



**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA**

**RACHEL TRINCHÃO SCHNEIBERG KALID RIBEIRO**

**EFEITO ANTIFÚNGICO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) 410nm ±  
10nm EM LEVEDURAS DA ESPÉCIE *Malassezia restricta*: ESTUDO  
EXPERIMENTAL**

**TESE DE DOUTORADO**

**Salvador-Bahia**  
**2023**

**RACHEL TRINCHÃO SCHNEIBERG KALID RIBEIRO**

**EFEITO ANTIFÚNGICO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) 410nm ±  
10nm EM LEVEDURAS DA ESPÉCIE *Malassezia restricta*: ESTUDO  
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Fernanda Grassi

**Coorientadora:** Profa Dra. Cristiane Maria Carvalho Costa Dias

**Salvador-Bahia**

**2023**

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

R484 Ribeiro, Rachel Trinchão Schneiberg Kalid

Efeito antifúngico de diodos emissores de luz (LEDs) 410nm  $\pm$  10nm em leveduras da espécie *Malassezia restricta*: estudo experimental. /Rachel Trinchão Schneiberg Kalid Ribeiro. – 2023.

66f.: 30cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Maria Fernanda Grassi

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Cristiane Maria Carvalho Costa Dias

Doutora em Medicina e Saúde Humana

Inclui bibliografia

1. Fototerapia. 2. Agentes antifúngicos. 3. Malassezia. I.Grassi, Cristiane Maria Carvalho Costa Dias. II. Efeito antifúngico de diodos emissores de luz (LEDs) 410nm  $\pm$  10nm em leveduras da espécie *Malassezia restricta*: estudo experimental

CDU: 615

**RACHEL TRINCHÃO SCHNEIBERG KALID RIBEIRO**

**“EFEITO ANTIFÚNGICO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS) 410NM ± 10NM EM LEVEDURAS DA ESPÉCIE MALASSEZIA RESTRICTA: ESTUDO EXPERIMENTAL”**

Tese apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 26 de abril de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Maria Cristina Reis Amendoeira  
Doutora em Psiquiatria e Saúde Mental  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ

---

Dra. Livia Assis Garcia  
Doutora em Fisioterapia  
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR

---

Dr. Gustavo Miranda Pires Santos  
Doutor em Biotecnologia  
Universidade Federal da Bahia, UFBA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Luana Leandro Gois  
Doutora em Biotecnologia  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

---

Prof. Dr. Raimundo Coutinho Junior  
Doutor em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carina Oliveira dos Santos  
Doutora em Modelagem Computacional e Tecnologia Industrial  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Este documento foi assinado digitalmente por Raimundo Coutinho Junior, Carina Oliveira dos Santos, Gustavo Miranda Pires Santos, Livia Assis Garcia e Luana Leandro Gois. Para verificar as assinaturas vá ao site <https://bahianaeducacao.portaldeassinaturas.com.br> e utilize o código 7B8F-22B6-2A7F-DA43.

## AGRADECIMENTOS

Mistura de emoção e plenitude se misturam nesse momento. Como é bom poder agradecer àqueles que se fizeram presentes, cada um de uma forma, e possibilitaram a conclusão deste trabalho. Trabalho este, feito a muitas mãos!

SENHOR, como agradecei pelas oportunidades e como clamei por Ti nos momentos difíceis. Aprendi novas formas de ir ao Seu encontro e consegui sentir, como nunca, Sua presença.

Chegar até aqui não seria possível sem a presença e apoio constante da minha querida orientadora Dra Fernanda Grassi. A doçura da sua voz, em todas as etapas deste trabalho, me fez ter forças para concluir. A sua facilidade em conduzir e a sabedoria das suas escolhas tornaram esse percurso mais leve e muito prazeroso. Obrigada por toda segurança e por toda independência para alçar vôos seguros. Pró, muito obrigada do fundo do meu coração! Sou sua fã! Agradeço à Dr. Bernardo Galvão por ter proporcionado esse encontro e à toda equipe do grupo de pesquisa em Doenças Infecciosas emergentes e negligenciadas da EBMSP.

Quantos finais de semana, quantos dias e noites eu me dispersei de vocês, Guga, meu companheiro de vida, meus filhos amados Ju e Guguinha. Só muito amor para compreenderem, aceitarem e apoiarem esse desafio. Sem o apoio familiar, eu não conseguiria. Obrigada à meus pais Lia e Elias, meu irmão Beto, minha sogra Frances pelo sentimento de orgulho emanado e por todo apoio. Vencemos juntos! Amo vocês!

Essa jornada me deu uma amiga, Éliissa! Juntas descobrimos um novo universo chamado Laboratório e fizemos dele uma segunda casa! Risos de alegria e de desespero fortaleceram uma amizade que é para sempre! Sua força e garra impulsionaram ainda mais essa conquista!

Um agradecimento carinhoso à minha co-orientadora e amiga Dra Cristiane Dias, meu anjo desde o mestrado, que não soltou a minha mão em nenhum momento e me fez ter forças para encarar o desafio do doutorado. Te amo, pró!

Obrigada às minhas amigas Carina Oliveira e Giovana Bergheme, fisioterapeutas admiráveis, que com suas ideias e apoio incondicional ajudaram a desenvolver esse trabalho. Vocês me deram a força necessária para acreditar. Obrigada por serem tão especiais na minha vida!

Preciso agradecer imensamente à DMC Equipamentos, representada pelas Dras. Luciana Almeida-Lopes e Marília Mancini. Obrigada por acreditarem na proposta, pelo acolhimento e disponibilidade. Vocês tornaram esse trabalho possível!

Dra Tânia Barros e toda equipe do laboratório de microbiologia da UFBA, dentre eles Felipe, Nonato e Mira. Como agradecer tanto conhecimento transmitido? Vocês, literalmente, pegaram na minha mão e me ensinaram tudo! Me deram espaço, materiais e muito carinho!

Muito obrigada a Dra Mônica Mattos e equipe da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, que com toda paciência me receberam inúmeras vezes, sempre com um grande sorriso e vontade de ajudar. Obrigada aos cachorrinhos que permitiram as coletas dos fungos. Obrigada à Cacai, Carol Trinchão, minha prima, que possibilitou esse contato com a Clínica Veterinária da UFBA e me ajudou a encontrar as cepas da *Malassezia*.

Nessa rota de aprendizado e conhecimento, entraram as Dras Rita Elizabeth Mascarenhas e Jéssica Gomes. Como vocês foram importantes para o ajuste das ideias e para a execução de deste trabalho. Obrigada por tanta disponibilidade! Estendo meu agradecimento a toda equipe do NUPI da Bahiana, Dr. Amâncio, Dr. Adriano, Samuca, Jair e Ediel. Muito, muito obrigada!!!

Obrigada à Dra. Beatriz Trinchão, Tiz, minha prima, e ao Dr. Daniel Dantas por aceitarem o desafio e por contribuírem tanto com as análises das imagens do trabalho.

Obrigada aos profissionais da Fiocruz, Dra Jacqueline Silva, Dr. Diogo Moreira, Dr. Carlos Gustavo Régis e suas equipes, por toda gentileza em nos ajudar com as análises das amostras. Obrigada Rita e Jurema por toda simpatia e disposição para os pedidos e entrega de materiais.

Não existe trabalho sem estatística! Por isso, agradeço ao professor e amigo Claracson Plácido pela disponibilidade para o tratamento estatístico e pelo incentivo moral. Você ampliou meus conhecimentos e tornou fácil o que parecia ser difícil!

Agradeço imensamente às minhas orientandas Clara Silva, Júlia Maynard, Sarah Souza e Priscila Brito e ao meu orientando Gustavo Barreto por alavancarem o meu tema de estudo e entenderem as minhas limitações nesse período de tempo escasso.

Meu muito obrigada às minhas amigas de vida, Keurina, Vêu, Mai e Cleinha por toda vibração positiva, e ao meu Quarteto (Cris, Tai e Sá). Vocês proporcionaram momentos de leveza durante o processo. Vamos brindar!!

Por fim, um agradecimento especial à Bahiana, intuição que me deu essa oportunidade! Obrigada Luciana Bilitário, minha coordenadora e amiga, pelo apoio em todos os sentidos, à minha equipe da Clínica de Fisioterapia que bateu palmas a cada conquista e à todos os professores do curso de Fisioterapia, que acompanharam dia a dia a minha rotina no laboratório.

Ainda temos muito trabalho! Mas por hora, só agradecer e comemorar!

## RESUMO

A *Malassezia (M) restricta* está associada a doenças cutâneas como dermatite seborreica e pitiríase versicolor, geralmente recorrentes ou resistentes aos tratamentos convencionais em alguns pacientes. A terapia com diodos emissores de luz (LEDs) violeta pode fornecer uma alternativa terapêutica. **Objetivo:** Descrever o efeito antifúngico de LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm sobre *M. restricta in vitro*. **Material e métodos:** O procedimento consistiu na aplicação de LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm em suspensão fúngica de *M. restricta* nas fluências de 61,13 J/cm<sup>2</sup>, 91,70 J/cm<sup>2</sup> e 183,39 J/cm<sup>2</sup>. Em seguida, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol, suplementado com 1% de azeite, e cultivados por 72 horas. As unidades formadoras de colônias (UFCs) foram quantificadas por contagem visual e porcentagem de ocupação da placa de cultura por análise digital. A morfologia foi avaliada por microscopia óptica. O percentual de inibição dos LEDs foi calculado considerando o crescimento da condição de controle negativo. O teste ANOVA foi utilizado para comparar as porcentagens médias de inibição de crescimento e ocupação de placa entre as três fluências dos LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm e o controle negativo. **Resultados:** A exposição das leveduras à luz nas fluências 61,13 J/cm<sup>2</sup>, 91,70 J/cm<sup>2</sup> e 183,89 J/cm<sup>2</sup> inibiu em mais de 70% o crescimento de UFCs de *M. restricta*. Não houve diferença entre as fluências aplicadas. A análise da imagem digitalizada das placas de cultura revelou que a média da porcentagem de ocupação das UFCs nas placas foi menor após intervenção dos LEDs. A avaliação microscópica das leveduras em lâminas à fresco e por coloração Gram revelou colônias com formatos circular e ovoide, membranas celulares bem delimitadas, sem a presença de pseudomicélios. Não foi identificada diferença estrutural nas colônias que receberam intervenção dos LEDs quando comparadas ao controle negativo. **Conclusão:** LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm nas fluências 61.13 J/cm<sup>2</sup>, 91.70 J/cm<sup>2</sup> e 183.89 J/cm<sup>2</sup> apresentam efeito antifúngico sobre *M. restricta in vitro*.

**Palavras-chaves:** Fototerapia. Agentes antifúngicos. *Malassezia*.

## ABSTRACT

*Malassezia (M)* yeast is present on the skin of healthy and diseased humans. *M. restricta* is the second most prevalent species, found on the face and scalp, and is associated with skin diseases such as seborrheic dermatitis and pityriasis versicolor, which are usually recurrent or resistant to conventional treatments in some patients. Therapy with violet light-emitting diodes (LEDs) may provide a therapeutic alternative. **Objective:** To describe the antifungal effect of violet LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm on *M. restricta in vitro*. **Material and methods:** The procedure consisted of the application of LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm in fungal suspension of *M. restricta* at fluences of 61.13 J/cm<sup>2</sup>, 91.70 J/cm<sup>2</sup> and 183.39 J/cm<sup>2</sup>. The isolates were seeded in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar with chloramphenicol, supplemented with 1% olive oil, and cultivated for 72 hours. Colony forming units (CFUs) were quantified by visual counting and percentage of occupancy of the culture plate by digital analysis. Morphology was evaluated by light microscopy. The percentage of LEDs inhibition was calculated considering the growth of the negative control condition. The ANOVA test was used to compare the average percentages of growth inhibition and plate occupancy between the three LEDs fluences 410 nm  $\pm$  10 nm and the negative control. **Results:** Yeast exposure to light at fluences of 61.13 J/cm<sup>2</sup>, 91.70 J/cm<sup>2</sup> and 183.89 J/cm<sup>2</sup> inhibited the growth of *M. restricta* CFUs by more than 70%. There was no difference between the applied fluences. The analysis of the digitized image of the culture dishes revealed that the average percentage of occupation of *M. restricta* CFUs in the Petri dishes was lower after LEDs intervention. Microscopic evaluation of the yeasts on fresh slides and by Gram stain revealed colonies with circular and ovoid shapes, well-delimited cell membranes, without the presence of pseudomycelia. No structural difference was identified in colonies that received LEDs intervention when compared to the negative control. **Conclusion:** Violet LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm at fluences 61.13 J/cm<sup>2</sup>, 91.70 J/cm<sup>2</sup> and 183.89 J/cm<sup>2</sup> have an antifungal effect on *M. restricta in vitro*.

**Keywords:** Phototherapy. Antifungal agents. *Malassezia*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características morfológicas da <i>M. restricta</i>	19
Figura 2 – Banda de comprimento de onda da luz e sua relação com a profundidade de penetração no tecido	21
Figura 3 – Mecanismo de ação da luz azul	23
Figura 4 – Equipamento Cluster de LEDs violeta e-light V	26
Figura 5 – Aplicação de LEDs 410 nm $\pm$ 10 nm em suspensão de leveduras de <i>M. restricta</i>	29
Figura 6 – Microscopia óptica de suspensão de colônias de <i>M. restricta</i>	30
Figura 7 – Placa representativa da padronização da contagem das UFCs de <i>M. restricta</i>	31
Figura 8 – Padronização do registro fotográfico	32
Figura 9 – Demarcação manual do círculo correspondente à área da ocupação da placa de Petri por UFCs de <i>M. restricta</i>	33
Figura 10 – Características macroscópicas das UFCs de <i>M. restricta</i> em diferentes tempos de cultura (de 48 a 120 horas), com destaque para o aumento do diâmetro da UFC entre 48 horas e 72 horas	34
Figura 11 – Taxas de inibição de crescimento da <i>M. restricta</i> (número de UFCs) e taxa de ocupação das placas após aplicação cluster de LEDs 410 $\pm$ 10 nm	36
Figura 12 – Características macroscópicas das UFCs de <i>M. restricta</i> expostas aos LEDs violeta nas fluências 61,13 J/cm <sup>2</sup> , 91,70 J/cm <sup>2</sup> , 183,89 J/cm <sup>2</sup> . Placas referentes ao experimento 3	37
Figura 13 – Microscopia óptica 100x, aumento de 1000x, em lâminas à fresco (a) e Gram (b) de <i>M. restricta</i> após intervenção do cluster LEDs (lâmina representativa da fluência 61,13 J/cm <sup>2</sup> )	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de UFCs e taxa de ocupação de *M. restricta* após aplicação do equipamento cluster de LEDs 410nm  $\pm$ 10nm em diferentes fluências. 35

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Parâmetros de diferentes comprimentos de onda da luz LED, profundidade de ação e aplicações clínicas 22

Quadro 2 – Parâmetros utilizados com o cluster e-light V com tempos de exposição de 10, 15 e 30 minutos 27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LED(s)	<i>Light Emitting Diode(s)</i> (Diodo(s) Emissor(es) de Luz)
M.	<i>Malassezia</i>
nm	nanômetro(s)
J	Joule(s)
cm <sup>2</sup>	centímetro(s) quadrado(s)
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
UFC(s)	Unidade(s) Formadora(s) de Colônia(s)
spp	espécies
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HTLV	<i>Human T lymphotropic vírus</i> (Vírus Linfotrópico da Célula T Humana)
ERO(s)	Espécie(s) Reativa(s) de Oxigênio
UV	Ultravioleta
US\$	Dólar(es)
R\$	Real(ais)
DS	Dermatite Seborreica
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
Mrlip1	lipase 1 <i>M. restricta</i>
ZPT	<i>zinc pyrithione</i> (Piritionato de Zinco)
IV	Infra Vermelho
ATP	Adenosina Trifosfato
NADH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
mm	milímetro
TFD	Terapia Fotodinâmica

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
NO	Óxido Nítrico
TRPV1	Potencial do Receptor Transitório Vanilóide 1
CAMKII	Calmodulina Proteína Quinase-II
NUPI	Núcleo de Pesquisa e Inovação
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
mW	miliwatt
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cm	centímetro
F	Fluência
I	Intensidade
W	Watt
t	tempo
s	segundo(s)
P	Potência
A	Área
UFBA	Universidade Federal da Bahia
uL	microlitro
mL	mililitro
McF	McFarland
C-	Controle negativo
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
p	P valor
DP	Desvio Padrão
UFSE	Universidade Federal de Sergipe

$^1\text{O}_2$

Oxigênio singlete

DNA

*Desoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
3.1 Doenças fúngicas e micoses superficiais	18
3.2 Gênero <i>Malassezia</i>	19
3.3 Fototerapia	21
<b>4 JUSTIFICATIVA</b>	<b>26</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
5.1 Equipamento cluster de LEDs 410 nm ± 10 nm	27
5.2 Cálculo da fluência	28
5.3 Isolados de <i>Malassezia restricta</i>	29
5.5 Experimento de avaliação de LEDs	29
5.6 Avaliação morfológica	31
5.7 Contagem de Unidade Formadora de Colônia	32
5.8 Avaliação da taxa de ocupação das colônias de <i>M. restricta</i>	32
5.9 Análise dos dados	34
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO</b>	<b>43</b>
<b>9 CONCLUSÃO</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas afetam mais de um bilhão de pessoas a cada ano <sup>(1)</sup> e são a quarta principal causa de doenças humanas. As infecções fúngicas superficiais são aquelas que acometem as mucosas da boca, região genital, pele e couro cabeludo. Os patógenos mais frequentemente associados são as espécies de *Candida* spp., *Epidermophyton* spp., *Malassezia* spp., *Piedraia hortae*, *Trichosporon beiguelae*, *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. <sup>(2, 3)</sup>.

A levedura do gênero *Malassezia* (*M*) está entre as causas frequentes de infecções fúngicas superficiais <sup>(3)</sup>. Considerada o eucarioto dominante em todos os animais de sangue quente, encontra-se presente na pele de humanos saudáveis e doentes, fazendo um complexo papel comensal e patogênico <sup>(4)</sup>.

