UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Jennifer Machado Soares

# Estudo de parâmetros microbianos em múltiplas sessões de terapia fotodinâmica antimicrobiana

São Carlos

Jennifer Machado Soares

# Estudo de parâmetros microbianos em múltiplas sessões de terapia fotodinâmica antimicrobiana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Dra. Kate Cristina Blanco

## Versão corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Soares, Jennifer Machado Estudo de parâmetros microbianos em múltiplas sessões de terapia fotodinâmica antimicrobiana / Jennifer Machado Soares; orientadora Kate Cristina Blanco versão corrigida -- São Carlos, 2019. 85 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 2. Curcumina natural. 3. Limiar de dose. 4. Faringotonsilites. I. Blanco, Kate Cristina, orient. II. Título.

Ao meu pai Eli, à minha mãe Luciana, ao meu namorado Lucas e à Fadinha.

#### AGRADECIMENTOS

Se hoje eu tenho a oportunidade de estar aqui, obter o título de mestre, é porque Deus sempre esteve comigo e me guiou por este caminho. Por isso, agradeço infinitamente por Ele nunca me abandonar e sempre me aparar quando eu mais preciso. E me permitir crescer em uma família que amo muito. Em minha casa somos apenas eu, meu pai Eli e minha mãe Luciana. Tudo o que eu sou é graças aos meus pais, que nunca desistiram de mim, sempre me protegeram e buscaram me fornecer o melhor, para que eu pudesse ser o melhor de mim. Eu amo muito você mãe, você pai. E um grande presente que Deus também colocou em minha vida é meu querido Lucas, que sempre alegra meu dia, me conforta quando me sinto triste, é meu companheiro de vida, que me auxilia a sempre ir atrás dos meus sonhos.

No nosso caminho nunca seguimos sozinhos, sem uma orientação, sem uma inspiração. E você incrível Kate foi/é essa pessoa a minha orientadora, inspiradora, amiga. Você acreditou em mim, no meu potencial, até quando eu duvidava. Me propôs desafio, mais sempre ao meu lado, nunca desamparando. Você me abre oportunidades para que eu possa ser uma cientista incrível. Você é minha querida mãe da ciência. Assim como a Thaila, que me ensinou a preparar meio de cultura, fazer um inóculo e me fez apaixonar por esta área da ciência. Me inspiro muito em vocês e me comprometo a honrar os ensinamento que vocês sempre dedicaram com muito carinho a mim.

Esse projeto não teria sido o que foi sem o apoio do professor Vanderlei, que paciente-mente sentou comigo verificando minhas análises. Tenho um grande carinho e admiração pelo senhor e pelo seu trabalho. Assim como você Natália, que sempre esteve acompanhando minha evolução, abrindo oportunidades e acreditando em meu trabalho. E como não falar da minha amiguinha Shirly, que deixou meus dias mais coloridos e me motivou a ter disposição para sempre continuar trabalhando e estudando

E um projeto não acontece sem os bastidores, as pessoas que fazem nossa vida ser ainda mais encantadora. E por isso agradeço ao apoio que tive desde a minha graduação, pois sem essa etapa eu não estaria aqui. Aos meus avós, tios, primos, madrinhas e padrinhos. A Mércia. Aos meus amigos Ana, Rai, Beli, Miguel, Leo, Anderson, Jader.

E finalmente agradeço a todas as pessoas que contribuem para pesquisa brasileira, que são todos os residentes no Brasil. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, assim como o apoio do centro de ótica e fotônica (CEPOF - Fapesp 2013/07276-1) e ao CNPQ. O suporte oferecido por estas instituições permitiram a concretização deste projeto.

"O importante não é o que mundo tem a oferecer a você, mas o que você traz para o mundo" Anne With An E

#### RESUMO

SOARES, J. M. Estudo de parâmetros microbianos em múltiplas sessões de terapia fotodinâmica antimicrobiana. 2019. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A Faringotonsilites consiste na inflamação infecciosa da tonsilas palatinas e da faringe, são documentados mais de 600 milhões de caso por ano, sendo que 30% dos casos bacterianos são causados pela bactéria gram positiva S. pyogenes e o principal tratamento é o uso de antibiótico. Atualmente, infecções recorrentes em seres humanos, como a infecção de garganta podem ser de difícil tratamento caso o patógeno infectante possua mecanismo de resistência que invalide a atividade do antibiótico. Como alternativa aos antibióticos destaca-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), que atua inativando a bactéria sem que a via de ação seja invalidada. Apesar dos seus benefícios, a TFDA possui limitações que podem influenciar nos protocolos de tratamentos, principalmente para múltiplas sessões. Portanto, o objetivo do trabalho consistiu em estudar a resposta bacteriana e a avaliar o potencial de desenvolvimento de resistências em múltiplas sessões de TFDA. Foi estudado a padronização da concentração do fotossensibilizador (FS) pela taxa de incorporação. As bactérias do gênero Streptococcus foram incubados com a curcumina natural a 37°C em diferentes formulações, sendo a de xarope (água + sacarose) e a álcool+DMSO. Posteriormente foi centrifugado e o sobrenadante coletado para análise da absorbância. Para os experimentos de TFDA, a bactéria incubada com xarope de curcumina (2.25 mg/ml), foi submetida a irradiação em uma Biotable ® com comprimento de onda de 450 nm, com flência de 0 - 115, 2*J/cm*<sup>2</sup>. Posteriormente as amostras foram diluídas e semeadas em placas de Petri com meio de cultura ágar BHI. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para a realização da contagem das unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/ml). As bactérias sobreviventes foram congeladas foram utilizadas para o próximo ciclo de tratamento e análise de aderência de biofilme (cristal violeta), sensibilidade do antibiótico (Kirby-Bauer), análises fenotípica (FTIR). A incorporação porcentual média de curcumina em xarope para S. mutans foi de 24%, assim como para S. pyogenes foi de 26%, por fim para o isolado clínico foi de 27%. Com o uso do xarope de curcumina na concentração de 2,25 mg/ml e luz no comprimento de onda de 450 nm aplicada em S. pyogenes e isolado clínico obteve-se um limiar de dose para 10 sessões de TFDA de 70, 2J/cm<sup>2</sup> e 71, 7J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. O perfil de redução bacteriana permaneceu similar ao longo dos ciclos para ambas culturas. As colônia sobrevivente, entretanto, apresentaram diminuição na adesão de biofilme e na taxa de incorporação do FS, mas não tiveram diferenças significativas no fenótipo de algumas biomoléculas. O presente estudo sugere a não resistência ao mecanismo de ação do tratamento, que se manteve eficaz nas dosagens estudadas. Esse resultado corrobora com a literatura de que o modo de ação da TFDA não perde a eficiência em múltipla sessões.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Curcumina natural. Limiar de dose. Faringotonsilites.

#### ABSTRACT

SOARES, J. M. Study of microbial parameters in multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy. 2019. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Pharyngotonsillitis is the infectious inflammation of the palatine tonsils and pharynx. Over 600 million cases per year, with 30 % of bacterial cases being caused by gram positive bacteria S. pyogenes and the main treatment is the use of antibiotic. Infections are recurrent diseases in humans. Bacterial throat infections may be difficult to treat if the pathogenic microorganism is resistant to antibiotic therapy. Photodynamic antimicrobial (aPDT) is an alternative to antibiotics, which can inactivate bacteria without causing adverse effects to the human body. The aPDT has features that can influence treatment protocols, especially for multiple sessions. The objective was to study the bacterial behavior from the evaluation of the development of aPDT resistance in multiple sessions. The ideal concentration of the photosensitizer (PS) was studied by its rate of bacterial incorporation. The microorganism was incubated in different formulations containing natural curcumin at 37 °C syrup (water + sucrose); and alcohol + DMSO. The bacterium was incubated in curcumin syrup (2.25 mg/ml) and performed the illumination of the samples in Biotable<sup>®</sup> at wavelength of 450 nm in different lighting times. Samples were diluted and seeded in BHI medium at 37 °C for 24 hours for counting colony forming units per milliliter (CFU/ml). Surviving bacteria were stored after each treatment cycle and biofilm adherence (crystal violet), antibiotic efficiency (Kirby-Bauer) and phenotypic FTIR analyzes were performed. The average percentage of curcumin incorporation in syrup for S. mutans, S. pyogenes and clinical isolate of pharyngotonsilites of 24, 26 and 27%, respectively. APDT (10) sessions with curcumin syrup (2.25 mg/ml) and light at 450 nm in S. pyogenes and clinical isolate were performed to obtain the dose threshold, and results of 70, 2J/cm<sup>2</sup> and 71, 7J/cm<sup>2</sup>, respectively. The bacterial reduction profile remained similar between the cycles for both microbial cultures. The surviving colony had a reduction in biofilm adhesion and PS incorporation rate, but did not present significant differences in the phenotype of some biomolecules. The present study presents data for the hypothesis of non-resistance to PDT, which remained effective in the dosages studied. This result corroborates with the literature that the mode of action of aPDT does not promote antimicrobial resistance.

