



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Letícia Monteiro Bianco

**Avaliação antifúngica de nanoestruturas de tungstato de prata
contra leveduras e fungos dermatófitos**

São José do Rio Preto
2021

Letícia Monteiro Bianco

**Avaliação antifúngica de nanoestruturas de tungstato de prata
contra leveduras e fungos dermatófitos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa
Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto
2021

B578a

Bianco, Letícia Monteiro.

Avaliação antifúngica de nanoestruturas de tungstato de prata contra leveduras e fungos dermatófitos / Letícia Monteiro Bianco. -- São José do Rio Preto, 2021

51 p. : tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Microbiologia. 2. Materiais nanoestruturados. 3. Micoses. 4. Antifungal agents. 5. Dermatomicose. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.

Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Letícia Monteiro Bianco

**Avaliação antifúngica de nanoestruturas de tungstato de prata
contra leveduras e fungos dermatófitos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Elza Maria Castilho
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Cátia Rezende
UNIFEV - Centro Universitário de Votuporanga

São José do Rio Preto
08 de Outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter ingressado neste trabalho e por ter chegado até aqui. Por ser meu ponto de apoio e fé para superar as adversidades impostas pela vida. Por ser luz, proteção e sabedoria que dá sentido á minha vida.

Aos meus pais Luiz Roberto Bianco e Rose Bianco, por me ensinarem os valores fundamentais da vida, pelo carinho e apoio para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Por todo amor e por serem minha maior inspiração, sou eternamente grata por tudo que fizeram por mim. Ao meu irmão Leonardo Bianco, que desde o início me apoia e me incentiva.

Ao meu namorado Francisco, por ser a melhor pessoa que eu poderia ter ao meu lado, por me incentivar e motivar, por acolher minhas dificuldades, tentando sempre contribuir para superação destas. Por não me deixar desistir, enfraquecer, por me amparar, me fazer mais forte e acreditar no meu potencial.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida, primeiramente pela oportunidade, e por ter acreditado em mim e me dado à oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço também pelos ensinamentos, pela paciência, dedicação, carinho e por mostrar-se sempre disposta a me ajudar. Obrigada pelos conselhos, amizade e por fazer parte do meu crescimento pessoal e profissional. Para mim você é uma inspiração e um grande exemplo de vida. Muito obrigado do fundo do meu coração!

Um agradecimento especial a duas pessoas que foram essenciais para a realização desse trabalho, Thiago Henrique Lemes e Maicon Henrique Caetano. Agradeço de coração a amizade de vocês, por compartilharem momentos tão bons, conselhos, risadas, por sempre me ajudarem e apoiarem em todos os momentos.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório, minha segunda família: Thiago Henrique Lemes, Maicon Henrique Caetano, Emília Cristina Gianizella, Luceli Ferreira de Souza, Mariela Domiciano Ribeiro, Bianca Gottardo de Almeida, João Paulo Zen Siqueira, Taiza Maschio de Lima, Letícia Queiroz Mozaner, Veridiana Pattini, Elza Maria Castilho, Cleuzenir Toschi Gomes Barbieri, Natalia Seron Brizzotti, Beatriz Gomes Ricardo, obrigada pela amizade de vocês, carinho, parceria e ajuda. Obrigado pelos ótimos momentos de descontração durante todo esse tempo! Vocês moram no meu coração!

As professoras Prof^a. Dr^a. Cátia Rezende e Prof^a. Dr^a. Elza Maria Castilho por participarem da banca examinadora de defesa, por dispensarem seu tempo na correção deste trabalho, contribuindo com a melhoria deste projeto.

Aos membros da comissão examinadora deste trabalho, Dr. João Paulo Zen Siqueira e Dr^a. Márcia Maria Costa Nunes Soares, por terem aceitado o convite, agregando experiência e conhecimento ao mesmo.

Ao laboratório de Microbiologia e à FAMERP, pela infraestrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, professores, coordenadores e equipe técnica, pela disponibilidade, dedicação aos alunos e prontidão em esclarecer todas as dúvidas.

Enfim, a todos os meus amigos, colegas e professores que não foram citados, mas que fizeram parte da minha formação e acreditaram em meu potencial.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

As infecções fúngicas representam um significativo problema de saúde pública no cenário mundial e estão aumentando em incidência, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos. A micose superficial é caracterizada pela infecção no estrato córneo, com baixa resposta inflamatória, e corresponde a principal causa de doença de pele, que afeta milhões de pessoas causadas por fungos dermatófitos, não dermatófitos ou leveduras. A alta tolerância e resistência dos fungos aos antifúngicos convencionais têm sido observado, esses fatores implicam na procura de compostos que sejam eficazes, que reduzam o tempo de tratamento e não apresentem riscos ao paciente. O tungstato de prata é um composto de tungstênio e prata, que ao ser irradiado com elétrons crescem partículas de prata com ação plasmônica, tornando-o mais bactericida e fungicida. O objetivo deste trabalho foi realizar a síntese das nanoestruturas de tungstato, pelo método de coprecipitação simples. A atividade antifúngica, *in vitro*, foi avaliada por microdiluição, obtendo-se a Concentração Inibitória Mínima (MIC) do tungstato de prata contra linhagens clínicas e cepas de referências (ATCC) de *Candida spp.*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*, apresentando atividade antifúngica efetiva com valores de MIC entre 0,03-62,5 µg/mL. Cepas de *C. krusei* mostrou-se mais sensível e cepas de *C. albicans* mais resistentes ao composto sintetizado. O ensaio de toxicidade foi realizado em modelo *in vivo* usando larvas de *Galleria mellonella*. O teste foi executado por inoculação com a mesma concentração de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ usada nos testes de microdiluição anteriores, e não apresentou toxicidade. O ensaio de *time kill* foi realizado com cepas clínicas e referências das espécies de *Candida* e dermatófitos. Esses resultados mostram uma potencial aplicação no controle de infecções fúngicas inovando os protocolos terapêuticos.

Palavras-chave: Infecções fúngicas. Nanoestruturas de tungstato de prata. Dermatófitos. Leveduras.

ABSTRACT

Fungal infections represent a significant public health problem worldwide and are on the increase, especially in immunocompromised hosts. Superficial mycosis is characterized by infection in the stratum corneum, with a low inflammatory response, and is the main cause of skin disease, which affects millions of people caused by dermatophyte, non-dermatophyte or yeast fungi. The high tolerance and resistance of fungi to conventional antifungals has been observed, these factors imply the search for compounds that are effective, that reduce the treatment time and do not present risks to the patient. Silver tungstate is a compound of tungsten and silver, which when irradiated with electrons grow silver particles with plasmonic action, making it more bactericidal and fungicidal. The objective of this work was to carry out the synthesis of tungstate nanostructures, by the simple co-precipitation method. The *in vitro* antifungal activity was evaluated by microdilution, obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of silver tungstate against clinical strains and reference strains (ATCC) of *Candida spp.*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*, showing effective antifungal activity with MIC values between 0,03-62,5 µg/mL. *C. krusei* strains were more sensitive and *C. albicans* strains more resistant to the synthesized compound. The toxicity test was performed in an *in vivo* model using *Galleria mellonella* larvae. The test was performed by inoculation with the same concentration of α -Ag₂WO₄ used in the previous microdilution tests, and showed no toxicity. The time kill assay was carried out with clinical strains and references of *Candida* species and dermatophytes. These results show a potential application in the control of fungal infections by innovating therapeutic protocols.

Keywords: Fungal infections. Silver tungstate nanostructures . Dermatophytes. Yeasts.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Infecções fúngicas	11
2.2 Agentes etiológicos e epidemiologia	11
2.3 Etiopatogênese	13
2.4 Manifestações clínicas das micoses superficiais.....	13
2.5 Diagnóstico das micoses superficiais.....	15
2.6 Atividade antimicrobiana.....	15
2.7 Tungstato de prata.....	16
3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	18
4. OBJETIVO.....	19
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5. METODOLOGIA.....	20
5.1 Síntese do tungstato de prata.....	20
5.2 Irradiação por feixe de elétrons	20
5.3 Caracterizações	20
5.4 Cepas Clínicas e ATCCs.....	21
5.5 Determinação da Concentração inibitória mínima (MIC).....	22
5.6 <i>Time kill</i>	23
5.7 Ensaio de toxicidade in vivo.....	24
6. CAPÍTULO 2 - Atividade antifúngica do tungstato de prata contra dermatófitos e <i>Candida spp.</i>	26
Introdução.....	28
Materiais e métodos.....	29
Resultados e discussão	31
Conclusão.....	35
Referências	36
7. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45
Anexo A. Representação gráfica da curva de crescimento das cepas em contato com o α -Ag ₂ WO ₄	49

1. INTRODUÇÃO

Os fungos fazem-se presente nos mais variados habitats, sendo dispersos por fatores como a água, alimento, vento, animais e humanos (FAJARDO et al. 2017). Em geral, vivem na matéria orgânica em decomposição como sapróbios, comensais ou parasitas em hospedeiros animais, vegetais (BALAU, 2019).

As infecções fúngicas representam um significativo problema de saúde pública no cenário mundial. Nas últimas décadas, os fungos são responsáveis pela maioria das causas de infecções em paciente imunocomprometidos (LOW; ROTSTEIN, 2011), sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade na população mundial (MAGAGNIN et al., 2011).

Os fungos dermatófitos constituem um grupo de organismos responsáveis por infecções frequentes na rotina dermatológica, cujos agentes mais prevalentes são principalmente dos gêneros *Thichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (CRIADO, 2011).

Além destes organismos, outros como exemplo, leveduras, são responsáveis por dermatomicoses, representando o gênero *Candida*, o de maior ocorrência (KHOSRAVI et al., 2013), e, a espécie *Candida albicans*, o principal agente isolado em infecções de diferentes tecidos (ABARZÚA-ARAYA et al., 2014).

Nos últimos anos, tem sido observada a alta tolerância e resistência dos fungos aos antifúngicos convencionais da prática clínica (COELHO, et al., 2020; SILVA et al., 2020). Diante desta realidade, a busca por novos agentes antimicrobianos passa a ser necessidade para área científica, com principal objetivo impedir a multiplicação ou sobrevida dos fungos (FOGGI et al., 2017).

Estudos apontam para a efetividade da prata contra um amplo espectro de microrganismos, e em associação com metais, exemplo Ag_2WO_4 , um material de interesse clínico (FOGGI et al., 2017).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas

As infecções fúngicas representam um significativo problema de saúde pública no cenário mundial. Nas últimas décadas, os fungos são responsáveis pela maioria das causas de infecções em paciente imunocomprometidos (LOW; ROTSTEIN, 2011), sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade na população mundial (MAGAGNIN et al., 2011).

As lesões decorrentes das infecções fúngicas manifestam-se, do ponto de vista clínico, nas mais diversas formas, podendo ser classificadas de acordo com suas localizações no organismo como: superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. As micoses superficiais são caracterizadas pela infecção até o estrato córneo com baixa resposta inflamatória, e corresponde a principal causa de doença de pele afetando milhões de pessoas mundialmente (RICARDO CRIADO et al., 2011; INDIRA et al., 2014).

2.2 Agentes etiológicos e epidemiologia

As leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem de forma assexuada, com perfis epidemiológicos dependentes da localização geográfica (SURYAWANSHI et al., 2017). O gênero *Candida* é um dos principais agentes etiológicos das micoses superficiais, com alta incidência nas dermatomicoses (OLIVEIRA, 2017). Neste sentido, *Candida albicans*, e as espécies *não-albicans* têm sido destaque em diversas patologias, como organismos oportunistas (CAMPOS et al., 2020).

