

Recebido em 02/2012. Aceito para publicação em 11/2012.

AÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO DERMATÓFITO *TRICHOPHYTON RUBRUM*

ACTION OF LOW INTENSITY LASER ON THE PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES OF *TRICHOPHYTON RUBRUM*

Idália Aparecida Waltrick de Brito Siqueira¹

Milton Beltrame Junior²

Maria Belén Salazar Posso³

Newton Soares da Silva⁴

RESUMO: A ação do laser arseneto de gálio alumínio (GaAIs), nos comprimentos de onda 685nm e 830nm em cultura de *Trichophyton rubrum*, foi estudada visando a obter os metabólitos secundários e avaliar a sua citotoxicidade em cultura de células. Foram utilizadas cepas do dermatófito *T. rubrum*, provenientes do laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Paraíba. O cultivo foi realizado em meio de cultura sólido de ágar Sabouraud (Merck, Alemanha) em placa de Petri. A colônia de *T. rubrum* foi irradiada com o laser (GaAIs) a uma distância de 1cm da placa e incubada em estufa 26 °C. Para o ensaio de citotoxicidade, foi utilizada a linhagem celular L929 (tecido conjuntivo de camundongo), proveniente do laboratório Adolf Lutz, de São Paulo. As células foram plaqueadas e incubadas com o extrato fúngico em diferentes concentrações, por uma hora. Após essa incubação, foi realizado o teste de Metil tiazol tetrazólio (MTT) para avaliação da citotoxicidade. Obteve-se uma diferença no crescimento das colônias-controle e irradiadas a 685 nm estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Na análise estatística comparativa da citotoxicidade causada pelos extratos nas concentrações 2,5 mg/ml e 25×10^{-6} mg/ml, foi obtido $p < 0,05$, o mesmo ocorreu entre as concentrações 25×10^{-2} mg/ml e 25×10^{-6} mg/ml. Na concentração de 25×10^{-2} mg/ml, observa-se uma elevação considerável (78,55%) na atividade mitocondrial dos grupos com tratamento, em relação ao controle. O laser GaAIs, nas condições metodológicas deste estudo, apresentou efeitos no metabolismo celular, alteração de morfologia e da taxa de crescimento da colônia in vitro. O extrato fúngico das colônias irradiadas apresentou efeito bioestimulador quando comparado ao extrato obtido do grupo controle e sem tratamento com laser.

Palavras-chave: laser; *Trichophyton rubrum*; citotoxicidade.

ABSTRACT: The action of aluminum gallium arsenide laser (GaAIs), at wavelengths of 685 nm and 830 nm was studied to obtain the secondary metabolites and to evaluate the cytotoxicity in cell culture of *Trichophyton rubrum*. Strains of the dermatophyte *T. rubrum* were used from the microbiology laboratory at the Universidade do Vale do Paraíba. The culture was grown in solid medium Sabouraud agar (Merck, Germany) in Petri dishes. The colony of *T. rubrum* was irradiated with the laser (GaAIs) at a distance of 1 cm from the plate and incubated at 26 °C. For the cytotoxicity assay, the cell line L929 (mouse connective tissue) from the Adolfo Lutz laboratory in Sao Paulo was used. Cells were plated and incubated with the fungal extract in different concentrations for 1 h. After this incubation, methyl thiazol tetrazolium (MTT) testing was performed to evaluate cytotoxicity. The difference in growth of the control and the colony irradiated at 685 nm was statistically significant ($p < 0.05$). In comparative statistical analysis of the cytotoxicity caused by the extracts at concentrations of 2.5 mg/ml and 25×10^{-6} mg/ml, $p < 0.05$ was obtained, and the same occurred between 25×10^{-2} mg/ml and 25×10^{-6} mg/ml concentrations. At the concentration of 25×10^{-2} mg/ml, a significant increase (78.55%) was observed in mitochondrial activity of treated groups compared to control. The GaAIs laser, under the methodological conditions of this study, affected cell metabolism, changed morphology, and altered the rate of colony growth in vitro. The extract of irradiated fungi had a biostimulative effect compared with the extract obtained from fungi without laser treatment.

Keywords: laser; *Trichophyton rubrum*; cytotoxicity.

¹ Doutoranda em Engenharia Biomédica - Universidade do Vale do Paraíba - Univap. E-mail: idaliasiqueira@yahoo.com.br.

² Doutor em Química - Universidade de São Paulo - USP e Professor Integral da Univap. E-mail: beltrame@univap.br.

³ Doutora em Enfermagem - Universidade de São Paulo - USP e Professora Integral da Univap. E-mail: mbelen@terra.com.br.

