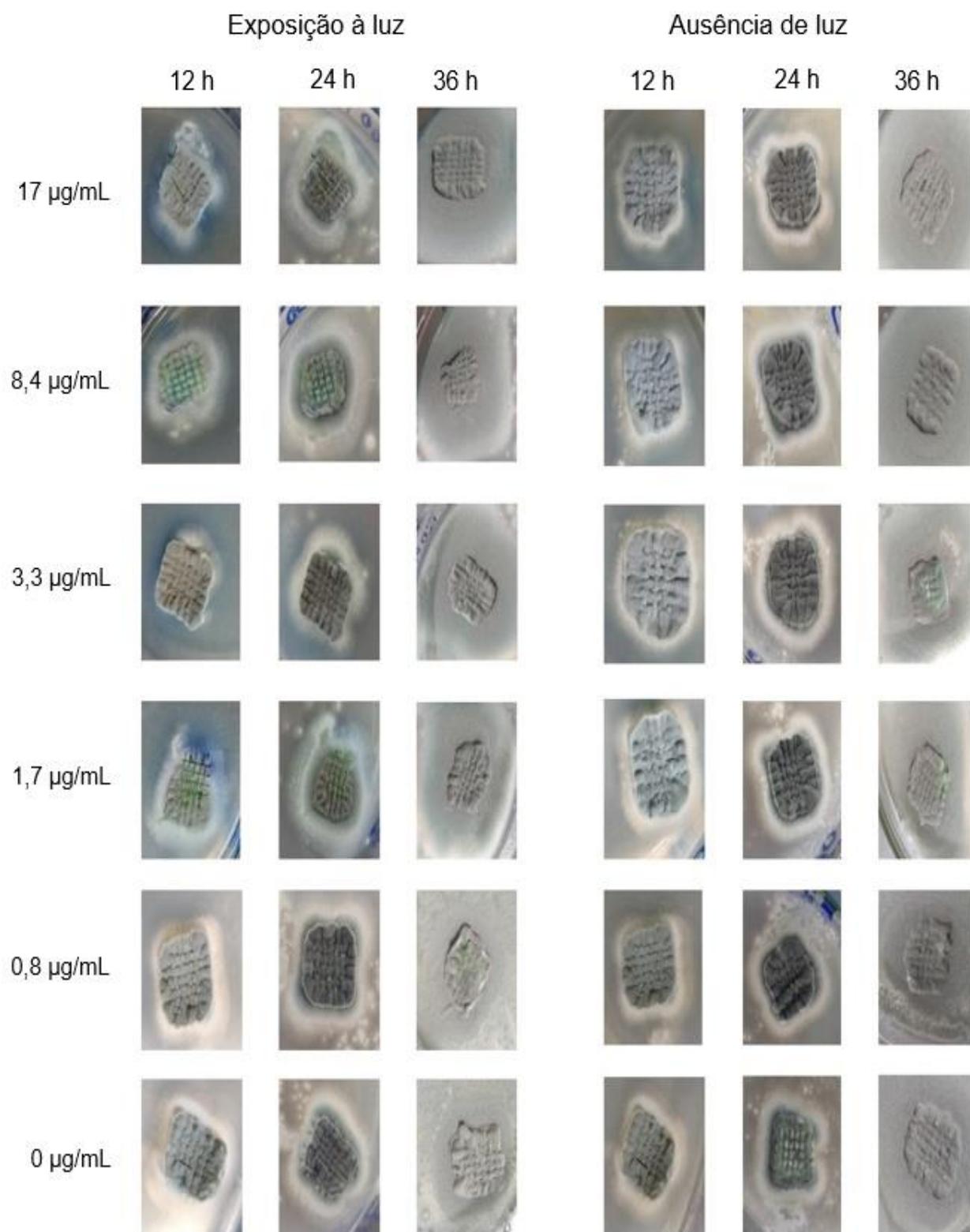
Fonte: Autora.

Ao comparar a metabolização da resazurina pelos biofilmes de *A. fumigatus* submetidos ao TFDA otimizado com KI, observou-se que ocorreu a metabolização da resazurina, ao utilizar todas as concentrações de AM, sem que houvesse diferenças significativas na metabolização dos biofilmes tratados na ausência ou na presença de KI. Contudo, a metabolização da resazurina pelos biofilmes submetidos ao TFDA com NAM adicionado de KI, foi menor do que a dos biofilmes controles e submetidos ao TFDA com AM.