Keywords: Antimicrobial photodynamic therapy. Natural curcumin. Threshold dose. Pharyngo-tonsillitis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Parede bactéria Gram-positiva e negativa	24
Figura 2 – Faringotonsilites	26
Figura 3 – Linha do tempo antibiótico e FS	29
Figura 4 – Diagrama de Jablonski	31
Figura 5 – Estrutura dos curcuminóides	32
Figura 6 – Janela terapêutica	34
Figura 7 – Modelo limiar de dose	36
Figura 8 – Testes bioquímicos	38
Figura 9 – Calibração do fotossensibilizador por absorbância	40
Figura 10 – Incorporação do fotossensibilizador	41
Figura 11 – Microscopia confocal de incorporação de fotossensibilizador	42
Figura 12 – Curva de crescimento bacteriano para análise metabólica	43
Figura 13 – Derivada da curva de crescimento bacteriano para análise metabólica	44
Figura 14 – Esquema de incorporação do fotossensibilizador pela bactéra	45
Figura 15 – Controle do fotossensibilizador	47
Figura 16 – Controle da dose de luz	47
Figura 17 – Inativação Fotodinâmica	48
Figura 18 – Metodologia multiplas sessões	50
Figura 19 – Curva da distribuição de dose e fração de morte para S. pyogenes em cada	
sessão com subdose de FS	53
Figura 20 – Valor do limiar de dose e sobreposição da curva de mortalidade para S.	
pyogenes com subdose de FS	53
Figura 21 – Fotobranqueamento xarope de curcumina	54
Figura 22 – Curva de distribuição de dose e fração de morte para S. pyogenes em cada	
sessão	56
Figura 23 – Valor do limiar de dose e sobreposição da curva de mortalidade de S. pyogenes	57
Figura 24 – Grupos controles das multiplas sessões de TFDA em S. pyogenes	58
Figura 25 – Curva de distribuição de dose e fração de morte para isolado clínico em cada	
sessão	59
Figura 26 – Valor do limiar de dose e sobreposição da curva de mortalidade de isolado	
clínico	60
Figura 27 – Grupos controles das múltiplas sessões de TFDA em isolado clínico	60
Figura 28 – FWHM para cada curva de Dth de S. pyogenes e isolado clínico	63
Figura 29 – Interação dos parâmetros de distribuição de dose para S. pyogenes e isolado	
clínico	64
Figura 30 – Antibiograma	70

Figura 31 – Adesão de biofilme	71
Figura 32 – Incorporação do fotossensibilizador pós TFDA	72
Figura 33 – Espectros de FTIR	74
Figura 34 – Espectros de FTIR ampliados	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – TFDA em bactéria com curcumina	33
Tabela 2 – Múltiplas sessões de TFDA na literatura	61
Tabela 3 – Evolução coeficiente de Pearson	62
Tabela 4 – Classificação dos antibióticos	69

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BDMC Bisdemetoxicurcumina CUR Curcumina DMC Demetoxicurcumina DMSO Dimetilsulfóxido EROs Espécies Reativa de Oxigênio FS Fotossensibilizador GAS Bactérias Estreptocócica do Grupo A IFD Inativação Fotodinâmica BHI Brain Heart Infusion FWHM Full Width at Half Maximum (largura à meia altura) f(Dth) Fração de Morte Celular Distribuição de Limiar de Dose g(Dth) Limiar de Dose Dth FTIR Transformada de Fourier no Infravermelho PBS Tampão Fosfato Salino UFC/ml Unidades Formadoras de Colônia por mililitro Attenuated Total Reflectance (reflexão total atenuada) ATR AMO Amoxicilina AZI Azitromicina EST Estreptomicina CIP Ciprofloxacina CV **Cristal Violeta** S0 Bactéria nunca submetida a TFDA
- S1 Bactéria submetida a 1 sessão de TFDA

- S5 Bactéria submetida a 5 sessões de TFDA
- S10 Bactéria submetida a 10 sessões de TFDA
- TFDA Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

## LISTA DE SÍMBOLOS

O2	Oxigênio Molecular
S0	Estado Singleto Fundamental
S <sub>1</sub> τ	Estado Singleto Excitado
<b>I</b> 1	Estado Tripleto Excitado

## SUMÁRIO

1	LITERATURA	
1.1Prefác	io	
1.2Bactér	ias	
1.2.1	Patogenicidade do Streptococcus pyogenes	25
1.2.2	Faringotonsilites	25
1.2.3	Resistência Bacteriana	27
1.3	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	28
1.3.1	Mecanismo de Ação	29
1.3.2	Curcumina	31
1.3.3	Luz Azul	33
1.4	Distribuição do Limiar de Dose	34
1.4.1	Modelo	35
2	ESTUDO DA FORMULAÇÃO DE CURCUMINA NATURAL NA IN-	
	CORPORAÇÃO MICROBIANA	
2.1	Contextualização	37
2.2	Objetivo	37
2.3	Metodologia	37
2.3.1	Microrganismos	37
2.3.1.1	Isolamento e identificação bacteriana	38
2.3.2	Fotossensibilizador	38
2.3.2.1	Curcumina em Dimetilsulfóxido	38
2.3.2.2	Xarope de Curcumina	38
2.3.3	Quantificação da Absorção do Fotossensibilizador	38
2.3.4	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	39
2.3.4.1	Fonte de Luz	39
2.3.4.2	Terapia Fotodinâmica	39
2.3.5	Validação da Absorção do Xarope de Curcumina	39
2.3.5.1	Microscópio de Fluorescência Confocal	39
2.3.5.2	Análise Metabólica por Curva de Crescimento	39
2.3.6	Análise Estatística	40
2.4	Resultados e Discussão	40
2.5	Conclusão	48
3	ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE LIMIAR DE DOSE EM MÚLTIPLAS	<b>)</b>
	SESSÕES DE TFDA 49	

3.1	Contextualização	49		
3.2	Objetivo	49		
3.3	Metodologia	49		
3.3.1	Microrganismo	49		
3.3.2	Fotossensibilizador	49		
3.3.3	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	50		
3.3.4	Múltiplas Sessões			
3.3.5	Fotobranqueamento	50		
3.3.6	Tratamento dos Dados	51		
3.3.7	Análise Estatística	51		
3.4	Resultados e Discussão	52		
3.5	Conclusão	65		
4	RESPOSTA DAS BACTÉRIAS SOBREVIVENTES A MÚLTIPLAS			
	SESSÕES DE TFDA			
4.1	Contextualização	67		
4.2	Objetivo	67		
4.3	Metodologia	67		
4.3.1	Preparo do Microrganismo	67		
4.3.2	Incorporação do Xarope de Curcumina	67		
4.3.3	Antibiograma Pelo Método Kirby-Bauer	67		
4.3.4	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	68		
4.3.5	Adesão de Biofilme	68		
4.3.6	Análise Estatística	68		
4.4	Resultados e Discussão	68		
4.4.1	Sensibilidade a Antibióticos	69		
4.4.2	Adesão Bacteriana	70		
4.4.3	Incorporação do Fotossensibilizador	71		
4.4.4	Espectroscopia de FTIR	72		
4.5	Conclusão	76		
5	CONCLUSÃO	77		
	REFERÊNCIAS	79		

#### **1 LITERATURA**

#### 1.1 Prefácio

Para o melhor entendimento do conteúdo, esta dissertação foi dividida em cinco partes: primeiro a apresentação dos conceitos teóricos que foram a base para este projeto, seguido de três parte que contem a evolução do estudo incluído a metodologia empregada e seu resultado para a obtenção da conclusão, que é a última parte.

O objetivo do trabalho foi investigar se a aplicação de um mesmo protocolo em múltiplas sessões de terapia fotodinâmica induz diferentes repostas de morte celular bacteriana ou outras características celulares a cada sessão de tratamento.

Dado a hipótese de que a bactéria pode desenvolver tolerância aos componentes de terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), principalmente em múltiplas sessões, uma vez que o protocolo não elimina todas as bactérias, este trabalho foi dividido em objetivos menores com intuito de responder essa hipótese. Para validar a atividade em múltiplas sessões da TFDA, estudou a interação do fotossensibilizador com a bactéria, analisou a evolução do limiar de dose ao longo de múltiplas sessões e posteriormente analisou os parâmetros microbiano das bactérias sobreviventes ao tratamento.

#### 1.2 Bactérias

As bactérias são microrganismos unicelulares e procariontes representantes do Reino Monera. Apresentam material genético imerso no citoplasma, sem compartimentações por membranas, exceto a membrana celular que é envolvida por uma parede celular. As bactérias são diferenciadas em relação a parede celular Gram positiva, com a camada de peptidoglicano espessa, a Gram-negativa, com uma fina camada de peptidoglicano entre a membrana celular e membrana externa, mostrado na Figura 1 e as bactérias sem parede celular como a pertencentes ao gênero Mycobacterium. Além disso, elas podem ter formatos de cocos (esférico), bacilos (bastão) ou espirilos (espiralados), isoladamente, em pares e em cadeias de acordo com o gênero.

1

Os primeiros relatos de vidas encontrados no planeta Terra são referentes as células pro-cariontes. São microrganismos que se adaptaram as condições hostis do ambiente e contribuíram com as transformações atmosféricas para que novas formas de vida pudessem desenvolver. O Reino Monera (bactérias e cianobactérias) é composto por diversas espécies que habitam os mais variados ambientes, desde regiões extremófilas como geleiras e vulcões ou ambientes como solo, ar ou em contato com outros organismos vivos. <sup>2</sup>

As bactérias são fundamentais para o funcionamento do ecossistema, pois, atuam ati-



Figura 1 – Representação da parede e estruturas das bactéria Gram-positiva e Gram-negativa. Fonte: Elaborada pela autora.

vamente no ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre, os quais são necessários/gerados durante o processo de decomposição e respiração, que são essenciais para a manutenção da vida. Com os avanços tecnológicos, o uso de microrganismo passou a ser explorado em diversos setores como na agricultura com a produção de metabolitos que fertilizam o solo; no alimentício para a produção de leite e derivadas por meio da fermentação láctica; no controle de poluição pelo processo de biorremediação; na medicina com a produção de hormônios e proteínas de interesse farmacêutico. <sup>3</sup>

Embora haja inúmeras contribuições para o ecossistema, as bactérias são conhecidas pelas doenças causadas nos seres vivos, principalmente em humanos. Haja vista, das espécies identificadas somente 1% corresponde ao grupo de bactérias patogênicas, <sup>4</sup> mas tais patógenos podem desencadear doenças fatais ou infecções rotineiras como a faringotonsilites causadas pela bactéria Streptococcus pyogenes, que quando não tratadas adequadamente podem evoluir a um caso mais grave, podendo levar o paciente a óbito. <sup>5</sup>

As bactérias que pertencem ao gênero Streptococcus são Gram-positivos e apresentamse morfologicamente como cocos, são anaeróbios facultativos, não produtores de catalase e de citocromo-oxidase. Os Streptococcus ou Estreptococos com relevância clínica são homofermentadores, ou seja, a partir da fermentação da glicose obtêm como produto o ácido lático. São capazes de produzir hemolisinas em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, sendo o tipo da hemólise utilizado para a classificação dentro do gênero, ou seja, as hemácias presentes no meio de cultura quando sofrem hemólise parcial ou completa classificados como bactéria de alfa-hemólise ( $\alpha$ ) e beta-hemólise ( $\beta$ ), respectivamente. E quando não há hemólise é caracterizada como bactéria de gama-hemolise ( $\gamma$ ). Existem inúmeras espécies pertencentes a esse gênero, dentre elas destaca-se a S. pneumoniae, principal responsável pela pneumonia bacteriana; S. agalactiae é relacionada com meningite em recém nascido, além de ser a bactéria com quadro de resistência mais preocupante mundialmente; S. mutans é a principal responsável pela carie dentária e dentre outras que são típicas não somente de humanos, mas também de animais tais como S. bovis e S. suis.<sup>6</sup>