⁴ Doutor em Biociências e Biotecnologia - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF e Professor Integral da Univap. E-mail: nsoares@univap.br.

1. INTRODUÇÃO

Toda e qualquer micose se inicia pela infiltração no hospedeiro, de um fungo apto ao parasitismo. Os fungos estabelecem processos que diversificam em extensão e em tipo anatomopatológico (LACAZ *et al.*, 2002).

O aumento de casos de micoses constitui um relevante problema de saúde pública, que afeta grande parte da população mundial, podendo comprometer a qualidade de vida (RODRIGUES, 2007).

Os dermatófitos possuem a capacidade de afetar tecidos queratinizados de humanos e outros animais, como pele, pêlos e unhas (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995), utilizando-os como material nutritivo. Mas, por outro lado, geram elastases, que lhes permitem conduzir-se sobre a elastina, o que também auxilia na sua instauração (TRABULSI *et al.*, 1999). No tecido cutâneo, normalmente os dermatófitos provocam lesões descamativas arredondadas, com eritemas nas bordas, com tendência à cura central. As unhas adquirem coloração branca amareladas com aspecto poroso e quebradiço (MARCHISIO; PREVE; TULLIO, 1996).

Os dermatófitos são classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, semelhantes em sua morfofisiologia, imunologia e taxonomia (LACAZ; MARTINS; PORTO, 1991; REZENDE *et al.*, 2008; SANTOS; SAMPAIO; PINHEIRO, 2006). *Trichophyton rubrum* é um fungo filamentoso que infecta os tecidos queratinizados, como pele, cabelos e unhas, é o agente mais comum de dermatomicoses do mundo (ALY *et al.*, 2001; ARENAS; DOMINGUEZ-CHERIT; FERNANDEZ, 1995; ELEWSKI, 2000; NWEZE, 2001).

Lacaz *et al.* (2002) relatam, em estudo *in vitro*, que, ao examinar o *T. rubrum* diretamente do material clínico, nota-se a presença de hifas septadas hialinas. As colônias de coloração branca e textura algodonosa, com pregas radiais na vista frontal e no reverso pigmentadas de vermelho, apresentaram crescimento lento (CERVELATTI *et al.*, 2004).

Os tratamentos para dermatomicoses constituem em debridamento químico e mecânico, tratamento farmacológico antifúngico tópico e sistêmico, ou uma associação de ambos. Essas opções de tratamento nem sempre são satisfatórias devido ao alto custo e eficácia (FINCH; WARSHAW, 2007). Os efeitos colaterais das medicações e a dificuldade de aplicação de medicações tópicas são fatores que comprometem o tratamento (LESHER, 1999; KOEHLER; MAIBACH, 2001).

A persistência de uma infecção fúngica não é rara e resulta em altos custos com o tratamento (ELEWSKI, 2000; JOISH; ARMSTRONG, 2001; SCHER, 1999). Os antifúngicos sistêmicos são considerados mais eficazes apesar do período longo, porém estudos demonstraram um elevado número de casos de recidiva após cinco anos de tratamento (SIGURGEIRSSON *et al.*, 2002; TOSTI *et al.* 1998). Pode ocorrer uma melhora do quadro clínico durante o tratamento, uma falsa cura que pode ser a causa de interrupção do tratamento (ZAITZ *et al.*, 1998).

Segundo Sabino, Inomata e Lamarco (1982), certos fungos são aptos a gerar metabólitos secundários que são tóxicos e algumas vezes, cancerígenos para o ser humano.

Os lasers de baixa intensidade têm sido utilizados na área de saúde, para o

tratamento clínico de processos inflamatórios, na biomodulação celular e alívio da dor, devido ao seu efeito antiinflamatório, na melhora da regeneração tecidual (BORATO *et al.*, 2008; ROCHA, 2003; SILVEIRA; NICOLAU, 2007), e pesquisas *in vitro* recentes têm enfatizado o uso do laser de baixa intensidade para o tratamento de dermatomicoses. Alguns autores relataram uma inibição significativa do crescimento do *T. rubrum* após a laserterapia (VURAL *et al.*, 2008; KOZAREVE; VIZINTIN, 2010; MANEVITCH *et al.*, 2010).

Porém, há uma escassez de pesquisas sobre o efeito do laser no tratamento de dermatomicoses, fazem-se necessários estudos que enfatizem a ação do laser em microrganismos (HEES; RAULIN; BÄUMLER, 2012). Nesse sentido, esta pesquisa objetiva verificar se o laser GaAIAs de baixa intensidade, emitindo no vermelho visível 685 nm e no infravermelho 830 nm, influencia no crescimento e na produção de metabólitos secundários do *T. rubrum*, além de verificar os efeitos desses metabólitos secundários em cultura de células L929.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cepas do dermatófito *T. Rubrum*, provenientes do laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Paraíba.