O gênero *Trichosporon* se constitui como grupo fúngico isolado das infecções superficiais, classificado como patógeno oportunista emergente, responsável pela disseminação de doenças na população imunocomprometida. As principais espécies incluem: *T. asahii* e *T. asteroides* (MOUBASHER; ABDEL-SATER; SOLIMAN, 2017).

Os dermatófitos são fungos altamente especializados capazes de degradar a queratina presente em pele, unhas e cabelo causando infecções

denominadas dermatofitoses. São divididos em três gêneros; *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*, e classificados de acordo com seu habitat primário em antropofílico, zoofílico e geofílico (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2017). Os dermatófitos antropofílicos são responsáveis pela maioria dos casos de dermatofitoses, seguidos por espécies zoofílicas (DIDEHDAR et al., 2016). Em alguns casos, as infecções superficiais por dermatófitos não se restringem somente a pele, evoluindo para quadro de infecções sistêmicas (INAOKI et al., 2015; LIANG et al., 2016).

Estima-se que aproximadamente 25% da população mundial seja afetada por essas infecções, com maior incidência em pacientes imunocomprometidos, portadores de doenças crônicas ou acima de 50 anos (DE BERKER, 2013).

Devido às condições de temperatura e ambiente do clima tropical, que são ideais para a disseminação dos fungos, o Brasil é um país com alta taxa de infecções fúngicas. Entretanto, essas doenças não fazem parte de notificação compulsória no Brasil, sendo assim, são relatados poucos estudos fragmentados sobre a epidemiologia dessas infecções, tornando difícil estimar a extensão do problema (ALMEIDA FILHO et al., 2020; ALTAF et al, 2020).

O principal agente etiológico das dermatofitoses é a espécie antropofílica *Trichophyton rubrum*, seguido por *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum* (HAYETTE; SACHELI, 2015). Sua distribuição pelo mundo esta diretamente ligada a fatores ambientais ou relacionados ao hospedeiro, uma vez que alguns fungos são cosmopolitas e outros dependem da adaptação ao meio (DE BERKER, 2013). Sendo assim, sua epidemiologia é variada, segundo fatores estacionais, regionais, faixa etária, contato com animais, condições higiênico-sanitárias, exposições á locais públicos, dentre outros (AQUINO et al., 2007; DALLA, 2019).

Um estudo epidemiológico na Europa, envolvendo 16 países, demonstrou que 40% dos indivíduos analisados apresentavam infecção dermatofítica no couro cabeludo. Já, outro estudo nos Estados Unidos, com crianças em creches, os valores percentuais variaram entre 22% a 50% com esta ocorrência (SILVA, 2019).

O dermatófito *Trichophyton rubrum* é o agente antropofílico mais frequentemente isolado na Europa, América do Sul e América do Norte

(AMEEN, 2010; NENOFF et al., 2014; LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2010; ZHAN et al., 2017). Esta mesma espécie no estudo de AQUINO et al. (2007) foi a mais encontrada a partir de pacientes ambulatoriais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com 69,2% dos casos de infecções, seguido de *Trichophyton mentagrophytes* com 20,3%, e pela espécie *Microsporum canis* com 5,7%.

Microsporum canis representa o principal agente de tinea capitis nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Por ser uma espécie zoofílica, o contato com animais infectados pode levar a infecção, consistindo os cães e gatos, os principais reservatórios (SILVA, 2019).

2.3 Etiopatogênese

Durante o processo de infecção, os dermatófitos remodelam o metabolismo do tecido hospedeiro para superar seus mecanismos de defesas, e este processo envolve a produção de uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas como elastases, proteases, lípases, para captação de nutrientes (DE AGUIAR PERES et al., 2010).

Candida albicans destaca-se como principal agente isolado das dermatomicoses, porém nos últimos anos *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* surgem como patógenos emergentes (ABARZÚA-ARAYA et al., 2014). Os principais mecanismos de virulência dessas espécies incluem os mecanismos de adesão, filamentação e uma ampla gama de produção de enzimas extracelulares importantes para colonização e infecção (WU; FENG; SANG, 2014).

Membros de *Trichosporon spp.* expressam glucuroxilomanano (GXM) em suas paredes celulares, um polissacarídeo que pode atenuar a capacidade fagocítica de neutrófilos e monócitos *in vivo*. Outros fatores de virulência em *Trichosporon* é a formação de biofilme, e a capacidade de secretar enzimas como proteases e lipases (COLOMBO et al., 2011).

2.4 Manifestações clínicas das micoses superficiais

Existem várias manifestações das micoses superficiais, dependendo do local acometido e o agente causador da micose. As infecções fúngicas do couro cabeludo, unhas e pele, são micoses conhecidas como tineas (SOMENZI, RIBEIRO, & MENEZES, 2006). Essas formas clínicas das micoses superficiais estão representadas na Figura 1.

Tinea capitis é uma dermatofitose do couro cabeludo que se apresenta como uma dermatose descamativa com algum grau de inflamação, muitas vezes acompanhada por perda de cabelo por tonsura. Em algumas formas clínicas inflamatórias mais graves pode ocorrer alopecia. É causada por fungos do gênero *Trichophyton* e *Microsporum* presentes no folículo piloso do pelo e ao redor da pele. Mais frequente em crianças, formando áreas arredondadas com falhas no cabelo (DIAS et al., 2013).

A tinea corporis inclui todas as infecções superficiais de pele, excluindo mãos, pés, couro cabeludo, barba, rosto. As lesões são circulares, geralmente irregulares, podendo ser múltiplas, a margem é bem delimitada (BOLOGNIA, JORIZZO, & RAPINI, 2015).

Onicomicose ou tinea ungueal é uma infecção que acomete as unhas, podendo ocasionar deslocamento parcial ou queda da unha. Essas infecções se iniciam pela extremidade proximal com manchas brancas ou amareladas. São ocasionadas, na maioria das vezes, por *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e leveduras do gênero *Candida spp* (PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015; KHOSRAVI et al., 2013).

Figura 1: Formas clínicas das micoses superficiais: (A) tinea capitis; (B) tinea corporis; (C) tinea ungueal.



Fonte: (CARVALHO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2010; PIRACCINI; ALESSANDRINI, 2015) modificado.

2.5 Diagnóstico das micoses superficiais

O diagnóstico das micoses inicia pela apreciação médica, das manifestações clínicas das lesões. O diagnóstico laboratorial, objetiva identificar o agente etiológico, para fins epidemiológicos, bem como para condução subsequente dos fármacos como agentes terapêuticos (FEUILHADE DE CHAUVIN, 2005; REISBERGER et al., 2003).

Consideram-se os exames principais para rotina laboratorial, a microscopia direta (MD) e a cultura (C). A MD é um exame de baixo custo, onde o material coletado é depositado em uma lâmina, introduzido uma gota de hidróxido de potássio (KOH) preparado para que os debris celulares sejam dissolvidos, facilitando a visualização de estruturas fúngicas. Apesar de ser prático, este recurso laboratorial não permite a identificação do agente etiológico (FEUILHADE DE CHAUVIN, 2005; GRUPTA; PAQUET, 2015). Assim, a cultura pode ser realizada como melhor alternativa, a partir de meios sólidos ou líquidos. Após crescimento das colônias em Ágar Sabouraud Dextrose, as culturas são direcionadas para identificação por características morfológicas, macro e microscópicas, além das adicionais provas bioquímicas, para reconhecimento das espécies fúngicas (ELY; ROSENFELD; STONE, 2014).

2.6 Atividade antimicrobiana

A alta tolerância e resistência dos fungos aos antifúngicos convencionais têm sido observados nos últimos anos (COELHO, et al., 2020; SILVA et al., 2020). O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos passa a ser prioridade para área científica, com principal objetivo impedir a multiplicação ou sobrevida dos fungos (FOGGI et al., 2017).

Estudos apontam para a efetividade da prata contra um amplo espectro de microrganismos, e em associação com metais, exemplo Ag_2WO_4 , um material de interesse clínico (FOGGI et al., 2017). No estudo de Longo et al. (2013), confirmaram que o material tem potencial para uso em dispositivos ópticos, sensores, aplicações biológicas, plasmônicas e catalíticas.

Um estudo realizado por Longo et al. (2013) demonstrou, pela primeira vez, o crescimento *in situ* de nanofilamentos de Ag metálica, a partir de cristais de tungstato de prata. Nesse estudo, os autores avaliaram o efeito antimicrobiano do α -Ag₂WO obtido pelo método de tratamento hidrotérmico convencional e o α -Ag₂WO₄ com filamentos de prata obtido por irradiação de elétrons. As duas amostras apresentaram efeito bacteriostático e bactericida contra *Staphylococcus aureus*, sendo que, as constituídas por filamentos de prata, foram as mais efetivas (LONGO et al., 2013).

Foggi et al. (2017) sintetizaram o α -Ag₂WO₄ pelo método de coprecipitação simples e avaliaram a atividade antifúngica frente à espécie *Candida albicans*. Os microcristais de α -Ag₂WO₄ foram capazes de inibir as colônias com concentração inibitória mínima (CIM) igual a 0,0625 mg/mL (FOGGI et al., 2017).

2.7 Tungstato de prata

Têm-se notado nos últimos anos, o interesse da comunidade científica nos estudos envolvendo as propriedades ópticas e eletrônicas do tungstato de prata (Ag₂WO₄), tendo em vista a facilidade de obtenção, por diversos métodos de síntese, controle de morfologia, tamanho de partícula, baixo custo, propriedades ópticas, eletrônicas e, pelas propriedades antimicrobianas (PERRIN et al., 2014)

Os tungstatos metálicos compreendem uma classe de óxidos semicondutores com várias aplicações, constituídos por ligações covalentes, iônicas e metálicas (ANDRÉS et al., 2014). O polimorfismo é observado especialmente por três tipos de estruturas: α -ortorrômbica cujo grupo espacial é Pn2n, β -hexagonal pertencendo ao grupo espacial p63/m e γ -cúbica com grupo espacial Fd3m. As fases β -hexagonal e γ -cúbica são metaestáveis e são facilmente convertidas para a fase α . A fase α -Ag₂WO₄ é termicamente estável e tem sido considerada como importante material, devido ao crescimento de filamentos de prata (Ag) na sua superfície, quando exposto à irradiação com elétrons (DA SILVA et al., 2014).

O tungstato de prata apresenta aplicações na quebra oxidativa de compostos orgânicos, na área dielétrica, optogenética/eletrofisiologia, propriedades fotoluminescentes e fotocatalíticas, bem como para sensores de gás e bactericidas (FOGGI et al., 2017).

Outras propriedades do Ag_2WO_4 tem sido observadas, como um sistema catalisador bifuncional altamente eficiente para fixação química de CO_2 atmosférico com álcoois propargílicos, para fornecer carbonatos cíclicos de α -alquilideno sob condições neutras e livres de solventes, de modo a eliminar o uso de grandes quantidades de soda cáustica ou solventes orgânicos inflamáveis na indústria química (SONG et al., 2014).

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade na população mundial, representando um significativo problema de saúde pública.

Devido às condições de temperatura e ambiente do clima tropical, que são ideais para a disseminação dos fungos, o Brasil é um país com grande probabilidade de infecções fúngicas. Entretanto, por não ser doença de notificação compulsória, seus números epidemiológicos de incidência podem ser subestimados.