Dentre as 18 espécies reconhecidas de *Malassezia* <sup>(5)</sup>, a *M. restricta* é a segunda espécie mais prevalente no ser humano <sup>(6)</sup>, encontrada nas regiões de face e couro cabeludo <sup>(7)</sup>, e está associada a doenças cutâneas dermatite seborreica e pitíriase versicolor <sup>(8,9)</sup>. A dermatite seborreica prevalece em 2 a 5% da população geral, chegando a atingir de 20 a 83% indivíduos imunossuprimidos, portadores de HIV e HTLV <sup>(10-13)</sup>. Esta dermatose é capaz de acometer mais regiões e intensificar inflamação nos locais lesionados <sup>(9)</sup>.

Os antifúngicos azólicos são os medicamentos de primeira instância recomendados para diminuir a atividade da *Malassezia* <sup>(7,14)</sup>, porém a extensa durabilidade do tratamento, precariedade de alternativas definitivas para a prevenção e a necessidade de cuidados especiais a longo prazo para a pele geram questionamentos sobre a efetividade dos métodos propostos, interferindo no resultado <sup>(14)</sup>. A incapacidade de controlar as reincidências das dermatites, atreladas aos sintomas, é transformada em angústia e irritação. O estresse e a ansiedade são fatores que exacerbam o prurido e dificultam um melhor prognóstico da patologia <sup>(15,16)</sup>.

A terapia com diodos emissores de luz (LEDs) violeta/azul demonstrou ter efeitos antifúngicos *in vitro* em espécies de *Trichophyton*, *Aspergillus niger* <sup>(17)</sup>, *Malassezia* <sup>(18)</sup> e em *Candida albicans* <sup>(19, 20)</sup> e efeitos biológicos benéficos na inflamação *in vivo* na pele de pacientes com eczema <sup>(21)</sup> e em mucosa vaginal em mulheres com candidíase vaginal recorrente <sup>(22,23)</sup>. A principal hipótese para explicar o efeito antifúngico é que LEDs violeta/azul causam excitação da porfirina intracelular endógena presente no fungo. A absorção dos fótons resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que eventualmente levam à morte celular <sup>(17,18)</sup>. No



entanto, poucos estudos avaliam as espécies de *Malassezia*, existindo uma lacuna dos efeitos *in vitro* deste recurso na *M. restricta* e, além de uma grande variação nos desenhos de estudo e nos protocolos de aplicação do LED. Portanto, a avaliação de novos protocolos para a utilização do LED violeta/azul, pode oferecer uma nova alternativa terapêutica no cuidado de infecções fúngicas superficiais. A fototerapia com luz violeta/ azul sem ultravioleta (UV) está no espectro de luz entre 400 e 500 nm e apresenta uma penetração máxima inferior a 1 mm <sup>(24,25)</sup>, apresentando uma vantagem para o tratamento de lesões provocadas por fungos causadores de micoses superficiais <sup>(26)</sup>.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Descrever o efeito antifúngico de LEDs violeta  $410\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$  sobre *M. restricta in vitro*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Verificar a inibição do crescimento de UFCs de *M. restricta* após irradiação com LEDs violeta  $410\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ .

Descrever a morfologia das UFC de *M. restricta* após irradiação com LEDs violeta  $410\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ .

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Doenças fúngicas e micoses superficiais

As micoses são doenças causadas por fungos e atingem mais de 400 milhões de pessoas no mundo <sup>(27)</sup>. Em 2017, estimou-se um gasto superior a US\$ 7,2 bilhões com as doenças fúngicas, incluindo US\$ 4,5 bilhões em 75.055 hospitalizações e US\$ 2,6 bilhões em 8.993.230 consultas ambulatoriais <sup>(28)</sup>. No Brasil, estas doenças representam um problema econômico com um custo que pode superar R\$400 mil por paciente, sendo consideradas uma questão de saúde pública <sup>(29)</sup>. Os sintomas de doenças fúngicas são muitas vezes semelhantes aos de outras infecções, resultando em diagnóstico e tratamento tardios, o que pode levar não apenas a resultados ruins para os pacientes, mas também a despesas médicas desnecessárias <sup>(28)</sup>.

As infecções fúngicas que afetam a pele, cabelos e unhas são chamadas dermatomicoses e classificadas como infecções fúngicas superficiais <sup>(30)</sup>. Estima-se que 20% a 25% da população mundial é acometida por micoses superficiais <sup>(31)</sup>. Os fatores predisponentes incluem condições climáticas, migrações de pessoas, atividades esportivas, contato prolongado com a água, estilo de vida, estado imunológico, terapia medicamentosa, idade dos pacientes, além das condições de vida e o ambiente onde as pessoas estão inseridas <sup>(30,32)</sup>.

As alterações dermatológicas em áreas mais expostas, causam mudanças na aparência física decorrentes das manchas, descamações e pele ressecada, aumentando o desconforto ao exibir a parte afetada <sup>(33,34)</sup>. Sua presença pode afetar de forma significativa a autoestima, o emocional, psicológico, lazer e limitar as atividades de vida diária de indivíduos adultos <sup>(16,33,34)</sup>. Pacientes que participaram de estudos que relacionam as dermatites e qualidade de vida relataram sofrer de insônias e baixa da autoestima <sup>(34-38)</sup>. Em estudos, participantes descrevem que o prurido intenso prejudica a qualidade do sono, aumenta a irritabilidade e desejo de coçar o local lesado <sup>(16,37,39)</sup>. Além do mais, possuem associações com transtorno depressivo e de ansiedade <sup>(40)</sup>.

Os fungos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* são os principais agentes etiológicos da dermatomicose, porém fungos não dermatófitos também estão relacionados, são eles: *Fusarium* e *Aspergillus* (fungos filamentosos) e leveduras dos gêneros *Candida*, *Malassezia* e *Trichosporon* <sup>(41)</sup>. As principais doenças causadas são as dermatofitoses (micose, tinea capitis, tinea pedis), a candidíase superficial (cutânea, orofaríngea, vaginal) e doença causada por *Malassezia* spp., como a pitiríase versicolor e a dermatite seborreica (DS) <sup>(3)</sup>. A DS prevalece em 2 a 5% da população geral. Indivíduos com AIDS/HIV e HTLV são os mais afetados, com incidência de 20 a 83% <sup>(42)</sup>. É a forma capaz de acometer mais regiões e

intensificar inflamação nos locais lesionados <sup>(36,39,43,44)</sup>. As áreas mais afetadas são o couro cabeludo, face, tórax, axilas e genitais <sup>(36,43-46)</sup>.

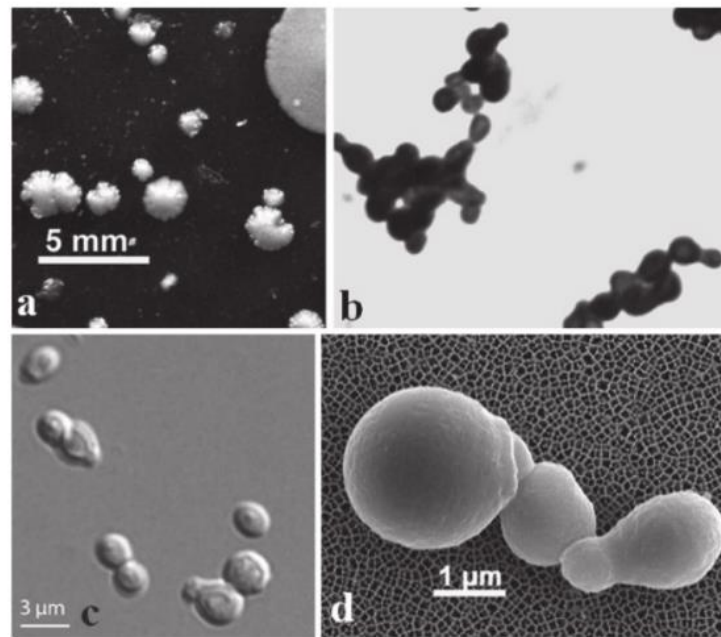
### 3.2 Gênero *Malassezia*

*Malassezia* spp. (anteriormente *Pityrosporum*) é um fungo lipofílico constituinte da flora normal da pele do ser humano, reconhecido há mais de um século <sup>(8,47)</sup>. Pertencente a classe *Malasseziomycetes*, habita a pele e mucosa de humanos e outros animais de sangue quente, e é um componente importante do microbioma cutâneo. Essa levedura age como comensal da pele, mas também está associada a distúrbios da pele e infecções da corrente sanguínea <sup>(48)</sup>.

Desde a designação do gênero *Malassezia* por Baillon em 1889, sua taxonomia, dimorfismos e repercussões têm sido relatados por alguns autores <sup>(5,8,14,47-49)</sup>. A depender das condições de cultivo, a *Malassezia* pode existir tanto na fase leveduriforme quanto na micelial <sup>(8)</sup>. É importante ressaltar que várias espécies e/ou genótipos de *Malassezia* podem causar patologias únicas ou semelhantes e variar em sua suscetibilidade antifúngica <sup>(49)</sup>.

Atualmente, por meio de métodos sorológicos e genéticos, o gênero *Malassezia* é dividido em 18 espécies: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. japônica*, *M. brasiliensis*, *M. caprae*, *M. cuniculi*, *M. equina*, *M. nana*, *M. psittaci*, *M. yamatoensis*, *M. arunalokei*, *M. dermatis*, *M. vespertilionis* <sup>(5,14)</sup>. A *Malassezia* spp. produz lipases extracelulares a fim de degradar os triglicerídeos do sebo humano e facilitar sua penetração do tecido. Por sua vez, os produtos resultantes, como os ácidos graxos saturados, causam irritação na pele dos indivíduos com caspa e dermatite seborreica <sup>(50)</sup>.

A *Malassezia restricta* é uma das mais predominantes leveduras da pele humana saudável e revelou ser a espécie mais abundante no couro cabeludo, pescoço, rosto e orelhas de voluntários saudáveis <sup>(7, 51)</sup>. Possui uma organização polissacarídica diferente de outras espécies de fungos, pois os polissacarídeos presentes na sua parede celular, insolúveis em álcalis, desempenham um papel essencial na organização e rigidez desta célula <sup>(51)</sup>. A lipase *Malassezia restricta* (Mrlip1) está envolvida principalmente na progressão da caspa <sup>(50)</sup>. A Figura 1 apresenta características morfológicas da *M. restricta*.



**Figura 1** — Características morfológicas da *M. restricta*. (a) Colônias muito restritas (se comparadas com *M. sympodialis* (canto superior direito)), que são um pouco elevadas e possuem margem lobada; (b– d) Gram, micrografias de Nomarski e microscopia eletrônica de varredura mostrando leveduras ovoides e globosas com um local de brotamento relativamente estreito.

Fonte: Guého E, Boekhout T, Begerow D, 2010 <sup>(52)</sup>

Dentre os múltiplos medicamentos com atividade antifúngica contra *Malassezia*, o cetoconazol tem sido usado para o tratamento de doenças de pele associadas a *M. restricta*. Este composto imidazólico, apresenta atividade fungistática contra a dermatite seborreica e a caspa <sup>(53-55)</sup>. O piritionato de zinco (ZPT), alcatrão de carvão, sulfeto de selênio e inibidores gerais de lipase também são considerados agentes antifúngicos para os tratamentos de dermatite e dermatite seborreica. O ZPT mostrou-se eficaz na inibição do crescimento de *M. restricta*, principalmente nos tratamentos anticaspa <sup>(7)</sup>.

A extensa durabilidade do tratamento, precariedade de alternativas definitivas para prevenção e a necessidade de cuidados especiais a longo prazo para a pele geram questionamentos sobre a efetividade dos métodos propostos, interferindo no resultado <sup>(16,33,40)</sup>. A incapacidade de controlar as reincidências das dermatites atrelada aos sintomas, é transformada em angústia e irritação. O estresse e a ansiedade são fatores que exacerbam o prurido e dificultam um melhor prognóstico <sup>(16,34,37,56)</sup>.

### 3.3 Fototerapia

A fototerapia é a aplicação clínica da luz como tratamento de uma doença específica <sup>(24,57)</sup>. Seu efeito depende do comprimento de onda, da frequência e do mecanismo de ação da luz, assim como do tempo de irradiação e da dose. O espectro de radiação inclui radiação infravermelha (IV, 760–1000 nm), luz visível (400–760 nm) e radiação ultravioleta (UV, 280–400 nm) <sup>(58)</sup>.

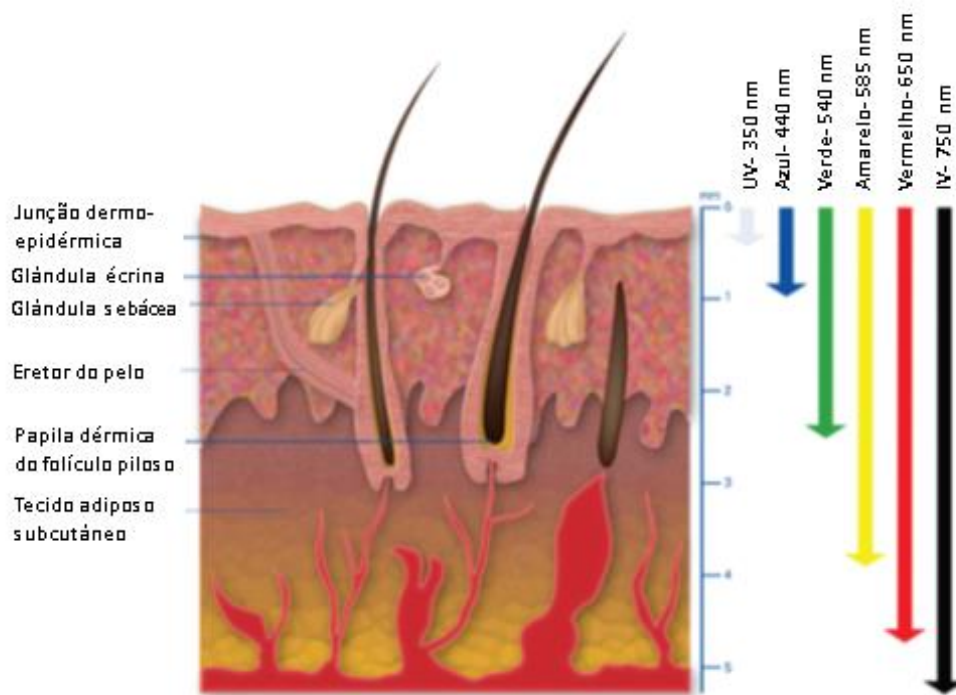
A fototerapia com radiação ultravioleta (UV) é utilizada há décadas no tratamento de doenças de pele, porém, por ser considerada um carcinógeno, seu uso não é recomendado por tempo prologado. A radiação sem UV, dentro do espectro de luz visível, vem sendo cada vez mais estudada e se torna uma alternativa segura e eficaz para o manejo de doenças crônicas da pele <sup>(59,60)</sup>. Os diferentes comprimentos de onda geram luz vermelha, laranja, amarela, verde, azul e violeta <sup>(24)</sup>.

A fototerapia, no espectro de luz visível, pode ser aplicada através de diodos emissores de luz (LEDs), considerados seguros por serem não ablativos e não térmicos. Quando usados sozinhos, sem adição de fotossensibilizadores tópicos, não causam danos à epiderme ou ao tecido dérmico. Até o momento, não existem relatos de complicações locais ou sistêmicas pelo uso do LED <sup>(60,61)</sup>.

Os LEDs são definidos como semicondutores complexos que convertem corrente elétrica em um espectro luminoso estreito não coerente <sup>(62)</sup>. A entrega de luz por dispositivos LED é contínua ou fotomodulada, sendo esta fornecida em modo pulsado com sequências e durações de pulso específicas. Os LEDs parecem afetar o metabolismo celular, desencadeando reações fotobioquímicas intracelulares, como aumento de adenosina trifosfato (ATP), modulação de espécies reativas de oxigênio, indução de fatores de transcrição, alteração da síntese de colágeno, estimulação da angiogênese e aumento do fluxo sanguíneo <sup>(25)</sup>.

A penetração da luz no tecido depende, principalmente, do comprimento de onda da luz <sup>(25,63)</sup>, Figura 2. O comprimento de onda de uma fonte terapêutica garante a absorção dos fótons incidentes nos cromóforos alvo, e podem fazê-lo nas profundidades onde os cromóforos se encontram <sup>(63)</sup>. Os cromóforos são as moléculas que absorvem a luz. Na pele, existem os seguintes cromóforos: ácidos nucleicos endógenos, aminoácidos aromáticos, ácido urocânico, triptofano, tirosina, cofatores NADH, citocromos, riboflavinas, porfirinas, melanina e precursores de melanina, protoporfirina IX, bilirrubina, hemoglobina,  $\gamma$ -caroteno ou moléculas de água <sup>(24)</sup>. A hemoglobina e a melanina da epiderme são altamente absorventes da luz visível.

A banda de onda, na qual o comprimento de onda dos fótons incidentes está localizado, determina não apenas qual parte da célula é o alvo, mas também a ação primária da luz. O comprimento de onda é, portanto, uma das considerações mais importantes na fototerapia, pois sem absorção não há reação <sup>(63)</sup>.



**Figura 2** — Banda de comprimento de onda da luz e sua relação com a profundidade de penetração no tecido.

Fonte: Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T, 2017<sup>(63)</sup>.

Um resumo dos parâmetros de diferentes comprimentos de onda da luz LED, profundidade de ação, juntamente com suas aplicações clínicas, é apresentado no Quadro 1.