O TFDA adicionado de KI não retardou ou impossibilitou o crescimento em meio BDA dos biofilmes de *A. fumigatus*, ao utilizar o AM e NAM como FS (Figura 36, Figura 37), se comparados aos biofilmes controle e aos biofilmes após o TFDA na ausência de KI. De modo geral, os dados apresentados indicam que nas condições do experimentais utilizadas, como a irradiância e concentração de FS, o KI não potencializou o efeito do TFDA e não houve o controle do crescimento e metabolismo dos biofilmes de *A. fumigatus*.

Hamblin (2017) relatou a potencialização do TFDA ao utilizar iodeto de potássio no tratamento de suspensões de conídios de diversas espécies fúngicas. Entretanto, os biofilmes são comunidades complexas, altamente estruturadas, com células em diferentes estágios de desenvolvimento. É sabido que esta estrutura fúngica é mais resistente aos agentes antifúngicos convencionais e ao TFDA (BORGHI, BORGIO, MORACE, 2016; FANNING, MITCHELL, 2012).

Figura 36. Desenvolvimento de biofilmes de *A. fumigatus* em meio BDA, após TFDA por 2h, utilizando AM como FS em diferentes concentrações, e na ausência de iluminação, adicionado de 100 mM de iodeto de potássio (KI). Após o tratamento os biofilmes foram mantidos a 30°C e o crescimento avaliado após 12 h, 24 h e 36 h.



Fonte: Autora.

Figura 37. Desenvolvimento de biofilmes de *A. flavus* em meio BDA, após TFDA por 2 h, utilizando NAM como FS em diferentes concentrações, e na ausência de iluminação, adicionado de 100 mM de iodeto de potássio (KI). Após o tratamento, os biofilmes foram mantidos a 30°C e o desenvolvimento avaliado após 12 h, 24 h e 36 h.



Fonte: Autora.

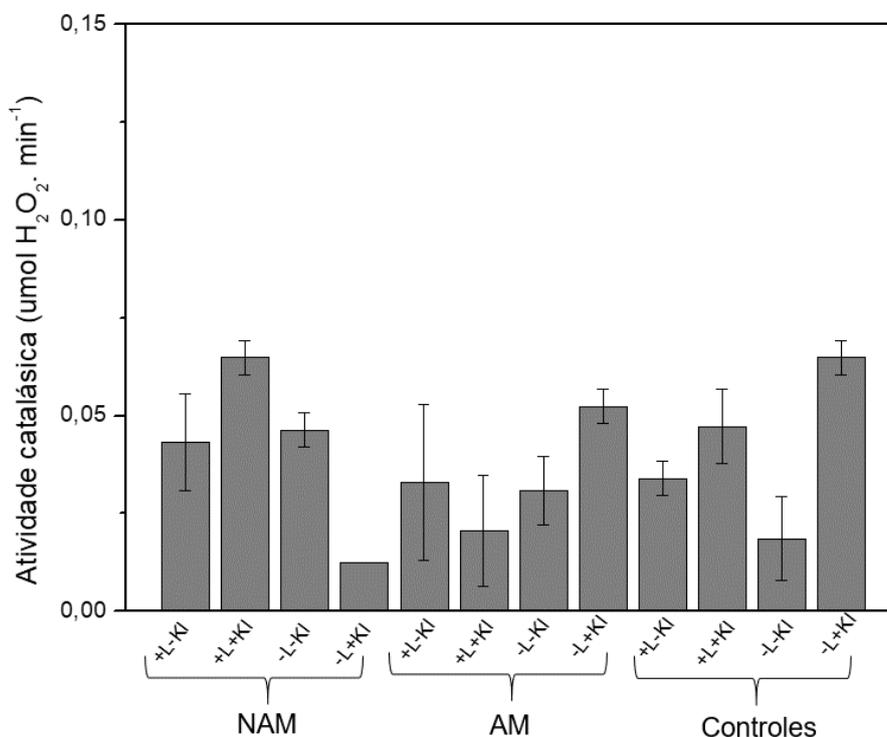
4.8. Atividade catalásica dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*

Durante o TFDA há o aumento na produção de EROS. Com o aumento da produção dessas moléculas, os microrganismos podem aumentar a atividade das enzimas do complexo antioxidante, na tentativa de restabelecer o equilíbrio. Portanto, a atividade da catalase, uma das principais enzimas do complexo antioxidante, foi avaliada imediatamente após o TFDA dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*.

O biofilme de *A. flavus* submetido ao TFDA, na presença de NAM e KI ($0,065 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$) foi o que apresentou maior atividade catalásica (Figura 38), que foi superior a atividade enzimática dos biofilmes não irradiados, indicando a resposta enzimática devido ao aumento da produção de EROS. Houve um aumento na atividade catalásica dos biofilmes que receberam o NAM e que não foram irradiados, em relação a atividade enzimática dos biofilmes controles que não receberam o FS, evidenciando a possível resposta enzimática na presença de NAM mesmo não havendo a irradiação.