O tratamento é longo, e a partir de observações clínicas, percebe-se que os antifúngicos disponíveis comercialmente são, por vezes, muito dispendiosos e, em alguns casos, podem desencadear reações adversas. Além disso, os dermatófitos vêm desenvolvendo cada vez mais resistência à terapêutica antifúngica convencional, o que ocasiona um aumento progressivo do número de recidivas e ausência de resposta aos fármacos convencionais.

Faz-se necessário então o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, com o objetivo de impedir a multiplicação ou sobrevida desses microrganismos.

4. OBJETIVO

Avaliar o efeito antifúngico da molécula tungstato de prata contra fungos dermatófitos e leveduriformes isolados de doença fúngica superficial.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Síntese e processamento da molécula tungstato de prata pelo método coprecipitação simples;
- b) Avaliar a Concentração fungicida e fungistática do tungstato de prata;
- c) Avaliar toxicidade do tungstato de prata, *in vivo*, com modelo invertebrado de *Galleria mellonella*;
- d) Avaliar *time kill* das cepas de leveduras e dermatófitos, frente ao tungstato de prata.

5. METODOLOGIA

5.1 Síntese do tungstato de prata

Primeiramente, α -Ag₂WO₄ foi sintetizado por meio do método de coprecipitação simples em meio 1:1 v/v de água e etanol, pois testes iniciais mostraram que este processo faz com que o potencial bactericida das micropartículas seja elevado em relação à síntese nos solventes separados. Estas amostras foram obtidas por simples mistura da solução de Ag (AgNO₃, Cennabras, 98.0%) na solução do formador de rede WO₄²⁻ (Na₂WO₄·2H₂O, Aldrich, 99.9%), sob agitação constante e temperatura de 70° C. Após a mistura, a solução foi deixada nas condições anteriores por 20 minutos, a fim de se obter uma maior homogeneização do sistema. As amostras foram lavadas até pH neutro e secas a 60°C em estufa.

5.2 Irradiação por feixe de elétrons

Para irradiar o material com elétrons, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (MEV) empregando o equipamento de modelo Supra 35-VP (Carl Zeiss, Alemanha) com tensão de aceleração de 15 kV. Utilizando esse método, foi observado, pela primeira vez, por Longo et. al, o crescimento inédito in situ em tempo real do crescimento de filamentos metálicos Ag a partir da Ag₂WO₄, ao submeter o cristal à irradiação de elétrons a partir da microscopia eletrônica (LONGO et al., 2016).

5.3 Caracterizações

As amostras foram caracterizadas estruturalmente em um Difratômetro de Raio X de marca Rigaku, modelo DMax2500PC. O equipamento foi operado nas condições de 40 kV e 150 mA, a radiação utilizada para as medidas foi a do Cu-Ka ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Foi empregada uma taxa de varredura de 2°/min no intervalo de 2 θ de 5 a 110°. Os difratogramas dos pós foram comparados com os padrões de difração segundo as fichas cristalográficas JCPDS (*Joint*

Committee on Powder Diffraction Standards) e ICSD (Inorganic Crystal Structure Database).

A espectroscopia Raman foi utilizada como técnica complementar à DRX, devido a esta ser mais sensível às mudanças de parâmetros de ordem local. A espectroscopia Raman forneceu informações do retículo cristalino, assim, tornando as duas técnicas (RAMAN e DRX) complementares na análise de formação de fases por meio desta técnica. Os dados de espectroscopia Raman foram obtidos em um equipamento RFS/100/S Bruker FT-Raman.

A análise por espectroscopia óptica nas regiões das radiações ultravioleta e visível (UV-Vis) é um tema muito importante para estudos de bandas de absorção óticas. Sendo possível à observação de efeitos quânticos relacionados a alterações na energia do gap com relação à desordem estrutural e influência da dopagem sobre as absorções. As caracterizações por UV-Vis foram realizadas em um equipamento Cary, modelo 5G pelo método de refletância difusa total utilizando uma esfera integradora.

Para a determinação de forma, tamanho, distribuição das partículas, textura, topografia e superfície, foi essencial o uso da microscopia eletrônica de varredura por força de campo (FEG-SEM). Neste trabalho foi utilizado um microscópio eletrônico com fonte de emissão eletrostática ("Field Emission Electron Guns") FEG-MEV - LEO 1550 (SILVA et al., 2016).

5.4 Cepas Clínicas e ATCCs

Neste estudo, foram utilizados isolados clínicos de *C. albicans* (CA1 - CA10), *C. parapsilosis* (CP1 - CP10), *C. krusei* (CK1 - CK10), *C. tropicalis* (CT1 - CT10), *T. rubrum* (TR1- TR10), *T. mentagrophytes* (TM1 - TM10), *M. canis* (MC1- MC10), além de cepas referências ATCCs (American Type Culture Collection) de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 40147) e *C. tropicalis* (ATCC 13803); *T. mentagrophytes* (ATCC 11481), *M. canis* (ATCC 9865) e CBS (Fungal Biodiversity Centre) *T. rubrum* (CBS 118892), cadastrados no SISGEN e pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP – Brasil.

5.5 Determinação da Concentração inibitória mínima (MIC)

A diluição seriada do α -Ag₂WO₄ permite determinar a concentração mínima de inibição que mata a célula fúngica. A análise da atividade antifúngica do α -Ag₂WO₄ foi realizada em duplicata de acordo com as instruções do método M27-A3 e M38 A-2 da CLSI. Cada inóculo foi ajustado de acordo com os respectivos protocolos do CLSI.

As suspensões de inóculos de fungos filamentosos foram preparadas a partir de culturas com 7 dias de crescimento em Agar Batata Dextrose (PDA), incubadas a 28° C para indução de esporulação. As superfícies das colônias cobertas com 5 mL de salina estéril (0,85%), foram raspadas com alça estéril. A mistura de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo estéril, permitindo a precipitação de estruturas mais pesadas. Posteriormente o sobrenadante foi transferido para novo tubo estéril e homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Os inóculos foram ajustados em espectrofotômetro com leitura a 530 nm, seguido de diluição das amostras na concentração 1:50.

Os inóculos das leveduras foram preparados com colônias crescidas de 24 horas em Agar Sabouraud Dextrose. As colônias foram suspensas em 5 mL de salina estéril a 0,85%. Essa suspensão foi homogeneizada e a densidade das células ajustadas em espectrofotômetro, em 530 nm, com transmitância de 85% a 95%, correspondente à escala 0,5 de McFarland. Esse inóculo foi então diluído 1:100 em salina e, seguidamente, 1:20 em meio RPMI-1640.

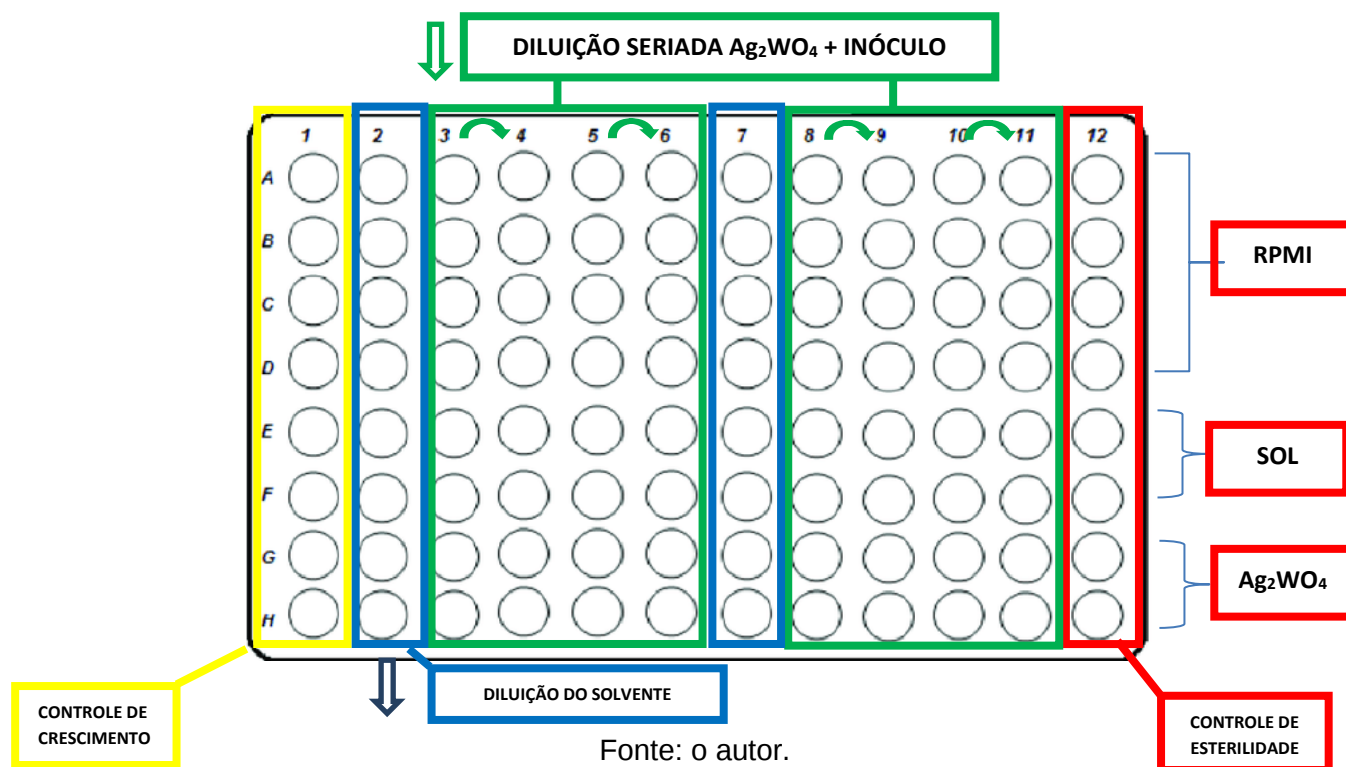
Inoculou-se 0,1 mL de cada suspensão de conídios ou leveduras em placas de poliestireno de 96 poços, contendo meio RPMI-1640 nas diferentes concentrações do tungstato de prata testados. Foram preparados poços controles de esterilidade (contendo 0,2 mL de RPMI) e de crescimento (contendo apenas inóculo e RPMI).

As placas foram mantidas a 35° C, com leitura após 120 horas (dermatófitos) ou 24 horas (leveduras). A determinação da CIM foi feita por análise visual e por análise de absorbância com leitor ELISA.

Para a determinação da concentração fungicida mínima (MFC), uma alíquota de cada poço foi transferida para placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com o auxílio de hastes estéreis de madeira. A MFC foi

determinada através da concentração mínima que inibiu crescimento visível no meio de cultura.

Figura 2: Esquema ilustrativo da placa de 96 poços para a realização da MIC.



5.6 Time kill

O ensaio foi conduzido usando uma modificação do método descrito por Klepser et al. (1998), com dez isolados de cada espécie de *Candida* e três de cada espécie de dermatófito. Valores do MIC obtidos por microdiluição em caldo foram usados nos estudos de tempo de morte. Os inóculos de leveduras foram preparados a partir de colônias repicadas em ASD com crescimento de 24 horas. Uma alíquota de 50 µl foi adicionada em tubo Falcon contendo 4,95 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) na concentração de 10^5 células por mL. Posteriormente 250 µl foram transferidos para novo tubo contendo 4,75 mL de CSD. Os inóculos de filamentosos foram preparados a partir de cultura de 7 dias em Agar Batata Dextrose (ABD) para indução de esporulação. Suspensões de 50 µL foram adicionadas em 4,95 mL de CSD. Após a

preparação dos inóculos, realizou-se diluição 1:1 (1 mL da solução do α -Ag₂WO₄ na concentração 2x o MIC com 1 mL do inóculo).