**Quadro 1** — Parâmetros de diferentes comprimentos de onda da luz LED, profundidade de ação e aplicações clínicas.

	<b>AZUL</b>	<b>AMARELO</b>	<b>VERMELHO</b>	<b>IV</b>
<b>Comprimento De onda (nm)</b>	400-470	570-590	630-700	800-1200
<b>Profundidade de penetração da luz LED</b>	< 1mm	0,5-2mm	2-3mm	5-10mm
<b>Profundidade de ação</b>	Epiderme	Derme Papilar	Anexos da pele	Anexos da pele e Derme Reticular
<b>Utilização em estudos terapêuticos</b>	Acne Terapia combinada	Fotoenvelhecimento Complicações pós-tratamento de laser e luz intensa pulsada Cicatrização de feridas Dermatites por radiação	Complicações pós-cirúrgicas Complicações pós-tratamento de laser Terapia Fotodinâmica Queimaduras solares Mucosites	Acne Foto rejuvenescimento Complicações pós-procedimentos Clareamento

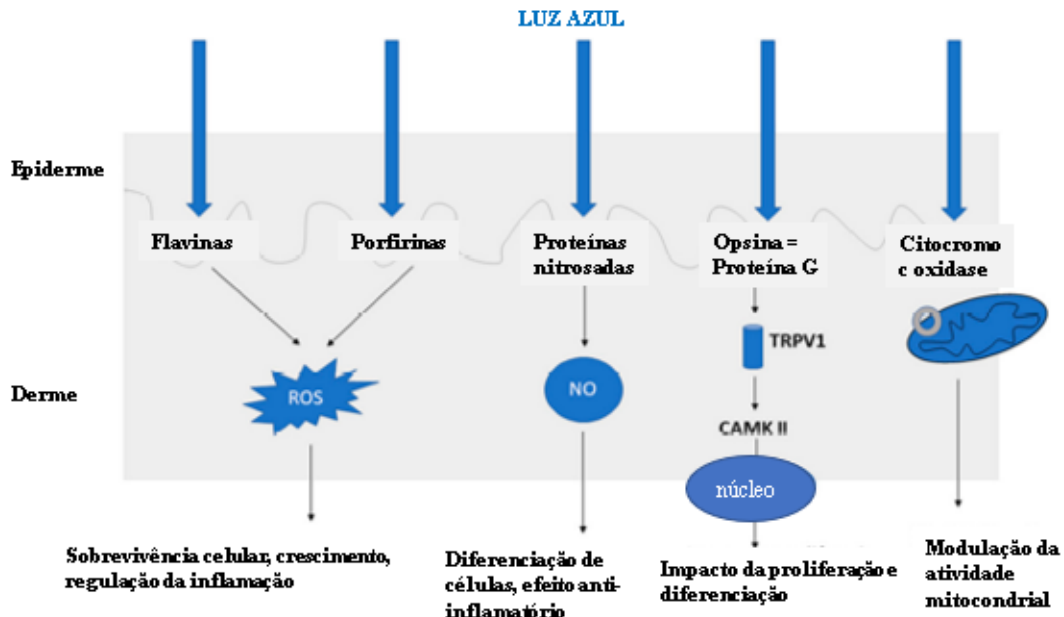
Fonte: Opel DR, Hagstron E, Pace AK et al 2015 <sup>(25)</sup>

### 3.4 Led violeta/azul

Nos últimos anos, o método de fototerapia com luz violeta/ azul sem UV (400-500 nm) vem atraindo atenção <sup>(24)</sup>, principalmente devido ao seu efeito antimicrobiano <sup>(23,64,65)</sup>. A penetração máxima desse comprimento de onda é de 0,07–1 mm <sup>(24,25)</sup>, concentrando sua ação na epiderme, camada onde se localizam os fungos causadores de micoses superficiais <sup>(26)</sup>.

A nível molecular, a luz violeta/azul é absorvida por porfirinas, flavinas, proteínas nitrosadas e opsinas; induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio, liberação de óxido nítrico e a ativação da sinalização acoplada à proteína G <sup>(24,57)</sup>, Figura 3. Acredita-se que a absorção de luz por essas moléculas induz um efeito de terapia fotodinâmica (TFD) natural, com a destruição das bactérias através da formação de radicais livres de oxigênio <sup>(25)</sup>.





**Figura 3** — Mecanismo de ação da luz azul.

\*ROS: *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio); NO: óxido nítrico; TRPV1: potencial do receptor transitório vanilóide 1; CAMKII: calmodulina proteína quinase-II.

Fonte: Sadowska M, NARBUTT J, Lesiak A, 2021 <sup>(24)</sup>.

As porfirinas estão presentes em enzimas a nível celular, como na hemoglobina, nas enzimas do citocromo p-450 e nos complexos da cadeia de transporte de elétrons. Já as flavinas estão presentes em proteínas, a exemplo dos criptocromos. A ativação de flavinas e proteínas flavo é considerada um mecanismo potencial da luz azul. O mononucleotídeo de flavina e o dinucleotídeo de flavina adenina, expostos à irradiação, aumentam em duas vezes a formação de EROs <sup>(24)</sup>.

LEDs 410nm são capazes de inibir a catalase, tetrâmetro presente em grande parte de fungos aeróbicos, responsável por degradar o peróxido de hidrogênio. A presença da catalase garante a sobrevivência dos fungos e invasão ao hospedeiro. No entanto, sua inativação por LEDs 410 nm torna as células fúngicas altamente suscetíveis ao ataque das espécies reativas de EROs <sup>(20)</sup>.

Independentemente do mecanismo, estudos clínicos *in vivo* mostram que a luz na banda de 400-500 nm é benéfica no tratamento de condições inflamatórias da pele <sup>(57)</sup>. O efeito anti-inflamatório parece ser o resultado de uma mudança na produção de citocinas <sup>(25)</sup>.

#### 4 JUSTIFICATIVA

A recorrência das micoses é muito comum e a incapacidade de controlá-las leva à ansiedade e irritação, o que agrava os sintomas e impede um melhor prognóstico da doença, principalmente em indivíduos imunossuprimidos. Nesse contexto, existe uma necessidade de alternativas terapêuticas de efeito mais rápido. A terapia com LEDs violeta/azul tem demonstrado efeito antifúngico *in vitro* e efeitos biológicos benéficos na inflamação da pele *in vivo*, como alívio do prurido e eritema. Além disso, a ação superficial do LED na epiderme, uma vez que a penetração da luz é inferior a 1mm, apresenta menor dano ao tecido.

Até o momento a utilização de LEDs violeta/azul é pouco reportada na literatura como alternativa de tratamento antifúngico para a *Malassezia*. Sendo a *M. restricta* uma das espécies mais predominantes na pele do ser humano, acreditamos que o estudo *in vitro* possa orientar diretrizes para o tratamento *in vivo* de micoses superficiais provocadas por essa espécie, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos portadores.

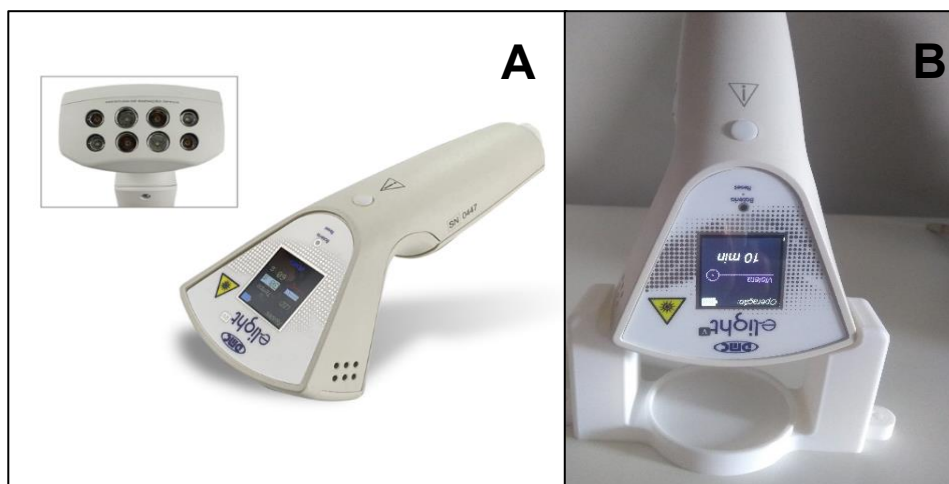
## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo experimental *in vitro* para avaliar o efeito antifúngico de Diodos Emissores de Luz (LEDs) violeta 410 nm  $\pm$  10 nm em leveduras de *Malassezia restricta*. O estudo foi realizado no laboratório de pesquisas do Núcleo de Pesquisa e Inovação (NUPI), localizado na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador-Bahia, de agosto de 2021 a agosto de 2022. A pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) (AED7762).

### 5.1 Equipamento cluster de LEDs 410 nm $\pm$ 10 nm

O equipamento utilizado foi o cluster **e-light V** da marca DMC EQUIPAMENTOS LTDA (São Carlos, Brasil), que possui um arranjo de 8 LEDs de cor violeta, com emissão de luz de 410 nm  $\pm$ 10 nm e potência de 480 mW por emissor. O equipamento está registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Registro 80030810174), Figura 4.

Um suporte modelo 3D RAISE3D-PRO2 (Irvine, CA, EUA), para as placas e para o equipamento cluster de LEDs, foi construído especialmente para o experimento com o propósito de manter fixa a distância de 3,15cm da superfície paralela do cluster à placa de cultura. Figura 4B.



**Figura 4** — **A:** Equipamento Cluster de LEDs violeta e-light V (DMC, São Carlos-SP, Brasil), **B:** Detalhe mostrando a montagem do equipamento sobre a base para irradiação. Fonte: a) <https://dmcabc.com.br/produto/e-light-8-emissores-led/>; b) autoria própria.

## 5.2 Cálculo da fluência

Para o cálculo da fluência foi utilizada a seguinte fórmula:

$$F \text{ (J/cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times t \text{ (s)}$$

**F** representa a fluência, medida em Joules por centímetro quadrado ( $J/cm^2$ ), **I** a irradiância, medida em Watts por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ) e **t** o tempo de exposição em segundos (s).

A potência do spot central do perfil de irradiação do cluster de LEDs na distância utilizada de 3,15 cm (2 W) foi medida usando um medidor de potência modelo PM200F-50 – Coherent, Santa Clara, EUA, com diâmetro do sensor de 5 cm.

O valor da irradiância ou densidade de potência ( $102 \text{ mW/cm}^2$ ) sobre a placa de Petri irradiada com a cultura foi calculado através da fórmula  $I = P/A$ , sendo P a potência média, medida na região da placa e A a área do sensor, equivalente a  $19,69 \text{ cm}^2$  (diâmetro de 5 cm).

Os parâmetros de dosimetria empregados no presente estudo foram baseados em ajustes após a realização de testes preliminares. Inicialmente, foram testados os valores de fluência de aproximadamente 2,5, 5,0, 10 e  $15 \text{ J/cm}^2$ , que se mostraram ineficazes na inibição/inativação do fungo. A partir de então, foram testadas as fluências  $61,13 \text{ J/cm}^2$ ,  $91,70 \text{ J/cm}^2$  e  $183,39 \text{ J/cm}^2$ , obtidas de acordo com o tempo de exposição, 10, 15 e 30 minutos (600, 900 e 1800 segundos), Quadro 2.

**Quadro 2** — Parâmetros utilizados com o cluster e-light V com tempos de exposição de 10, 15 e 30 minutos.

Distância (cluster LEDs à base do poço) (cm)	Potência do spot do cluster (W)	Irradiância ( $W/cm^2$ )	Tempo de exposição (s)	Fluência ( $J/cm^2$ )
3,15	2,0	0,102	600	61,13
			900	91,70
			1800	183,39

### 5.3 Isolados de *Malassezia restricta*

Os isolados de *M. restricta* (M001-2497) foram obtidos de pelo canino de uma fêmea de três anos de idade, semeados em meio de cultura ASD acrescido de 1% azeite. Os isolados foram gentilmente cedidos pela Dra. Mônica Mattos dos Santos, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

#### Cultura e expansão de isolados da *Malassezia restricta*

Inicialmente, em cabine de segurança biológica classe 2, as leveduras foram semeadas por esgotamento com ajuda de uma alça de microbiologia 10 uL em placas de Petri estéreis de 90x15mm contendo 20 mL de meio de cultura ASD com Cloranfenicol (NEOGEN, Lansing Michigan, Estados Unidos), acrescido de 1% de azeite de oliva extravirgem 0,50% de acidez (Gallo, Abrantes, Portugal). As placas foram em seguida incubadas em estufa Quimis® a  $33\pm 2^\circ\text{C}$  por 72 horas <sup>(54)</sup>.

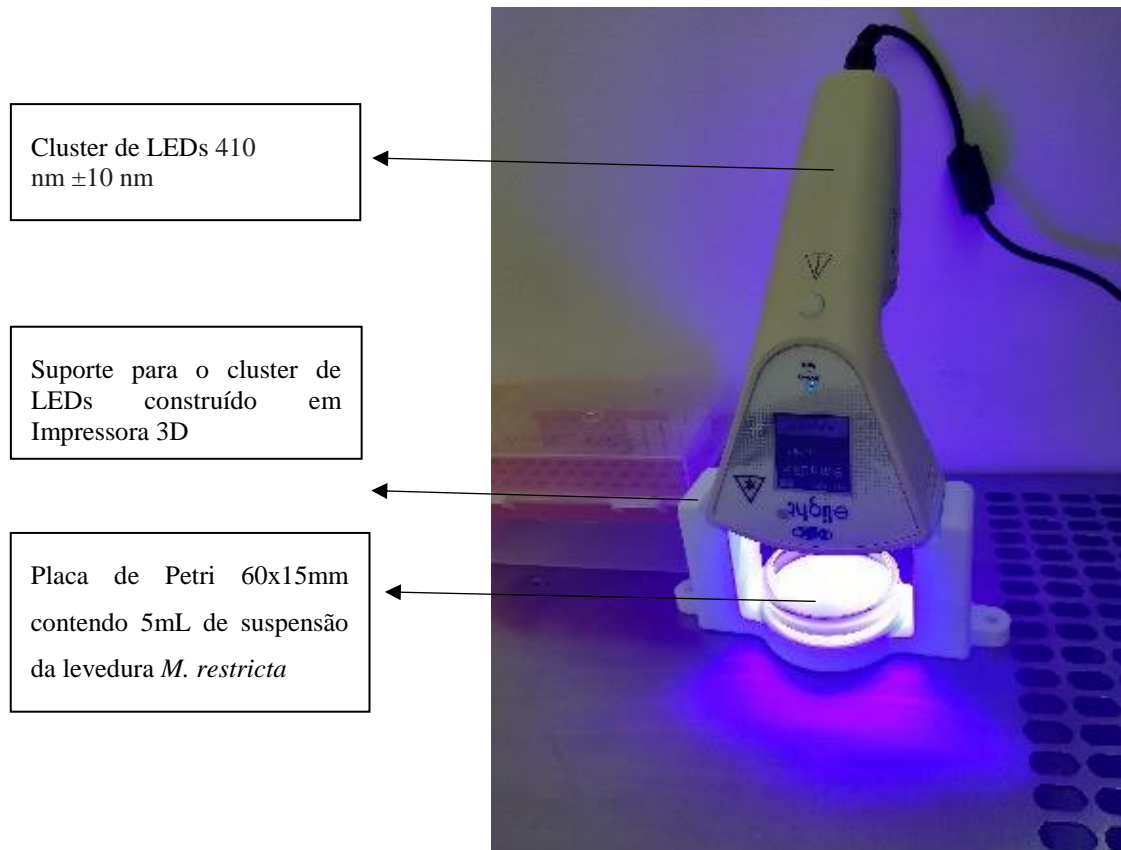
Para a preparação da suspensão de uso, colônias de *M. restricta* bem delimitadas, com formato ovoide, foram recuperadas das placas de Petri com alça de microbiologia 10uL e colocadas em um tubo de ensaio de vidro 8-mm contendo 4 mL de solução salina 0,85%. As colônias foram ressuspensas em vórtex por 30 segundos e realizada a leitura em turbidímetro DEN-1 (McFarland densitometer, BIOSAN). As suspensões foram ajustadas para a turvação de 0,5 McFarland (McF), equivalente a  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL, e sequencialmente diluídas até 1:100 ( $10^{-2}$ ) em triplicata. Brevemente, 1 mL da solução 0,5 McF foi transferida para tubos contendo 9 mL de solução salina 0,85%.

### 5.5 Experimento de avaliação de LEDs

A aplicação do cluster de LEDs foi realizada em cabine de segurança biológica. A fim de se obter uniformidade de absorção da luz, a dimensão da placa de Petri utilizada foi de 60 x 15 mm. (CRAL®, Cotia, Brasil) na qual foi distribuída 5 mL da suspensão de *M. restricta* ( $10^{-2}$ ).

As placas foram submetidas à intervenção do cluster de LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm nas fluências de 61,13 J/cm<sup>2</sup>, 91,70 J/cm<sup>2</sup> e 183,39 J/cm<sup>2</sup> por 10 (T1), 15 (T2) e 30 (T3) minutos, respectivamente, utilizando um suporte para o equipamento construído em impressora 3D,

Figura 5. Por orientação do fabricante, a cada 10 minutos de aplicação foi realizado um intervalo de 5 minutos para o resfriamento do aparelho.



**Figura 5** — Aplicação de LEDs 410 nm±10 nm em suspensão de leveduras de *M. restricta*.

Fonte: autoria própria.

O controle negativo (C-) consistiu em 5mL da suspensão da *M. restricta* em salina que não recebeu nenhum tipo de intervenção.

Após as intervenções (LEDs, C-) os recipientes contendo as suspensões de *M. restricta* foram vedados com parafilme e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, 50 µL da suspensão de cada condição foi semeada em triplicata, em placas de Petri 90 x 15mm contendo meio ASD com Cloranfenicol e 1% de azeite de oliva. As soluções foram espalhadas utilizando-se alça para esfregação formato L, descartável e estéril (CRAL®, Cotia, Brasil).

As placas foram incubadas em estufa a  $33 \pm 2^\circ\text{C}$  por 72 horas, e em seguida as UFCs foram avaliadas em relação a morfologia (microscopia óptica e Gram) e quantidade (contagem visual e análise digital). Os experimentos foram repetidos 3 vezes.