2.1 Método de cultivo

O cultivo do *T. rubrum* foi realizado em meio de cultura sólido de ágar Sabouraud (Merck Alemanha), dextrose 4% em placas

de Petri.

O repique do fungo foi realizado com o auxílio de uma alça em L, por meio da remoção de um pedaço de área de 1cm², com formato quadrado da borda distal do halo, de uma colônia crescida por nove dias. Esse pedaço foi utilizado como inóculo para placas contendo o mesmo meio. Para isso, ele foi colocado no centro dessas placas, as quais foram incubadas por 15 dias a 26 °C, com pouca luz. Nove placas foram inoculadas a partir de uma única placa mãe.

2.2 Método de irradiação

As placas foram identificadas e nomeadas para a realização do experimento, sendo três placas para o grupo controle, três para o grupo irradiado a 685 nm e três para o grupo irradiado a 830 nm.

Para a irradiação, foi utilizado o aparelho Thera lase® (DMC, Ribeirão Preto, Brasil), com emissão na região visível (685 nm) e na região infravermelha (830 nm) do espectro eletromagnético. Ambos os comprimentos de onda apresentavam os mesmos parâmetros de irradiação: potência de 35mW, irradiação por fibra óptica de 600µm, densidade de potência de 0,04W/cm², densidade de energia (fluência) de 4J/cm², tempo de irradiação de 1min e 55s e energia de 4,6J. A colônia de *T. rubrum* foi irradiada com o laser (GaAIAs) a uma distância de 1cm da placa e incubadas em estufa 26 °C e o crescimento foi observado diariamente.

2.3 Método de mensuração da colônia

O crescimento do *T. rubrum* irradiado, ou não, foi mensurado diariamente durante

15 dias. A mensuração foi realizada com régua metálica milimetrada, com variação de 0,5mm, devido à imprecisão desse instrumento de medida.

Os aspectos macroscópicos das colônias foram registrados com o uso de uma câmera digital (SONY/Cyber-shot DSC-P93A), no 15º dia após a irradiação.

2.4 Método de extração dos metabólitos

O método de extração foi realizado conforme descrito por Gupta (2000). As culturas de *T. rubrum* irradiadas ou não foram extraídas, por meio de maceração, em 100ml da solução de metanol, clorofórmio e ácido acético, na proporção de 50:50:1 (vol/vol/vol). O extrato foi filtrado em lã de vidro e, posteriormente, submetido à evaporação rotativa à baixa pressão. O resíduo oleoso obtido foi extraído com 50ml de acetonitrila, por 5 minutos, e filtrado em lã de vidro. O solvente foi removido por evaporação rotativa à baixa pressão a 40 °C. O resíduo seco obtido foi misturado com 5ml de acetonitrila no vórtex. Posteriormente, foi seco em estufa a 30 °C por 72h, pesado e armazenado em frascos de vidro protegidos da luz.

2.5 Método de ensaio Metil tiazol tetrazólio (MTT)

Foram utilizadas células da linhagem celular L929 (tecido conjuntivo de camundongo), provenientes do Laboratório Adolf Lutz, São Paulo. O meio de cultura utilizado foi o Meio Mínimo Essencial (MEM) adicionado 10% Soro Fetal Bovino (SFB). As células foram descongeladas e mantidas em garrafas de culturas, em estufa, a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂. Para testes

com o extrato fúngico, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas novamente na estufa por 24h, para adesão.

O extrato fúngico dos grupos irradiados ou não foi diluído em Dimetil Sulfóxido (DMSO) sob agitação manual, onde a concentração final dos extratos foi de 25 mg/ml. As células L929 plaqueadas foram ensaiadas com os extratos. O meio de cultura de cada poço foi removido e foram adicionados 180µl de Tampão salino-fosfato (PBS). Foram adicionadas, então, 20µl dos extratos no primeiro poço, e realizada uma diluição seriada. Células sem adição dos extratos (somente com 200µl de PBS) foram utilizadas como controle. Em seguida, as placas foram incubadas, em estufa, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ por 1h. Após esse período, a solução de PBS (com ou sem extrato) foi aspirada e descartada. Foram, então, adicionados 200µl da solução de MTT em todos os poços da placa de cultura, a qual foi incubada novamente.

Após o período de uma hora, a solução de MTT foi aspirada e descartada e foram adicionados 200µl de DMSO em todos os poços. Em seguida, a placa foi agitada por 30min, a 37 °C, e levada ao espectrofotômetro (SpectraCount, Packard), para leitura a 570 nm.