#### 1.2.1 Patogenicidade do Streptococcus pyogenes

Microrganismos patogênicos possuem a capacidade de causar doenças sob condições apropriadas. A habilidade de infectar e a gravidade decorrente da infecção são atribuídas ao grau de patogenicidade denominada de virulência, que varia dependendo do microrganismo, hospedeiro e a interação entre eles. Para que o microrganismo possa permanecer no hospedeiro os fatores de aderência, por exemplo, a Adesina P1 e a Proteína F de S. mutans e S. pyogenes, respectivamente, são mecanismos de virulência que permitem a penetração e a proliferação sobre um tecido. <sup>1</sup> Além da aderência, para garantir a permanência no hospedeiro algumas bactérias estreptocócicas possuem em sua superfície a proteína M, que transpassa a parede celular e majoritariamente fica localizado externamente a célula. A proteína M auxilia na aderência da bactéria com o tecido e confere resistência a fagocitose por macrófagos pois, sua região N terminal varia dentro de uma mesma espécie, promovendo alta diversidade antigênica. O procedimento de sorotipagem proposto por Lancefield tornou-se pouco conveniente para um resultado de caracterização das cepas, pois atualmente já foram identificados mais de 200 tipos de terminações da proteína M para S. pyogenes.<sup>7</sup>

Um outro mecanismo de virulência é a produção de toxinas responsáveis por desencadear a resposta inflamatória do sistema imune que em altas concentrações pode levar ao choque séptico. As exotoxinas são proteínas majoritariamente secretadas por bactérias Gram-positivas, que ao encontrar receptores no hospedeiro levam ao dano da célula ou interrupção de um mecanismo de ação. Um exemplo de exotoxina encontrado em S. pyogenes é a estreptolisina que forma poros nas membranas celulares e as toxinas eritrogênicas que estimulam excessivamente o sistema imunológico. <sup>8</sup>

#### 1.2.2 Faringotonsilites

A microbiota das tonsilas palatinas é composta por bactérias anaeróbicas e aeróbicas, composta de uma grande diversidade de agentes etiológicos que podem causar faringotonsilite tanto em adulto quanto em crianças. O principal agente responsável pela faringotonsilite bacteriana é o S. pyogenes, pertencente ao grupo A ( $\beta$ )-hemolítico do gênero Streptococcus (GAS). É um patógeno exclusivamente humano, sensível a penicilina e a eritromicina, podendo causar diversas doenças relacionadas com à mucosa bucal de fácil disseminação. Em geral, a incidência de

cada microrganismo dependerá da idade do paciente, região geográfica e estação do ano.

A faringotonsilites aguda causada por S. pyogenes é responsável por até 21,9% dos casos em adultos, <sup>9</sup> e até 50% em crianças. <sup>10</sup> A faringotonsilites pode ser causada por outros GAS com a frequência de 1% - 9.5%. <sup>11, 10</sup> Os principais sintomas que diferenciam a faringotonsilite de uma infecção viral são a presença de fluidos inflamatórios na tonsilas (exsudato tonsilar), febre alta, ausência de tosse, dores de cabeça e abdominais, além de inchaço nos nós cervicais anteriores, <sup>5</sup> Figura 2.

A transmissão da faringotonsilites ocorre por meio de gotículas de saliva ou secreções



# Figura 2 – Ilustração comparativa entre as tonsilas e garganta saudáveis com a apresentada por faringotonsilites bacteriana. Fonte: Adaptada de BRUCEBLAUS.<sup>12</sup>

infectadas, por isso é disseminada facilmente em locais com aglomerações. As principais medidas de prevenção consistem em hábitos simples, como lavagens das mãos, impedir a dispersão de gotículas ao espirrar ou tossir e não compartilhar objetos pessoais. <sup>6</sup> Apesar das medidas simples, na década de 90 a Europa teve inúmeros casos de infecção causadas por bactérias estreptocócicas, principalmente a S. pyogenes. Para evitar novos surtos, criouse um programa de vigilância chamado Strep-euro no qual alguns países europeus tiveram seus hospitais associados ao programa. As principais iniciativas da Strep-euro foram a divulgação de medida preventivas e a difusão da importância em relatar e disponibilizar os dados epidemiológicos em publicações médicas.

Um exemplo do resultado desta campanha foi apresentado por CRETI<sup>13</sup> que mostra a importância de entender a epidemiologia do microrganismo e ressalta que deve ser um controle periódico. Neste artigo em questão, 207 amostras foram coletadas durante 11 anos na Itália. O programa não foi realizado continuamente, mas sim durante os anos de 1994-1996 e em 2003-2005. Percebe-se pelos resultados obtidos, que após o primeiro programa os dados e as práticas epidemiológicas foram mais eficientes. Entretanto, no segundo programa houveram mais casos pediátricos e a porcentagem de morte diminuiu em 3%.

Além da coleta do número de pacientes infectados e o quadro clínico, um estudo epide-miológico pode ser feito com auxílio da tipagem microbiana. Por meio dela é possível saber a genética populacional, e assim conhecer a história de infecção e patogenicidade, para poder ter o controle de surto e vigilância de doenças infeciosas. A realidade encontrada em um país não necessariamente é a mesma encontrada nos países vizinhos ou em outros continentes, apesar de parecerem semelhantes. Assim, conhecer a realidade epidemiológica pode auxiliar no controle e na prevenção de doenças. <sup>13</sup>

Além da faringotonsilites, outra enfermidade causada por S. pyogenes é a escarlatina, uma infecção que não necessariamente depende da ação direta do microrganismo, mas decorre de

uma reação alérgica às toxinas por ele produzida. O quadro consiste em inflamação da garganta, febre, erupções cutâneas. Porém tanto a faringotonsilite como a escarlatina podem evoluir para quadros mais graves como a febre reumática que é uma doença autoimune de origm infeciosa com características inflamatórias que envolve coração, articulações e sistema nervoso central. Todos os anos, cerca de 1.100 a 1.600 pessoas morrem em decorrência de doença associadas com as bactérias estreptocócica do grupo A (GAS).<sup>14</sup>

#### 1.2.3 Resistência Bacteriana

O principal tratamento utilizado para infecção bacteriana, inclusive em caso de faringotonsilites é a prescrição de antibiótico. As cepas de S. pyogenes, em geral, são sensíveis à penicilina e à eritromicina, mas em comparação a décadas anteriores, requerem doses significati-vamente maiores em decorrência do uso excessivo e indiscriminado. <sup>1</sup> Além disso, a prescrição de antibiótico para casos de faringotonsilites virais contribuem para a seleção de microrganismos tolerantes ao medicamento, uma vez que este tratamento é ineficaz para vírus, mas irá atuar na microbiota normal que são as bactérias comensais, ou seja, benéficas ao hospedeiro. Como con-sequência, o desequilíbrio da microbiota normal, irá favorecer a proliferação de microrganismos nocivos que podem desencadear outras enfermidades ou apresentar tolerância aos antibióticos convencionais. <sup>2</sup>

Em virtude do mecanismo de ação do antibiótico ser específico para alvos celulares ou moleculares da bactéria, pequenas modificações nestas estruturas impedem a efetividade da classe do fármaco. As alterações são decorrentes das modificações no material genético, seja pela mutação espontânea do DNA ou durante a replicação; pelos elementos móveis; pela aquisição via conjugação de plasmídeo ou por bacteriófagos. Estas modificações podem alterar a permeabilidade da membrana restringindo a absorção do fármaco; inibir a síntese proteica ou atuação das enzimas modificando ligações e aumentar a taxa de expulsão do antibiótico com auxílio das bombas de efluxo. Esse mecanismo de proteção das bactérias se propaga por meio do processo de seleção artificial, que é promovido pela ineficiência do antibiótico nas células bacterianas resistentes, as quais resistem ao tratamento e se reproduzem até ser a maioria da população. Em outras palavras, apesar da ação humana aumentar os casos de resistência aos antibióticos, as estratégias bacterianas já existem na natureza e disseminam naturalmente. <sup>15, 16</sup>

Além disso, as bactérias já podem ter mecanismo de resistência em relação a uma classe de antibiótico antes mesmo deles serem inseridos no mercado. Isso afeta diretamente a economia e o desenvolvimento de novos fármacos. Ao longo dos anos, tem sido cada vez mais difícil encontrar novos antibióticos que possam ser inseridos no mercado. Para um medicamento ser aprovado, não basta possuir atividade, mas deve ter ao menos um diferencial vantajoso em relação aos comercializados. Devido a esse cenário, as indústrias farmacêuticas não têm investido fortemente em novos antimicrobianos, consequentemente a cada ano o Food and Drug Administration (FDA) aprova menos medicamentos nesta categoria. Ademais, a resistência aumenta significativamente com o passar dos anos, estima-se que em 2050 haverá 10 milhões de mortes por ano devido às bactérias multirresistentes. <sup>17</sup>

A descoberta da penicilina foi um marco importante para a medicina e na ciência. Entretanto, o cenário atual requer que novas abordagens sejam estudadas e aplicadas para solucionar os desafios devido às bactérias resistentes. Uma das alternativas emergentes atualmente na literatura tem sido a terapia fotodinâmica antimicrobiana, por ter um mecanismo de ação sem alvos específicos, mas direcionado para bactérias, independente de ser resistente a diversas classes de antibiótico.<sup>18</sup>

#### 1.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Desde a Antiguidade, a luz é utilizada como um agente terapêutico por diversos povos para tratamento de doenças de pele como vitiligo, psoríase e feridas. Na Grécia Antiga conside-ravam que a exposição à luz solar (helioterapia) auxiliava a manter uma boa saúde além de ser indicada para tratamento de diversas enfermidades. Mas somente em 1903, o dinamarquês Niels Finsen foi premiado com o Nobel em física pelo uso da fototerapia com luz ultravioleta para tratamento de tuberculose cutânea.<sup>19</sup>

Quase que simultaneamente, o primeiro relato da associação da luz com uma molécula fotossensível foi feito em 1900 pelo alemão Oscar Raab, que acidentalmente expôs luz branca a uma cultura de Paramecium caudatum contendo acridina e constatou efeitos citotóxicos mais intensos quando havia a combinação da luz branca com as moléculas de acridina. Com a descoberta da fluorescência, Raab postulou que a citotoxicidade era resultado da transferência de energia da luz a molécula fotossensível, a qual era capaz de converter os produtos da fluorescência em atividade tóxica para células, por uma via semelhante ao empregado pelas clorofilas. <sup>20</sup> No mesmo ano, o neurologista francês Jean Prime relatou que a administração oral da eosina em paciente com epilepsia quando exposto à luz solar induzia dermatites, sendo o primeiro relato do uso clínico da associação de luz e fotossensibilizador(FS) em humanos. <sup>21</sup> Posteriormente, Raab, Jodlbauer e von Tappeiner mostraram que para ter efeitos tóxicos nas células era necessário um terceiro elemento, o oxigênio, e denominaram este mecanismo de ação fotodinâmica. <sup>19</sup>