A atividade catalásica dos biofilmes expostos ao TFDA com AM foi menor do que a atividade catalásica dos biofilmes não tratados e dos biofilmes tratados com o NAM. A maior atividade da catalase de ($0,065 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$) foi observada nos biofilmes tratados com AM não adicionados de KI.

Figura 38. Atividade da catalase extraída de biofilmes de *A. flavus* submetidos ao TFDA com azul de metileno e novo azul de metileno como fotossensibilizadores na presença (+KI) e na ausência de iodeto de potássio (-KI). Ausência de luz (-L) e presença de luz (+L).



Fonte: Autora.

Para a atividade catalásica dos biofilmes de *A. fumigatus* tratados com o NAM (Figura 39), foi possível constatar que os maiores consumos de H₂O₂ foram obtidos na presença de KI (0,4 μmol H₂O₂ min⁻¹). No entanto, na ausência de KI a atividade foi menor (0,139 μmol H₂O₂ min⁻¹) se comparada a atividade enzimática obtida dos biofilmes tratados com o FS e KI. A atividade catalásica dos biofilmes tratados com NAM adicionado de KI foi aproximadamente 3 vezes maior se comparada a atividade dos biofilmes tratados somente com o NAM (0,139 μmol H₂O₂ min⁻¹) e irradiados, e cerca de 2,4 vezes maior se comparadas aos biofilmes controles, que foram tratados com o NAM e KI, mas não foram irradiados (0,167 μmol H₂O₂ min⁻¹), indicando uma possível resposta enzimática, devido ao aumento da produção de EROS.

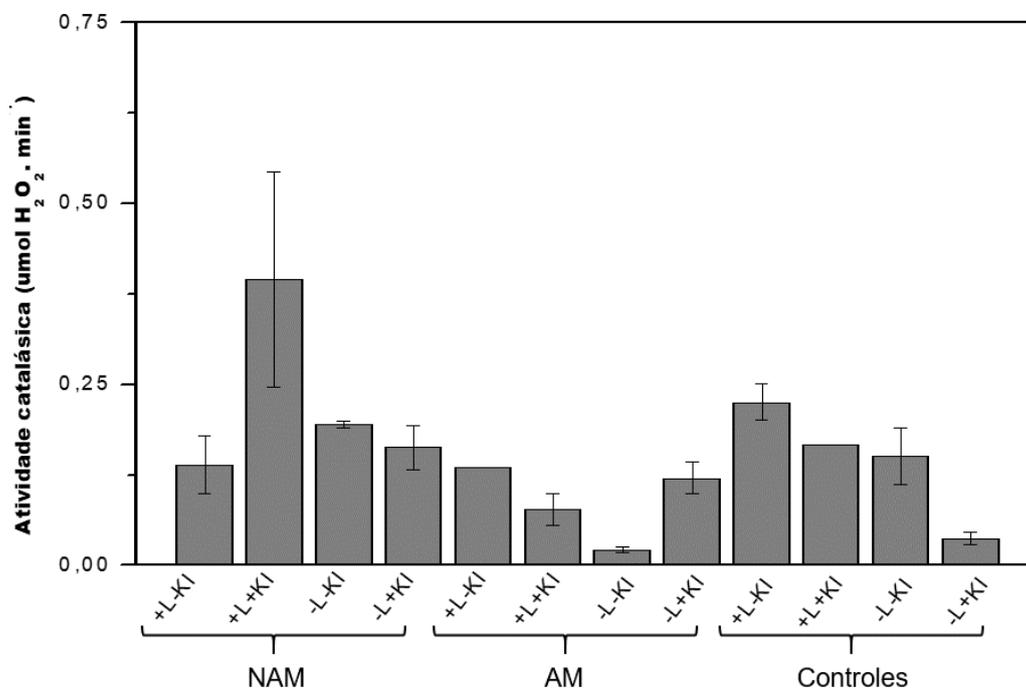
De forma geral as atividades enzimáticas dos biofilmes tratados com o NAM foram superiores as observadas para os biofilmes tratados com AM e para os biofilmes controles. Os biofilmes tratados com o AM e expostos à luz apresentaram maior atividade catalásica (0,136 μmol H₂O₂ min⁻¹) se comparados aos biofilmes irradiados e tratados com o AM e KI (0,077 μmol H₂O₂ min⁻¹).