2.6 Método de análise

Os resultados foram digitados e tabulados eletronicamente, analisados quantitativamente e representados em forma de gráficos. Para análise descritiva e de correlação dos dados obtidos, foi utilizado o programa Microsoft Excel® 2007 e Origin versão 7.0 para o cálculo das médias e desvios-padrão de todas as variáveis anali-

sadas, que serão apresentados em forma de gráficos. Para comparar as médias das variáveis e identificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, os ensaios foram analisados por ANOVA, seguidos de Tukey, utilizando-se o software Bioestat 5.0. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$ (VIEIRA, 1991).

3. RESULTADOS

Após o acompanhamento das colônias, foram constatadas alterações de

crescimento, topografia, textura e pigmentação.

Em média, as colônias irradiadas, com 685 nm e 830 nm, apresentaram taxa de crescimento superior quando comparado com o grupo controle. Ambas superaram uma diferença no crescimento de 29,2% e 16,0%, respectivamente, ao final de 15 dias (Fig. 1). Observa-se uma diferença no crescimento das colônias-controle e irradiadas a 685 nm com significância estatística ($p < 0,05$).

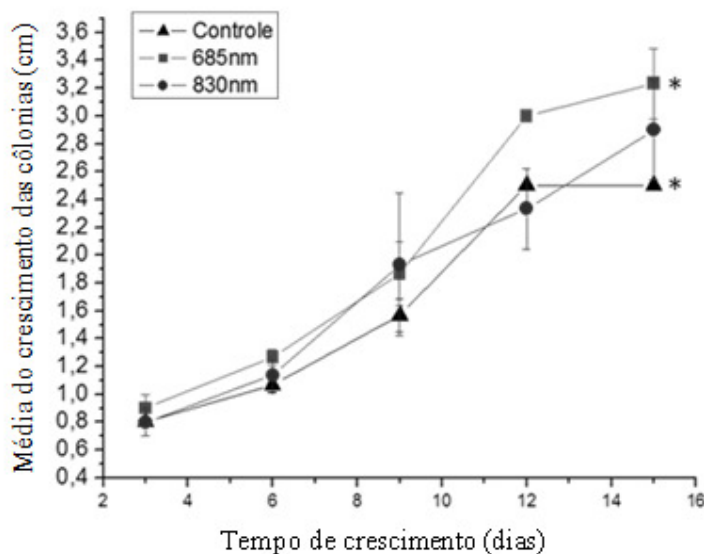


Fig. 1 - Crescimento das colônias. O diâmetro de cada colônia foi mensurado com uma régua e o resultado é dado em centímetros por dia de cultura como média e desvio padrão de triplicatas. * $p < 0,05$.

As culturas de *T. rubrum* das placas-controle apresentaram os aspectos característicos de cultura para esse microrganismo, como coloração branca, região apicular no centro, textura

algodonosa, com infiltração no meio de cultivo, e bordas regulares (Fig. 2). No reverso da colônia, foi observada pigmentação castanha no centro e coloração amarela nas bordas (Fig. 3).



Fig. 2 - Frente das colônias de *T. rubrum* do grupo controle e irradiados após 15 dias de incubação.

No comprimento de onda de irradiação de 685 nm, as colônias apresentaram aumento de crescimento, maior desenvolvimento da região apicular, hiperpigmentação castanho claro no reverso e textura frontal veludosa (Figs. 2 e 3).

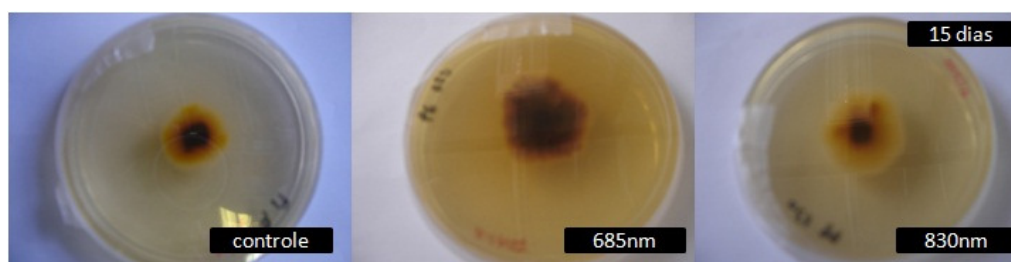


Fig. 3 - Reverso das colônias de *T. rubrum* do grupo controle e irradiados após 15 dias de incubação.