Um tubo sem α -Ag₂WO₄ foi incluído como controle de crescimento para cada isolado. Em pontos de tempo predeterminados (8, 12 e 24h) para leveduras e (8, 24 e 48h) para dermatófitos, uma alíquota de 10 μ l foi retirada de cada amostra, e semeada em placas de ASD, com auxílio de alça Drigalski, incubadas a 30° C. As contagens de colônias foram determinadas após 24h (leveduras) e 120h (dermatófitos) e expressas como número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). A porcentagem de inibição foi calculada por comparação com o controle de crescimento usando o método de contagem de colônias.

5.7 Ensaio de toxicidade in vivo

A toxicidade do composto α -Ag₂WO₄ (62,5 μ g/mL em 10% metanol) foi avaliada utilizando larvas do modelo experimental de toxicidade *G. mellonella* (IGNASIAK; MAXWELL, 2017). Para cada condição, foram separadas 5 larvas de *G. mellonella* (275 $\pm$ 25 mg) no sexto instar de desenvolvimento em placas de Petri (90x15 mm). Os volumes de 5 e 10 μ l do composto foram injetados na última pró-pata da direita das larvas de *G. mellonella* utilizando uma microseringa de Hamilton modelo 7000.5KH de 10 μ l nas seguintes doses 2,27 mg kg⁻¹ (10 μ l de 62,5 μ g mL⁻¹), 1,13 mg kg⁻¹ (5 μ l de 62,5 μ g mL⁻¹), 0,227 mg kg⁻¹ (10 μ l de 6,25 μ g mL⁻¹) e 0,0227 mg kg⁻¹ (10 μ l de 0,625 μ g mL⁻¹). Os controles do experimento foram larvas intocadas (*naïve*) e larvas inoculadas com 10% metanol. As larvas foram incubadas a 37°C, privadas de alimentação e iluminação direta. Foram feitas avaliações da sobrevivência das larvas a cada 24 h, durante 5 dias e também foram retiradas diariamente as formações de pré-pupas para retardar a metamorfose.

Atividade antifúngica do tungstato de prata contra dermatófitos e *Candida* spp.

Letícia Monteiro Bianco¹, Marcelo Assis², Elson Longo², Thiago Henrique Lemes¹, Bianca Gottardo de Almeida¹, Natália Seron Brizzotti-Mazuchi³, Mariela Domiciano Ribeiro³, Taiza Maschio de Lima¹, Maicon Henrique Caetano¹, Marcia Regina von Zeska Kress⁴, João Paulo Zen Siqueira³, Margarete Teresa Gottardo de Almeida³

¹ Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Campus São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, Brasil, 15054-000, Telefone: +55 (17) 32212200.

² Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF) - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), P.O. Box 676, 13565 – 905, São Carlos, SP, Brasil.

³ Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, Brasil, 15090-000, Telefone: +55 (17) 32015843.

⁴ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. Café, Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto, Brasil, 14040-903, Telefone: +55 (16) 33154181.

Autor correspondente:

Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Cep: 15090-000, Telefone: +55(17)32015843

E-mail: margarete@famerp.br

Artigo a ser submetido a revista Medical Mycology

Resumo

As infecções fúngicas representam um significativo problema de saúde pública no cenário mundial e estão aumentando em incidência, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos. A micose superficial é caracterizada pela infecção no estrato córneo, com baixa resposta inflamatória, e corresponde a principal causa de doença de pele, que afeta milhões de pessoas causadas por fungos dermatófitos, não dermatófitos ou leveduras. A alta tolerância e resistência dos fungos aos antifúngicos convencionais têm sido observado, esses fatores implicam na procura de compostos que sejam eficazes, que reduzam o tempo de tratamento e não apresentem riscos ao paciente. O tungstato de prata é um composto de tungstênio e prata, que ao ser irradiado com elétrons crescem partículas de prata com ação plasmônica, tornando-o mais bactericida e fungicida. O objetivo deste trabalho foi realizar a síntese das nanoestruturas de tungstato, pelo método de coprecipitação simples. A atividade antifúngica, *in vitro*, foi avaliada por microdiluição, obtendo-se a Concentração Inibitória Mínima (MIC) do tungstato de prata contra linhagens clínicas e cepas de referências (ATCC) de *Candida spp.*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*, apresentando atividade antifúngica efetiva com valores de CIM entre 0,03-62,5 µg/mL. Cepas de *C. krusei* mostrou-se mais sensível e cepas de *C. albicans* mais resistentes ao composto sintetizado. O ensaio de toxicidade foi realizado em modelo *in vivo* usando larvas de *Galleria mellonella*. O teste foi executado por inoculação com a mesma concentração de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ usada nos testes de microdiluição anteriores, e não apresentou toxicidade. O ensaio de *time kill* foi realizado com cepas clínicas e referências das espécies de *Candida* e dermatófitos. Esses resultados mostram uma potencial aplicação no controle de infecções fúngicas inovando os protocolos terapêuticos.

Palavras chave: Infecções fúngicas. Nanoestruturas de tungstato de prata. Dermatófitos. Leveduras.

Introdução

Atualmente, as infecções fúngicas têm se tornado um problema de saúde pública, sendo responsáveis pela maioria das causas de infecções em pacientes imunocomprometidos, aumentando as taxas de morbimortalidade na população mundial.¹⁻³ As micoses superficiais são caracterizadas pela infecção até o estrato córneo com baixa resposta inflamatória, e corresponde a principal causa de doença de pele, podendo ser ocasionados por fungos dermatófitos e leveduriformes.^{4,5}

Os dermatófitos são fungos altamente especializados capazes de degradar queratina presente em pele, unhas e cabelo causando dermatofitoses, sendo os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* mais frequentemente isolados.^{4,6} Durante o processo de infecção, remodelam o metabolismo do tecido hospedeiro para superar seus mecanismos de defesas, e este processo envolve a produção de uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas como elastases, proteases, lipases, para captação de nutrientes. Outro grupo também frequentemente encontrado são as leveduras do gênero *Candida*, com alta incidência nas dermatomicoses.^{7,8} *Candida albicans* se destaca como principal agente dessas infecções, porém nos últimos anos espécies não-albicans (NAC) surgiram como patógenos oportunistas.^{9,10} As espécies NAC mais comuns de importância clínica são *Candida krusei*, *Candida glabrata*, o complexo *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*.¹¹⁻¹³ Os principais mecanismos de virulência dessas espécies incluem adesão, filamentação e uma ampla gama de produção de enzimas extracelulares importantes para colonização e infecção.^{14,15}

O tratamento das dermatofitoses consiste no uso de antifúngicos tópicos ou sistêmicos, sendo as principais classes os azóis, as poliaminas, alilaminas e equinocandinas, com alvos sobre componentes da parede celular e membrana citoplasmática.¹⁶ O uso prolongado desses fármacos no tratamento sistêmico, acarreta potenciais efeitos colaterais como danos hepatotóxicos e nefrotóxicos, contribuindo para a baixa adesão ao tratamento. Além disso, o surgimento de linhagens resistentes à terapêutica é evento comum, decorrente à seleção de clones novos a partir da exposição aos antifúngicos.¹⁷⁻¹⁹ Algumas espécies, como *Candida krusei*, por exemplo, apresentam resistência intrínseca aos azóis, especialmente o fluconazol e itraconazol, responsáveis pelo insucesso do tratamento.^{20,21} Entre os mecanismos de resistência, destacam-se ativação de bomba de efluxo, alterações nas vias de sínteses de ergosterol, modificações na parede celular ou na enzima alvo do fármaco. Os azóis atuam inativando a enzima C-14- α -desmetilase, interrompendo a síntese de ergosterol na membrana celular. Os poliênicos ligam-se ao ergosterol na membrana celular formando poros que alteram a permeabilidade da membrana, ocorrendo à perda de proteínas, hidratos de carbono e íons potássio, causando morte celular. As alilaminas inibem a enzima esqualeno epoxidase diminuindo a concentração de ergosterol, aumentando a permeabilidade da membrana celular, interrompendo a organização

celular e diminuindo o crescimento do fungo. As equinocandinas inibem a síntese de glucanas pela inativação da enzima *1,3-beta-glucana*, resultando na interrupção da formação da parede celular.⁵⁰

Devido à crescente tolerância e resistência à terapêutica convencional, os materiais em nanoescala surgem como novos agentes antimicrobianos. Nanopartículas metálicas são mais promissoras devido a grande proporção entre área de superfície e volume.

A prata em associação com metais tem mostrado alta efetividade contra um amplo espectro de microrganismos. Um exemplo dessa associação é o tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$), um semicondutor com aplicações na quebra oxidativa de compostos orgânicos, na área dielétrica, optogenética/eletrofisiologia, propriedades fotoluminescentes e fotocatalíticas, bem como para sensores de gás e antimicrobiana. Estudos mostraram nanoestruturas de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ que ao ser irradiado com elétrons crescem filamentos de prata com ação plasmônica, tornando-o mais bactericida e fungicida. Nesse estudo, a amostra irradiada com elétrons apresentou efeito bactericida maior contra *Staphylococcus aureus*, do que a amostra obtida pelo método hidrotérmico convencional.²²⁻²⁶

O objetivo deste trabalho foi realizar a síntese das nanoestruturas de tungstato de prata pelo método de coprecipitação simples, irradiado por elétrons, bem como avaliar a atividade antifúngica e fungicida das nanoestruturas e o tempo de morte frente a isolados de dermatófitos de origem humana e *Candida* spp., além de determinar a toxicidade *in vivo* em *Galleria mellonella*.

Materiais e métodos

Síntese do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$

A amostra de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foi obtida pelo método de co-precipitação em meio aquoso utilizando o procedimento descrito por Assis et al. em trabalhos anteriores.²⁷⁻²⁹ Primeiro, 1.10^{-3} mol de $\text{Na}_2\text{WO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 99,5%) foi dissolvido em 50.0 mL de H_2O destilado e mantido a 70°C. Em outro béquer, 2.10^{-3} mol de AgNO_3 (Cennabras 99,8%) foi dissolvido em 50.0 mL de H_2O destilado e mantido a 70°C. Sob agitação, a solução de AgNO_3 foi adicionada à solução de $\text{Na}_2\text{WO}_4.2\text{H}_2\text{O}$, obtendo-se a formação de um precipitado branco. A solução foi deixada sob agitação durante 10 minutos, centrifugada e lavada várias vezes com água destilada (pH=7). O pó resultante foi seco em estufa a 60°C durante 24h.

Caracterizações

As amostras $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foram caracterizadas estruturalmente em um difratômetro de raios-X Rigaku, modelo DMax2500PC. O equipamento foi operado a

40 kV e 150 mA utilizando radiação Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). A amostra também foi caracterizada por análise em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FE-SEM), utilizando um Supra 35-VP (Carl Zeiss) operado a 10 kV. A carga superficial da amostra (água, pH=7) foi analisada usando um Zetasizer NanoZS (Malvern, Reino Unido).