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) ou Inativação Fotodinâmica (IFD) são os nomes da técnica descoberta por Raab quando aplicada em microrganismos, contudo, ela possui o mesmo mecanismo de ação quando usado em células eucarióticas. É uma técnica aprovada em diversos países, princialmente da Europa, para tratamentos de câncer, infecções, entre outras enfermidades. Sua ação é localizada com base na interação concomitante de luz, oxigênio molecular (*O*<sub>2</sub>) e fotossensibilizador (FS) para desencadear danos em células procarió-ticas e eucarióticas. A atuação individual do FS ou da luz em comprimento de onda não devem desencadear efeitos citotóxicos em célula do tecido não infectado. Em virtude do mecanismo de ação, a TFDA possui ação localizada, o que diminui a possibilidade de efeitos colaterais. Além disso, pode ser aplicado em conjunto com outros precedimentos clínicos tradicionais sem



Figura 3 – Linha do tempo do descobrimento de novos antibióticos e FS. Fonte: WAINWRIGHT.<sup>22</sup>

aumentar significativamente as despesas do tratamento visto que possui baixo custo pelo uso de diodo emissor de luz (LED), como dispositivo de irradiação. <sup>23</sup>

Embora a TFDA tenha sido uma técnica descoberta no início do século XX, o desen-volvimento de FS foi escasso nas primeiras décadas e com o descobrimento da penicilina, os esforços para o tratamento de doenças infecciosas foram destinados principalmente para criação de novos antibióticos. Entretanto, com a era da resistência às diversas classes de antimicrobianos, a busca por alternativas ganhou destaque, como consequência o renascimento da descoberta por novos FS, mostrado na Figura 3.<sup>22</sup>

#### 1.3.1 Mecanismo de Ação

A etapa inicial da TFDA é primordial para bons resultados, pois, consiste na absorção de uma molécula fotossensibilizadora pelo microrganismo, <sup>24</sup> no qual a incorporação é modulada pelas interações eletrostáticas da parede celular com o FS. De modo geral, a superfície de uma bactéria é carregada negativamente favorecendo a ligação com FSs catiônicos. As bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a TFDA por serem mais permeáveis aos FSs, pois, sua parede celular possui mais poros que facilitam a entrada de moléculas neutras e carregadas negativamente, apesar da repulsão eletrostática das cargas negativas dos ácidos teicóicos. Analogamente, os lipopolissacarídeos conferem às bactérias Gram-negativa um envoltório celular carregado negativamente, mas por terem uma membrana externa, os FS aniônicos e neutros são dificilmente incorporados por elas.<sup>25</sup>

Após a incorporação do FS pela bactéria, o mecanismo de ação será ativado pela absorção de fótons pelo FS, com energia suficiente para promover um elétron do estado fundamental ( $S_0$ ) para o estado singleto excitado ( $S_1$ ), o qual possui alta probabilidade em transitar sem radiação para o estado tripleto excitado ( $T_1$ ), via cruzamento intersistema. A transição de estado ocorre com a reversão do spin do elétron, o qual não pode retornar ao  $S_0$  pois violaria o Princípio de Exclusão de Pauli, visto que teria os mesmos números quânticos do elétron no  $S_0$ . Por esta razão,

o tempo de vida para o  $T_1$  é mais longo e permite interagir com o oxigênio molecular ( $O_2$ ). O processo da TFDA diferencia-se dos processos oxidativos celulares por ser dependente da absorção da luz. A interação do FS com o  $O_2$  pode ocorrer por meio de dois tipos de reações denominadas de reação tipo I e tipo II, respectivamente. <sup>26, 27</sup>

Na reação do tipo I, o FS no  $T_1$  reage diretamente com os substratos orgânicos, na membrana celular ou componentes celulares, com a transferência de elétrons para formar íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ),radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxila (-OH). Em contraste, na reação do tipo II o FS no estado  $T_1$  transfere energia diretamente ao oxigênio molecular, excitando-o para o seu estado singleto altamente reativo. O oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), reage com aminoácidos, proteínas, lipídeos insaturados e

ácidos nucleicos, de modo a promover a morte do tecido via necrose ou apoptose. <sup>28</sup> O mecanismo é ilustrado por meio do Diagrama de Jablonski na Figura 4.

De certo, as biomoléculas celulares são danificadas pelas EROs produzidas durante TFDA, assim os diversos locais afetados simultaneamente levam a disfunção celular. Uma das principais biomoléculas atacadas são os lipídios, como os presentes na membrana plasmática, que sofrem modificações oxidativas e diminuição das cadeias insaturadas, perturbando diretamente a fluidez e organização da membrana que são essenciais para a integridade celular. As proteínas bacterianas são afetadas pela fototoxicidade desencadeando interrupções em diversas funções metabólicas.No entanto, sabe-se que os danos contribuem ativamente para morte celular, mas o modo como desencadeia o processo de morte permanece desconhecido.

<sup>25</sup> Os danos causados no DNA geralmente são pontuais, pois as alterações são em algumas bases, principalmente na guanina por ser mais susceptível a oxidação, de modo que a maquinaria de reparação é capaz de recuperar o DNA nativo, permitindo a sobrevivência do microrganismo. Porém, em casos de mutações não revertidas, os mecanismos moleculares podem ser comprometidos, levando a morte da bactéria. <sup>29</sup>

A eficiência do dano está atrelada a interação do FS com a célula, pois, em diferentes regiões a eficiência quântica pode ser distinta, além de dificultar a difusão das EROs para que atinjam os alvos moleculares. Por exemplo, o oxigênio singleto possui uma vida de 100 ns, o que possibilita apenas a difusão de aproximadamente 20 nm, inferior às dimensões celulares que são da ordem de micrômetros. <sup>29</sup> Em outras palavras, não é necessário que o FS esteja totalmente internalizado na bactéria, mas sua interação aumenta o efeito antimicrobiano e é favorecida com diferentes tempos de incubação para diferentes localizações celulares. <sup>24</sup> Contudo, a seletividade do FS pela bactéria ao invés de células de mamíferos esta relacionada com curtos tempos de incubação do FS antes da irradiação, diminuindo a incorporação pelo tecido hospedeiro. <sup>22</sup>



Figura 4 – Mecanismo de ação da TFDA por meio do diagrama de Jablonski. Fonte: Adaptada de WAINWRIGHT.<sup>22</sup>

#### 1.3.2 Curcumina

O emprego de princípios ativos de origem vegetal com finalidade medicinal datam desde o início da história da Humanidade e a busca pela compreensão dos mecanismos de ação e as descobertas de moléculas bioativas impulsionam as indústrias farmacêuticas atuais. A partir da extração alcoólica do rizoma de Curcuma longa obtém-se um pó amarelo composto por três curcuminóides sendo 60% - 70% curcumina (CUR), 20% - 27% demetoxicurcumina (DMC) e 10% - 15% bisdemetoxicurcumina (BDMC), os quais são utilizados como condimento, principalmente na culinária indiana. <sup>30</sup> Além do seu emprego alimentício, a curcumina natural, composta pelos três curcuminóides, possui propriedades bioativas com efeitos antiinflamatórios, antiangiogênicos, antioxidantes, cicatrizantes e anticancerígenos. Devido a sua baixa toxidade e poucos colaterais, a curcumina é considerada segura por agências reguladoras como a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América. <sup>31</sup>

A estrutura da curcumina [(1E, 6E) -1, 7 -bis(4 -hydroxy -3 -methoxyphenyl) -

1, 6 – *heptadiene* – 3, 5 – *dione*] é formada por duas unidades aromáticas substituídas por um grupo metoxila e um grupo fenólico, ambas separadas por cadeia de polietileno composta por grupo ceto-enol ou di-ceto. A curcumina é encontrada majoritariamente na forma enol quando diluída em etanol, mas em solvente aquoso a forma di-ceto é predominante, pois é estabilizada pela coordenação de uma molécula de água. <sup>33</sup> Ambas formas permitem formar complexos com moléculas inorgânicas como alumínio e boro. As características estruturais conferem à curcumina um caráter lipofílico (*LogP* = 2, 5) e ácido, altamente solúvel em solventes orgânicos como dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etanol e acetona. A solubilidade da curcumina é aumentada em meio alcalino e a solução possui coloração laranja amarelada, mas é desfavorecida pela rápida degradação. <sup>34</sup>

O processo de degradação in vitro por autoxidação leva a uma transformação química



Figura 5 – Estrutura química dos curcuminóides do estrato de Curcuma longa: a curcumina, desmetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina. Fonte: Adaptada de NELSON.<sup>32</sup>

da curcumina em biciclopentadiona, que não necessariamente compromete a atividade pois os produtos do processo também podem auxiliar no mecanismo de ação. Esta reação ocorre por meio da oxigenação seguido da ligação dos dois anéis de metoxifenol da curcumina e ciclização dupla da cadeia heptadienediona. Para cada molécula de oxigênio consumida uma molécula de curcumina é convertida na autoxidação. <sup>35</sup> Em menor proporção, outra via de degradação é a solvólise, no qual as moléculas do solvente atuam na substituição nucleofílica formando como produto o diferuloilmetano, vanilina e ácido ferúlico com concentrações dependentes do pH ou da temperatura de incubação. <sup>32</sup>

Além da autoxidação e da solvólise, a curcumina pode sofrer degradação fotoquímica. As características fotofísicas são dependentes do solvente, e em geral, sua absorção é compreendida entre 408 a 500 nm e a emissão entre 460 a 560 nm, Mas, quando interage com superfícies hidrofóbicas, como a membrana, a fluorescência tem um desvio para o azul. <sup>36</sup> O mecanismo de degradação fotoquímica é mediado por oxigênio molecular por meio de reações tipo I (transferência de elétrons para  $O_2$ ) e tipo II (transferência de energia para  $O_2$ ), obtendo como principais produtos da degradação a vanilina, o ácido vanílico, o 4-vinilguaiacol, o ácido ferúlico, o aldeído ferúlico e 7 –*hidroxi* –1 –[(2*E*) –3 –(4 –*hidroxi* –3 –*metoxif enil*)*prop* –2 – *enoyI*] –6 –*metoxinaf talen* –2(1*H*) –*ona*, que também são FS, porém menos fotossensíveis que a curcumina. <sup>37</sup>

Visto que a absorção da curcumina está localizada na região visível do espectro eletromagnético, em específico no azul, a TFDA se restringe na aplicação de infecções superficiais, de modo que possa ativar a curcumina internalizada na bactéria. Diversos estudos são relatados na literatura sobre o uso da curcumina como FS para TFDA em diferentes espécies bacterianas, tanto Gram-positiva como Gram-negativa. Alguns estudos estão apresentados na Tabela 1 e mostram que independente da espécie bacteriana as concentrações da formulação e a dose de luz entregue geralmente são mais elevadas quando comparada a outros FSs, contudo, o efeito antimicrobiano é alcançado, validando o uso como FS.