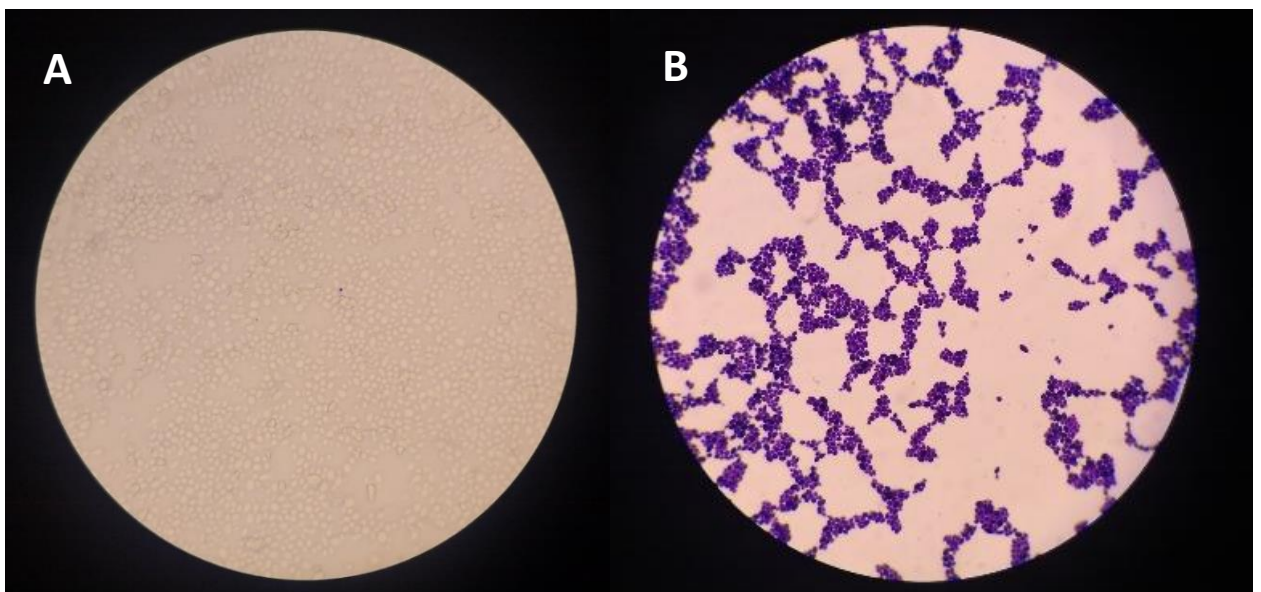
### 5.6 Avaliação morfológica

As placas foram visualizadas macroscopicamente quanto ao formato das UFCs (circular, oval ou fusiforme), coloração (branca, creme amarelada), brilho (brilhante, opaca), superfície (lisa ou rugosa), elevação (plana, convexa, umbonada) <sup>(66)</sup>. A homogeneidade do crescimento foi avaliada através da distribuição das colônias na superfície do meio.

Para avaliação microscópica das leveduras, uma UFC de *M. restricta*, localizada no quadrante delimitado da Placa 1 de cada condição, foi selecionada aleatoriamente para a confecção da lâmina à fresco e para a coloração de Gram.

As lâminas foram preparadas colocando a UFC selecionada em 10 uL de solução salina 0,85% sobre uma lâmina de vidro. Para as lâminas à fresco, a solução foi imediatamente recoberta com lamínula. Adicionalmente, as lâminas foram submetidas à coloração Gram, após secagem da suspensão, para excluir contaminação das placas por bactérias <sup>(67,68)</sup>.

As lâminas foram submetidas à leitura em microscópio (Olympus® CX22LED, Tokyo, Japão) com a objetiva de aumento de 100x, fotografadas e avaliadas quanto a morfologia celular, coloração e presença de pseudomicélio, Figura 6.

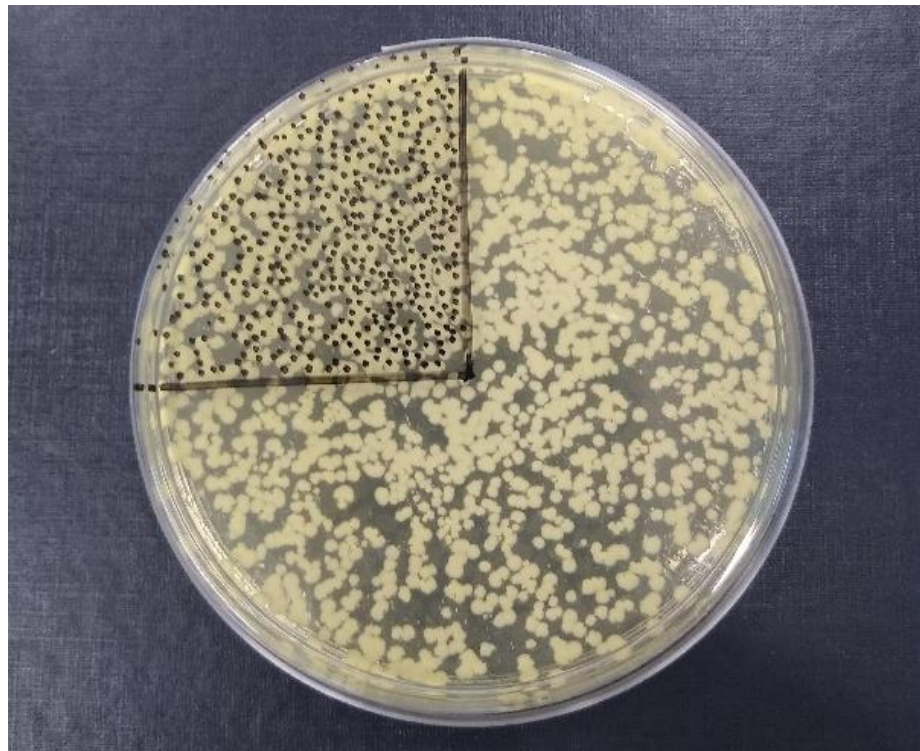


**Figura 6** — Microscopia óptica de suspensão de colônias de *M. restricta*. A: Lâmina à fresco. B: Coloração GRAM. Fonte: autoria própria.



### 5.7 Contagem de Unidade Formadora de Colônia

A contagem das UFCs foi realizada pelo pesquisador na delimitação do quadrante previamente demarcado no fundo da Placa de Petri, utilizando uma caneta marcador permanente, Figura 7. O contador de colônias CP 608 (PHOENIX® Equipamentos Científicos, Araraquara, Brasil) foi utilizado para identificar UFCs em brotamento e/ou convergentes.

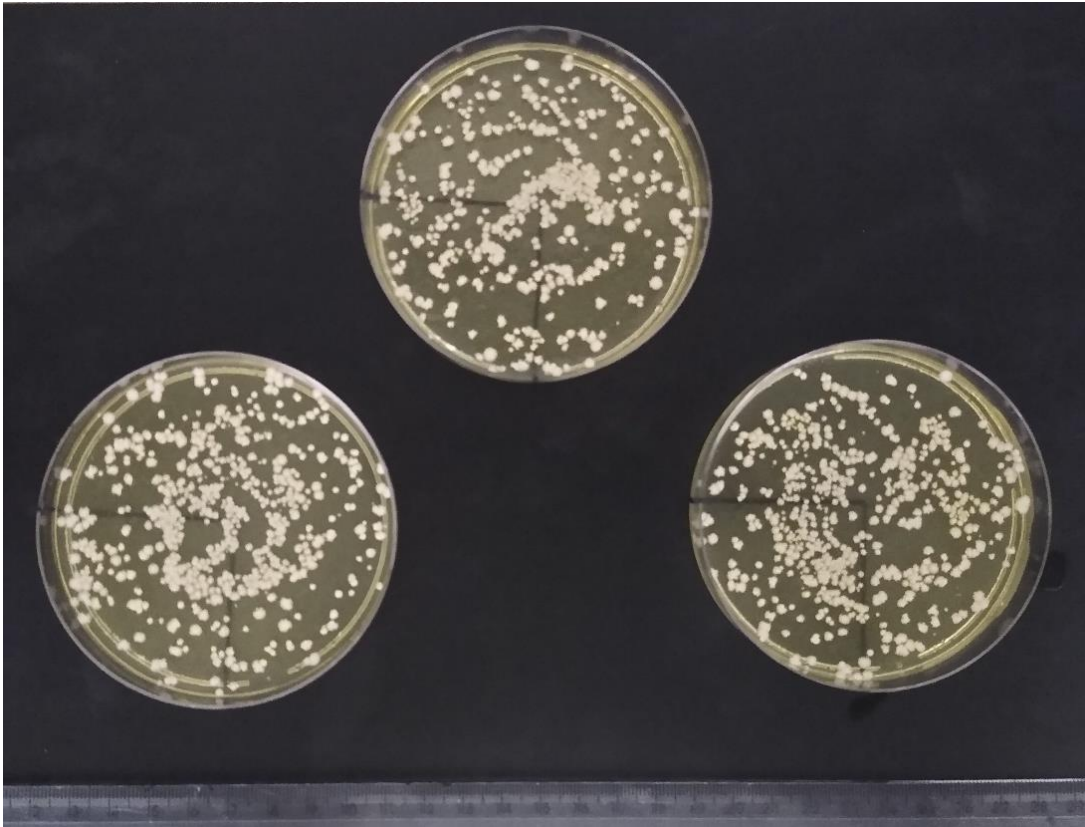


**Figura 7** — Placa representativa da padronização da contagem das UFCs de *M. restricta*.

Fonte: autoria própria.

### 5.8 Avaliação da taxa de ocupação das colônias de *M. restricta*

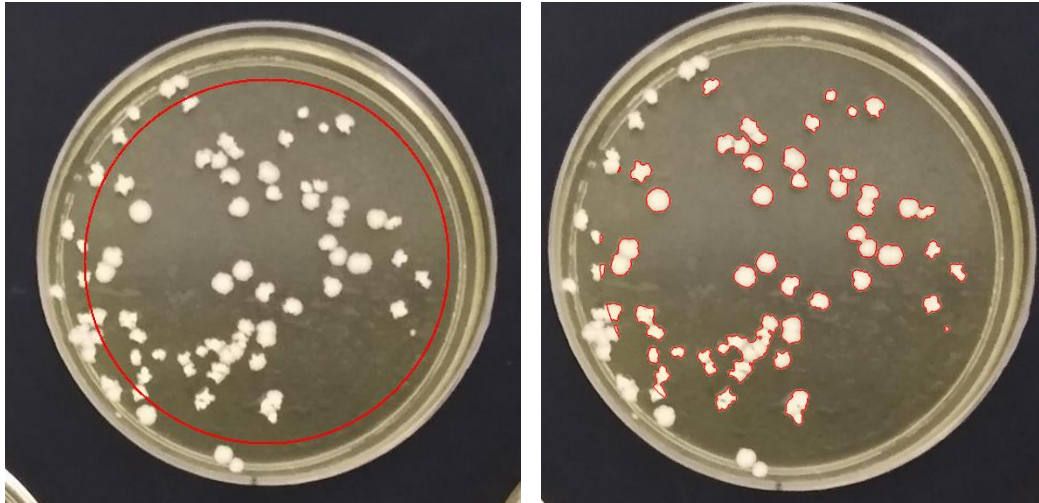
As triplicatas das placas de cada condição foram identificadas e posicionadas, sem tampa e em fundo preto, dentro da Cabine de Segurança Biológica com luz fria desligada. Foi realizado o registro fotográfico utilizando a câmera traseira do SmartPhone modelo e hardware moto g<sup>7</sup> power, 12 MegaPixels, sem flash e sem zoom, Figura 8. As imagens foram transferidas para um computador, no formato *Joint Photographic Experts Group* (JPEG), para que a porcentagem da área ocupada pela levedura *M. restricta* fosse calculada. Foi considerado que as UFCs tiveram distribuição homogênea de crescimento na placa de Petri.



**Figura 8** — Padronização do registro fotográfico.

Fonte: autoria própria.

Inicialmente, em software específico (PetriNote), o avaliador demarcou a área da placa de Petri com o maior círculo possível, evitando a borda da placa, Figura 9. Para diferenciar a área de meio de cultura da área de colônia fúngica, a imagem colorida foi convertida para tons de cinza e, em seguida, foi feita a segmentação da imagem por limiarização destes tons. Esta limiarização é feita sobre todos os pixels da área demarcada. O limiar usado foi 160, ou seja, pixels com tons acima desta intensidade foram considerados como pertencentes às colônias e os demais foram considerados grupo de fundo <sup>(69)</sup>.



**Figura 9** — Demarcação manual do círculo correspondente à área da ocupação da placa de Petri por UFCs de *M. restricta*. Fonte: imagem cedida pelo Dr. Daniel Oliveira Dantas. Departamento de Computação. Universidade Federal de Sergipe. Aracaju, Sergipe, Brasil.

### 5.9 Análise dos dados

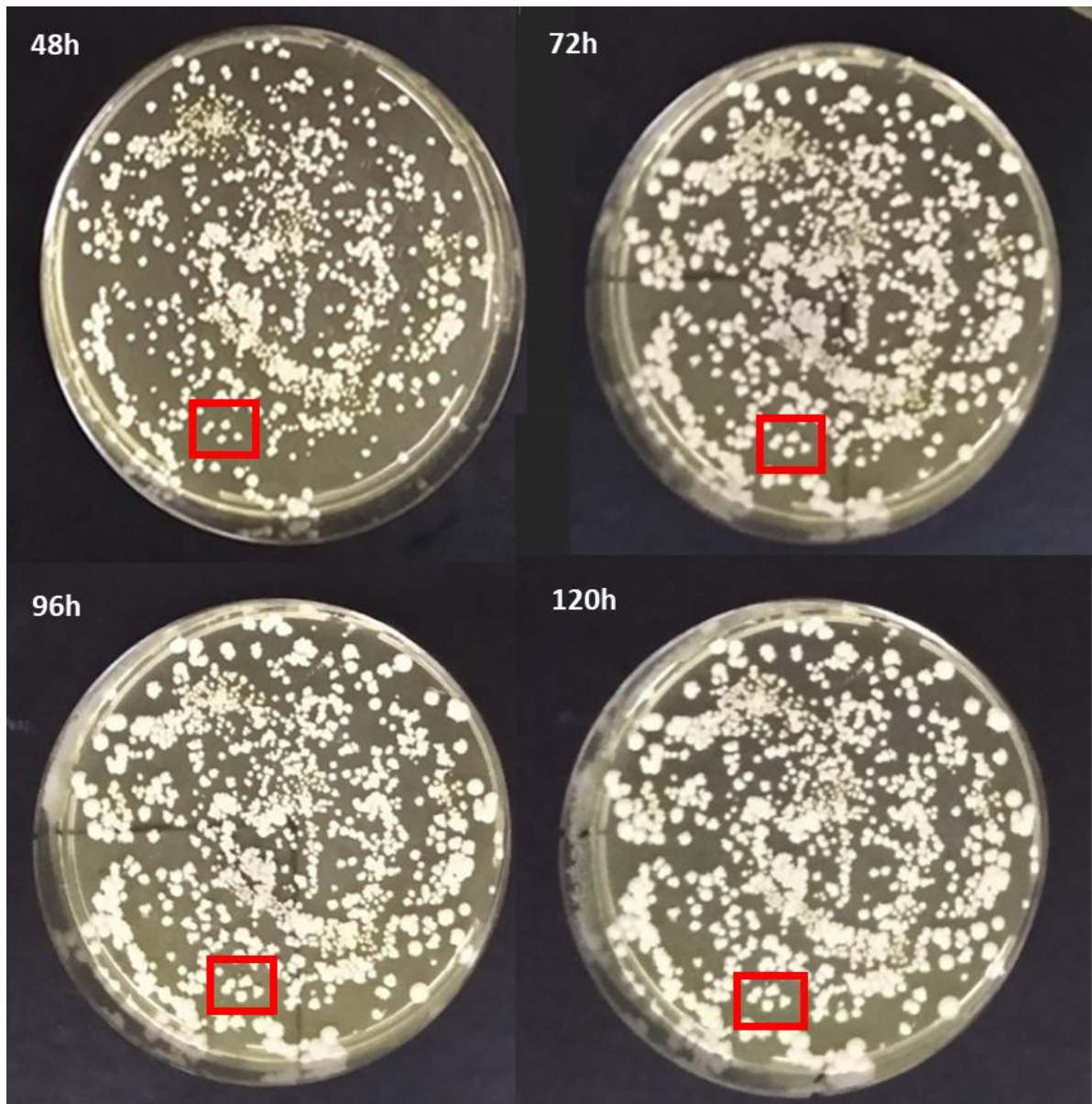
A taxa de inibição de cada uma das intervenções (LEDs 61,13 J/cm<sup>2</sup>, 91,70 J/cm<sup>2</sup> e 183,39 J/cm<sup>2</sup>) foi calculada com base na diminuição percentual no valor médio das colônias em comparação com o controle negativo. A porcentagem de ocupação da placa por levedura foi determinada a partir de uma imagem digital da placa, dividindo-se o número de pixels classificados como colônias pelo número total de pixels da placa, utilizando uma ferramenta de análise de imagem (PetriNote)<sup>(69)</sup>.

O teste ANOVA foi utilizado para comparar as porcentagens médias de inibição de crescimento e ocupação de placa entre as três fluências dos LEDs 410 nm ± 10 nm e o controle negativo. Um P valor (p) inferior a 0,05 foi considerado significativo. A análise de banco de dados, descritiva e analítica, foi realizada usando o software GraphPad Prisma 9.4.0 para Windows.



## 6 RESULTADOS

Após 48 horas de cultura, as UFCs de *M. restricta* apresentaram formato ovóide, na cor creme, aspecto brilhante, com superfície lisa e elevação levemente convexa. Após 48 horas de cultura, notou-se aumento do diâmetro das UFCs. Não houve modificação das características de forma, contorno e coloração das UFCs no período de cultura, de 48 horas a 120 horas, Figura 10.



**Figura 10** — Características macroscópicas das UFCs de *M. restricta* em diferentes tempos de cultura (de 48 a 120 horas), com destaque para o aumento do diâmetro da UFC entre 48 horas e 72 horas.

Fonte: autoria própria.

Em relação ao número de UFCs, não houve variação nos tempos avaliados. As médias ( $\pm$  DP) de UFCs de *M. restricta* foram 201,67 ( $\pm$  82,28) em 48 horas, 203,89 ( $\pm$  82,85) em 72 horas, 205,67 ( $\pm$  83,68) em 96 horas e 206,22 ( $\pm$  83,71) em 120 horas. Considerando-se a dinâmica de resultados do crescimento das UFCs e morfologia das colônias, os experimentos para a avaliação de LEDs foram realizados com leveduras cultivadas por 72 horas.