Teste de susceptibilidade

A diluição serial do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ permite determinar a concentração mínima de inibição que mata a célula fúngica. A análise da atividade antifúngica do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foi realizada em duplicata de acordo com as instruções do método M27-A3 e M38 A-2 da CLSI.^{30,31} No estudo, foram utilizados isolados clínicos de *C. albicans* (CA1 - CA10), *C. parapsilosis* (CP1 - CP10), *C. krusei* (CK1 - CK10), *C. tropicalis* (CT1 - CT10), *T. rubrum* (TR1 - TR10), *T. mentagrophytes* (TM1 - TM10), *M. canis* (MC1 - MC10), além de cepas referências ATCCs (American Type Culture Collection) de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 40147) e *C. tropicalis* (ATCC 13803); *T. mentagrophytes* (ATCC 11481), *M. canis* (ATCC 9865) e CBS (Fungal Biodiversity Centre) *T. rubrum* (CBS 118892). Cada inóculo foi ajustado de acordo com os respectivos protocolos do CLSI.

As amostras do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foram dissolvidas em metanol a 10% e adicionadas a uma placa de 96 poços de poliestireno contendo 100 μL de meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) em diluições de 1000 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente 100 μL de cada inóculo foi transferido para cada poço. As placas foram incubadas nos tempos de 24 horas para leveduras e 120 horas para dermatófitos, a 37 °C.

Para a determinação da concentração fungicida mínima (MFC), uma alíquota de cada poço foi transferida para placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com o auxílio de hastes estéreis de madeira. A MFC foi determinada através da concentração mínima que inibiu crescimento visível no meio de cultura.

Ensaio de toxicidade in vivo

A toxicidade do composto $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (62,5 $\mu\text{g/mL}$ em 10% metanol) foi avaliada utilizando larvas do modelo experimental de toxicidade *G. mellonella*.³³ Para cada condição, foram separadas 5 larvas de *G. mellonella* ($275 \pm 25 \text{ mg}$) no sexto instar de desenvolvimento em placas de petri (90x15 mm). Os volumes de 5 e 10 μL do composto foram injetados na última pró-pata da direita das larvas de *G. mellonella* utilizando uma microseringa de Hamilton modelo 7000.5KH de 10 μL nas seguintes doses 2,27 mg kg^{-1} (10 μL de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 1,13 mg kg^{-1} (5 μL de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 0,227 mg kg^{-1} (10 μL de 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 0,0227 mg kg^{-1} (10 μL de 0,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os controles do experimento foram larvas intocadas (*naïve*) e larvas inoculadas com 10% metanol. As larvas foram incubadas a 37°C, privadas de alimentação e iluminação direta. Foram

feitas avaliações da sobrevivência das larvas a cada 24 h, durante 5 dias e também foram retiradas diariamente as formações de pré-pupas para retardar a metamorfose.

Time kill

O ensaio foi conduzido usando uma modificação do método descrito por Klepser et al., com dez isolados de cada espécie de *Candida* e três de cada espécie de dermatófito.³² Valores do MIC obtidos por microdiluição em caldo foram usados nos estudos de tempo de morte. Os inóculos de leveduras foram preparados a partir de colônias repicadas em ASD com crescimento de 24 horas. As colônias foram adicionadas em tubo Falcon contendo 4,95 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) na concentração de 10^5 células por mL. Posteriormente 250 µl foram transferidos para novo tubo contendo 4,75 mL de CSD. Os inóculos de filamentosos foram preparados a partir de cultura de 7 dias em Agar Batata Dextrose (ABD) para indução de esporulação. Suspensões de 50 µl foram adicionadas em 4,95 mL de CSD. Após a preparação dos inóculos, realizou-se diluição 1:1 (1 mL da solução do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na concentração 2x o MIC com 1 mL do inóculo).

Um tubo sem $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foi incluído como controle de crescimento para cada isolado. Em pontos de tempo predeterminados (8, 12 e 24h) para leveduras e (8, 24 e 48h) para dermatófitos, uma alíquota de 10 µl foi retirada de cada amostra, e semeada em placas de ASD, com auxílio de alça Drigalski, incubadas a 30° C. As contagens de colônias foram determinadas após 24h (leveduras) e 120h (dermatófitos) e expressas como número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). A porcentagem de inibição foi calculada por comparação com o controle de crescimento usando o método de contagem de colônias.

Resultados e discussão

Síntese e caracterizações do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$

Para verificar se o material foi obtido, análises de difração de raios X (DRX) foram realizadas. Observa-se na Figura 1A que $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foi indexado com fase ortorrômbica pertencente ao grupo Pn2n de acordo com a ficha nº 243987 do banco de dados ICSD (Inorganic Crystal Database).³⁴ Nenhuma outra fase foi obtida, apresentando grande pureza do material. As Figuras 1B e 1C mostram imagens de FE-SEM em diferentes ampliações. Observa-se que os materiais possuem morfologia homogênea de microbastões hexagonais, estabilizados pelas superfícies (010), (101) e (100).^{35,36} O tamanho médio obtido para esta amostra foi de 203 nm de largura por 1237 nm de comprimento. O potencial zeta obtido para esses microbastões foi de -26 mV, de acordo com trabalhos publicados anteriormente.^{37,38}

O potencial antimicrobiano do α -Ag₂WO₄ irradiado por feixe de elétrons já é comprovado pela literatura. Longo e colaboradores demonstraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA). As amostras irradiadas reduziram 4 vezes o MIC em comparação as amostras não irradiadas.⁵¹

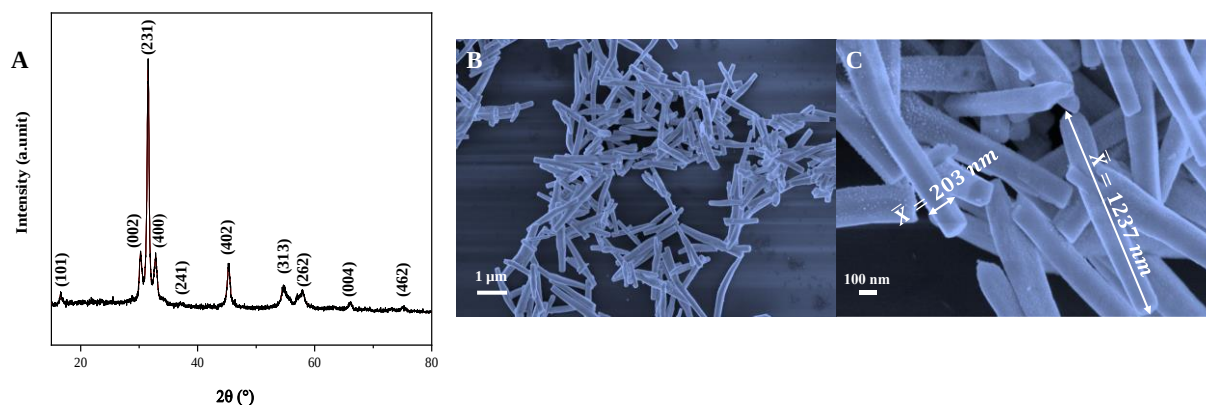


Figure 1 – A) padrões de XRD da amostra α -Ag₂WO₄; e imagens FE-SEM da amostra α -Ag₂WO₄ obtida nas ampliações B) 20K e C) 100K.

Teste de susceptibilidade antifúngica

A atividade antifúngica das nanoestruturas do tungstato de prata é mostrada na Tabela 1. Em geral, o α -Ag₂WO₄ apresentou atividade antifúngica efetiva considerando os valores de MIC de 0,03 - 62,5 μ g/mL contra as linhagens de leveduras e 0,4 – 15,6 μ g/mL para dermatófitos.

A melhor atividade foi observada em *Candida krusei* (CK4 e CK6) com MIC de 0,03 μ g/mL; seguido por *Candida parapsilosis* (CP1 e CP2) com MIC de 0,06 μ g/mL. Esse resultado é importante porque essas espécies têm se mostrado resistentes a fármacos azólicos, principalmente o fluconazol. Jamiu e colaboradores ressaltam a mudança no perfil de infecções causadas por *Candida* spp. nos últimos anos, com destaque para *C. krusei*, com potencial patogênico e rápida capacidade de desenvolver resistência adquirida frente a outras classes de antifúngicos.³⁹⁻⁴²

Os valores mais baixos da atividade inibitória foram encontrados em cepas clínicas de *C. albicans*, com valor de MIC entre 31,2 e 62,5 μ g/mL mostrando menor atividade do tungstato. Diferentemente, frente à cepa CAATCC observou-se atividade inibitória com MIC 3,9 μ g/mL. Estudos conduzidos por Foggi e colaboradores (2017) evidenciaram a ação fungistática e fungicida de α -Ag₂WO₄ contra *C. albicans* ATCC (90028), com valores de MIC de 3,9 μ g/mL, corroborando com os resultados do presente estudo. Ressalta-se que nessa pesquisa o número maior de linhagens clínicas utilizadas são provenientes de nichos anatômicos diferentes. A variabilidade de ambiente e o estresse sofrido por esses isolados podem contribuir para mudanças no mecanismo de defesa e tolerância desses microrganismos, justificando valores de MICs e MFCs variáveis para as outras linhagens de *C. albicans*.⁴³

Já para os dermatófitos, foi registrada, em geral, valor de MIC 3,9 µg/mL. A melhor atividade antifúngica do tungstato de prata foi encontrada frente à espécie *M. canis* (MC8) com MIC 0,48 µg/mL; e a menor, com MIC 15,6 µg/mL, para as cepas TMATCC, MC9 e MC10. Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado o crescente aumento de linhagens de dermatófitos resistentes a terapêutica convencional. Em estudo conduzido por Azambuja e colaboradores, até 25% das linhagens de *T. rubrum* apresentaram resistência ao fluconazol e itraconazol.⁴⁴ Diante disso, o tungstato com seu baixo valor de MIC, apresenta-se como opção viável para novas abordagens no tratamento das dermatofitoses.^{45,46}

A média geométrica dos MICs e MFCs calculadas (Tabela 2) ressalta que a melhor atividade de MIC e MFC do tungstato de prata foi observada contra as linhagens de *C. krusei* (0,17/0,66 µg/mL, respectivamente) para leveduras, enquanto para dermatófitos contra *T. rubrum* (2,9/3,3 µg/mL).

Tabela 1: Os valores de MIC e MFC do α -Ag₂WO₄ contra cepas de leveduras e dermatófitos.