Bactéria	Concentração	Dose J/cm²	Redução logUFC/ml	Ref.
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	2,5 mg/ml	120	3	39
Aeromonas hydrophila	75 µM	139	3,33	40
Burkholderia cepacia	50 µM	28,8	4	41
Escherichia coli	75 µM	139	2,65	40
Enterococcus faecalis *	40 µM	72	95%	42
Pseudomonas aeruginosa *	40 µM	72	81,1%	42
Staphylococcus aureus	1,5 mg/ml	20,1	3,6	43
Streptococcus mutans	600 µmol	75	1,7	44
Salmonella Typhimurium	75 µM	417	2,82	40

Tabela 1 – TFDA em diferentes bactérias utilizando curcumina como FS e luz na região azul do espectro eletromagnético. \*Estudo em biofilme, no qual a redução é dada em porcentagem.

Fonte: Elaborada p	oela autora.
--------------------	--------------

#### 1.3.3 Luz Azul

Para induzir a fotoinativação do microrganismo é necessário a ativação do FS por meio da luz em um comprimento de onda adequado. Em geral, combinando a maioria das bandas de Soret (região de máxima absorção de uma molécula) dos FS e as fornecidas pelas fontes de luz, a TFDA comumente é aplicada utilizando a região azul, verde ou vermelha do espectro eletromagnético. <sup>45</sup> Além disso, para que o efeito do tratamento seja direcionado, o comprimento de onda não deve ativar os cromóforos naturais. Desse modo, é preferível a aplicação dentro da janela óptica terapêutica, que consiste no intervalo de 650 a 1300 nm do espectro visível, o qual possui baixa absorção das biomoléculas e da água, mostrado na Figura 6, principalmente em caso de infecções internas porque não apresentará toxicidade às células eucarióticas. <sup>46</sup>

Embora a região do azul esteja compreendida no intervalo de 400 a 490 nm, a qual não corresponde a região da janela terapêutica, o seu uso para tratamento de infecções superficiais não apresenta toxicidade para as células epiteliais, pois, dificilmente esses cromóforos celulares serão ativados devido à baixa penetrabilidade da luz azul em tecidos. <sup>45</sup> Entretanto, alguns estudos relataram que a luz azul atua como antimicrobiano, sem a necessidade do uso de um



Figura 6 – Janela Óptica Terapêutica incluindo o espectro de absorção de diversos consti-tuinte do tecido biológico.
Fonte: Adaptada de TABOADA.<sup>47</sup>

FS. <sup>48</sup> Apesar do mecanismo ainda não estar bem esclarecido, acredita-se que esse efeito seja em decorrência da presença de porfirinas livres com bandas de Soret na região de 405 nm e de flavinas ou flavoproteina livres com absorção no intervalo de 430 nm a 470 nm, que atuam como FS nos microrganismos. <sup>49</sup> A efetividade dependerá da quantidade de moléculas livres disponíveis para absorvem o fóton e transferir a energia ou elétron para formação de EROs. O número de porfirinas e flavinas endógenas varia entre as diferentes espécies bacterianas, principalmente quando comparada às Gram-positivas que são mais susceptíveis que as Gram-negativas. <sup>50</sup>

Provavelmente, devido a essa ação adicional na TFDA, a luz azul é mais eficiente para inativação de microrganismos quando comparada com a luz verde e vermelha. <sup>45</sup> Contudo, devido às suas propriedades, não é possível ser empregada para infecções que estejam internas e sistêmicas sem que haja um dispositivo que propague a luz até o local desejado. No entanto, o emprego em tratamento de infecções superficiais e localizadas como em garganta, unha, feridas na pele é viável, contribuindo para diminuir a evolução para uma infecção sistêmica. <sup>22</sup>

#### 1.4 Distribuição do Limiar de Dose

O diferencial da TFDA é a atuação concomitante de três componentes: o FS, a luz e o oxigênio. A variação de cada um destes três parâmetros irá modificar a resposta do tratamento, podendo ser mais ou menos efetivo. Contudo, definir uma dose de TFDA é um desafio, visto que o resultado não possui uma equivalência direta da concentração do FS e da dose de luz para a produção de EROs. <sup>51</sup> Dentre os três elementos, o oxigênio molecular é considerado intrínseco do sistema biológico, ou seja, está presente no microrganismo e no local da infecção. Por outro lado, a dose de luz e a concentração do FS são parâmetros flexíveis para atingir resultados eficientes no tratamento.
## 1.4.1 Modelo

Em uma cultura bacteriana a resposta de um estímulo externo pode ser ligeiramente diferente dependo da distribuição de células presentes. A resposta biológica a um estímulo mensurável é comumente denominado de dose resposta. Por exemplo, dada a aplicação de uma concentração fixa de FS, a morte bacteriana pode variar para cada dose de luz entregue. Poucas células bacterianas são mortas em baixas ou em altas doses de luz, entretanto existe uma dose limiar que elimina ao menos metade da população. Desse modo, o limiar de dose é definido como a quantidade mínima de luz que deve ser absorvida pelo FS para que o dano celular oxidativo causado seja irreversível em uma célula. <sup>52</sup>

Todavia, observa-se experimentalmente que a curva dose resposta de uma cultura micro-biana estará compreendida dentro de um intervalo de luz aplicado, visto as diferenças metabólicas de cada célula bacteriana que proporciona heterogeneidade para população. Como consequência, a dose limiar é apresentada como uma distribuição, na qual quanto maior a dose entregue maior a fração de bactérias mortas e, analogamente, quanto menor a dose aplicada menor a fração de morte bacteriana. Matematicamente, para uma densidade de microrganismos tem-se que a probabilidade de fração de morte celular compreendida até a dose aplicada ( $f(D_a)$ )) é dada como resultado da integral da Equação 1.1. Onde g(D)dD corresponde a densidade de células bacterianas da população que respondem ao tratamento, sendo g( $D_a$ ) a distribuição de dose, podendo ser explicitado como na Equação 1.2. <sup>53</sup>

$$f(D_a) = \frac{\sum_{0}^{D_a} g(D) \, dD}{(1.1)}$$

$$g(D_a) = \frac{df(D)}{dD}\Big|_{D_a}$$
(1.2)

A plotagem de g( $D_a$ ) corresponde a uma curva de distribuição que fornece parâmetros capazes de descrever a população estudada, conforme mostrado na Figura 7. O valor do pico corresponde ao limiar de dose que elimina 50% da população (Dth, threshold dose, sendo um indicador de tolerância ou sensibilidade ao tratamento, quando comparada com outras populações ou entre sessões. Além disso, a largura da curva à meia altura, ou comumente referido com FWHM (do inglês Full Width at Half Maximum), pode ser interpretada como o grau de heterogeneidade da população, visto que quanto mais larga a distribuição implica que existe número significativo de células bacterianas presentes com resposta distinta da maioria. Quando a largura é pequena, a população tende a ser mais homogênea. <sup>52, 53</sup>

Esse modelo teórico foi desenvolvido por pesquisadores do CePOF (Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica) por SABINO <sup>52</sup> e empregado no estudo de células eucarióticas por FARIA.<sup>53</sup> O uso deste modelo em microrganismo ainda é escasso na literatura, mas evidencia grande potencial para análise complementar na resposta ao tratamento de TFDA.



Figura 7 – Curvas do modelo distribuição do limiar de dose a partir de um curva teórica de fração de morte bacteriana (f(D)) e sua derivada g(D) como curva de distribuição de dose, explicitando os parâmetros D<sub>th</sub> e FWHM. Fonte: Elaborada pela autora.

# 2 ESTUDO DA FORMULAÇÃO DE CURCUMINA NATURAL NA INCORPORAÇÃO MICROBIANA

## 2.1 Contextualização

Um dos processos limitantes para a eficiência da TFDA é a penetração do FS nos microrganismos. A primeira etapa no processo de inativação bacteriana é a interação do FS com sua superfície para que possa transpassá-la para o meio intracelular. A morfologia das bactérias afetam diretamente a sua interação com as moléculas fotossensibilizadoras no processo de internalização. <sup>25</sup> Nas bactérias Gram-negativas o mecanismo de difusão do FS é mediado pela membrana externa, formada por lipopolissacarídeos, que dificultam a incorporação de moléculas neutras e carregadas negativamente, enquanto que na Gram-positiva a penetração do FS pode ser facilitada pelos poros presentes na parede celular formada por peptidoglicano, além de ser mais favoráveis para interação de FSs catiônicos. <sup>54</sup>

Portanto, para que um protocolo da TFDA seja eficiente, é necessário que a escolha do FS assim como a formulação sejam adequadas para a espécie bacteriana, pois pode modificar as características físico-químicas das moléculas, os quais são parâmetros imprescindíveis para otimizar a interação.

## 2.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo consiste em caracterizar quantitativamente e qualitativamente a interação da curcumina natural na formulação xarope e na solução álcool/DMSO em bactérias do gênero Streptococcus. Além disso, verificar in vitro uma concentração ótima de incorporação da molécula fotossensibilizadora para ser utilizada em estudos posteriores (Cap. 3).

## 2.3 Metodologia

#### 2.3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos ensaios foram as bactérias Gram-positivas Streptococ-cus mutans (ATCC 25175), Streptococcus pyogenes (isolado de infecção em pacientes) e isolado clínico de diversas bacterias de pacientes com farigotonsilite streptocócica. O microrganismo foi cultivado em meio líquido Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C e 150 rpm em incubadora com agitação orbital (Quimis <sup>®</sup>). Após o crescimento microbiano em overnight, as amostras foram centrifugadas (5702 Eppendorf <sup>®</sup>) e resuspendidas em tampão fosfato salino (PBS) e posteriormente diluídas para obtenção do inóculo em  $10^7 - 10^8 U F C/mI$  (unidades formadoras de colônia por mililitros), verificado pela densidade ótica em 600 nm (Cary UV-Vis50, Varian).