No comprimento de onda de 830 nm, as colônias apresentaram uma alteração de textura e pigmentação, com características mistas. A coloração foi branca e a textura veludosa na região do contorno apicular, transparente e membranosa nas bordas irregulares da colônia (Fig. 2). A região

apicular obteve maior desenvolvimento em relação ao das colônias-controle e ao das irradiadas a 685 nm. No reverso da colônia, observou-se hiperpigmentação castanho escuro e amarelo nas bordas, conforme (Fig. 3).

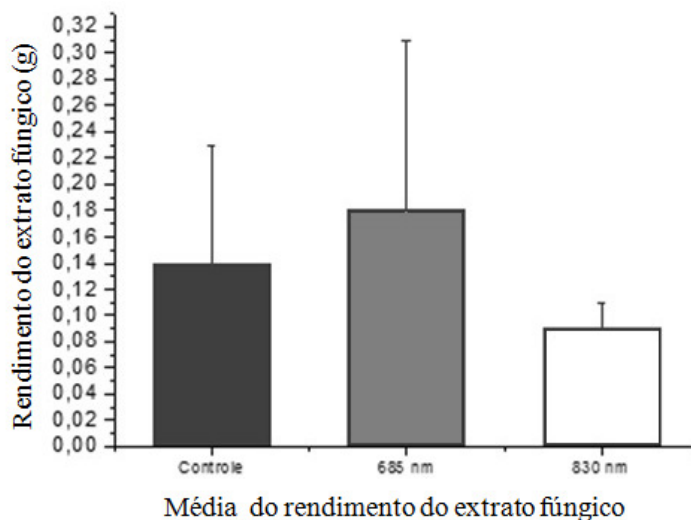


Fig. 4 - Rendimento do extrato fúngico. Rendimento do extrato fúngico. O extrato orgânico seco obtido de cada placa foi pesado e o resultado é apresentado como média e desvio padrão do resultado obtido de três placas de cada tratamento. Na comparação dos grupos, tratamentos com o controle $p > 0,05$, sem significância estatística.

Após a pesagem dos extratos fúngicos secos, foi observado que o rendimento do extrato das placas irradiadas a 685 nm, em média, foi 35,71% superior do que o do controle. Porém o rendimento dos extratos

fúngicos das placas irradiadas a 830 nm, em média, foi 35,71% inferior ao do controle (conforme Fig. 4). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,3250$).

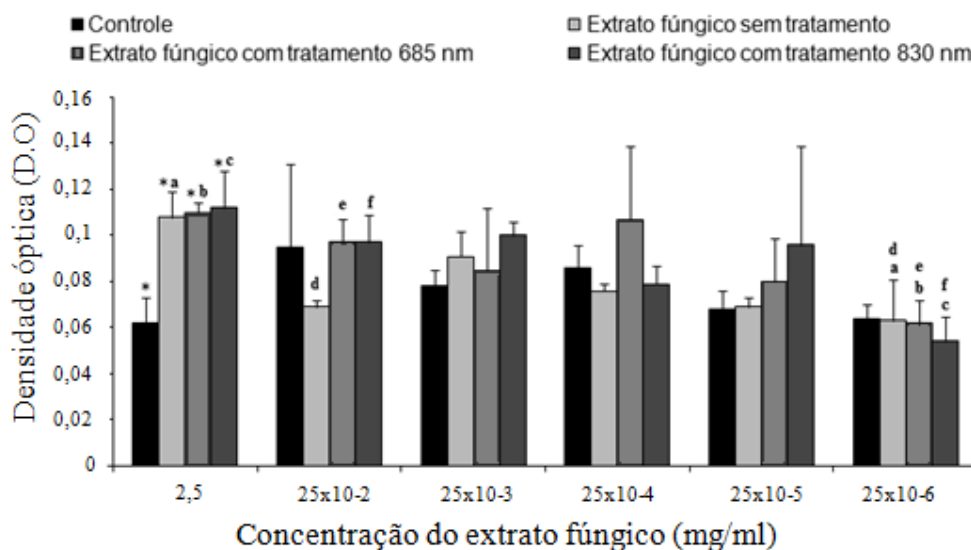


Fig. 5 - Concentração do extrato fúngico na atividade de enzimas mitocondriais de células L929 em cultura. Efeito da concentração do extrato fúngico na atividade de enzimas mitocondriais de células L929 em cultura. Média e desvio padrão de cada tratamento. Diferença estatística sinalizada com letras (vide Tabela 1).