<i>C. albicans</i>	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)	<i>C. parapsilosis</i>	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)	<i>C. krusei</i>	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)	<i>C. tropicalis</i>	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)
CAATCC	3,9	500	CPATCC	3,9	1000	CKATCC	0,48	1,95	CTATCC	1,95	1000
CA1	62,5	62,5	CP1	0,06	0,06	CK1	0,48	0,97	CT1	0,97	0,97
CA2	62,5	62,5	CP2	0,06	0,24	CK2	0,24	0,97	CT2	0,48	0,48
CA3	62,5	125	CP3	0,24	0,48	CK3	0,24	0,97	CT3	0,48	0,97
CA4	62,5	125	CP4	0,12	0,12	CK4	0,03	0,97	CT4	0,24	0,24
CA5	31,2	62,5	CP5	1,95	1,95	CK5	0,12	0,24	CT5	0,97	0,97
CA6	31,2	62,5	CP6	0,24	0,24	CK6	0,03	0,03	CT6	0,48	0,48
CA7	62,5	62,5	CP7	0,48	0,48	CK7	0,24	0,97	CT7	0,48	0,48
CA8	62,5	62,5	CP8	0,97	0,97	CK8	0,48	0,97	CT8	0,24	0,24
CA9	62,5	62,5	CP9	0,97	0,97	CK9	0,12	0,97	CT9	0,48	0,48
CA10	62,5	62,5	CP10	0,24	0,24	CK10	0,24	0,97	CT10	0,24	0,24
<i>T. rubrum</i>	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)	<i>T. mentagrophytes</i>	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)	<i>M. canis</i>	MIC (µg/mL)	MFC (µg/mL)			
TRATCC	1,9	3,9	TMATCC	15,6	15,6	MCATCC	3,9	3,9			
TR1	3,9	3,9	TM1	3,9	7,8	MC1	1,9	3,9			
TR2	7,8	7,8	TM2	3,9	7,8	MC2	3,9	7,8			
TR3	3,9	3,9	TM4	3,9	7,8	MC3	3,9	3,9			
TR5	3,9	3,9	TM5	3,9	7,8	MC4	3,9	7,8			
TR6	3,9	3,9	TM6	3,9	3,9	MC5	0,9	3,9			
TR7	1,9	1,9	TM7	3,9	7,8	MC6	3,9	3,9			
TR8	0,9	1,9	TM8	7,8	7,8	MC8	0,4	7,8			
TR9	1,9	1,9	TM9	3,9	7,8	MC9	15,6	15,6			
TR10	3,9	3,9	TM10	1,9	1,9	MC10	15,6	15,6			

Fonte: o autor.

Tabela 2: Média geométrica da MIC e MFC de cada espécie.

MÉDIA GEOMÉTRICA (µg/mL)							
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. canis</i>
MIC	42,8	0,37	0,17	0,51	2,9	4,4	3,2
MFC	85,6	0,74	0,66	0,96	3,3	6,7	6,3

Teste de toxicidade em *Galleria mellonella*

A toxicidade do composto foi analisada no modelo in vivo *Galleria mellonella*. Este sistema modelo tem semelhanças com a resposta imune inata dos mamíferos e possui defesas celulares e humorais. Os hematócitos larvais funcionam como fagócitos e liberam proteínas semelhantes aos anticorpos de mamíferos.^{33,47,48,49} A toxicidade do composto Ag_2WO_4 foi avaliada com larvas do modelo invertebrado e alternativo de virulência e toxicidade *Galleria mellonella*. Todas as larvas controle (*naïve* e inoculada com 10% metanol) sobreviveram até o final do experimento. Todas as larvas inoculadas com as diferentes doses do composto sobreviveram até o final do experimento, indicando a não toxicidade do composto $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nas doses testadas (figura 3).

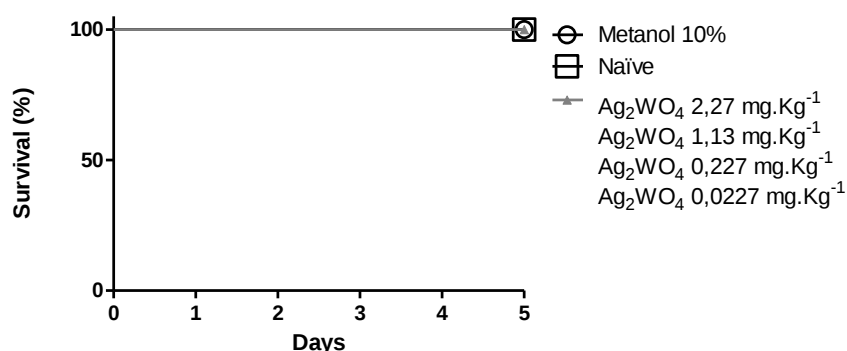


Figura 2: Representação gráfica do teste de toxicidade de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e controles (solução de metanol 10%) em *Galleria mellonella*.

Time kill

O ensaio de tempo de morte foi realizado ao longo de um período de 24h para leveduras e 48h para dermatófitos, sendo expostos à concentração de 2x o MIC para cada espécie. Um gráfico foi traçado entre o número logarítmico de UFC/mL e o tempo (Anexo A). A redução máxima de UFC/mL para cepas de *Candida parapsilosis*, foi observada com 12 e 24h, com taxa de inibição de 92,24%, em comparação ao controle.

Já para cepas de *Candida tropicalis*, a taxa de inibição chegou a 95,92% com 12h. *Candida krusei* obteve maior índice de inibição 82,87% com 8h. Em *Candida albicans*, todas as cepas foram inibidas 100% com 8h de incubação.

Já para os dermatófitos, *Microsporum canis* teve maior taxa de inibição 92,86% com 48h de incubação. Com 48h de incubação, *Trichophyton mentagrophytes* obteve sua maior taxa de inibição com 98,33%. *Trichophyton rubrum* foi 100% inibido com apenas 8h de incubação.

Conclusão

O $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sintetizada pelo método de coprecipitação simples em meio aquoso, e irradiado por elétrons através de um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (MEV) é alternativa factível como estratégia de controle para doenças fúngicas causadas por espécies de *Candida* e dermatófitos, com boa atividade antimicrobiana. Os menores valores de MIC contra cepas de *não-albicans* caracterizam um resultado importante, uma vez que estas espécies têm mostrado uma resistência à terapêutica convencional, principalmente a drogas azólicas. Considerando-se a atividade antifúngica do composto $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ mesmo em concentrações mínimas de ação, e, o efeito não tóxico *in vivo* observado em ensaios com *Galleria mellonella*, a opção terapêutica apresenta potencial para futuros ensaios clínicos no tratamento das dermatofitoses e dermatomicoses.

Referências

1. Low C-Y, Rotstein C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med Rep*. 2011;3.
2. de Berker D. Nail anatomy. *Clinics in Dermatology*. 2013;31:509–15.
3. Queiroz-Fernandes G. perfil de resistência de agentes de micoses oportunistas no brasil. *IAJMH*. 2020;4.
4. Criado PR, Oliveira CB de, Dantas KC, Takiguti FA, Benini LV, Vasconcellos C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. *An Bras Dermatol*. 2011;86:726–31.
5. Indira G, Reddy KR, Vishvanadh R, Rao RK, Raghuramulu G, Reddy SR. Clinicoetiologic investigations on superficial mycoses of Warangal (A.P) India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4:S311–9.
6. Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. *Mycopathologia*. 2017;182:215–27.
7. Oliveira EP, Andrade F de S, Lima-Neto RG de. Ocorrência de micoses superficiais em um centro de saúde pública localizado na cidade de Patos – PB, Brasil. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2017;49.
8. Khosravi AR, Shokri H, Nikaein D, Mansouri P, Erfanmanesh A, Chalangari R, et al. Yeasts as Important Agents of Onychomycosis: *In Vitro* Activity of Propolis Against Yeasts Isolated from Patients with Nail Infection. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2013;19:57–62.

9. Campos T, Cosentino C, Simioni PU, Ugrinovich LA. Avaliação do comportamento de leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. *Ciência & Inovação*. 2020;5.
10. Abarzúa-Araya A, Pérez M, Nauhm Y, León E, Fich F. *Candida* parapsilosis and *candida guilliermondii*: Emerging pathogens in nail candidiasis. *Indian J Dermatol*. 2014;59:24.
11. Kaur R, Dhakad MS, Goyal R, Kumar R. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6:455–60.
12. Mäkinen A, Nawaz A, Mäkitie A, Meurman JH. Role of Non-Albicans *Candida* and *Candida Albicans* in Oral Squamous Cell Cancer Patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018;76:2564–71.
13. Sadeghi G, Ebrahimi-Rad M, Mousavi SF, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Emergence of non- *Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *Journal de Mycologie Médicale*. 2018;28:51–8.
14. Wu F, Feng J, Sang H. Pseudo-Clubbing Complicated by Dermatophyte Onychomycosis. *Ann Dermatol*. 2014;26:271.
15. Rocha WRV da, Nunes LE, Neves MLR, Ximenes ECP de A, Albuquerque MCP de A. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. *RSD*. 2021;10:e43910414283.
16. Lopes AI, Tavarira FK, Pintado ME. Conventional and natural compounds for the treatment of dermatophytosis. *Medical Mycology*. 2020;58:707–20.

17. Bergold AM, Georgiadis S. novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *VA*. 2004;5.
18. Soares CVD, Duarte ABS, de Andrade Júnior FP, de Azevedo Firmino L, Soares GVD, Bezerra AS. uso irracional de antifúngicos: resistência e toxicidade. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*. 2021;17.
19. Almeida LMM de, Souza EA de F, Bianchin DB, Svidzinski TIE. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. *An Bras Dermatol*. 2009;84:249–55.
20. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. *Front Microbiol*. 2017;7.
21. Castanheira M. Fungemia Surveillance in Denmark Demonstrates Emergence of Non-*albicans Candida* Species and Higher Antifungal Usage and Resistance Rates than in Other Nations. *J Clin Microbiol*. 2018;56.
22. Andrés J, Gracia L, Gonzalez-Navarrete P, Longo VM, Avansi W, Volanti DP, et al. Structural and electronic analysis of the atomic scale nucleation of Ag on α -Ag₂WO₄ induced by electron irradiation. *Sci Rep*. 2015;4:5391.
23. Foggi CC, Fabbro MT, Santos LPS, de Santana YVB, Vergani CE, Machado AL, et al. Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. *Chemical Physics Letters*. 2017;674:125–9.
24. Longo E, Cavalcante LS, Volanti DP, Gouveia AF, Longo VM, Varela JA, et al. Direct in situ observation of the electron-driven synthesis of Ag filaments on α -Ag₂WO₄ crystals. *Sci Rep*. 2013;3:1676.

25. da Silva LF, Catto AC, Avansi W, Cavalcante LS, Andrés J, Aguir K, et al. A novel ozone gas sensor based on one-dimensional (1D) α -Ag₂WO₄ nanostructures. *Nanoscale*. 2014;6:4058–62.
26. De Santana YVB, Gomes JEC, Matos L, Cruvinel GH, Perrin A, Perrin C, et al. Silver Molybdate and Silver Tungstate Nanocomposites with Enhanced Photoluminescence. *Nanomaterials and Nanotechnology*. 2014;4:22.
27. Assis M, Cordoncillo E, Torres-Mendieta R, Beltrán-Mir H, Mínguez-Vega G, Oliveira R, et al. Towards the scale-up of the formation of nanoparticles on α -Ag₂WO₄ with bactericidal properties by femtosecond laser irradiation. *Sci Rep*. 2018;8:1884.
28. Assis M, Robeldo T, Foggi CC, Kubo AM, Mínguez-Vega G, Condoncillo E, et al. Ag Nanoparticles/ α -Ag₂WO₄ Composite Formed by Electron Beam and Femtosecond Irradiation as Potent Antifungal and Antitumor Agents. *Sci Rep*. 2019;9:9927.
29. Assis M, Pontes Ribeiro RA, Carvalho MH, Teixeira MM, Gobato YG, Prando GA, et al. Unconventional Magnetization Generated from Electron Beam and Femtosecond Irradiation on α -Ag₂WO₄: A Quantum Chemical Investigation. *ACS Omega*. 2020;5:10052–67.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition. *CLSI document M27-A3*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
31. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. *CLSI document M38-A2*. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

32. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42:1207–12.
33. Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes.* 2017;10:428.
34. Pereira PFS, Santos CC, Gouveia AF, Ferrer MM, Pinatti IM, Botelho G, et al. α -Ag_{2-2x}Zn_xWO₄ (0 ≤ x ≤ 0.25) Solid Solutions: Structure, Morphology, and Optical Properties. *Inorg Chem.* 2017;56:7360–72.
35. Laier LO, Assis M, Foggi CC, Gouveia AF, Vergani CE, Santana LCL, et al. Surface-dependent properties of α -Ag₂WO₄: a joint experimental and theoretical investigation. *Theor Chem Acc.* 2020;139:108.
36. Assis M, Ponce MA, Gouveia AF, Souza D, da Costa JP de C, Teodoro V, et al. Revealing the Nature of Defects in α -Ag₂WO₄ by Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy: A Joint Experimental and Theoretical Study. *Crystal Growth & Design.* 2021;21:1093–102.
37. Thangavel S, Thangavel S, Raghavan N, Alagu R, Venugopal G. Efficient visible-light photocatalytic and enhanced photocorrosion inhibition of Ag₂WO₄ decorated MoS₂ nanosheets. *Journal of Physics and Chemistry of Solids.* 2017;110:266–73.
38. Ju P, Wang Z, Zhang Y, Zhai X, Jiang F, Sun C, et al. Enhanced oxidase-like activity of Ag@Ag₂WO₄ nanorods for colorimetric detection of Hg²⁺. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2020;603:125203.