# 2.3.1.1 Isolamento e identificação bacteriana

A bactéria Streptococcus pyogenes foi isolado da infecção de pacientes com farigo-tonsilite streptocócica, por meio da coleta de swab e foi identificada pela Dra Kate Cristina Blanco segundo os testes bioquímicos sugerido por WINN, <sup>8</sup> apresentados na Figura 8. As bactéria coletadas estão de acordo com o CAAE 83082018.4.0000.8148 (Ação fotodinâmica no tratamento de faringotonsilite estreptocócica).



Figura 8 – Esquema de testes bioquímicos para identificação do S. pyogenes. Fonte: Elaborada pela autora.

# 2.3.2 Fotossensibilizador

# 2.3.2.1 Curcumina em Dimetilsulfóxido

A solução estoque foi preparada diluindo 5 mg da Curcumina Natural (PDT Pharma <sup>®</sup>) com 0, 1% (m/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) em 1 mL de álcool etílico. A partir desta solução foram realizadas diluições para obtenção das concentrações de 0,5; 0,75; 1; 3 e 5 mg/ml para os ensaios microbiológicos.

# 2.3.2.2 Xarope de Curcumina

A base para o xarope de curcumina foi preparada com 30% de sacarose a 80 °C em placa de aquecimento (Gehataka <sup>®</sup>). A solução estoque foi preparada usando 5 mg de Curcumina Natural (PDT PHARMA <sup>®</sup>) triturada com bastão de vidro e diluída em 2% (m/v) de álcool etílico.

<sup>55</sup>Concentrações de 0.5; 0.75; 1; 3 e 5 mg/ml de FS foram obtidas da solução estoque.

# 2.3.3 Quantificação da Absorção do Fotossensibilizador

O inóculo em  $10^7 - 10^8 U F C/ml$  foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rotações por minutos (rpm). O sobrenadante foi descartado e a bactéria foi ressuspendida na solução contendo FS, permanecendo. incubada em estufa (EletroLab<sup>®</sup>) a 37 °C por 4 minutos. Após esse período as amostras foram centrifugadas para a coleta do sobrenadante e foram realizadas diluições a fim de medir a absorbância no espectrômetro (Cary UV-Vis50, Varian) em 425 ± 7 nm para

curcumina em DMSO e 440 ± 7 nm para o xarope de curcumina. Os resultados foram obtidos pela correlação entre a absorbância do sobrenadante com a absorbância do solução do FS na concentração correspondente. <sup>54</sup>

# 2.3.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

# 2.3.4.1 Fonte de Luz

Como fonte de luz foi utilizado um dispositivo intitulado Biotable <sup>®</sup>, desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico – LAT, do Instituto de Física de São Carlos, composta por 24 diodos emissores de luz (LED - Light Emitting Diode) no comprimento de onda de 450 nm. Cada poço recebe irradiação uniforme com intensidade média de 30  $mW/cm^2$ . A dose de luz utilizada foi de 28,8  $J/cm^2$ .

## 2.3.4.2 Terapia Fotodinâmica

Após a coleta do sobrenadante a bactéria foi ressuspendida em PBS e submetida a irradiação na Biotable<sup>®</sup>. Em cada experimento continha quatro grupos, três grupos controles (inóculo + PBS; inóculo + PBS + irradiação; inóculo + FS) e, o grupo TFD (inóculo + FS + irradiação). Após a irradiação todas as amostras foram diluídas e semeadas em placas de Petri com meio de cultura ágar BHI. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para a realização da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). A quantificação das colônias bacterianas foi feita considerando o número de células presentes em 1 ml do meio líquido. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 2.3.5 Validação da Absorção do Xarope de Curcumina

#### 2.3.5.1 Microscópio de Fluorescência Confocal

Os microrganismos foram incubados com 0,75 mg/ml de xarope de curcumina por 4 minutos a 37 °C. Posteriormente, os microrganismos foram resuspendidos em PBS e 10 $\mu$ l foram colocados sobre uma lamínula de vidro. As imagens da suspensão foram adquiridas utilizando o microscópio confocal (LSM780 - Carl Zeiss, Alemanha) com um laser de argônio emissor a 458 nm para excitação. O sinal de fluorescência foi coletado em um canal de 469 a 599 nm, correspondendo a fluorecência do xarope de curcumina.

#### 2.3.5.2 Análise Metabólica por Curva de Crescimento

Após o preparo do microrganismo (2.3.1), a bactéria foi ressuspendida em água destilada autoclavada e na base do xarope na proporção de 1:400. Em seguida foram colocadas no incubadora com agitação orbital (Quimis <sup>®</sup>) em 150 rpm a 37 °C. As medidas de densidade óptica foram realizadas a 600 nm utilizando o espectrômetro (Cary UV-Vis50, Varian).

# 2.3.6 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata (total n = 9). O desvio padrão é apresen-tado como barra de erros, sendo que em alguns casos devido ao pequeno valor a barra não é perceptível. Para verificara distribuição normal dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram avaliados pelo teste T student. Um valor de p < 0, 05; 0, 01; 0, 005; 0, 001 foram considerados significativos.

## 2.4 Resultados e Discussão



Figura 9 – Calibração do fotossensibilizador por absorbância. a) Espectro absorbância curcumina em diferente formulações. b) Reta de calibração da absorbância versus diferentes concentrações da curcumina para a formulação em xarope (440 nm) e para a formulação em álcool/DMSO (425nm). Gráficos normalizados. Fonte: Elaborada pela autora.

A resistência aos antibióticos pelas bactérias aumenta significativamente com o passar do tempo, estima-se que em 2050 haverá 10 milhões de mortes anualmente devido às bactérias multirresistentes. <sup>17</sup> A TFDA é uma alternativa ao tratamento padrão, pois seu mecanismo de ação permite a eliminação de células indesejáveis pela combinação de três componentes: a molécula fotossensibilizadora; a dose de luz; e o oxigênio presente na célula. Para que a terapia seja eficiente, o patógeno deve interagir com o FS porém, o efeito citotóxico deve ocorrer apenas quando há a incidência da luz. A estabilidade da formulação utilizada neste trabalho já foi comprovada anteriormente e os estudos preliminares da ação fotodinâmica contra o Staphylococcus aureus (ATCC 25923) e os isolados clínicos da faringotonsilite aguda mostraram-se eficazes e promissores para seu uso clínico. <sup>55</sup>

O dado presente na Figura 9.a indica que a curcumina natural possui máxima absorção em  $\lambda$  = 440*nm* quando na solução xarope e em  $\lambda$  = 425*nm* quando em álcool/DMSO. A quantificação da incorporação da curcumina no xarope foi realizada após o período de incubação do microrganismo com o FS por 4 minutos pela correlação entre a absorbância do sobrenadante e a concentração nominal da formulação, Figura 9.b. A interação da curcumina em xarope foi comparada com a solução álcool/DMSO nas mesmas proporções para três espécies de bactérias do gênero Streptococcus: S. mutans (ATCC 25175), um patógeno bucal; S. pyogenes (isolado clínico de faringotonsilite) e o isolado clínico coletados de paciente com faringotonsilites.

Foi verificado que a interação do xarope é superior à solução álcool/DMSO para os três microrganismos estudados. A interação porcentual média de curcumina para S. mutans foi de 24% em xarope e de 10% em solução de álcool/DMSO (Figura 10.a). O aumento da interação também ocorreu para a linhagem isolada de paciente S. pyogenes que foi de 26% em xarope e de 13% em solução de álcool/DMSO (Figura 10.b). Para o isolado clínico de pacientes a interação do FS foi de 27% e 5% em xarope e álcool/DMSO, respectivamente (Figura 10.c).



Figura 10 – Incorporação de diferentes concentrações do xarope de curcumina e da curcu-mina em álcool/DMSO. a) S. mutans. b) S. pyogenes. c) isolado clínico. ; ; indica diferença significativa de *p* <0.05; 0,01; 0,005 respectivamente. Fonte: Elaborada pela autora.

Como visto na Figura 10.c, a absorção do xarope é predominante em baixas concentrações para o isolado clínico. As bactérias S. mutans e S. pyogenes possuem uma taxa de interação linear com a concentração disponibilizada até o limiar de 3 mg/ml (Figura 10.a e 10.b). Como observado, altas concentrações não resultam em maior absorção de FS. Aparentemente para

o tempo de incubação usado, sobre tais concentrações, pode haver mecanismo de saturação na penetração do FS. Muito acima de 3 mg / ml, ocorre uma diminuição da captação. Além disso, foi verificada uma estagnação da concentração incorporada para as três cepas. O FS encontra-se capturado pelas bactérias conforme a visualização da microscopia confocal, Figura

11. Entretanto, devido ao limite de resolução não foi possível determinar a localização celular exata da incorporação do FS. No entanto, a imagem demonstra qualitativamente a presença de curcumina nos domínios internos dos microrganismos, pois a autofluorescência da curcumina se sobrepõe à localização da bactéria.



Figura 11 – Imagem de fluorescência de microscopia confocal do mesmo campo de visão. Em cima: células tratadas com xarope de curcumina. Embaixo: Imagem de campo claro. a) S. mutans b) S. pyogenes c) isolado clínico. Fonte: Elaborada pela autora.

A membrana biológica é o principal componente celular de interação com moléculas anfipáticas como a curcumina, a qual possui a cadeia principal hidrofóbica com alguns grupos funcionais polares, capaz de interagir com a membrana biológica e influenciar em sua fluidez semelhante a outras moléculas anfipáticas como por exemplo, o colesterol. <sup>56</sup> A cabeça dos fosfolipídios interagem com os grupos metoxi ou hidroxilo da curcumina, para que a direção da ligação influencie diferentemente no grau de ordem da bicamada celular. Quando a curcumina está em baixas concentrações a interação desta com a bactéria ocorre apenas na superfície celular com os grupos acil ordenados, mas quando a ligação é perpendicular eles são desordenados. Ge-ralmente a curcumina irá apresentar um impedimento estérico na região de ligação promovendo o ordenamento apenas localmente, pois na região de não ligação haverá um desordenamento para compensação entrópica. <sup>57</sup> Essa modulação da membrana é semelhante ao mecanismo empregado em células eucarióticas com a presença do colesterol na membrana. Em bactérias,

a estabilidade mecânica é mantida pela presença de parede celular, visto que o colesterol está ausente. Entretanto o efeito da curcumina nas membranas biológicas ainda não é totalmente compreendido. Além da interação com os fosfolipídios, a curcumina pode modular a atividade das proteínas de membrana, como verificado por INGOLFSSON <sup>58</sup> e HUNG <sup>59</sup> através do estudo dos canais formados pela gramicidina A sem afetar sua condutância que modificará a espessura e a propriedade elástica das bicamadas.