Caceres et al. (2017) relataram atividade catalásica de $0,008 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ para micélios de *A. flavus*. A atividade catalásica para os biofilmes de *A. flavus* analisados, tratados ou não, foi superior ao citado por Caceres e colaboradores.

De modo geral, a atividade catalásica dos biofilmes de *A. flavus* após o TFDA foi inferior se comparada a atividade observada para os biofilmes de *A. fumigatus* após o TFDA. Adicionalmente, atividade catalásica dos biofilmes de *A. fumigatus* foi 50 vezes maior que a reportada por Caceres et al. (2017) para micélios de *A. flavus*.

A alta atividade catalásica dos biofilmes tratados com o fotossensibilizador NAM e iodeto de potássio evidencia, indiretamente, o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio. O aumento da atividade catalásica de *Aspergillus terreus* após a indução do estresse oxidativo pelo tratamento com Anfotericina B foi evidenciado por Blatzer e colaboradores (2015). Blum e colaboradores (2008) observaram que a atividade da catalase de uma linhagem de *A. terreus* resistente a Anfotericina B, foi superior quando comparada a atividade catalásica de uma linhagem de *A. fumigatus* susceptível a Anfotericina B, indicando que o aumento da atividade enzimática da catalase está diretamente relacionado a resistência ao estresse oxidativo. Diante do exposto, é esperado que biofilmes resistentes ao TFDA possuam alta atividade catalásica em resposta ao aumento do estresse oxidativo celular (BLATZER et al., 2015; BLUM et al., 2008).

Figura 39. Atividade da catalase extraída de biofilmes de *A. fumigatus* submetidos ao TFDA com azul de metileno e novo azul de metileno como fotossensibilizadores na presença (+KI) e na ausência (-KI) de iodeto de potássio. Ausência de luz (-L) e presença de luz (+L).



Fonte: Autora.

É importante ressaltar que nos estudos relatados anteriormente, os biofilmes não foram formados sobre um suporte inerte de polietileno. Este suporte mimetiza os diversos ambientes naturalmente utilizados por estas espécies fúngicas, tais como equipamentos industriais, materiais metálicos e plásticos, partículas do solo, tubulações de água e esgoto, próteses (ortopédicas, cardíacas e vasculares) e cateteres (vasculares, urinários ou do sistema nervoso), reforçando-se a importância deste estudo na análise do TFDA como uma alternativa para a erradicação de biofilmes. Os resultados obtidos deixam claro que diferentes parâmetros do TFDA devem ser mais bem analisados para melhoria de sua eficiência para o controle do desenvolvimento de biofilmes fúngicos sobre superfícies inertes.

5. Conclusões

Os biofilmes de *A. fumigatus* foram mais tolerantes aos antifúngicos avaliados se comparados aos biofilmes de *A. flavus*. De forma geral, os biofilmes de *A. fumigatus* foram mais resistentes a anfotericina B, miconazol e hipoclorito de sódio se comparados aos conídios e micélios da mesma linhagem. Já os micélios de *A. flavus* foram mais tolerantes aos antifúngicos avaliados se comparados aos conídios e biofilmes da mesma linhagem.

O TFDA seja com AM ou NAM, nas condições empregadas até o momento, não foi eficiente para o controle dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus*. O uso do iodeto de potássio também não aumentou a eficiência do processo. De modo geral, não houve aumento significativo da atividade catalásica dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus* após o TFDA, na ausência de KI. No entanto, houve um aumento da atividade catalásica dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus* após o TFDA com NAM na presença de KI.

Cabe ressaltar que este é o primeiro estudo da eficácia do TFDA em biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus* desenvolvidos sobre suporte inerte de polietileno, o que contribui para o entendimento e uso do TFDA em futuras aplicações sobre biofilmes e outras espécies fúngicas. A continuidade dos estudos é importante para que sejam determinados parâmetros que permitam o aumento da eficiência do TFDA para o controle dos robustos biofilmes desenvolvidos em suporte inerte, seja para as espécies analisadas, como para as demais espécies.