Os LEDs 410nm  $\pm$  10nm utilizados nas fluências de 61,13 J/cm<sup>2</sup>, 91,70 J/cm<sup>2</sup> e 183,39 J/cm<sup>2</sup> reduziu o crescimento das UFCs de *M. restricta* de forma significativa,  $p < 0,0001$ , quando comparado ao controle negativo, Tabela 1. Não houve diferença significativa no número de UFCs quando as fluências foram comparadas entre si.

**Tabela 1** — Número de UFCs e taxa de ocupação de *M. restricta* após aplicação do cluster de LEDs 410nm  $\pm$  10nm em diferentes fluências.

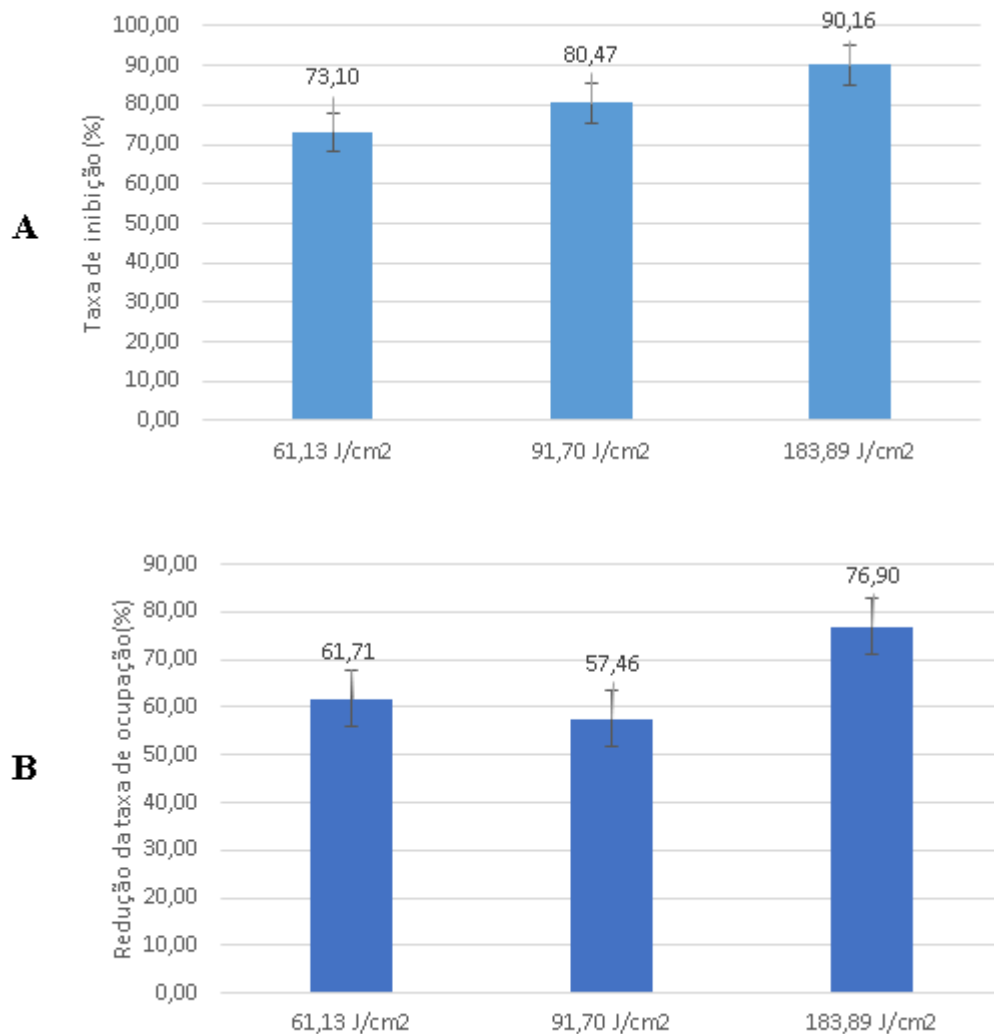
Fluência (J/cm <sup>2</sup> )	Média ( $\pm$ DP) de UFCs	p*	Taxa de ocupação ( $\pm$ DP) de UFCs (%)	p*
<b>Controle negativo</b>	203,89 ( $\pm$ 82,85)		36,28 ( $\pm$ 8,35)	
<b>61,13 J/cm<sup>2</sup></b>	48,33 ( $\pm$ 4,59)		13,89 ( $\pm$ 4,46)	
<b>91,70 J/cm<sup>2</sup></b>	42,67 ( $\pm$ 16,59)	< 0,0001	15,43 ( $\pm$ 6,02)	= 0,0006
<b>183,39 J/cm<sup>2</sup></b>	21,50 ( $\pm$ 18,41)		8,38 ( $\pm$ 6,55)	

J: Joule; DP: desvio padrão; UFCs: unidades formadoras de colônias; p:P valor.

\* Teste ANOVA.

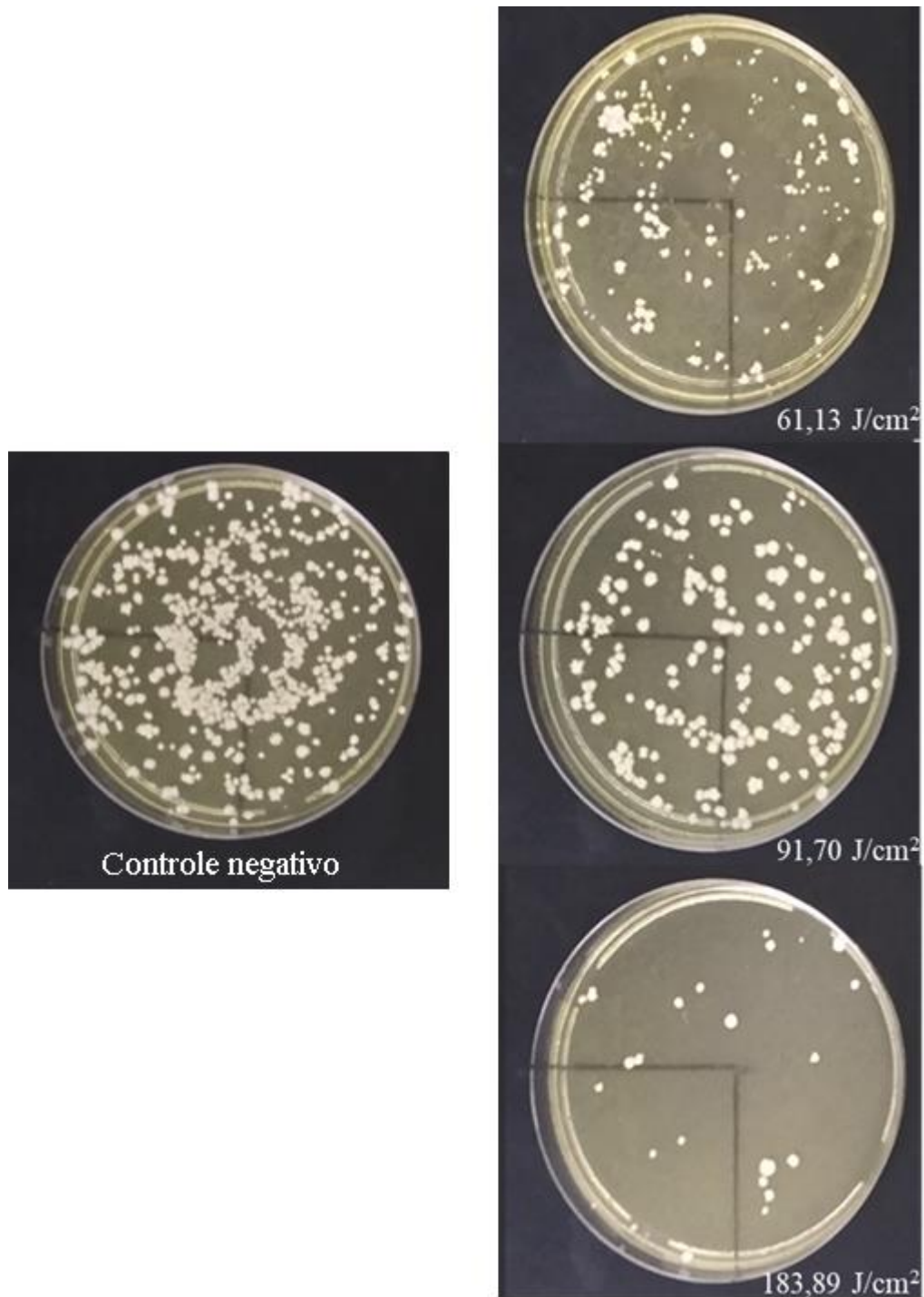
Em relação às taxas de ocupação das leveduras nas placas, a análise da imagem digitalizada revelou que a média da porcentagem de ocupação das UFCs de *M. restricta* nas placas de Petri foi menor após intervenção do cluster de LEDs,  $p = 0,0006$ . A exposição à fluência 183,39 J/cm<sup>2</sup> demonstrou um maior efeito na média da porcentagem de ocupação das UFCs de *M. restricta* nas placas de Petri, porém não houve diferença significativa quando as fluências foram comparadas entre si.

As taxas de inibição de crescimento da *M. restricta* (número de UFCs) e da taxa de ocupação das placas foram superiores a 70% e 50%, respectivamente, com todas as fluências do cluster de LEDs 410  $\pm$  10 nm avaliadas, Figura 11.



**Figura 11** — **A:** Porcentagem de Inibição de LEDs  $410 \pm 10$  nm no crescimento de UFCs de *M. restricta*. As UFCs foram visualmente contadas após 72 horas de aplicação do cluster de LEDs. **B:** Porcentagem da redução da taxa de ocupação de UFCs de *M. restricta* após aplicação de LEDs  $410 \pm 10$  nm. Após 72 horas de aplicação do equipamento cluster de LEDs, as imagens foram digitalizadas e analisadas através do aplicativo PetriNote.

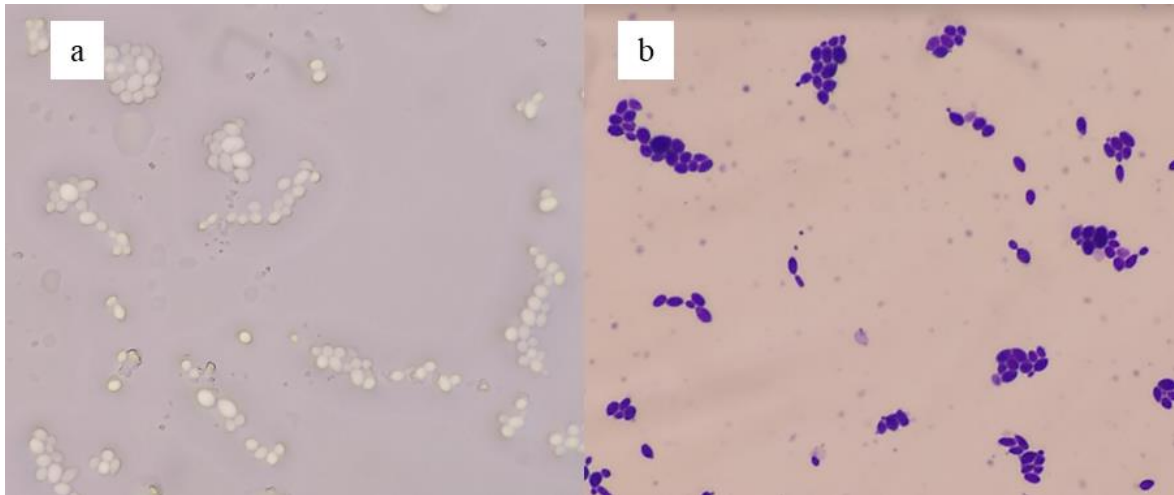
Após a intervenção do equipamento cluster de LEDs, as UFCs de *M. restricta* estavam distribuídas homogeneamente nas placas de Petri e apresentavam forma homogênea, com formato ovoide, na cor creme, brilhante, com superfície lisa e elevação levemente convexa, semelhantes às colônias que não receberam a intervenção. As UFCs expostas as fluências  $61,13 \text{ J/cm}^2$  e  $183,89 \text{ J/cm}^2$  apresentaram visualmente um diâmetro menor quando comparadas ao controle negativo. As UFCs expostas a fluência  $91,70 \text{ J/cm}^2$  mantiveram um diâmetro semelhante ao do controle negativo, Figura 12.



**Figura 12** — Características macroscópicas das UFCs de *M. restricta* expostas aos LEDs violeta nas fluências  $61,13 \text{ J/cm}^2$ ,  $91,70 \text{ J/cm}^2$ ,  $183,89 \text{ J/cm}^2$  e controle negativo. Placas referentes ao experimento 3.

A avaliação microscópica das UFCs de *M. restricta* em lâminas à fresco (Figura 13a) e por coloração Gram (Figura 13b) revelou colônias com formatos circular e ovoide, membranas celulares bem delimitadas, sem a presença de pseudomicélios. Não foi identificada diferença

estrutural nas colônias que receberam intervenção do cluster de LEDs quando comparadas ao controle negativo, Figura 6 e Figura 13a e b. A coloração GRAM mostrou ausência de contaminação das amostras por bactérias.



**Figura 13** — Microscopia óptica 100x, aumento de 1000x, em lâminas à fresco (a) e Gram (b) de *M. restricta* após intervenção do cluster de LEDs (lâmina representativa da fluência 61,13 J/cm<sup>2</sup>).



## 7 DISCUSSÃO

Esse estudo, até o momento, é pioneiro na investigação da ação antifúngica de LEDs violeta  $410\text{nm} \pm 10\text{nm}$  na espécie *M. restricta*. Os resultados encontrados demonstram que todas as fluências de LEDs utilizadas tiveram efeito antifúngico, inibindo mais de 70% o crescimento de *M. restricta*. Esse efeito fungicida foi observado com a aplicação da menor fluência avaliada ( $61,13 \text{ J/cm}^2$ ), não havendo diferenças em relação ao número de UFCs, taxa de ocupação nas placas e morfologia das colônias com a aplicação das fluências superiores.

No presente estudo, nós avaliamos a taxa de inibição do crescimento da *M. restricta*, não apenas pelo número de UFCs, como também pela taxa de ocupação das colônias na placa de Petri utilizando uma análise digital de imagem que considera o diâmetro de cada colônia. Este método está em avaliação pela equipe de Ciências de Computação da Universidade Federal de Sergipe (UFSE) para colônias de bactérias (resultados não publicados). Nós observamos que a redução da taxa de ocupação das colônias de *M. restricta* após a aplicação do equipamento cluster de LEDs (57 a 77%) correspondeu diretamente a taxa de inibição de crescimento das UFCs após a aplicação do equipamento (73 a 90%).

Os estudos que avaliaram os efeitos de LEDs sobre outras espécies de *Malassezia*, utilizaram parâmetros diferentes dos utilizados no nosso estudo, não apenas em relação ao comprimento do espectro de luz avaliado, mas também na irradiância, fluência e tempo de exposição. Avaliando LEDs de comprimentos de onda de 370 a 415nm nas espécies *M. furfur*, *M. sympodialis* e *M. globosa* <sup>(18)</sup>, foi observado uma inibição importante do crescimento das colônias apenas com LEDs de 380 e 392,5 nm, chegando a 100% de inibição da *M. globosa*. Diferente do nosso estudo, a aplicação de LEDs 410 nm não foi efetiva para a inibição do crescimento das diferentes espécies de *Malassezia*. Esses resultados diferentes podem ser explicados pelas diferenças não apenas entre as espécies avaliadas, mas também por diferenças nos protocolos empregados. A irradiância aplicada por esses autores ( $28\text{mW/cm}^2$ ) foi bem abaixo da utilizada no presente estudo ( $102\text{mW/cm}^2$ ). A irradiância influencia diretamente a potência, assim mesmo utilizando o mesmo comprimento de onda (410nm), as potências foram diferentes entre os dois estudos.

Moorhead e cols <sup>(17)</sup> utilizaram LEDs 405nm com irradiância de  $35 \text{ mW/cm}^2$  para avaliar o efeito antifúngico sobre as espécies *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Aspergillus(A) niger*. As espécies *Trichophyton* foram completamente inibidas após quatro

horas de exposição à luz, totalizando a fluência de 504 J/cm<sup>2</sup>. A espécie *A. niger* demonstrou uma maior resistência, e seu crescimento foi inibido com uma dose superior, 1440 J/cm<sup>2</sup>. Apesar da utilização de um comprimento de onda similar ao do nosso estudo, os autores utilizaram uma irradiância muito menor, o que necessitou um maior tempo de exposição do fungo à luz.

Muitos estudos relatam o efeito antifúngico do LED violeta /azul nas espécies de *Candida* com comprimento de onda variando de 405 a 415 nm *in vitro* <sup>(19,20,65)</sup>. O LED tem sido igualmente empregado em mulheres com vaginite recorrente por *Candida* spp. <sup>(22,23,70)</sup>, diminuindo sintomas como eritema e prurido. A *Candida* spp., assim como a *Malassezia* spp. são fungos leveduriformes, com paredes celulares semelhantes, o que pode justificar o efeito antifúngico do LED em ambos os gêneros.

A faixa de espectro de luz utilizada no presente estudo tem a propriedade de penetração na epiderme, local predominante das leveduras do gênero *Malassezia* <sup>(71)</sup>. A absorção de fótons de luz, no espectro entre 400nm e 450nm, pelas porfirinas endógenas presentes nas células da epiderme promove uma fotoexcitação que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente oxigênio singleto (<sup>1</sup> O<sub>2</sub>). As ERO reagem com componentes celulares, causam desequilíbrio na homeostase celular e danos em organelas citoplasmáticas e ácidos nucleicos. Como consequência, ocorre a morte celular por apoptose, necrose ou autofagia <sup>(17)</sup>. De fato, Wi e cols, 2012 <sup>(18)</sup>, avaliando as diversas espécies de *Malassezia* mostraram que LEDs com comprimento de onda de 392,5 ± 1 nm induziram o aumento da produção intra e extracelular de ERO, mas não o dano ao DNA. Outra hipótese é que o LED 410nm é capaz de inibir a catalase, tetrâmetro presente em grande parte de fungos aeróbico, responsável por degradar o peróxido de hidrogênio. A presença da catalase garante a sobrevivência dos fungos e invasão ao hospedeiro e sua inativação pelo LED 410 nm torna as células fúngicas altamente suscetíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio <sup>(20)</sup>.