Figura 12 – Curva de crescimento bacteriano para análise metabólica por medida da absor-bância a 600 nm em água destilada autoclavada e na base xarope. a) S. mutans.
b) S. pyogenes. c) isolado clínico.; ; ; *J* indicam diferença significativa de *p* <0.05; 0,01; 0,005; 0,001 respectivamente.</li>
Fonte: Elaborada pela autora.

Visto que há diferença da interação do FS dependendo da formulação, investigou-se a influência da base do xarope no metabolismo da bactéria por meio da curva de crescimento em água destilada autoclavada (sem sacarose) e na base do xarope (com sacarose) através de absorbância em 600nm. A Figura 12 mostra distintas curvas para os diferentes meios. Para o funcionamento do metabolismo microbiano é necessário a presença de nutrientes. A adição de sacarose possibilitou diferença de crescimento estatisticamente significativa nas primeiras horas como mostra a Figura 12.a e 12.b, enquanto que na Figura 12.c a diferença começa ser

significativa após 5 horas, provavelmente devido ao isolado clínico ser mais exigente nutricionalmente para o desenvolvimento. Visto que a diferença entre o crescimento nas duas soluções é a composição de sacarose, o resultado sugere que a presença deste carboidrato influencie na absorção do FS.

Os três microrganismos apresentam um padrão de crescimento com concavidade negativa na presença da sacarose, no entanto, a concavidade torna-se positiva na ausência deste carboidrato. A concavidade da curva relaciona a taxa de crescimento microbiano. O crescimento na base do xarope é acelerado nas primeiras horas, atingindo rapidamente a fase estacionária quando comparado ao crescimento em água destilada sem sacarose, Figura 13.



Figura 13 – Derivada da curva de crescimento bacteriano, por meio da absorbância em 600 nm, para análise metabólica em água destilada autoclavada e na base xarope. a) S. mutans. b) S. pyogenes. c) isolado clínico. Fonte: Elaborada pela autora.

A formulação da curcumina natural influencia diretamente na taxa de absorção do FS, como apresentado nos resultados através da Figura 10. Apesar da solubilidade da curcumina natural ser maior na solução álcool/DMSO verifica-se uma preferência dos microrganismos pela interação dos curcuminóides solubilizados no xarope. A ligação à glicose por cepas bacterianas foi observada pela taxa de afinidade bacteriana do transporte de nutrientes em microrganismos durante o tempo de replicação. Esse resultado sugere uma sinergia entre o xarope e os curcuminóides, devido ao açúcar auxiliar na capturação do FS e aumentar o potencial de incorporação



Figura 14 – Esquema hipotético da influência das formulações de curcumina na incorpora-ção do FS pela bactéria e a ativação do metabolismo bacteriano. Fonte: Elaborada pela autora.

dos curcuminóides solubilizados no xarope. Bactérias do gênero Streptococcus com relevância clínica são homofermentadores, ou seja, são capazes de obter energia através da fermentação da glicose. <sup>8</sup> Logo, quando o carboidrato está presente em abundância num ambiente, o metabo-lismo do microrganismo acelera, consequentemente irá incorporar mais moléculas de sacarose o qual carregará neste processo as moléculas de curcumina e dos demais curcuminóides. Esse mecanismo é semelhante à estratégia utilizada para administração de antibióticos em micror-ganismos resistentes. ALLISON <sup>60</sup> verificou que as cepas suscetíveis a antibióticos possuem um metabolismo mais acelerado em comparação com as cepas resistentes. Ao administrar o fármaco em conjunto com outro metabólito, por exemplo a glicose e a frutose, há um aumento na produção de NADH e na força prótonmotora devido a ativação do ciclo do ácido cítrico (CAC), desse modo as cepas resistentes aumentam o estímulo de incorporação do fármaco <sup>61</sup> (Figura 14).

Uma vez que o FS foi incorporado pelos microrganismos, a TFDA foi realizada, considerando a dose de luz de 28, 8*J/cm*<sup>2</sup> em 450 nm para as diferentes concentrações de xarope incorporados. O resultado de inativação obtido corresponde somente a ação da TFDA, pois a interação apenas do xarope (Figura 15) ou da luz (Figura 16) com os microrganismos não apresentaram efeitos citotóxicos. A fim de evidenciar os resultados, a análise dos dados de UFC/ml foram transformados para a base logarítmica (*log*<sub>10</sub>). Considerando apenas o FS incorporado, obteve-se uma redução de 3,4 log para S. mutans (Figura 17.a), 2,9 log para S. pyogenes (Figura 17.b) e 2,5 para isolado clínico (Figura 17.c) na concentração nominal de 5 mg/ml. A inativação para o isolado clínico foi menor comparada as outras espécies bacterianas, pois trata-se de uma comunidade bacteriana que apresenta uma interação entre as diferentes bactérias e auxilia na proteção contra agentes externos que podem diminuir a eficiência da TFDA. A comparação da TFDA da curcumina em álcool/DMSO não é apresentada, pois como o DMSO é dependente da concentração nominal de curcumina, a sua porcentagem apresentouse tóxica às bactérias na ausência de luz.

A morte celular bacteriana causada pela TFDA decorre dos danos sofridos pela membrana citoplasmática, proteína e pelo DNA. Os danos na membrana modificam as proteínas presentes, alteram os gradientes de concentração, além de alterar a síntese da parede celular, sendo que o conjunto destes fatores sejam suficientes para induzir a morte bacteriana. A eficiência do dano está atrelada à interação do FS com a célula, pois em diferentes regiões a eficiência quântica pode ser distinta, além de dificultar a difusão das EROs para que atinjam os alvos moleculares.

<sup>29</sup>Contudo, a internalização torna o processo mais efetivo, visto que permite atuação das duas vias de ação, pois o tipo I (transferência de elétrons) necessita da internalização enquanto o tipo II (transferência de energia) não é obrigatório. Deste modo, diferentes tempos de incubação permitem distintas localizações do FS na célula, auxiliando na difusão das espécies reativas e consequentemente na eficiência da ação fotodinâmica, principalmente para as reações do tipo I que preferencialmente devem ocorrer no interior celular para maior eficácia, porque existem mais biomoléculas disponíveis para iteração.

Considerando a concentração de 3mg/ml, observou-se a redução de 1,5 a 3 *log*10(*U F C/ml*) com dose de luz de 28, 8*J/cm*<sup>2</sup>. Tal resultado é considerado adequado devido a captação da curcumina e a compreensão do modelo apresentado aqui legitima o uso do xarope na aplicação clínica.





Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 16 – Controle da luz 28, 8*J/cm*<sup>2</sup> para S. mutans, S. pyogenes e isolado clínico. Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 17 – Inativação Fotodinâmica com 28, 8*J/cm*<sup>2</sup> a 450 nm para diferentes concentra-ções de incorporação do xarope de curcumina. a) S. mutans. b) S. pyogenes. c) isolado clínico. ; ; ; *J* indicam diferença significativa de *p* <0.05; 0,01; 0,005; 0,001 respectivamente. Fonte: Elaborada pela autora.</p>

# 2.5 Conclusão

A interação do FS pelo microrganismo é uma etapa fundamental para eficiência da TFDA. Além das características físico-químicas da molécula a taxa de interação pode ser modulada com a formulação, possibilitando assim, uma estratégia alternativa para implementação do tratamento em casos clínicos que o FS é solubilizado em solventes tóxicos às células.

Nas concentrações estudadas foi verificado que a interação do FS é crescente atingindo o máximo em 3 mg/ml, sendo estagnada acima desta. Deste modo, para estudos in vitro com curcumina natural serão utilizadas concentrações até este limiar. Nossos resultados sugerem que o uso do xarope de curcumina promove alta eficiência na interação de FS por influenciar no metabolismo bacteriano e, consequentemente, promove melhores resultados da TFDA.

# 3 ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE LIMIAR DE DOSE EM MÚLTIPLAS SESSÕES DE TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

#### 3.1 Contextualização

A descoberta da penicilina foi um grande marco na historia da ciência, possibilitou avanços em diversas áreas de pesquisa, saúde e indústria. Inicialmente, aparentou ser a solução para as complicações envolvendo microrganismos, mas logo mostrou ser um cenário idealizado devido as respostas negativas aos tratamentos implementados.<sup>62</sup> Atualmente, vivenciamos a era pós antibiótico, no qual infecções recorrentes em seres humanos, como a infecção de garganta, podem ser de difícil tratamento caso o patógeno infectante possua mecanismo de resistência que invalide a atividade do antibiótico.<sup>16</sup> Neste cenário, a TFDA mostra-se como uma alternativa promissora devido a sua eficiência na atividade antimicrobiana sem que a via de ação seja invalidada. Apesar dos seus benefícios, a TFDA possui limitações que podem influenciar nos protocolos de tratamentos, principalmente para múltiplas sessões.<sup>18</sup>

O estudo da influência da TFDA nas bactérias sobreviventes ao tratamento não deve ser negligenciado, mas devem ter uma cinética de inativação compreendida, tal como o perfil da gerações sucessivas ao tratamento empregado para garantir a eficácia e segurança dos protocolos. 63

#### 3.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo consiste em estudar a variação dos parâmetro das curvas resposta de mortalidade celular de Streptococcus pyogenes e Isolado Clínico para diferentes doses de luz ao decorrer de múltiplas sessões de TFDA utilizando o modelo de distribuição do limiar de dose (1.4). Desse modo, avaliar o potencial de desenvolvimento de tolerância ao tratamento.

## 3.3 Metodologia

#### 3.3.1 Microrganismo

As bactérias S. pyogenes e isolado clínico foram preparadas conforme a descrição em 2.3.1.