Tabela 1 - Diferença estatística da análise de atividade mitocondrial nas variações de concentração de extrato fúngico

Comparação da concentração de extrato fúngico	Significância estatística (Análise de Tukey)	Sinalização em letras na Fig. 5
2,5 mg/ml	p<0,01	Controle comparado com os demais grupos, sinalizados como: a, b, c, na mesma concentração.
2,5 mg/ml e 25x10 ⁻⁶ mg/ml	p<0,05	Comparação entre a, b, c na concentração 2,5 mg/ml e os grupos sinalizados que tiveram diferença estatística na concentração 25x10 ⁻⁶ , sendo a, b, c, respectivamente.
25x10 ⁻² mg/ml e 25x10 ⁻⁶ mg/ml	p<0,05	Comparação entre d, e, f na concentração 25x10 ⁻² mg/ml e os grupos sinalizados que tiveram diferença estatística na concentração 25x10 ⁻⁶ , sendo d, e, f, respectivamente.

Com relação ao teste de citotoxicidade dos extratos fúngicos sobre células L929, as que não receberam qualquer extrato fúngico tiveram uma menor atividade mitocondrial, quando comparado com as células que receberam extratos fúngicos na concentração de 2,5 mg/ml, com significância estatística (p<0,01). No entanto, não houve diferença na atividade mitocondrial das células tratadas com os diferentes extratos, nessa concentração. Esse efeito diminui com a diminuição da concentração dos extratos fúngicos.

Na análise estatística comparativa da citotoxicidade causada pelos extratos nas concentrações 2,5 mg/ml e 25x10⁻⁶ mg/ml, obteve-se p<0,05, o mesmo ocorreu entre as concentrações 25x10⁻² mg/ml e 25x10⁻⁶ mg/ml (Tabela 1).

Foi possível, também, notar que, conforme as concentrações dos extratos aumentam, houve o aumento da atividade mitocondrial com uma hora de incubação.

Na concentração de 25x10⁻² mg/ml, observou-se uma elevação considerável (78,55%) na atividade mitocondrial dos grupos com tratamento, em relação ao controle e queda de atividade, após diminuir as concentrações, como pode ser verificado na Fig. 5. Observou-se um aumento da atividade mitocondrial quando utilizados os extratos fúngicos com tratamento laser diferente, do extrato fúngico sem tratamento, em que foi observada a diminuição da atividade mitocondrial, de 27,37%, em relação ao controle na concentração, 25x10⁻² mg/ml. Observou-se, ainda, um aumento da atividade mitocondrial das células com extrato fúngico com tratamento laser 830nm, na concentração 2,5 mg/ml, sendo um aumento de 82,14%, em relação ao controle.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, constatou-se que a utilização da luz laser de baixa

intensidade, na irradiação do dermatófito filamentosso *T. rubrum*, resultou no aumento do crescimento do diâmetro das colônias, contradizendo os estudos de Vural *et al.* (2008) e Biscanin, Stipetic e Jerolimo (2005), em que a laserterapia resultou no efeito inibitório do crescimento celular das colônias fúngicas.

No estudo de Vural *et al.* (2008) foi descrito o crescimento de colônias de *T. rubrum*, irradiadas com laser em vários comprimentos de onda, nas doses de 4 e 8 J/cm² (1064nm) e 8 J/cm² (532 nm), obtidas do laser de Nd:YAG, e isso promoveu um efeito inibitório de crescimento das colônias. Neste estudo foi aplicada a irradiação da luz laser em comprimentos de onda na mesma faixa de espectro (infravermelho e vermelho visível), porém em diferente densidade de energia, podendo-se, então, inferir que a densidade de energia pode ter sido responsável pela discrepância de resultados.

Biscanin, Stipetic e Jerolimo (2005) descreveram o estudo do efeito da laserterapia de baixa intensidade no crescimento de *Candida albicans* e inflamação palatal em dois pacientes com estomatite por dentadura. Ambos os pacientes foram irradiados na mucosa palatal e na base acrílica da dentadura, com tempo de 5 minutos de exposição (830 nm, 3,0 J/cm², 60 mW) e tempo de 10 minutos (685 nm, 3,0 J/cm², 30 mW), por 5 dias consecutivos. Avaliou-se, por intermédio do método de swab e estimação semiquantitativa do crescimento das colônias em placa com ágar. A inflamação foi avaliada conforme resposta clínica. Após o término do tratamento, ocorreu a diminuição das colônias e da inflamação. Há relatos, na literatura, sobre os efeitos do laser na

melhora do quadro de inflamação, porém ainda são poucos estudos sobre o efeito da luz laser em microrganismos sem a utilização de um fotossensibilizador. Biscanin, Stipetic e Jerolimo (2005) apresentaram resultados promissores, no tratamento de lesões fúngicas causadas por *Candida albicans*, com laserterapia, mas, ainda, fazem-se necessários estudos que validem essa técnica para o tratamento de lesões causadas por outras cepas fúngicas.