Os LEDs livres de raios ultravioleta, como os utilizados neste estudo, são uma alternativa para o tratamento de doenças causadas por fungos/bactérias por apresentarem poucos efeitos colaterais <sup>(61,72,73)</sup>. Além disso, o fato do LED atuar diretamente na célula bacteriana ou fúngica pode ser uma vantagem frente à medicamentos, pelo custo e possibilidade de interações medicamentosas diversas, além da possibilidade de resistência aos fármacos. O tratamento do LED pode ser benéfico em indivíduos imunossuprimidos, como portadores de HTLV-1 e HIV que apresentam uma alta prevalência de micoses superficiais e cutâneas <sup>(12,42,74)</sup>.

Este estudo demonstrou que LEDs 410nm  $\pm$  10 nm nas fluências de 61,13 J/cm<sup>2</sup>, 91,70 J/cm<sup>2</sup> e 183,89 J/cm<sup>2</sup> reduzem o número de UFCs de *M. restricta*. Embora o mecanismo de ação do LED contra *Malassezia* não tenha sido elucidado nesta pesquisa, supõe-se que a produção de ERO pode desempenhar um papel importante. Os resultados sugerem que o LED pode ser uma nova ferramenta terapêutica contra doenças cutâneas causadas por leveduras *Malassezia*. No entanto, são necessários estudos de fase I para avaliar a segurança da aplicação na epiderme.

## **8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO**

Avaliar outras espécies de *Malassezia* e as alterações ultra estruturais na membrana plasmática e organelas da *M. restricta* por microscopia eletrônica. Também será verificada a integridade do DNA, e a produção de radicais livres de oxigênio.

## **9 CONCLUSÃO**

LEDs 410nm  $\pm$  10 nm tem um potente efeito antifúngico sobre a levedura *M. restricta in vitro*, diminuindo a taxa de crescimento e a taxa de ocupação das colônias na placa de cultura.

## REFERÊNCIAS

1. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012;4(165):165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
2. Kovitwanichkanont T, Chong AH. Superficial fungal infections. *Aust J Gen Pract.* 2019 Oct;48(10):706-711. doi: 10.31128/AJGP-05-19-4930. PMID: 31569324.
3. Hay R. Superficial fungal infections. *Med (United Kingdom).* 2017;45(11):707-10. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.08.006>
4. Grice EA, Dawson TL 23\*Jr. Host-microbe interactions: *Malassezia* and human skin. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:81-87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.024>
5. Lorch JM, Palmer JM, Vanderwolf KJ, Schmidt KZ, Verant ML, Weller TJ, et al. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia.* 2018;41:56-70. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.04>
6. Honnavar P, Chakrabarti A, Dhaliwal M, Dogra S, Handa S, Lakshmi PVM, Rudramurthy SM. Sociodemographic characteristics and spectrum of *Malassezia* species in individuals with and without seborrhoeic dermatitis/dandruff: A comparison of residents of the urban and rural populations. *Med Mycol.* 2021 Mar 4;59(3):259-265. doi: 10.1093/mmy/myaa050. PMID: 32556200.
7. Park M, Cho YJ, Lee YW, Jung WH. Understanding the Mechanism of Action of the Anti-Dandruff Agent Zinc Pyrithione against *Malassezia restricta*. *Sci Rep.* 2018 Aug 14;8(1):12086. doi: 10.1038/s41598-018-30588-2. PMID: 30108245; PMCID: PMC6092343.
8. Prohic A, Sadikovic TJ, Krupalija-Fazlic M, Kuskunovic-Vlahovljak S. *Malassezia* species in healthy skin and in dermatological conditions. *Int J Dermatol.* 2016;55(5):494-504. <https://doi.org/10.1111/ijd.13116>
9. Sommer B, Overy DP, Kerr RG. Identification and characterization of lipases from *Malassezia restricta*, a causative agent of dandruff. *FEMS Yeast Res.* 2015 Nov;15(7):fov078. doi: 10.1093/femsyr/fov078. Epub 2015 Aug 21. PMID: 26298017.

10. Sobral AL, Sampaio B, Cristina Â, Mameri A, Jeunon De Sousa Vargas T, Ramos-E-Silva M, et al. Seborrheic dermatitis. Continuing Medical Education. An Bras Dermatol. 2011;86(6):1061–74. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600002>
11. Martin F, Taylor GP. Prospects for the management of human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. AIDS Rev. 2011;13(3):161-70. Cited: PMID: 21799534.
12. Moreno-Coutiño G, Sánchez-Cárdenas CD, Bello-Hernández Y, Fernández-Martínez R, Arroyo-Escalante S, Arenas R. Isolation of *Malassezia* spp. in HIV-positive patients with and without seborrheic dermatitis. An Bras Dermatol. 2019 Sep-Oct;94(5):527-531. doi: 10.1016/j.abd.2019.09.012. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31777352; PMCID: PMC6857564.
13. Schierhout G, McGregor S, Gessain A, Einsiedel L, Martinello M, Kaldor J. Association between HTLV-1 infection and adverse health outcomes: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. Lancet Infect Dis. 2020 Jan;20(1):133-143. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30402-5. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31648940.
14. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Aneke CI, Otranto D, Cafarchia C. Conventional therapy and new antifungal drugs against *Malassezia* infections. Med Mycol. 2021;59(3):215-234. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa087>
15. Sparber F, Ruchti F, LeibundGut-Landmann S. Host Immunity to *Malassezia* in Health and Disease. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:198. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00198>
16. Xuan M, Lu C, He Z. Clinical characteristics and quality of life in seborrheic dermatitis patients: a cross-sectional study in China. Health Qual Life Outcomes. 2020;18:308. <https://doi.org/10.1186/s12955-020-01558-y>
17. Moorhead S, Maclean M, MacGregor SJ, Anderson JG. Comparative Sensitivity of Trichophyton and Aspergillus Conidia to Inactivation by Violet-Blue Light Exposure. Photomed Laser Surg. 2016;34(1):36-41. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.3922>
18. Wi HS, Na EY, Yun SJ, Lee JB. The antifungal effect of light emitting diode on *Malassezia* yeasts. J Dermatol Sci. 2012;67(1):3-8. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.04.001>
19. Tsutsumi-Arai C, Arai Y, Terada-Ito C, Imamura T, Tatehara S, Ide S, Shirakawa J, Wakabayashi N, Satomura K. Inhibitory effect of 405-nm blue LED light on the growth of

*Candida albicans* and *Streptococcus mutans* dual-species biofilms on denture base resin. *Lasers Med Sci.* 2022 Jun;37(4):2311-2319. doi: 10.1007/s10103-022-03507-1. Epub 2022 Jan 16. PMID: 35034224.

20. Dong PT, Zhan Y, Jusuf S, Hui J, Dagher Z, Mansour MK, Cheng JX. Photoinactivation of Catalase Sensitizes *Candida albicans* and *Candida auris* to ROS-Producing Agents and Immune Cells. *Adv Sci (Weinh).* 2022 Apr;9(10):e2104384. doi: 10.1002/advs.202104384. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35119220; PMCID: PMC8981478.

21. Keemss K, Pfaff SC, Born M, Liebmann J, Merk HF, von Felbert V. Prospective, Randomized Study on the Efficacy and Safety of Local UV-Free Blue Light Treatment of Eczema. *Dermatology.* 2016;232(4):496-502. doi: 10.1159/000448000. Epub 2016 Aug 19. Erratum in: *Dermatology.* 2016;232(4):522. PMID: 27537360.

22. Robatto M, Pavie MC, Garcia I, Menezes MP, Bastos M, Leite HJD, Noites A, Lordelo P. Ultraviolet A/blue light-emitting diode therapy for vulvovaginal candidiasis: a case presentation. *Lasers Med Sci.* 2019 Dec;34(9):1819-1827. doi: 10.1007/s10103-019-02782-9. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30945022.

23. Robatto M, Pavie MC, Tozetto S, Brito MB, Lordêlo P. Blue Ligth Emitting Diode in Treatment of Recurring Vulvovaginal Candidiasis: a Case Report. *Brazilian J Med Hum Heal.* 2017;5(4):162–8. <https://doi.org/10.17267/2317-3386bjmhh.v5i4.1472>

24. Sadowska M, Narbutt J, Lesiak A. Blue Light in Dermatology. *Life (Basel).* 2021 Jul 8;11(7):670. doi: 10.3390/life11070670. PMID: 34357042; PMCID: PMC8307003.

25. Opel DR, Hagstrom E, Pace AK, Sisto K, Hirano-Ali SA, Desai S, Swan J. Light-emitting Diodes: A Brief Review and Clinical Experience. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2015 Jun;8(6):36-44. PMID: 26155326; PMCID: PMC4479368.

26. Nenoff P, Mayser P, Uhrlaß S. Pilzinfektionen der Haut und Nägel [Fungal infections of skin and nails]. *Hautarzt.* 2021 Oct;72(10):843-846. German. doi: 10.1007/s00105-021-04886-2. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34554287; PMCID: PMC8459583.

27. Global Action for Fungal infection. Annual Report 2021. April, 2022. Disponível em: [https://gaffidocuments.s3.eu-west-2.amazonaws.com/GAFFI\\_Annual+report\\_2021\\_final.pdf](https://gaffidocuments.s3.eu-west-2.amazonaws.com/GAFFI_Annual+report_2021_final.pdf). Acesso em: 25 de setembro de 2022.

28. Benedict K, Jackson BR, Chiller T, Beer KD. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. *Clin Infect Dis*. 2019 May 17;68(11):1791-1797. doi: 10.1093/cid/ciy776. PMID: 30204844; PMCID: PMC6409199.
29. Borba HHL, Steimbach LM, Riveros BS, Tonin FS, Ferreira VL, Bagatim BAQ, Balan G, Pontarolo R, Wiens A. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. *Mycoses*. 2018 Oct;61(10):754-763. doi: 10.1111/myc.12801. Epub 2018 Jul 5. PMID: 29893450.
30. Silva-Rocha WP, de Azevedo MF, Chaves GM. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *J Mycol Med*. 2017 Mar;27(1):57-64. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.08.009. Epub 2016 Sep 20. PMID: 27663203.
31. Tomaz, D. (2011). Será fungo?. *Revista Portuguesa De Medicina Geral E Familiar*, 27(1), 96–108. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v27i1.10825>
32. Urban K, Chu S, Scheufele C, Giesey RL, Mehrmal S, Uppal P, Delost GR. The global, regional, and national burden of fungal skin diseases in 195 countries and territories: A cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2017. *JAAD Int*. 2020 Nov 30;2:22-27. doi: 10.1016/j.jdin.2020.10.003. PMID: 34409349; PMCID: PMC8362308.
33. Pärna E, Aluoja A, Kingo K. Quality of life and emotional state in chronic skin disease. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(3):312–6.
34. Kim DH, Li K, Seo SJ, Jo SJ, Yim HW, Kim CM, et al. Quality of life and disease severity are correlated in patients with atopic dermatitis. *J Korean Med Sci*. 2012;27(11):1327–32.
35. Rivitti EA. *Dermatologia de Sampaio e Rivitti* [Internet]. 4th ed. São Paulo: Artes Medicas; 2015. Available from: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536702766/cfi/0!/4/4@0.00:40.8>
36. Wolff K, Johnson RA, Saavedra AP, Roh EK. *Dermatologia de Fitzpatrick: Atlas e Texto* [Internet]. 8th ed. Porto Alegre: AMGH; 2019. Available from: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788580556247/cfi/4!/4/2@100:0.00>
37. Araya M, Kulthanan K, Jiamton S. Clinical characteristics and quality of life of seborrheic dermatitis patients in a tropical country. *Indian J Dermatol*. 2015;60(5):519.



38. Hutchings C V., Kid Wan Shum, Gawkrödger DJ. Occupational contact dermatitis has an appreciable impact on quality of life. *Contact Dermatitis*. 2001;45(1):17–20.
39. Bologna JL, Jorizzo JL, Schaffer J V. *Dermatologia* [Internet]. 3rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. Available from: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595155190/cfi/6/2!/4/2@0.00:0.00>.
40. Guo F, Yu Q, Liu Z, Zhang C, Li P, Xu Y, et al. Evaluation of life quality, anxiety, and depression in patients with skin diseases. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(44):e22983.
41. Di Chiacchio N, Madeira CL, Humaire CR, Silva CS, Fernandes LH, Dos Reis AL. Superficial mycoses at the Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo between 2005 and 2011. *An Bras Dermatol*. 2014 Jan-Feb;89(1):67-71. doi: 10.1590/abd1806-4841.20141783. PMID: 24626650; PMCID: PMC3938356.
42. Forrestel AK, Kovarik CL, Mosam A, Gupta D, Maurer TA, Micheletti RG. Diffuse HIV-associated seborrheic dermatitis - a case series. *Int J STD AIDS*. 2016 Dec;27(14):1342-1345. doi: 10.1177/0956462416641816. Epub 2016 Mar 24. PMID: 27013615.
43. Azulay RD, Azulay DR, Azulay-Abulafia L. *Dermatologia* [Internet]. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. Available from: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527732475/cfi/6/10!/4/2/34@0:96.3>
44. Clark GW, Pope SM, Jaboori KA. Diagnosis and treatment of seborrheic dermatitis. *Am Fam Physician*. 2015;91(3):185–90.
45. Gupta AK, Bluhm R. Seborrheic dermatitis. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2004;18(1):13–26.
46. Dessinioti C, Katsambas A. Seborrheic dermatitis: Etiology, risk factors, and treatments: Facts and controversies. *Clin Dermatol* [Internet]. 2013;31(4):343–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.01.001>
47. Sampaio AL, Mameri AC, Vargas TJ, Ramos-e-Silva M, Nunes AP, Carneiro SC. Seborrheic dermatitis. *An Bras Dermatol*. 2011 Nov-Dec;86(6):1061-71; quiz 1072-4. English, Portuguese. doi: 10.1590/s0365-05962011000600002. PMID: 22281892.
48. Theelen B, Cafarchia C, Gaitanis G, Bassukas ID, Boekhout T, Dawson TL Jr. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. *Med Mycol*. 2018 Apr

- 1;56(suppl\_1):S10-S25. doi: 10.1093/mmy/myx134. Erratum in: *Med Mycol.* 2019 Apr 1;57(3):e2. PMID: 29538738.
49. Fuller LC, Barton RC, Mohd Mustapa MF, Proudfoot LE, Punjabi SP, Higgins EM. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of tinea capitis 2014. *Br J Dermatol.* 2014 Sep;171(3):454-63. doi: 10.1111/bjd.13196. PMID: 25234064.
50. Ali S, Khan FI, Mohammad T, Lan D, Hassan MI, Wang Y. Identification and Evaluation of Inhibitors of Lipase from *Malassezia restricta* using Virtual High-Throughput Screening and Molecular Dynamics Studies. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 18;20(4):884. doi: 10.3390/ijms20040884. PMID: 30781686; PMCID: PMC6412828.
51. Stalhberger T, Simenel C, Clavaud C, Eijsink VG, Jourdain R, Delepierre M, Latgé JP, Breton L, Fontaine T. Chemical organization of the cell wall polysaccharide core of *Malassezia restricta*. *J Biol Chem.* 2014 May 2;289(18):12647-56. doi: 10.1074/jbc.M113.547034. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24627479; PMCID: PMC4007454.
52. Guého, Eveline & Boekhout, Teun & Begerow, Dominik. (2010). Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure. 10.1007/978-3-642-03616-3\_2. Disponible em: [https://www.researchgate.net/publication/278710422\\_Biodiversity\\_Phylogeny\\_and\\_Ultrastructure](https://www.researchgate.net/publication/278710422_Biodiversity_Phylogeny_and_Ultrastructure)
53. Park M, Cho YJ, Lee YW, Jung WH. Genomic Multiplication and Drug Efflux Influence Ketoconazole Resistance in *Malassezia restricta*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Apr 30;10:191. doi: 10.3389/fcimb.2020.00191. PMID: 32426297; PMCID: PMC7203472.
54. Carrillo-Muñoz AJ, Rojas F, Tur-Tur C, Sosa MA, Diez GO, Espada CM, et al. *In vitro* antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. *Mycoses.* 2013;56(5):571-75. <https://doi.org/10.1111/myc.12076>
55. Rojas FD, Córdoba SB, de Los Ángeles Sosa M, Zalazar LC, Fernández MS, Cattana ME, Alegre LR, Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano GE. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. *Mycoses.* 2017 Feb;60(2):104-111. doi: 10.1111/myc.12556. Epub 2016 Sep 14. PMID: 27625339.
56. Benyamini Y, Goner-Shilo D, Lazarov A. Illness perception and quality of life in patients with contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2012;67(4):193-9.

57. Garza ZCF, Born M, Hilbers PAJ, van Riel NAW, Liebmann J. Visible Blue Light Therapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Curr Med Chem*. 2018;25(40):5564-5577. doi: 10.2174/0929867324666170727112206. PMID: 28748760.
58. Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol*. 2008 Mar-Apr;84(2):450-62. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00286.x. Epub 2008 Jan 29. PMID: 18248499.
59. Krutmann J, Medve-Koenigs K, Ruzicka T, Ranft U, Wilkens JH. Ultraviolet-free phototherapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005 Apr;21(2):59-61. doi: 10.1111/j.1600-0781.2005.00141.x. PMID: 15752121.
60. Hopkins SL, Siewert B, Askes SH, Veldhuizen P, Zwier R, Heger M, Bonnet S. An *in vitro* cell irradiation protocol for testing photopharmaceuticals and the effect of blue, green, and red light on human cancer cell lines. *Photochem Photobiol Sci*. 2016 May 11;15(5):644-53. doi: 10.1039/c5pp00424a. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27098927; PMCID: PMC5044800.
61. Ablon G. Phototherapy with Light Emitting Diodes: Treating a Broad Range of Medical and Aesthetic Conditions in Dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2018 Feb;11(2):21-27. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29552272; PMCID: PMC5843358.
62. Dourado KBV, Gomes AC, Carnevali Junior LC, Paulo, RJF de. Ledterapia: Uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparo tecidual. *Ensaio e Ciência: Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde*. 2011; 15 (6):231-248.
63. Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med Sci*. 2017;32(8):1909–18.
64. Murdoch LE, McKenzie K, Maclean M, Macgregor SJ, Anderson JG. Lethal effects of high-intensity violet 405-nm light on *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and on dormant and germinating spores of *Aspergillus niger*. *Fungal Biol*. 2013 Jul-Aug;117(7-8):519-27. doi: 10.1016/j.funbio.2013.05.004. Epub 2013 May 30. PMID: 23931117.
65. Wang T, Dong J, Zhang G. Analyzing Efficacy and Safety of Anti-Fungal Blue Light Therapy via Kernel-Based Modeling the Reactive Oxygen Species Induced by Light. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2022 Aug;69(8):2433-2442. doi: 10.1109/TBME.2022.3146567. Epub 2022 Jul 18. PMID: 35085070.