39. Seyoum E, Bitew A, Mihret A. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal susceptibility profile in Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2020;20:231.
40. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015;58:2–13.
41. Jamiu AT, Albertyn J, Sebolai OM, Pohl CH. Update on *Candida krusei* , a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology.* 2021;59:14–30.
42. Aldardeer NF, Albar H, Al-Attas M, Eldali A, Qutub M, Hassanien A, et al. Antifungal resistance in patients with Candidaemia: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2020;20:55.
43. Albuquerque P, Nicola AM, Nieves E, Paes HC, Williamson PR, Silva-Pereira I, et al. Quorum Sensing-Mediated, Cell Density-Dependent Regulation of Growth and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio.* 2014;5.
44. Azambuja CV de A, Pimmel LA, Klafke GB, Xavier MO. Onychomycosis: clinical, mycological and in vitro susceptibility testing of isolates of *Trichophyton rubrum*. *An Bras Dermatol.* 2014;89:581–6.
45. Coelho JLG, Saraiva EMS, Mendes R de C, Santana WJ de. dermatófito: resistência a antifúngicos / dermatophyt: resistance to antifungals. *BJD.* 2020;6:74675–86.
46. Ebert A, Monod M, Salamin K, Burmester A, Uhrlaß S, Wiegand C, et al. Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. *Mycoses.* 2020;63:717–28.
47. Sheehan G, Kavanagh K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence.* 2018;9:163–72.

48. Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence*. 2013;4:350–3.
49. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2002;34:153–7.
50. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics*. 2020;9:312.
51. Longo VM, De Foggi CC, Ferrer MM, Gouveia AF, André RS, Avansi W, et al. Potentiated Electron Transference in α -Ag₂WO₄ Microcrystals with Ag Nanofilaments as Microbial Agent. *J Phys Chem A* 2014;118:5769–78.

7. CONCLUSÃO

O α -Ag₂WO₄ é de fácil obtenção e apresentou uma boa atividade antifúngica, tanto para fungos dermatófitos, quanto para leveduras. Considerando também o efeito não tóxico *in vivo* observado em ensaios com *Galleria mellonella*, torna-se uma opção para futuros ensaios clínicos no tratamento das dermatofitoses e dermatomicoses.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA FILHO, Marcos Adelino et al. Epidemiologia das micoses subcutâneas em um serviço público de referência dermatológica em fortaleza, Ceará, Brasil. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 15, n. 1, p. 7-17, 2020.

ALTAF, Anas et al. Occurrence of dermatophytes and other fungal agents from clinically suspected cases of superficial mycoses. *IP International Journal of Medical Microbiology and Tropical Diseases*, v. 6, n. 2, p. 92-95, 2020.

AMEEN, Mahreen. Epidemiology of superficial fungal infections. ***Clinics in dermatology***, v. 28, n. 2, p. 197-201, 2010.

ANDRÉS, J. et al. Structural and electronic analysis of the atomic scale nucleation of Ag on α -Ag₂WO₄ induced by electron irradiation. ***Scientific Reports***, v. 4, p. 1–7, 2014.

AQUINO, Valério Rodrigues; CONSTANTE, Caroline Collioni; BAKOS, Lucio. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 82, n. 3, p. 239-244, 2007.

BALAU, Ana Rafaela Mendes. Infecções fúngicas de origem tropical. 2019. Tese de Doutorado.

BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L.; RAPINI, R. P. *Dermatologia-Bologna*. Rio de Janeiro: Elsevier. 3 ed. 2015.

CAMPOS, Tábata et al. Avaliação do comportamento de leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. *Ciência & Inovação*, v. 5, n. 1, 2020.

CARVALHO, Sandrina et al. Tinha do couro cabeludo: importância do tratamento atempado para prevenção da alopecia cicatricial. ***Nascer e Crescer***, v. 25, n. 3, p. 169-172, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition. **CLSI document M27-A3** . Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. **CLSI document M38-A2**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COELHO, José Leonardo Gomes et al. Dermatofito: resistência a antifúngicos. ***Brazilian Journal of Development***, v. 6, n. 10, p. 74675-74686, 2020.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 682-700, 2011.

DA SILVA, Carolinne Serafim. Etiologia e epidemiologia da tinea capitis: relato de série de casos e revisão da literatura. **RBAC**, v. 51, n. 1, p. 9-16, 2019.

DA SILVA, L. F. et al. A novel ozone gas sensor based on one-dimensional (1D) α -Ag₂WO₄ nanostructures. **Nanoscale**, v. 6, n. 8, p. 4058–4062, 2014.

DALLA LANA, Daiane Flores. Desenvolvimento de novas entidades químicas e formulações para o tratamento de dermatomicoses. 2019.

DE AGUIAR PERES, N. T. et al. Dermatófitos: Interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.

DE BERKER, D. Nail anatomy. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 509–515, 2013.

DIAS, Maria Fernanda Reis Gavazzoni et al. Atualização terapêutica das micoses superficiais: artigo de revisão parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 6, p. 937-944, 2013.

DIDEHDAR, M. et al. Characterization of clinically important dermatophytes in North of Iran using PCR-RFLP on ITS region. **Journal de mycologie medicale**, v. 26, n. 4, p. 345-350, 2016.

ELY, J. W.; ROSENFELD, S.; STONE, M. S. Diagnosis and management of tinea infections. **American family physician**, v. 90, n. 10, p. 702-710, 2014.

FAJARDO, Aline Didoni et al. Estudo epidemiológico das infecções fúngicas superficiais em Itajaí, Santa Catarina. **RBAC**, v. 49, n. 4, p. 396-400, 2017.

FEUILHADE DE CHAUVIN, M. New diagnostic techniques. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, p. 20-24, 2005.

FOGGI, C. C. et al. Synthesis and evaluation of A-Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. **Chemical Physics Letters**, v. 674, p. 125–129, 2017.

GUPTA, A K.; PAQUET, M. Management of onychomycosis in Canada in 2014. **Journal of cutaneous medicine and surgery**, v. 19, n. 3, p. 260-273, 2015.

HAYETTE, Marie-Pierre; SACHELI, Rosalie. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 3, p. 164-179, 2015.

INAOKI, M. et al. Case of dermatophyte abscess caused by *Trichophyton rubrum*: A case report and review of the literature. **Mycoses**, v. 58, n. 5, p. 318–323, 2015.

INDIRA, Gadangi et al. Clinicoetiologic investigations on superficial mycoses of Warangal (AP) India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 4, p. S311-S319, 2014.

KHOSRAVI, A. R. et al. Yeasts as important agents of onychomycosis: in vitro activity of propolis against yeasts isolated from patients with nail infection. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 19, n. 1, p. 57-62, 2013.

LONGO, E. et al. Direct in situ observation of the electron-driven synthesis of Ag filaments on α -Ag₂WO₄ crystals. **Scientific Reports**, v. 3, p. 4–7, 2013.

LONGO, E. et al. In situ Transmission Electron Microscopy observation of Ag nanocrystal evolution by surfactant free electron-driven synthesis. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–8, 2016.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. et al. Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases. **Medical mycology**, v. 48, n. 3, p. 476-479, 2010.

LOW, C.-Y.; ROTSTEIN, C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. **F1000 Medicine Reports**, v. 3, n. July, p. 1–8, 2011.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, 2017.

MOUBASHER, A. H.; ABDEL-SATER, M. A.; SOLIMAN, Z. Incidence and biodiversity of yeasts, dermatophytes and non-dermatophytes in superficial skin infections in Assiut, Egypt. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, 2017.

NENOFF, Pietro et al. Mycology—an update. Part 1: Dermatomyces: causative agents, epidemiology and pathogenesis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 12, n. 3, p. 188-210, 2014.

NOBRE, Francisco Xavier et al. Síntese, caracterização e atividade fotocatalítica de tungstos de prata obtidos via síntese hidrotérmica assistido por sonificação química (Tese) Universidade Federal do Amazonas, Manaus; 2016.

OLIVEIRA, Ertenia Paiva. Ocorrência de micoses superficiais em um centro de saúde. *RBAC*, v. 49, n. 3, p. 289-93, 2017.

PEREIRA, S. Efeito dos íons Ni²⁺ nas propriedades estruturais, ópticas e morfológicas do tungstato de prata (Dissertação) Universidade Federal de São Carlos; 2015.

PERRIN, A. et al. Silver Molybdate and Silver Tungstate Nanocomposites with Enhanced Photoluminescence. **Nanomaterials and Nanotechnology**, v. 4, p. 22, 2014.

PIRACCINI, Bianca Maria; ALESSANDRINI, Aurora. Onychomycosis: a review. **Journal of Fungi**, v. 1, n. 1, p. 30-43, 2015.

REISBERGER, E.M. et al. Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid–Schiff-stained nail clippings. **British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 4, p. 749-754, 2003.

RICARDO CRIADO, P. et al. Superficial mycosis and the immune response elements. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 726–731, 2011.

RODRIGUES, Douglas A. et al. **Atlas de dermatologia em povos indígenas**. SciELO-Editora Fap-Unifesp, 2010.

SILVA, André et al. Estudo estrutural, morfológico, elétrico e óptico de cristais de α -Ag₂WO₄ dopados com Mo⁶⁺ via co-precipitação assistida por PVP. **Jornal de Física**. v. 64, n. 1, p. 18201, 2015.

SILVA, L. K. R. et al. Síntese e caracterização estrutural, morfológica e óptica nanocristais de α - Ag₂WO₄. **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, p. 1403 -1414. 2018.

SILVA, R. M. et al. Morphological evolution and visible light-induced degradation of Rhodamine 6G by nanocrystalline bismuth tungstate prepared using a template-based approach. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 96–97, p. 83–91, 2016.

SILVA, Shellygton Lima et al. Perfil de sensibilidade antifúngica de isolados clínicos obtidos de onicomicose aos antifúngicos convencionais. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e561985775-e561985775, 2020.

SOMENZI, Carlos César; RIBEIRO, Tatyana Sampaio; MENEZES, A. Características particulares da micologia clínica e o diagnóstico laboratorial de micoses superficiais. **NewsLab**, v. 77, p. 106-18, 2006.