Os estudos de Vural *et al.* (2008) e Biscanin, Stipetic e Jerolimo (2005) demonstraram que laser de baixa intensidade tem ação no metabolismo celular de microrganismos, inibindo o seu crescimento. Porém não há definição criteriosa, na literatura, sobre a definição de protocolos de utilização da laserterapia de baixa intensidade no tratamento de feridas infectadas que podem ser causadas pelo *T. rubrum*.

Além de acompanhar o crescimento fúngico após a irradiação da luz laser em dois comprimentos de onda diferentes, avaliou-se o efeito dos metabólitos fúngicos, produzidos após a irradiação com laserterapia, nas células L929. Nesse experimento, foi observado um aumento significativo da atividade mitocondrial das células incubadas com extrato fúngico com tratamento laser, em relação ao controle. O estudo de Holt *et al.* (1988), envolvendo metabólitos secundários em cultura de células L929, apresentou uma inibição da atividade mitocondrial. Pode-se inferir, então, que a irradiação com laser de baixa intensidade nas colônias fúngicas resultou um efeito na produção de metabólitos secundários, pois estes ao ensaiados nas células L929, promoveu uma estimulação da atividade mitocondrial.

Fernandes *et al.* (2009) relataram um estudo sobre a ação de metabólitos secundários de fungos endofíticos contra bactérias gram positivas, gram negativas e leveduras, também foi testada a ação antitumoral. Em conclusão, os autores descreveram que esses metabólitos podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos. Ainda assim, são necessários mais estudos que descrevam a ação dos metabólitos secundários de fungos e possíveis aplicações clínicas.

Evidenciou-se, neste estudo, a importância de maiores estudos sobre a ação da fototerapia em microrganismos e a elaboração de protocolos clínicos seguros para o uso do laser de baixa intensidade, para o tratamento de dermatomicoses.

5. CONCLUSÕES

O laser de baixa intensidade GaAAs, nas condições metodológicas, apresentou efeitos no metabolismo celular do *T. rubrum*, como a alteração de morfologia e da taxa de crescimento da colônia *in vitro*.

Em relação aos metabólitos secundários, foi observado, após o processo de extração, que o maior rendimento foi obtido das placas irradiadas a 685nm e o menor rendimento foi obtido das placas irradiadas a 830nm, quando comparado com o rendimento das placas controle.

O extrato fúngico das colônias irradiadas promoveu efeito bioestimulador em células L929, quando comparado ao grupo controle sem tratamento laser.

6. AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sônia Khouri Crosariol,

do Laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Paraíba, que gentilmente, cedeu as cepas fúngicas.

À Fundação Vale Paraibana de Ensino (FVE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALY, R.; HAY, R. J.; DEL PALACIO, A.; GALIMBERTI, R. Epidemiology of *Tinea capitis*. *Med Mycol*, v. 38, p.183-188, 2000.

ARENAS, R.; DOMINGUEZ-CHERIT, J.; FERNANDEZ, L. M. Open randomized comparison of itraconazole versus terbinafine in onychomycosis. *Int J Dermatol*, v. 34, p.138-143, 1995.

AMAN, S. *et al.* *Tinea unguium* in Lahore, Pakistan. *Med Mycol*, v. 39, p.177-180, 2001.

BISCANIN, M. M.; STIPETIC, M. M.; JEROLIMO, V. Effect of Low-Level Laser Therapy on *Candida albicans* Growth in Patients with Denture Stomatitis. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 23, n. 3, p. 328-332, 2005.

BORATO, E. *et al.* Avaliação imediata da dor e edema em lesão muscular induzida por formalina e tratada com laser 808 nm. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, v. 14, n.5, p.446-449, 2008.

CERVELATTI, E. P. *et al.* Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Genetic and Molecular Biology*, v. 27, n. 1, p. 99-102, 2004.

ELEWSKI, B. E. Onychomycosis. Treatment, quality of life, and economic issues. *Am J Clin Dermatol*, v. 1, p.19-26, 2000.