66. Yarrow D. Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeast. In: Kurtzman CP, Fell JW, editors. *The Yeasts - A Taxonomy Study*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Publishers; 1998. p. 77-100. <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50014-9>
67. Vicente MF, Basilio A, Cabello A, Peláez F. Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(1):15-32. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00489.x>
68. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil), Organização Pan-Americana da Saúde. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: norma aprovada [Internet]. 2nd. ed. Pennsylvania; 2002. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mis-16205>
69. Gonzalez RC, Woods RE. *Digital image processing*. 3rd. ed. New Jersey: Prentice Hall; 2008.
70. Dai T, Hamblin MR. Visible Blue Light is Capable of Inactivating *Candida albicans* and Other Fungal Species. *Photomed Laser Surg*. 2017 Jul;35(7):345-346. doi: 10.1089/pho.2017.4318. Epub 2017 Jun 14. PMID: 28613980; PMCID: PMC5512304.
71. Maraschin MM, Spader T, Mario DAN, Rossato L, Lopes PGM. Infecções Causadas por *Malassezia*: Novas Abordagens. 2008; *Saúde, Santa Maria*, 34a(1-2): 4-8.
72. Dai T, Gupta A, Murray CK, Vrahas MS, Tegos GP, Hamblin MR. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? *Drug Resist Updat*. 2012 Aug;15(4):223-36. doi: 10.1016/j.drug.2012.07.001. Epub 2012 Jul 28. PMID: 22846406; PMCID: PMC3438385.
73. Fonseka S, Narankotuwa KHH, Bandara DDJ. Light-emitting Diode Light Therapy for Facial Seborrheic Dermatitis: A Case Report. *J Cutan Aesthet Surg*. 2021 Apr-Jun;14(2):241-243. doi: 10.4103/JCAS.JCAS\_188\_20. PMID: 34566371; PMCID: PMC8423200.
74. Montañó-Castellón I, Marconi CSC, Saffe C, Brites C. Clinical and Laboratory Outcomes in HIV-1 and HTLV-1/2 Coinfection: A Systematic Review. *Front Public Health*. 2022 Mar 7;10:820727. doi: 10.3389/fpubh.2022.820727. PMID: 35359787; PMCID: PMC8963803.

## ANEXOS

## ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF EVIDENCE-BASED HEALTHCARE

Registered Report

 Journals  
**BAHIANA**  
SCHOOL OF MEDICINE AND PUBLIC HEALTH

**Protocol for evaluating the in vitro effect of violet light-emitting diodes (LEDs) 410 nm ± 10 nm on yeast cultures**

**Protocolo para avaliação do efeito in vitro de diodos emissores de luz violeta (LEDs) 410 nm ± 10 nm em culturas de levedura**

<b>Rachel Trinchão Schneiberg Kalid Ribeiro<sup>1</sup></b> 	<b>Jacqueline de Jesus Silva<sup>8</sup></b> 
<b>Élissa da Silva Santos<sup>2</sup></b> 	<b>Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira<sup>9</sup></b> 
<b>Rita Elizabeth Mascarenhas<sup>3</sup></b> 	<b>Daniel Oliveira Dantas<sup>10</sup></b> 
<b>Marília Wellichan Mancini<sup>4</sup></b> 	<b>Beatriz Trinchão Andrade<sup>11</sup></b> 
<b>Luciana Almeida-Lopes<sup>5</sup></b> 	<b>Jéssica Mirella de Souza Gomes<sup>12</sup></b> 
<b>Tânia Fraga Barros<sup>6</sup></b> 	<b>Cristiane Maria Carvalho Costa Dias<sup>13</sup></b> 
<b>Carlos Gustavo Regis<sup>7</sup></b> 	<b>Maria Fernanda Rios Grassi<sup>14</sup></b> 

<sup>1</sup>Corresponding author. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Salvador). Bahia, Brazil. racheltrinchao@bahiana.edu.br,  
<sup>2,3,12-14</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Salvador). Bahia, Brazil. elissasantos10@hotmail.com, relizabeth@bahiana.edu.br,  
nupi-jessicagomes@bahiana.edu.br, cmccdias@bahiana.edu.br, fernanda.grassi@fiocruz.br  
<sup>4</sup>Instituto de Pesquisas e Ensino na Área da Saúde - NUPEN (São Carlos). São Paulo, Brazil. marilia.mancini@dmcgroup.com.br, almeidalopes@nupen.com.br  
<sup>5</sup>Universidade Federal da Bahia (Salvador). Bahia, Brazil. tfbarros@ufba.br  
<sup>7,9</sup>Fundação Oswaldo Cruz (Salvador). Bahia, Brazil. carlos.regis@fiocruz.br, jacqueline.jesus@fiocruz.br, diogo.magalhaes@fiocruz.br  
<sup>10,11</sup>Universidade Federal de Sergipe (Aracaju). Sergipe, Brazil. ddantas@dcomp.ufs.br, beatriz@dcomp.ufs.br

Disponível em: <https://journals.bahiana.edu.br/index.php/evidence/article/view/4736>

**Registered Reports**

**(EN) 4736 - Protocol for evaluating the *in vitro* effect of violet light-emitting diodes (LEDs) 410 nm  $\pm$  10 nm on yeast cultures / Protocolo para avaliação do efeito *in vitro* de diodos emissores de luz violeta (LEDs) 410 nm  $\pm$  10 nm em culturas de levedura**

Rachel Trinchão Schneiberg Kalid Ribeiro, ÉliSSa da Silva Santos, Rita Elizabeth Mascarenhas, Marília Wellichan Mancini, Luciana Almeida-Lopes, Tânia Fraga Barros, Carlos Gustavo Regis, Jacqueline de Jesus Silva, Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira, Daniel Oliveira Dantas, Beatriz Trinchão Andrade, JéSSica Mirella de Souza Gomes, Cristiane Maria Carvalho Costa Dias, Maria Fernanda Rios Grassi

Ed. Resp.: Ana Marice Ladeia

DOI: 10.17267/2675-021Xevidence.2022.e4736

Submitted 07/14/2022, Accepted 10/25/2022, Published xx/xx/2022

**Protocol for evaluating the *in vitro* effect of violet light-emitting diodes (LEDs) 410 nm  $\pm$  10 nm on yeast cultures**

**Protocolo para avaliação do efeito *in vitro* de diodos emissores de luz violeta (LEDs) 410 nm  $\pm$  10 nm em culturas de levedura**

Rachel Trinchão Schneiberg Kalid Ribeiro 0000-0002-0555-8623<sup>1</sup>

ÉliSSa da Silva Santos 0000-0001-6610-6279<sup>2</sup>

Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas 0000-0002-9865-7777<sup>3</sup>

Marília Wellichan Mancini 0000-0002-2799-0054<sup>4</sup>

Luciana Almeida-Lopes 0000-0002-5873-2656<sup>5</sup>

Tânia Fraga Barros 0000-0002-6507-433X<sup>6</sup>

Carlos Gustavo Regis 0000-0001-8196-8694<sup>7</sup>

Jacqueline de Jesus Silva 0000-0002-6176-9070<sup>8</sup>

Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira 0000-0003-3323-4404<sup>9</sup>

Daniel Oliveira Dantas 0000-0002-0142-891X<sup>10</sup>

Beatriz Trinchão Andrade 0000-0002-1407-8250<sup>11</sup>

JéSSica Mirella de Souza Gomes 0000-0003-4540-8459<sup>12</sup>

Cristiane Maria Carvalho Costa Dias 0000-0003-1944-3154<sup>13</sup>

Maria Fernanda Rios Grassi 0000-0002-7356-5569<sup>14</sup>

<sup>1</sup>Corresponding author. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Salvador). Bahia, Brazil. racheltrinchao@bahiana.edu.br,

<sup>2, 3, 12-14</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Salvador). Bahia, Brazil. elissasantos10@hotmail.com, relizabeth@bahiana.edu.br, nupi-jessicagomes@bahiana.edu.br, cmccdias@bahiana.edu.br, fernanda.grassi@fiocruz.br

<sup>4, 5</sup>Instituto de Pesquisas e Ensino na Área da Saúde - NUPEN (São Carlos). São Paulo, Brazil. marilia.mancini@dmcgroup.com.br, almeidalopes@nupen.com.br

<sup>6</sup>Universidade Federal da Bahia (Salvador). Bahia, Brazil. tfbarros@ufba.br

<sup>7-9</sup>Fundação Oswaldo Cruz (Salvador). Bahia, Brazil. carlos.regis@fiocruz.br, jacqueline.jesus@fiocruz.br, diogo.magalhaes@fiocruz.br

<sup>10, 11</sup>Universidade Federal de Sergipe (Aracaju). Sergipe, Brazil. ddantas@dcomp.ufs.br, beatriz@dcomp.ufs.br

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** *Candida spp* and *Malassezia spp* cause superficial infections that may be resistant to conventional treatments. Violet light-emitting diodes (LEDs) therapy is a therapeutic alternative. **PURPOSE:** To describe the protocol for evaluating the antifungal effect of violet LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm on *Candida spp* and *Malassezia spp in vitro*.

**PROTOCOL:** LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm are applied to a fungal suspension at fluences of 61.13 J/cm<sup>2</sup>, 91.70 J/cm<sup>2</sup>, and 183.39 J/cm<sup>2</sup>. The isolates are cultured for 48 to 72 hours. Colony forming units (CFUs) are quantified by visual counting and percent culture plate occupancy by digital analysis. Morphology is assessed by light microscopy and Gram staining, and yeast metabolism/function by transmission electron microscopy, assessment of reactive oxygen species, and DNA fragmentation. **DATA ANALYSIS:** the percentage of LEDs inhibition is calculated considering the growth of the negative control condition and the percentage of plate occupancy by yeasts by dividing the number of pixels classified as colonies by the total number of pixels on the plate. The morphological and functional aspects are described for the intervention and negative control. The ANOVA test is used to compare the mean percentages of growth inhibition and plate occupancy between the three fluences of LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm and the negative control. **ESTIMATED RESULTS:** We intend to determine the antifungal effect of the different fluences of LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm on *Candida spp* and *Malassezia spp*. The evaluation of other fungal species by this protocol should be investigated.

**Keywords:** Phototherapy. Antifungal agents. *Candida*. *Malassezia*.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** *Candida spp* e *Malassezia spp* causam infecções superficiais que podem ser resistentes aos tratamentos convencionais. A terapia com diodos emissores de luz violeta (LEDs) é uma alternativa terapêutica. **OBJETIVO:** Descrever o protocolo de avaliação do efeito antifúngico *in vitro* dos LEDs violeta 410 nm  $\pm$  10 nm sobre a *Candida spp* e *Malassezia spp*. **PROTOCOLO:** LEDs de 410 nm  $\pm$  10 nm são aplicados a uma suspensão fúngica em fluências de 61,13 J/cm<sup>2</sup>, 91,70 J/cm<sup>2</sup> e 183,39 J/cm<sup>2</sup>. Os isolados são cultivados por 48 a 72 horas. As unidades formadoras de colônias (UFCs) são quantificadas por contagem visual e a porcentagem de ocupação da placa de cultura por análise digital. A morfologia é avaliada por microscopia de luz e coloração de Gram, e o metabolismo/função da levedura por microscopia eletrônica de transmissão, avaliação de espécies reativas de oxigênio e fragmentação de DNA. **ANÁLISE DOS DADOS:** O percentual de inibição dos LEDs é calculado considerando o crescimento da condição de controle negativo e o percentual de ocupação da placa por leveduras, dividindo-se o número de pixels classificados como colônias pelo número total de pixels na placa. Os aspectos morfológicos e funcionais são descritos para a intervenção e controle negativo. O teste ANOVA é utilizado para comparar as porcentagens médias de inibição de crescimento e ocupação de placa entre as três fluências dos LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm e o controle negativo. **RESULTADOS ESTIMADOS:** Pretendemos determinar o efeito antifúngico das diferentes fluências de LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm sobre *Candida spp* e *Malassezia spp*. A avaliação de outras espécies de fungos por este protocolo deve ser investigada.

**Palavras-chave:** Fototerapia. Agentes antifúngicos. *Candida*. *Malassezia*.



## INTRODUCTION

Fungal infections affect more than one billion people each year<sup>1</sup> and are the fourth leading cause of human disease. *Candida* and *Malassezia* species are among the frequent causes of superficial fungal infections.<sup>2</sup> Vulvovaginitis is one of the most common genital infections in women and is manifested by vaginal discharge, itching, burning and/or stinging, dysuria, and dyspareunia.<sup>3</sup> *Candida albicans*, a saprophyte found in the vaginal mucosa, is the main species associated with vulvovaginitis.<sup>4</sup> However, nonalbicans *Candida* species, including *C. glabrata*, also cause vulvovaginitis in HIV-infected women.<sup>5</sup> Although vulvovaginitis is usually sporadic and associated with mild to moderate symptoms, the infection may recur in some women and responds poorly to conventional treatment.<sup>6</sup>

The genus *Malassezia* includes lipophilic and lipodependent fungi.<sup>7</sup> To date, 18 species of *Malassezia*<sup>8</sup> are known. *Malassezia spp* is considered one of the most common skin inhabitants in warm-blooded animals.<sup>9</sup> *M. globosa* and *M. restricta* are involved in the development of seborrheic dermatitis/dandruff (SD/D) and *M. sympodialis* is associated with atopic dermatitis.<sup>10</sup> Seborrheic dermatitis occurs in 2% to 5% of the general population and affects 20% to 83% of immunocompromised individuals with HIV and HTLV.<sup>11-13</sup>

Azole antifungals are the first-line agents for the treatment of superficial infections with *Candida spp* and *Malassezia spp*. However, the long duration of treatment and the need for special long-term skin/mucosal care limit the efficacy of the proposed methods.<sup>14,15</sup> The inability to control the recurrence of fungal infection leads to anxiety and irritation, which aggravates the symptoms and prevents a better prognosis of the pathology.<sup>16-18</sup>

Violet/blue LED has shown antifungal activity in vitro and beneficial biological effects on skin inflammation in vivo.<sup>19,20</sup> The LED causes excitation of endogenous intracellular porphyrin present in the fungus, which acts as a photosensitizer. The absorption of photons leads to the production of reactive oxygen species, which eventually leads to cell death.<sup>19,21</sup> The wavelength of violet/blue LED ranges from 380 to 495 nm, the therapeutic window with lower penetration into the skin, as it mainly reaches the epidermis<sup>22</sup>, the layer where superficial mycoses occur.<sup>2</sup> This study describes the experimental protocol to evaluate the in vitro antifungal effect of violet light-emitting diodes (LEDs) (410 nm  $\pm$  10 nm) on *Candida spp.* and *Malassezia spp.*

## METHODS

### Study protocol

The protocol was designed to study *in vitro* the antifungal effect of violet light-emitting diodes (LEDs) 410 nm  $\pm$  10 nm on yeast. The study is conducted at the research laboratory Núcleo de Pesquisa e Inovação - NUPI (Research and Innovation Center) at the Bahiana School of Medicine and Public Health (EBMSP) in Salvador-Bahia-Brazil.

### Ethical considerations

Submission to the Institutional Research Board is waived because no human subjects are involved. The study is registered in the Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen (National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge) (SisGen AE39DE1 and AED7762).

### LEDs equipment 410 nm $\pm$ 10 nm

The LED device used is the cluster e-light V of the brand DMC Equipamentos Ltda. (São Carlos, Brazil), which has an array of 8 violet LEDs with a light emission wavelength of 410 nm  $\pm$  10 nm and a power of 480 mW per emitter. The device is registered with the Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (National Health Surveillance Agency) (registration 80030810174).

### Isolates of *Candida* and *Malassezia* species

The isolates of *Candida* spp used were obtained from the Clinical Analysis Laboratory Jaime Cerqueira, Salvador, Brazil, and are seeded in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) culture. The isolates of *Malassezia* spp used were obtained from the School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Universidade Federal da Bahia (UFBA), and are seeded in SDA culture medium plus 1% olive oil.

### Culture and expansion of yeast isolates.

First, yeast are seeded in a class 2 biological safety cabinet with a 10  $\mu$ L microbiology loop in 90x15mm sterile Petri dishes containing 20 mL SDA with chloramphenicol (Neogen, Lansing Michigan, United States). For *Malassezia* spp. cultures, 1% extra virgin olive oil with 0.50% acidity (Gallo, Abrantes, Portugal) is added to the culture medium. The plates are then incubated in a Quimis® oven at 36  $\pm$  2°C for 48 hours and at 33  $\pm$  2°C for 72 hours for *Candida* spp.<sup>20</sup> and *Malassezia* spp.<sup>23</sup>, respectively. To prepare the suspension, remove well-defined,

ovoid yeast colonies from the Petri dishes using a 10  $\mu$ L microbiology loop and place them in an 8-mm glass tube containing 4 mL of 0.85% saline. Then mix the colonies in a vortex and adjust the turbidity to 0.5 McFarland (McF), which corresponds to  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL in the DEN -1 turbidimeter (McFarland Densitometer, Biosan).