Referências

- ADEBO, O. A. et al. Review on microbial degradation of aflatoxins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3208-3217, 2017.
- ADEYEYE, S. A. O. Fungal mycotoxins in foods: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1213127, 2016.
- AMESCUA, G. et al. Rose bengal photodynamic antimicrobial therapy: a novel treatment for resistant *Fusarium keratitis*. **Cornea**, v. 36, n. 9, p. 141-1144, 2017.
- BALLARD, E. et al. In-host microevolution of *Aspergillus fumigatus*: A phenotypic and genotypic analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 113, p. 1-13, 2018.
- BALTAZAR, L. M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 202, 2015.
- BARASCH, A.; GRIFFIN, A. V. Miconazole revisited: new evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials. **Future Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 265-269, 2008.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M. & GOMI, K. (editors). **Aspergillus Molecular Biology and Genomics**. Linton: Caister Academic Press, 2010. p. 1-16.
- BLATZER, M. et al. Amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus* is overpowered by coapplication of pro-oxidants. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 18, p. 1424-1438, 2015.
- BLUM, G. et al. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1553-1555, 2008.
- BORGHI, E.; BORGO, F.; MORACE, G. Fungal biofilms: update on resistance. In: **Fungal Biofilms and Related Infections**. Springer, Cham, 2016. p. 37-47.
- BORMAN, A. et al. MIC distributions and evaluation of fungicidal activity for amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin and 20 species of pathogenic filamentous fungi determined using the CLSI broth microdilution method. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 27, 2017.
- CACERES, I. et al. Piperine inhibits aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus* by modulating fungal oxidative stress response. **Fungal Genetics and Biology**, v. 107, p. 77-85, 2017.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.
- CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.

- COPPOCK, R. W.; CHRISTIAN, R. G.; JACOBSEN, B. J. Aflatoxins. In: **Veterinary Toxicology**. Academic Press, p. 983-994, 2018.
- COTINGUIBA, G. G. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2015.
- CROFT, C. A. et al. Interactions of *Aspergillus fumigatus* conidia with airway epithelial cells: a critical review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 472, 2016.
- DE CARVALHO L. L. et al. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) using methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 316-323, 2019.
- DE CARVALHO, G. G.; FELIPE, M. P.; COSTA M. S. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. **The Journal of Microbiology** v. 47, p. 619–623, 2009.
- DE FREITAS, S. A. A. et al. Protocolo de atendimento do paciente com estomatite protética na atenção básica/primary care for patients with denture stomatitis. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 12, n. 3, 2011.
- DE MENEZES, H. D. et al. Photodynamic treatment with phenothiazinium photosensitizers kills both ungerminated and germinated microconidia of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium solani*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 164, p. 1-12, 2016.
- DE OLIVEIRA K.T. et al. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015.
- DE OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Mycotoxins and their Implications in Food Safety: Aflatoxins. **Future Science Ltd**, 2014. 6-19.
- DIOGO, P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against endodontic *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* mono and mixed biofilms in the presence of photosensitizers: A comparative study with classical endodontic irrigants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 498, 2017.
- DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**. v. 87, p. 895–903, 2011.
- ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 7-10, 2002.
- ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.

- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.
- GEIßEL, B. et al. Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3098, 2018.
- GILABERTE, Y. et al. Cutaneous spore trichosis treated with photodynamic therapy: an in vitro and in vivo study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 32, p. 54–57, 2014.
- GIROLDO, L. M. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**. V. 24, p. 109–112, 2009.
- GONZALES, F. P. et al. Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n.3, p. 653-661, 2010.
- GONZALES, J. C. et al. Photodynamic inactivation of conidia of the fungus *Colletotrichum abscissum* on *Citrus sinensis* plants with methylene blue under solar radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 176, p. 54-61, 2017.
- GOW, N. A.R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, p. 1-25, 2017.
- GRAÇA, B. P. **O Hipoclorito de sódio em Endodontia**. 2014. Tese de Doutorado. [sn].
- GRANINGER, W.; DIAB-ELSCHAHAWI, M.; PRESTERL, E. Antifungal Agents. In: **Clinically Relevant Mycoses**. Springer, Cham, 2019. p. 31-42.
- HAGIWARA, D.; WATANABE, A.; KAMEI, K. Sensitisation of an azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strain containing the Cyp51A-related mutation by deleting the SrbA gene. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38833, 2016.
- HAGIWARA, S. et al. The molecular identification and antifungal susceptibilities of *Aspergillus* Species causing otomycosis in Tochigi, Japan. **Mycopathologia**, p. 1-9, 2018.
- HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67-73, 2016.
- HAMBLIN, M. R. et al. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 1, p. 51-57, 2002.