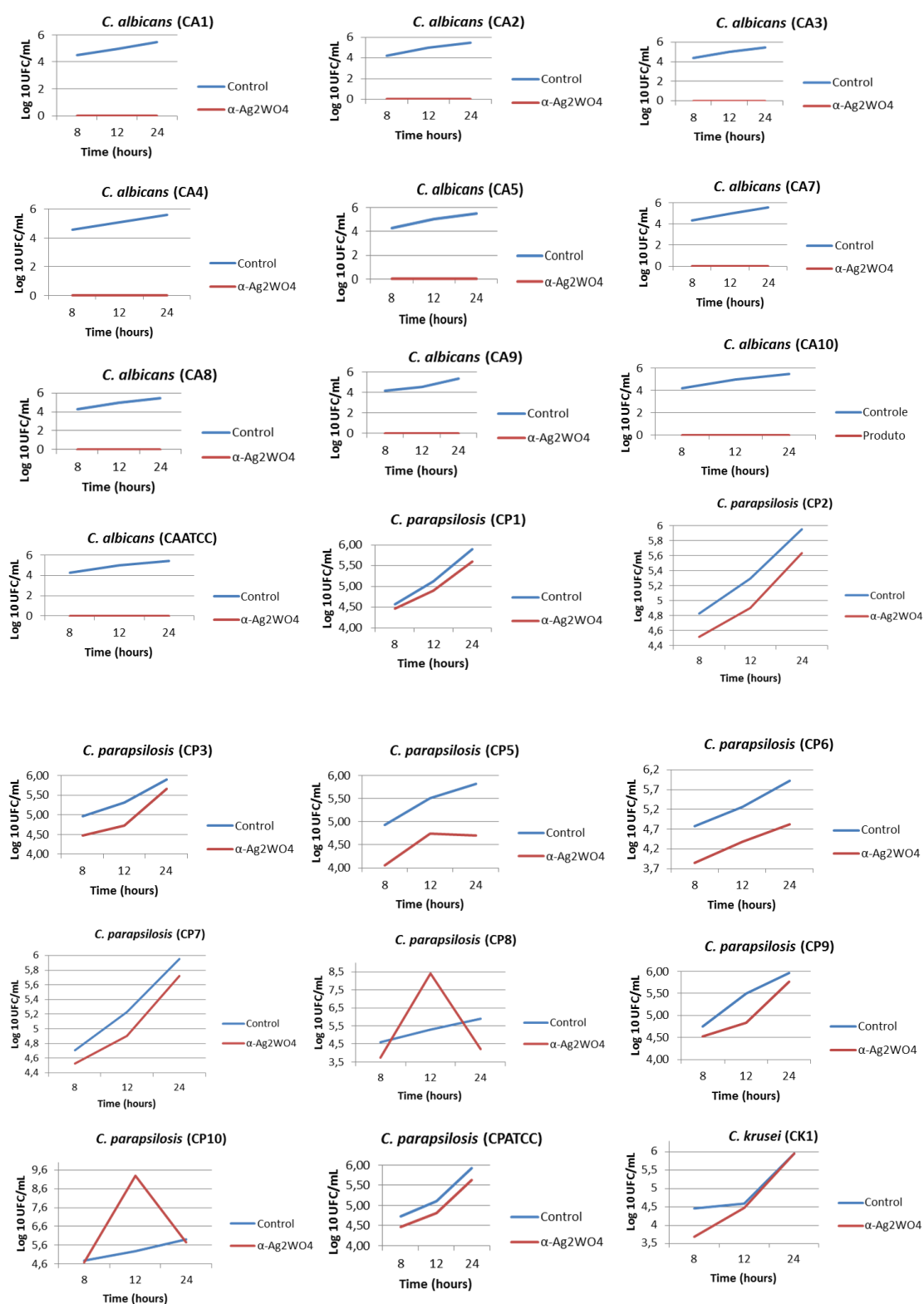
SONG, Q. W. et al. Efficient chemical fixation of CO₂ promoted by a bifunctional Ag₂WO₄/Ph₃P system. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1633–1638, 2014.

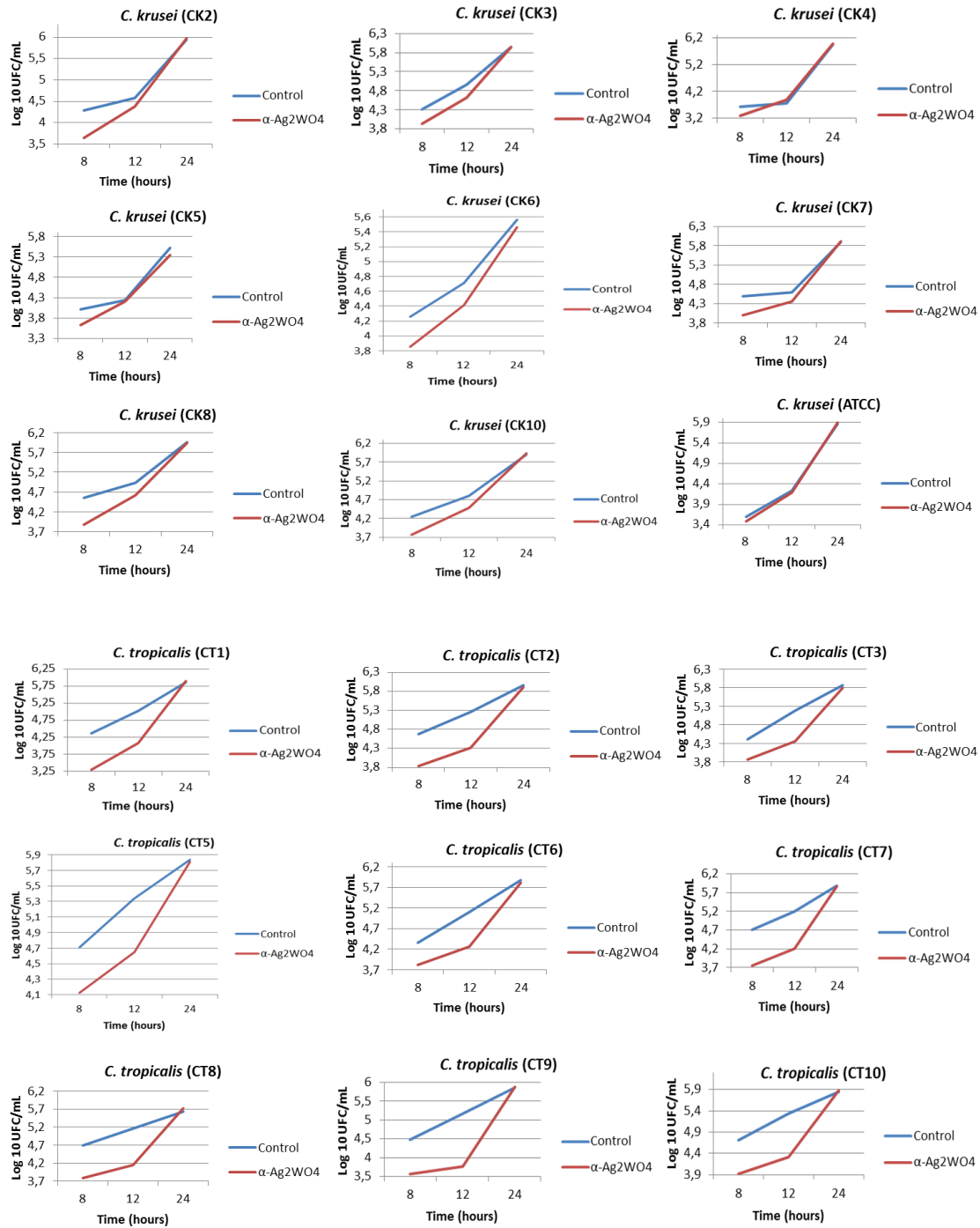
SURYAWANSHI, R. S. et al. Onychomycosis: dermatophytes to yeasts: an experience in and around Mumbai, Maharashtra, India. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 5, n. 5, p. 1959, abr. 2017.

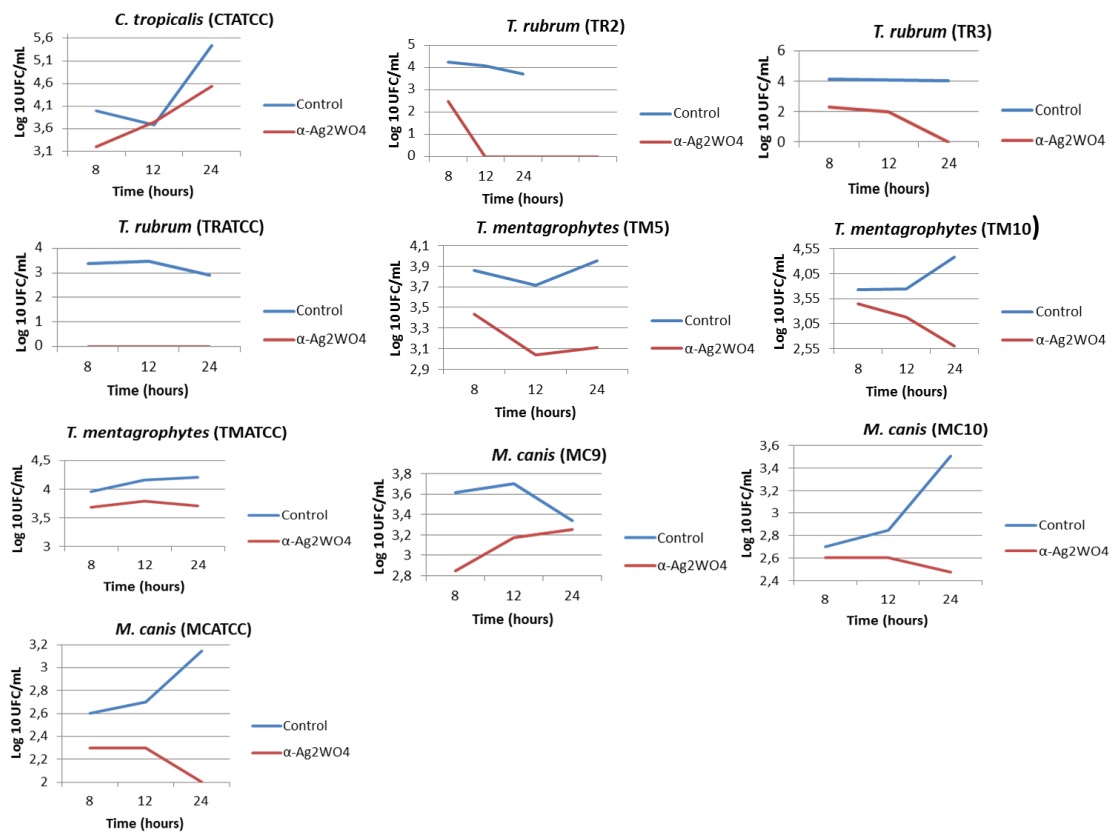
WU, F.; FENG, J.; SANG, H. Pseudo-clubbing complicated by dermatophyte onychomycosis. **Annals of Dermatology**, v. 26, n. 2, p. 271–273, 2014.

ZHAN, Ping; LIU, Weida. The changing face of dermatophytic infections worldwide. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 77-86, 2017.

Anexo A. Representação gráfica da curva de crescimento das cepas em contato com o α -Ag₂WO₄.







TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 08/10/2021



Assinatura do autor