### **LEDs application**

Use LEDs on 60 x 15 mm Petri dishes (CRAL®, Cotia, Brazil) containing 5 mL yeast suspension ( $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) in a biological safety cabinet. Irradiate the plates with LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm for 10 (T1), 15 (T2), and 30 (T3) minutes, corresponding to fluence of 61.13 J/cm<sup>2</sup>, 91.70 J/cm<sup>2</sup>, and 183.39 J/cm<sup>2</sup>, respectively. These fluences were adjusted after initial experiments based on the study described elsewhere.<sup>24</sup>

According to the manufacturer's instructions, a 5-minute break is taken every 10 minutes to allow the instrument to cool. The positive control consists of a yeast suspension in the presence of an antifungal agent with a 50% growth inhibitory concentration (IC50). The negative control (C-) consists of the yeast suspension without any type of intervention. After the intervention, 50  $\mu$ L of the suspension of each condition is added in triplicate to 90 x 15 mm Petri dishes containing ASD medium with chloramphenicol (*Candida spp.*) and enriched with 1% olive oil for *Malassezia spp.* cultures. The solutions are spread with a sterile disposable L-shaped spreader bar. The culture plates containing *Candida spp.* are incubated at  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  for 48 hours, whereas those containing *Malassezia spp.* are incubated at  $33 \pm 2^\circ\text{C}$  for 72 hours. Colony forming units (CFUs) are then quantified by visual counting and the percentage of occupancy of the culture plate is determined by digital analysis. Morphology is assessed by light microscopy and Gram stain, and metabolism/function by transmission electron microscopy and DNA fragmentation. The experiments are repeated 3 times.

### **Morphological evaluation**

CFUs are examined macroscopically for shape (circular, ovoid, or fusiform), color (white, yellowish-creamy), brightness (light, opaque), surface (smooth or rough), and elevation (flat, convex, roof-shaped).<sup>25</sup> Homogeneity of growth is assessed by the distribution of colonies on the surface of the medium. For microscopic evaluation of yeast, a CFU in a delineated quadrant of plate 1 of each condition is randomly selected for preparation of a new slide and Gram staining. Slides are prepared by placing the selected CFU in 10  $\mu$ L of 0.85% saline on a glass slide. For fresh slides, the solution is immediately covered with a coverslip. In addition, after

the suspension dries, the slides are subjected to Gram staining to exclude bacterial contamination of the plates.<sup>4,26</sup> The slides are viewed under a light microscope (Olympus® CX22LED, Tokyo, Japan) with a 100x magnification objective, photographed, and examined for cell morphology, staining, and the presence of pseudomycelium.

#### **Quantification of colony forming units (CFU).**

CFU is counted in the quadrant previously drawn on the bottom of the Petri dish with a permanent marker. The CP 608 colony counter (PHOENIX® Equipamentos Científicos, Araraquara, Brazil) is used to identify budding and/or converging CFUs.

#### **Evaluation of the colony occupation rate of the culture plate.**

Triplicate plates of each condition are identified and placed without cover in front of a dark background in the biological safety cabinet with cold light off. Digital images are captured using smartphone's rear camera, without flash or zoom. The images are transferred to a computer in JPEG (Joint Photographic Experts Group) format so that the percentage of surface occupied by yeast can be calculated. Only plates with a homogeneous growth distribution in the Petri dish are considered. To determine the areas of the culture medium and the fungal colony, the image is converted to gray scale and segmented by thresholding. The threshold used is 160, i.e., values above this intensity are considered as colonies and the others as background group.<sup>27</sup>

#### **Transmission electron microscopy**

Cells are fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, and postfixed in 1.5% potassium permanganate for 1 hour while protected from light. Samples are dehydrated in an acetone series and embedded in Spurr resin (Ted Pella, Redding, CA). Ultrathin sections were imaged on a 400-mesh copper grid and contrasted in 5% uranyl acetate and 3% lead citrate. Ultrastructural analysis is performed using a Zeiss109 transmission electron microscope at 80 kV.<sup>28</sup> Ultrastructural changes in the cytoplasmic organelles as well as the elemental chemical composition of fungal cells will be visualized.

#### **DNA fragmentation assay**

The DNA fragmentation assay was performed to evaluate the integrity of the genetic material. The assay was performed according to the protocol described elsewhere by Wi et al, 2012.<sup>21</sup> Briefly, yeast colonies were suspended in 500 µL of lysis buffer [100 mM Tris-HCl, pH 8.0,

sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.5%, 250 mM NaCl, 30 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0] and vortex mixed for 10 s, then incubated at 100° C for 15 min. Then, 500 µL of 3.0 M sodium acetate is added and incubated at -20°C for 10 min. The protein in the supernatant is removed with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1). DNA is precipitated with an equal volume of isopropanol, washed with 500 µL of 70% ethanol, dried, and mixed with 20 µL of TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). DNA samples are analyzed in a 1% agarose gel.

### **Assessment of reactive oxygen species (ROS)**

Cells are harvested, seeded per well in 1 ml supplemented medium, and then exposed to LED application at the indicated fluences. Samples are then washed with sterile saline and incubated with SYTO-61 at a concentration of 0.5 µM (for DNA staining) and CellROX green probe (for ROS staining) for 30 minutes in the dark. Samples are washed and placed in polypropylene tubes. Cells are resuspended in 1 mL of isotonic diluent. At least 10,000 events are recorded using a BD LSRFortessa™ Cell Analyzer (BD, New Jersey, USA). ROS are identified using the FITC channel (gain of 500 V) and cells identified by SYTO-61 staining are quantified using the APC channel (gain of 450 V). Cells are detected with a two-dimensional dot plot between the APC channel (gain of 562 V) and the FSC channel (gain of 150 V). A second gate is generated by a two-dimensional dot plot between the APC and FTIC channels (gain of 320 V) to select viable cells that are positive for the ROS.

### **Data analysis**

The inhibition rate of each of the interventions (LEDs 61.13 J/cm<sup>2</sup>, 91.70 J/cm<sup>2</sup>, and 183.39 J/cm<sup>2</sup>) is calculated based on the percentage decrease in the mean value of colonies compared with the negative control. The percentage of occupancy of the plate by yeast is determined from a digital image of the plate by dividing the number of pixels classified as colonies by the total number of pixels on the plate using an image analysis tool (PetriNote).<sup>27</sup>

The ANOVA test is used to compare the mean percentages of growth inhibition and plate occupancy between the three fluences of LEDs 410 nm ± 10 nm and the negative control. A P value less than 0.05 is considered significant. Database, descriptive and analytical analysis is performed using GraphPad Prisma 9.4.0 software for Windows.

### **Estimated Results**

The results of this protocol will allow to determine the antifungal effect of the different fluences of LEDs 410 nm  $\pm$  10 nm on *Candida spp.* and *Malassezia spp. in vitro*. The evaluation of other fungal species by this protocol should be investigated.

#### **AUTHOR'S CONTRIBUTION**

Ribeiro RTSK, Santos ES, Dias CMCC, Grassi MFR, Mascarenhas REM, Barros TF, Mancini MW, and Lopes LA participated in the literature survey and discussion of the research project. Ribeiro RTSK, Santos ES, Grassi MFR, Mascarenhas REM, Gomes JMS, Silva JJ, Regis CG, Moreira DRM, Dantas DO, and Andrade BT developed the initial design of the project and participated in its methodological construction. Dias CMCC and Grassi MFR performed the critical review of the project and approved the final text.

#### **CONFLICTS OF INTEREST**

No financial, legal or political conflicts involving third parties (government, corporations and private foundations, etc.) have been declared for any aspect of the submitted work (including, but not limited to grants and funding, advisory board participation, study design, preparation of manuscript, statistical analysis, etc.).

#### **INDEXERS**

The Journal of Evidence-Based Healthcare is indexed by DOAJ.

#### **REFERENCES**

1. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012;4(165):165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>
2. Hay R. Superficial fungal infections. *Med (United Kingdom).* 2017;45(11):707-10. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.08.006>

3. Linhares IM, Amaral RLG, Robial R, Eleutério Junior J. Vaginites e vaginoses: Protocolos Febrasgo – Ginecologia, nº 24. [Internet]. São Paulo: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia; 2018. Available from: [https://www.febrasgo.org.br/images/pec/Protocolos-assistenciais/Protocolos-assistenciais-ginecologia.pdf/NOVO\\_Vaginites-e-Vaginoses.pdf](https://www.febrasgo.org.br/images/pec/Protocolos-assistenciais/Protocolos-assistenciais-ginecologia.pdf/NOVO_Vaginites-e-Vaginoses.pdf)
4. Vicente MF, Basilio A, Cabello A, Peláez F. Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(1):15-32. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00489.x>
5. Oliveira PM, Mascarenhas RE, Lacroix C, Ferrer SR, Oliveira RPC, Cravo EA, et al. *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(3):239-44. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702011000300010>
6. Boatto HF, Girão MJBC, Moraes MS, Francisco EC, Gompertz OF. The role of the symptomatic and asymptomatic sexual partners in the recurrent vulvovaginitis. *Rev Bras Ginecol e Obstet.* 2015;37(7):314-8. <https://doi.org/10.1590/S0100-720320150005098>
7. Maraschin MM, Spader T, Alves D, Mario N, Rossato L, Lopes PGM. Infections by malassezia: new approaches. *Saúde (Santa Maria).* 2008;34(1 e 2):4-8. <https://doi.org/10.5902/223658346488>
8. Lorch JM, Palmer JM, Vanderwolf KJ, Schmidt KZ, Verant ML, Weller TJ, et al. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia.* 2018;41:56-70. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.04>

9. Grice EA, Dawson TL 23<sup>\*</sup>Jr. Host-microbe interactions: Malassezia and human skin. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:81-87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.024>
10. Prohic A, Sadikovic TJ, Krupalija-Fazlic M, Kuskunovic-Vlahovljak S. Malassezia species in healthy skin and in dermatological conditions. *Int J Dermatol.* 2016;55(5):494-504. <https://doi.org/10.1111/ijd.13116>
11. Sobral AL, Sampaio B, Cristina Â, Mameri A, Jeunon De Sousa Vargas T, Ramos-E-Silva M, et al. Seborrheic dermatitis. *Continuing Medical Education. An Bras Dermatol.* 2011;86(6):1061–74. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600002>
12. Martin F, Taylor GP. Prospects for the management of human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *AIDS Rev.* 2011;13(3):161-70. Cited: PMID: 21799534.
13. Schierhout G, McGregor S, Gessain A, Einsiedel L, Martinello M, Kaldor J. Association between HTLV-1 infection and adverse health outcomes: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(1):133-43. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(19\)30402-5](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30402-5)
14. Nishimoto AT, Sharma C, Rogers PD. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(2):257-270. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz400>
15. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Aneke CI, Otranto D, Cafarchia C. Conventional therapy and new antifungal drugs against Malassezia infections. *Med Mycol.* 2021;59(3):215-234. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa087>



16. Sparber F, Ruchti F, LeibundGut-Landmann S. Host Immunity to *Malassezia* in Health and Disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:198. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00198>
17. Xuan M, Lu C, He Z. Clinical characteristics and quality of life in seborrheic dermatitis patients: a cross-sectional study in China. *Health Qual Life Outcomes.* 2020;18:308. <https://doi.org/10.1186/s12955-020-01558-y>
18. Willems HME, Ahmed SS, Liu J, Xu Z, Peters BM. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. *J Fungi (Basel).* 2020;6(1):27. <https://doi.org/10.3390/jof6010027>
19. Moorhead S, Maclean M, MacGregor SJ, Anderson JG. Comparative Sensitivity of *Trichophyton* and *Aspergillus Conidia* to Inactivation by Violet-Blue Light Exposure. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(1):36-41. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.3922>
20. Demitto FO, Amaral RCR, Biasi RP, Guilhermetti E, Svidzinski TIE, Baeza LC. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. in vitro among patients from Reginal University Hospital of Maringá-PR. *J Bras Patol Med Lab.* 2012;48(5):315-21. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000500003>
21. Wi HS, Na EY, Yun SJ, Lee JB. The antifungal effect of light emitting diode on *Malassezia* yeasts. *J Dermatol Sci.* 2012;67(1):3-8. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.04.001>
22. Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med Sci.* 2017;32(8):1909–18.

23. Carrillo-Muñoz AJ, Rojas F, Tur-Tur C, Sosa MA, Diez GO, Espada CM, et al. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. *Mycoses*. 2013;56(5):571-75. <https://doi.org/10.1111/myc.12076>
24. Robatto M, Pavie MC, Tozetto S, Brito MB, Lordêlo P. Blue Ligth Emitting Diode in Treatment of Recurring Vulvovaginal Candidiasis: a Case Report. *Brazilian J Med Hum Heal*. 2017;5(4):162–8. <https://doi.org/10.17267/2317-3386bjmhh.v5i4.1472>
25. Yarrow D. Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeast. In: Kurtzman CP, Fell JW, editors. *The Yeasts - A Taxanomy Study*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Publishers; 1998. p. 77-100. <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50014-9>
26. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil), Organização Pan-Americana da Saúde. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: norma aprovada [Internet]. 2nd. ed. Pennsylvania; 2002. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mis-16205>
27. Gonzalez RC, Woods RE. *Digital image processing*. 3rd. ed. New Jersey: Prentice Hall; 2008.
28. Gomes-Junior RA, Silva RS, Lima RG, Vannier-Santos MA. Antifungal mechanism of [RuIII(NH3)4catechol]<sup>+</sup> complex on fluconazole-resistant *Candida tropicalis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2017;1;364(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx073>

## ANEXO 2 – ORIENTAÇÕES DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO RELACIONADOS AO TEMA

# CERTIFICADO

Certificamos que **Profa. Rachel Trinchão Schneiberg Kalid Ribeiro, Prof. Pietro Araujo dos Santos e Prof. Vitor Sotero dos Santos** participaram como membros da **Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso** intitulado **“TERAPIA FOTODINÂMICA NO TRATAMENTO DE AFECÇÕES CUTÂNEAS INFLAMATÓRIAS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA”**, elaborado por **Priscila da Silva Britto**, aluna do curso de Fisioterapia do Centro Universitário UniRuy, realizado sob orientação da **Profa. Rachel Trinchão Schneiberg Kalid Ribeiro**.

**Salvador, 10 de junho de 2020.**



**Pietro Araujo dos Santos**  
Coordenador Acadêmico dos Cursos de Fisioterapia e Radiologia

CENTRO UNIVERSITÁRIO  
**UniRuy**

# CERTIFICADO



**BAHIANA**  
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

Este documento foi gerado eletronicamente em Salvador, Bahia, Brasil, em 06 de Setembro de 2021, às 14:02:14. Para verificar as assinaturas vá ao site <http://portal.bahianaeducacao.gov.br> e utilize o código 7974-23048-7202-1402.

Certificamos que **Rachel Trinchão Schneiberg Kalid Ribeiro** orientou em 2021, o Trabalho de Conclusão de Curso – TCC, em Fisioterapia, da aluna Clara Costa Silva, sobre o tema: **“Recursos eletrotermofototerapêuticos com efeito antifúngico para o gênero malassezia: revisão”**.

**Salvador, 06 de setembro de 2021.**

**Prof.ª Luciana Ribeiro Bittávia**  
Coordenadora do Curso  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

**CERTIFICADO**



**BAHIANA**  
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA


Certificamos que *Rachel Frinçhão Schneiberg Kalid Ribeiro* orientou em 2021, o Trabalho de Conclusão de Curso – TCC, em Fisioterapia, da aluna Júlia Maynard de Oliveira, sobre o tema: “Eficácia da fototerapia UV free nas onicomicoses: uma revisão sistemática”.

Salvador, 19 de janeiro de 2022.

*Prof.<sup>a</sup> Luciana Ribeiro Bilitário*  
Coordenadora do Curso  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Este documento foi assinado digitalmente por Vera Lucia Martins Do Rosário.  
Para verificar as assinaturas vá ao site <https://bahianadocidaco.portofoliosassinaturas.com.br> e utilize o código E0FD-1720-4D1F-7299.

**CERTIFICADO**



**BAHIANA**  
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

Certificamos que *Rachel Frinçhão Schneiberg Kalid Ribeiro* orientou em 2022, o Trabalho de Conclusão de Curso – TCC, em Fisioterapia, da aluna Sarah de Oliveira Souza, sobre o tema: “Qualidade de vida em adultos com dermatite seborreica: revisão sistemática”.

Salvador, 27 de janeiro de 2023.

*Prof.<sup>a</sup> Luciana Ribeiro Bilitário*  
Coordenadora do Curso  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Este documento foi assinado digitalmente por Vera Lucia Martins Do Rosário.  
Para verificar as assinaturas vá ao site <https://bahianadocidaco.portofoliosassinaturas.com.br> e utilize o código 7425-CF18-2118-431C.

## ANEXO 3 – APRESENTAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

**11º CONGRESSO INTERNACIONAL DE FISIOTERAPIA**

**BIOFOTOMODULAÇÃO NO TRATAMENTO DE DERMATITES: UMA REFLEXÃO CIENTÍFICA**

MsC. Rachel Trinchão (BA)

@rachelts78

**XVIII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**  
**Lista de trabalhos**  
**Categoria Comunicação Oral**

**XX MOSTRA CIENTÍFICA E CULTURAL DA BAHIANA**  
 20 e 21 de novembro, às 8h

2020098	Júlia Maynart de Oliveira	Maria Fernanda Grassi	FISIOTERAPIA	EFICÁCIA DA FOTOTERAPIA UV FREE NAS ONICOMICOSSES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA	PROJETO DE PESQUISA	PIBIC 08
---------	---------------------------	-----------------------	--------------	--	---------------------	----------

**XXII MCC**  
 XXII MOSTRA CIENTÍFICA E CULTURAL DA BAHIANA

**FORMAÇÃO EM SAÚDE: UM ATO POLÍTICO EM DEFESA DA VIDA.**

**RELAÇÃO DE TRABALHOS CIENTÍFICOS APROVADOS**

**MODALIDADE: PESQUISA**

**SALA 9**

LINK DE ACESSO: <https://bahiana-edu-br.zoom.us/j/93903667404>

17h30 às 17h50	FISIOTERAPIA	QUALIDADE DE VIDA EM ADULTOS COM DERMATITE SEBORREICA: REVISÃO SISTEMÁTICA	SARAH DE OLIVEIRA SOUZA	260827
----------------	--------------	--	-------------------------	--------