- HAMBLIN, M. R. Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation by inorganic salts. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 15, n. 11, p. 1059-1069, 2017.
- HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Inorganic Salts and Antimicrobial Photodynamic Therapy: Mechanistic Conundrums?. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3190, 2018.
- HAN, X. et al. Microbial responses to membrane cleaning using sodium hypochlorite in membrane bioreactors: cell integrity, key enzymes and intracellular reactive oxygen species. **Water research**, v. 88, p. 293-300, 2016.
- HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.
- HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.
- HU, X. et al. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1299, 2018.
- HUANG, L. et al. Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using Photofrin. **ACS Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 320-328, 2017.
- HUANG, L. et al. Potentiation by potassium iodide reveals that the anionic porphyrin TPPS4 is a surprisingly effective photosensitizer for antimicrobial photodynamic inactivation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 277-286, 2018.
- IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 138-161, 2013.
- IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. Crescimento microbiano em biofilmes. Publicado em 18/11/2005, revisto em 03/04/2008. Disponível em <<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354>>. Acessado em 25/07/2019.
- JAVED, F.; SAMARANAYAKE, L. P.; ROMANOS, G. E. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 5, p. 726-734, 2014.
- KAUR S.; SINGH S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 2-9, 2013.

- KELEMEN, H. et al. Characterization of Inclusion Complexes between Miconazole and Different Cyclodextrin Derivatives. **Acta Medica Marisiensis**, v. 64, n. 2, p. 70-76, 2018.
- KHANNA, P.; SUNDARIL, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.
- KHODAVAISY, S. et al. In vitro activities of five antifungal agents against 199 clinical and environmental isolates of *Aspergillus flavus*, an opportunistic fungal pathogen. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 2, p. 116-121, 2016.
- KOCSUBÉ, S. et al. *Aspergillus* is monophyletic: evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. **Studies in Mycology**, v. 85, p. 199-213, 2016.
- KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.
- LATGÉ, J. P. CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 2-75, 2019.
- MADRID, I. M. et al. Eficácia de soluções desinfetantes na eliminação de fungos de importância médica e veterinária. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 1, 2013.
- MCCARTHY, Matthew; O'SHAUGHNESSY, Elizabeth M.; WALSH, Thomas J. Amphotericin B: Polyene resistance mechanisms. In: **Antimicrobial Drug Resistance**. Springer, Cham. p. 387-395, 2017
- MELLO, S. C. M.; REIS, A.; DA SILVA, J. B. T. Manual de curadores de germoplasma-micro-organismos: fungos filamentosos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.
- MENEZES H.D. **Inativação fotodinâmica de conídios dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e cumarínicos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. p. 125, 2012.
- MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The extracellular matrix of fungal biofilms. In: **Fungal Biofilms and Related Infections**. Springer, Cham, 2016. p. 21-35.
- MOWAT, E. et al. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 1205-1212, 2007.

- MUNIN, E. et al. Study of germtube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal Photochemistry Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 1 p. 16–20, 2007.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.
- NIE, X. et al. *Aspergillus flavus* SUMO contributes to fungal virulence and toxin attributes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 35, p. 6772-6782, 2016.
- PAULUSSEN, C. et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2017.
- PEREIRA, M. M. G.; DE CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.
- PIÉRARD, G. E. et al. Miconazole, a pharmacological barrier to skin fungal infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 8, p. 1187-1194, 2012.
- PONTES, L. et al. *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Carrying CYP51A with TR34/L98H/S297T/F495I Substitutions Detected after Four-Year Retrospective Azole Resistance Screening in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 3, 2020.
- POURHAJIBAGHER, M. et al. Sub-lethal doses of photodynamic therapy affect biofilm formation ability and metabolic activity of *Enterococcus faecalis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 159-166, 2016.
- PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. In: **Yeast Membrane Transport**. Springer, Cham, 2016. p. 327-349.
- PROCHNOW, E. P. et al. Antimicrobial photodynamic effect of phenothiazinic photosensitizers in formulations with ethanol on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 291-296, 2016.
- RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.
- REICHHARDT, C. et al. Analysis of the *Aspergillus fumigatus* biofilm extracellular matrix by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 11, p. 1064-1072, 2015.

RODRIGUES, G. B. et al. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 116, p. 89-94, 2012.

RUDRAMURTHY, S. M. et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 55, 2019.

SATO, V. S.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermotolerant phytase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm on an inert support using sugarcane bagasse as carbon source. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 610-624, 2016.

SEPHTON-CLARK, P. C.S; VOELZ, K. Spore germination of pathogenic filamentous fungi. In: **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press, 2018. p. 117-157.

SHISHODIA, S. K.; TIWARI, S.; SHANKAR, J. Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. **Mycology**, p. 1-15, 2019.

SPEROTTO, R. A. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. 1 ed. Lajeado. **Edit. Univates**, 2014. 326 p.

ST. D., Tyler G. et al. All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509-520, 2011.

SUGUI, J. A. et al. *Aspergillus fumigatus* and related species. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 2, p. a019786, 2015.

TRUONG, C. et al. How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 913-919, 2017.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WAINWRIGHT, M. et al. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e49-e55, 2017.

WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives—suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 4, p. 381-394, 2000.

WAINWRIGHT, M.; MCLEAN, A. Rational design of phenothiazinium derivatives and photoantimicrobial drug discovery. **Dyes and Pigments**, v. 136, p. 590-600, 2017.

WALKER, Graeme M.; WHITE, N. A. Fungi: Biology and Applications: Introduction to fungal physiology. **Fungi: Biology and Applications**, 3 ed. Eds. Kevin Kavanagh, 2017 p. 1-35.

WEAVER, M. A. et al. Genome sequences of three strains of *Aspergillus flavus* for the biological control of aflatoxin. **Genome Announcements**, v. 5, n. 44, p. e01204-17, 2017.

WILLIAMS, C.; RAJENDRAN, R.; RAMAGE, G. *Aspergillus* biofilms in human disease. In: **Fungal Biofilms and Related Infections**. Springer, Cham, p. 1-11, 2016.

YIN, R.; R HAMBLIN, M. Antimicrobial photosensitizers: drug discovery under the spotlight. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 2159-2185, 2015.

ZHANG, J. et al. Relevance of heterokaryosis for adaptation and azole-resistance development in *Aspergillus fumigatus*. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1896, p. 20182886, 2019.

ZHANG, Y. et al. Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation mediated by a cationic fullerene by added iodide: in vitro and in vivo studies. **Nanomedicine**, v. 10, n. 4, p. 603-614, 2015.

Anexo 1- Composição do meio Khanna (KHANNA et al., 1995)

- Solução de sais de Khanna [20x].....5,0 mL
 - NH₄NO₃.....2,0g
 - KH₂PO₄.....1,3g
 - MgSO₄.7H₂O.....0,362g
 - KCl.....0,098g
 - ZnSO₄.H₂O.....0,007g
 - MnSO₄.H₂O.....0,0138g
 - Fe₂(SO₄).6H₂O.....0,0066g
 - CuSO₄.5H₂O.....0,0062g
 - Água destilada q.s.p.....100mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Fonte de carbono1,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Anexo 2 – Desenvolvimento de micélios livres e biofilmes tratados com Anfotericina B e Miconazol

Tabela 1. Medidas dos raios das colônias obtidas a partir do desenvolvimento dos micélios livres de *A. flavus* e *A. fumigatus*, previamente tratados com Anfotericina B em meio BDA, a 30°C por 12 h, 24 e 36h.

Anfotericina B (µg/mL)	<i>A. flavus</i> Raio (cm)			Anfotericina B (µg/mL)	<i>A. fumigatus</i> Raio (cm)		
	12h	24h	36h		12h	24h	36h
5000	0,27 ± 0,06	0,46 ± 0,2	0,54 ± 0,12	1000	1,87 ± 0,18	0,15 ± 0,09	0 ± 0
2500	0,57 ± 0,08	0,62 ± 0,2	1,00 ± 0,09	100	1,85 ± 0,35	1,48 ± 0,15	0,18 ± 0,08
1250	0,80 ± 0,04	0,86 ± 0,14	1,3 ± 0,21	10	1,88 ± 0,14	1,65 ± 0,12	0,15 ± 0,04
620	0,92 ± 0,07	1,33 ± 0,3	1,49 ± 0,19	1	1,85 ± 0,26	1,66 ± 0,15	0,12 ± 0,07
0	1,17 ± 0,08	1,17 ± 0,05	1,55 ± 0,14	0	1,89 ± 0,27	1,89 ± 0,3	1,89 ± 0,08

Tabela 2. Medidas dos raios das colônias obtidas a partir do desenvolvimento dos micélios livres de *A. flavus* e *A. fumigatus* previamente tratados com Miconazol, após a incubação em meio BDA em estufa por 12 h, 24 h e 36 h.

Miconazol (µg/mL)	<i>A. flavus</i> Raio (cm)			<i>A. fumigatus</i> Raio (cm)		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
7500	0,33 ± 0,01	0,46 ± 0,23	0,53 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,39 ± 0,01
3750	0,49 ± 0,12	0,53 ± 0,08	0,57 ± 0,5	0,42 ± 0,14	0,45 ± 0,017	0,5 ± 0,6
1880	0,96 ± 0,24	1,10 ± 0,11	1,48 ± 0,8	0,44 ± 0,027	0,85 ± 0,035	01,2 ± 0,72
940	0,98 ± 0,02	1,03 ± 0,25	1,42 ± 0,03	0,66 ± 0,031	0,96 ± 0,22	1,53 ± 0,07
0	1,17 ± 0,15	1,17 ± 0,6	1,55 ± 0,1	0,68 ± 0,13	1,06 ± 0,33	1,55 ± 0,4

Tabela 3. Medidas dos raios das colônias obtidas a partir do desenvolvimento dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus* previamente tratados com Anfotericina B, após a incubação em meio BDA, a 30°C por 12 h, 24 h e 36 h.