- _____. *Tinea capitis: a current perspective*. J Am Acad Dermatol, v. 42, p. 1-20, 2000.
- FERNANDES, M. R. V. *et al.* Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria Alternata* isolated from *Coffea arabica* L. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 4, p. 677-685, 2009.
- FINCH, J. J.; WARSHAW, E. M. Toenail onychomycosis: Current and future treatment options. Dermatol. Ther., v. 20, p. 31-46, 2007.
- GUPTA, A. K. *et al.* Detection of Xanthomegnin in Epidermal Materials Infected with *Trichophyton rubrum*. J. Invest Dermatol, v. 115, p. 901-905, 2000.
- HEES, H.; RAULIN, C.; BAUMLER, W. Laser treatment of onychomycosis: an in vitro pilot study, JDDG, v. 10, p. 1-5, 2012.
- HOLT, P. S. *et al.* Cytotoxic effect of T-2 mycotoxin on cells in culture as determined by a rapid colorimetric bioassay. Toxicol, v. 26, p. 549-558, 1988.
- JOISH, V. N; ARMSTRONG, E. P. Which antifungal agent for onychomycosis? A pharmacoeconomic analysis. Pharmacoeconomics, v. 19, p.983-1002, 2001.
- KOEHLER, A. M.; MAIBACH, H. I. Electronic monitoring in medication adherence measurement. Implications for dermatology, Am J Clin Dermatol, v. 2, p. 7-12, 2001.
- KOZAREV, J.; VIZINTIN, Z. Novel laser therapy in treatment of onychomycosis. Journal of the Laser and Health Academy, v. 1, p. 1-8, 2010.
- LACAZ, C. S. *et al.* Tratado de microbiologia médica, São Paulo: Sarvier, 2002, p. 303-304.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Micologia Clínica: Dermatofitos, 8. ed., São Paulo: Brasil, 1991, p. 120-160.
- LESHER, J. L. JR. Oral therapy of common superficial fungal infections of the skin. J Am Acad Dermatol, v. 40, p. S31-S34, 1999.
- MANEVITCH, Z. *et al.* Direct antifungal effect of femtosecond laser on *Trichophyton rubrum* onychomycosis, Photochem Photobiol, v. 86, n. 2, p. 476-9, 2010.
- MARCHISIO, F. V.; PREVE, L.; TULIO, V. Fungi responsible for skin mycoses in Turin (Italy), Mycoses, v. 39, n. 3-4, p. 141-150, 1996.
- NWEZE, E. I. Etiology of dermatophytoses amongst children in northeastern Nigeria. Med Mycol, v. 39, p. 181-184, 2001.
- REZENDE, C. *et al.* Estudo epidemiológico das dermatofitoses em instituições públicas da cidade de Barretos, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 40, n. 1, p. 13-16, 2008.
- ROCHA, J. C. T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogenese. Revista Brasileira de Promoção de Saúde, Fortaleza-CE, 2003. Disponível em: http://www.unifor.br/hp/revista_saude/v17-1/artigo8.pdf. Acesso em: 24 nov. 2011.
- RODRIGUES, E. R. Estudo da ação de extratos vegetais de *Pothomorphe umbellata* e Drogas antifúngicas sobre linhagens de *Trichophyton rubrum* e análise da expressão proteica. 2007. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia da UNAERP, Ribeirão Preto, 2007.
- SABINO, M.; INOMATA, E. I.; LAMARCO, L.

- C. A. Variação dos níveis de aflatoxina B1 em pasta de amendoim e paçoca consumidas no estado de São Paulo. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 42, n. 1/2, p. 39-44, 1982.
- SANTOS, C. C. G.; SAMPAIO, E. A. P.; PINHEIRO, N. B. Fatores de virulência do gênero *Trichophyton*, 2006. Disponível em: http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo_medstudents_20070131_04.doc. Acesso em: 11 ago. 2009.
- SCHER, R. K. Onychomycosis: therapeutic update. J Am Acad Dermatol, v. 40, p. S21-S26, 1999.
- SIGURGEIRSSON, B. *et al.* Long-term effectiveness of treatment with terbinafine vs itraconazole in onychomycosis: A 5-year blinded prospective follow-up study. Arch. Dermatol, v. 138, p. 353-357, 2002.
- SILVEIRA, M. V.; NICOLAU, R. A. Efeito analgésico em afecções músculo-esquelético pós-terapia com laser operando em baixa potência - revisão de literatura, IN: XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2007, São José dos Campos, SP. Anais eletrônicos, São Paulo: UNIVAP, 2007, p. 2019-2022. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/INIC_07/trabalhos/saude/epg/EPG00388_01O.pdf. Acesso em: 07 maio 2009.
- TOSTI, A. *et al.* Relapses of onychomycosis after successful treatment with systemic antifungals: A three-year follow-up. Dermatology, v. 197, p.162-166, 1998.
- TRABULSI, L. R.; TRABULSI (ED), L.R.; ALTHERTUM, F. Microbiologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p. 586.
- VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. 2. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1991. 203p.
- VURAL, E. *et al.* The effects of laser irradiation on *Trichophyton rubrum* growth. Lasers Medical Science, v. 23, p. 348-353, 2008.
- WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. Clin Microbiol Rev., v. 8, p. 240-259, 1995.
- ZAITZ, C. *et al.* Compendio de Micologia Médica. Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda., 1998, p. 65-7.