Anfotericina B (µg/mL)	<i>A. flavus</i> Raio (cm)			Anfotericina B (µg/mL)	<i>A. fumigatus</i> Raio (cm)		
	12h	24h	36h		12h	24h	36h
5000	0,26 ± 0,12	0,49 ± 0,14	0,55 ± 0,22	1000	2,4 ± 0,15	0 ± 0	0 ± 0
2500	0,47 ± 0,17	0,57 ± 0,29	0,83 ± 0,08	100	2,42 ± 0,22	0,25 ± 0,17	0,15 ± 0,02
1250	0,51 ± 0,07	0,65 ± 0,33	0,9 ± 0,03	10	2,42 ± 0,36	0,4 ± 0,02	0,18 ± 0,01
620	0,6 ± 0,25	0,7 ± 0,25	0,98 ± 0,047	1	2,45 ± 0,16	0,42 ± 0,052	0,7 ± 0,03
0	0,71 ± 0,33	1,1 ± 0,52	1,3 ± 0,17	0	2,45 ± 0,2	2,56 ± 0,37	2,5 ± 0,22

Tabela 4. Medidas dos raios das colônias obtidas a partir do desenvolvimento dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus* previamente tratados com Miconazol, após a incubação em meio BDA, a 30°C por 12 h, 24 h e 36 h.

Miconazol (µg/mL)	<i>A. flavus</i> Raio (cm)			<i>A. fumigatus</i> Raio (cm)		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
7500	0,05 ± 0,4	0,07 ± 0,6	0,07 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,41 ± 0,12	0,42 ± 0,2
3750	0,08 ± 0,3	0,08 ± 0,09	0,09 ± 0,01	0,42 ± 0,17	0,51 ± 0,21	0,62 ± 0,12
1880	0,3 ± 0,12	0,7 ± 0,12	0,75 ± 0,12	0,44 ± 0,18	0,64 ± 0,18	1,01 ± 0,23
940	0,64 ± 0,17	0,77 ± 0,027	0,8 ± 0,33	0,75 ± 0,22	1,06 ± 0,25	1,1 ± 0,13
0	0,71 ± 0,45	1,1 ± 0,55	1,3 ± 0,04	0,73 ± 0,27	1,1 ± 0,2	1,05 ± 0,42

Anexo 3 - Desenvolvimento de micélios livres e biofilmes tratados com hipoclorito de sódio

Tabela 1. Medidas dos raios das colônias obtidas a partir do desenvolvimento dos micélios livres de *A. flavus* e *A. fumigatus* previamente tratados com hipoclorito de sódio (NaClO), após a incubação em meio BDA a 30°C por 12 h, 24 h e 36 h.

NaClO (µg/mL)	<i>A. flavus</i> Raio (cm)			<i>A. fumigatus</i> Raio (cm)		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
6660	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0	0,15 ± 0	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,07	0,18 ± 0
5000	0,17 ± 0	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,01
3320	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,026
1660	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,28 ± 0,012	0,36 ± 0,021	0,4 ± 0,027	0,95 ± 0,035
0	1,17 ± 0,1	1,2 ± 0,11	1,55 ± 0,03	0,68 ± 0,2	1,06 ± 0,033	1,55 ± 0,19

Tabela 2. Medidas dos raios das colônias obtidas a partir do desenvolvimento dos biofilmes de *A. flavus* e *A. fumigatus* previamente tratados com hipoclorito de sódio, após a incubação em meio BDA e estufa por 12 h, 24 h e 36 h.

NaClO (µg/mL)	<i>A. flavus</i> Raio (cm)			<i>A. fumigatus</i> Raio (cm)		
	12h	24h	36h	12h	24h	36h
6660	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0	0,10 ± 0
5000	0,01 ± 0	0,01 ± 0	0,01 ± 0,01	0,16 ± 0	0,16 ± 0	0,18 ± 0,02
3320	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,21 ± 0,013	0,26 ± 0,04	0,52 ± 0,026
1660	0,08 ± 0,024	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,022	0,6 ± 0,017	0,75 ± 0,019	1,07 ± 0,015
0	0,71 ± 0,15	1,1 ± 0,013	1,3 ± 0,15	0,73 ± 0,2	1,1 ± 0,023	1,05 ± 0,032