#### 3.3.2 Fotossensibilizador

Para os experimentos de múltiplas sessões foi utilizada a formulação xarope de curcumina. A base para o xarope de curcumina foi preparada diluindo 30 g de sacarose em 70 g de água sob aquecimento de 80 °C. O xarope foi preparado para concentração final de 0,75 mg/ml e 2,25

mg/ml de Curcumina Natural (PDT Pharma<sup>®</sup>) triturada com bastão de vidro e adicionado em 2% (m/v) de álcool etílico. O volume final da solução foi completado com a base do xarope. <sup>55</sup>

#### 3.3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Com o inóculo padronizado, separou-se um volume para os grupos controles e tratamentos. Os grupos controles incluem controle geral (bactéria + PBS), controle da luz (bactéria + PBS + irradiação) e o controle do FS (bactéria + FS). As bactérias do grupo tratamento (bactéria + FS + luz) e do grupo FS foram distribuídas em eppendorfs com volume de 500  $\mu$ L e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, para serem ressuspendidas em xarope de curcumina. Todos os grupos foram incubados a 37 °C por 4 minutos. Os tratamentos e o controle de luz foram irradiados na Biotable<sup>®</sup> de 40 *mW/cm*<sup>2</sup> no comprimento de onda de 450nm. As doses de luz estudadas foram fracionadas, sendo de 19,2; 38,4; 57,6; 76,8; 96 e 115,2 *J/cm*<sup>2</sup>. Por fim, todas as amostras foram diluídas e semeadas em placas de Petri com meio de cultura ágar BHI. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas para a realização da UFC/mI.

#### 3.3.4 Múltiplas Sessões

As colônias de cada tratamento localizadas na placa de Petri foram coletadas com auxílio de uma alça de inoculação e depositadas em meio BHI líquido a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, foram armazenadas em tubos criogênicos a -20 °C, contendo 20% de glicerol. As bactérias congeladas foram utilizadas para o próximo ciclo de tratamento, seguindo os protocolos anteriores (2.3.1 e 3.3.3). O esquema é apresentado abaixo na Figura 18.



Figura 18 – Esquema do protocolo de múltiplas sessões de TFDA. 1) irradiação da bactéria com FS na Biotable. 2) Cultura de bactérias plaqueada após o tratamento de TFDA. 3) Coleta de colônias sobreviventes a sessão aplicada. 4) Inóculo contendo as bactérias sobreviventes a TFDA.
 Fonte: Elaborada pela autora.

## 3.3.5 Fotobranqueamento

A solução xarope de curcumina de 2,25 mg/ml foi irradiada na Biotable<sup>®</sup> (descrito em 2.3.4.1) com intensidade de 40  $mW/cm^2$  e no comprimento de onda de 450nm, nos intervalos de 8 a 48 minutos. A cada intervalo o espectro de absorção foi coletado usando o espectrômetro

(Cary UV-Vis50, Varian) no intervalo de 300 a 800 nm, em cubeta de quartzo. O valor máximo da absorbância para cada espectro (440 nm) foi coletado para plotagem em função do tempo de irradiação no software Origin <sup>®</sup> 2017.

## 3.3.6 Tratamento dos Dados

Para a análise da distribuição do limiar de dose é necessário a descrição dos dados matematicamente. Visto que os dados representam a mortalidade populacional, foram analisadas as funções que descrevem esse comportamento. Dentre elas a que melhor se ajustou aos dados com menor  $\chi^2$  foi a função logística, dada pela fórmula:

$$f = \frac{a}{\left(1 + e^{-k(x-x_c)}\right)}$$
(3.1)

A função logística ajustada corresponde portanto a função f(Dth) do modelo descrito em 1.4, sendo que foi derivada para obter a curva de distribuição de dose (g(Dth)). Os parâmetros de largura da curva e máximo foram extraídos através da ferramenta Multiple Peak Fit do software Origin<sup>®</sup>.

## 3.3.7 Análise Estatística

Os experimentos para S. pyogenes foram realizados em triplicatas (N=9) e para o isolado clínico em duplicata (N=6). O desvio padrão é apresentado como barra de erros, sendo que em alguns casos, devido ao pequeno valor da barra, não é perceptível. Para verificar distribuição normal dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados de dose limiar em múltiplas sessões foram avaliados por Anova 1 way. Os grupos controles foram avaliados por Anova 2 way para verificar se a média é diferente entre os tratamentos e as doses. Ambas análises e o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson foram realizadas no software Origin<sup>®</sup>. Um valor de p < 0, 05 foi considerado significativo.

## 3.4 Resultados e Discussão

A TFDA é uma técnica muito estudada como alternativa ao tratamento de infecções bacterianas, que são geralmente tratadas com antibióticos. Também é frequentemente relatado pela literatura e por programas de epidemiologia os casos de desenvolvimento de resistência microbiana a diversos fármacos em ambientes clínicos, de pecuária e agricultura.

<sup>16</sup> Um dos principais motivos de usar a TFDA como alternativa é por não apresentar relatos de desenvol-vimento de resistência, uma vez que o mecanismo de ação é dado por oxidação inespecífica. Contudo, na literatura há poucos estudos destinados a verificar se os protocolos empregados podem perder a eficiência quando a bactéria é submetida a múltiplas sessões de TFDA, pois, mesmo que o mecanismo de ação seja inespecífico, existe uma etapa anterior que está relacionada com a interação da bactéria com FS e a luz, que pode influenciar na eficácia do tratamento e ser estudado por dosimetria.

Baseado nos resultados de incorporação do FS e redução da carga bacteriana obtida no capítulo 2, a concentração de 0,75 mg/mL do xarope de curcumina foi selecionada para os experimentos de distribuição de dose, por ser um valor abaixo do limiar de concentração incorporada. A Figura 19 mostra a evolução das curvas de distribuição de doses obtidas para S. pyogenes ao longo de três sessões de TFDA. A fração de morte máxima atingida para os três ciclos foi cerca de 60%, mas apenas as sessões 1 e 2 tiveram perfil sigmoide como resposta às diferentes doses aplicadas. A sessão 3 não apresentou comportamento de mortalidade sigmoide, sendo que a obtenção da dose limiar tem maior imprecisão e parâmetro heterogeneidade da população indisponíveis.

Apesar das doses de luz entregues serem elevadas, a concentração do FS não permite obter um perfil de mortalidade com a região platô próximo a 100% de morte, conforme requerido pelo modelo proposto por SABINO.<sup>52</sup> O comportamento da fração de morte (f(Dth)) reflete na distribuição de dose limiar (g(Dth)). A Figura 20 apresenta os valores obtidos para limiares de dose considerando 3 sessões de TFDA com FS na concentração de 0,75 mg/ml, indicando que o tratamento não é otimizado, uma vez que as Dth são elevadas e não foi possível obter morte de todas as células bacterianas.

Com o propósito de aumentar a eficiência da TFDA, optou-se pelo uso do xarope na concentração de 2,25 mg/mL, o qual corresponde a 10% da concentração do xarope utilizado em casos clínicos e atende ao requisito de ser abaixo do limiar de incorporação (vide Figura 10) para poder seguir com múltiplas sessões de subdose à TFDA. <sup>55, 65</sup>

Ademais, foi realizado um teste para assegurar que as doses de luz não tivessem uma ação de fotobranqueamento imediata, ou seja a conversão da curcumina em outras espécies químicas, a fim de garantir a atividade fotodinâmica para cada combinação de luz e FS realizada. O fotobranqueameto do xarope de curcumina natural apresentado na Figura 21.a mostra o comportamento da absorção do xarope (440 nm) normalizado como uma exponencial decrescente



Figura 19 – Curva de distribuição de limiar de dose (g(Dth) - derivada) e fração de morte celular bacteriana (f(Dth) - pontos) totalizando 3 sessões de TFDA para S. pyogenes, com diferentes doses de luz aplicadas a 450 nm e subconcentração do xarope de curcumina (0,75 mg/ml). Cada gráfico representa a resposta bacteriana em cada sessão de 1 a 3 identificados na devida ordem no respectivo gráfico. Fonte: Elaborada pela autora.





Figura 20 – a) Valores dos limiares de dose e da dose limiar média ao longos das 3 sessões de TFDA em S. pyogenes. b) Sobreposição de todas as curvas de mortalidade celular de S. pyogenes em múltiplas sessões de TFDA. Ambos com subdose do xarope de curcumina (0,75 mg/ml). Fonte: Elaborada pela autora.

no tempo, cuja taxa de decaimento de 0,  $09 \pm 0$ ,  $02min^{-1}$  e o tempo de meia vida corresponde a 7 ± 1 minutos. A normalização foi realizada pela divisão do pico da absorbância de cada tempo de irradiação (A440) pela absorbância sem luz (A0). A Figura 21.b evidência o deslocamento do pico de absorção para a esquerda devido a solvatação da água presente na base do xarope, de modo que a contribuição do pico do curcuminóide mais hidrofóbico se torne menos evidente no espectro. <sup>66</sup> Apesar de após a primeira dose haver um decaimento de aproximadamente 40%, as doses restantes seguem com uma degradação menos acentuada ao longo do tempo. Dessa forma, uma porcentagem de moléculas permanecem disponíveis para atividade fotodinâmica, uma vez que a concentração escolhida foi de 2,25 mg/ml.



Figura 21 – Fotobranqueamento do xarope de curcumina (2,25 mg/ml) por absorbância (440 nm) excitando no comprimento de onda 450 nm por meio da Biotable<sup>®</sup> de 40 mW/cm<sup>2</sup>. a) Espectro de absorbância do xarope de curcumina (2,25 mg/ml). b)Curva de fotobranqueamento em função do tempo do xarope de curcumina (2,25 mg/ml). Fonte: Elaborada pela autora

Com a finalidade de verificar a resposta e tolerância de S. pyogenes e isolado clínico em relação a TFDA, foi estabelecido um total de 10 ciclos, de tal forma a garantir relevância estatística para resultados de sucessivas gerações, a exemplo TAVARES, <sup>67</sup> ZHANG, <sup>68</sup> e AMIN.<sup>48</sup> Como mostrado na Figura 22 foi constado ausência de perda na eficiência da TFDA com xarope de curcumina na concentração de 2,25 mg/ml e doses de luz de 0 – 115,  $2J/cm^2$  para S. pyogenes durantes as 10 sessões.

Além disso, com o intuito de verificar um cenário no qual a TFDA poderia promover resistência ou tolerância ao tratamento aplicado, optou-se pelo emprego de subdoses e superdo-sagem de FS e luz, respectivamente. Por essa razão, a Dth ao longo das sessões foram elevadas, de tal modo que dificilmente seriam empregadas em situações clínicas, uma vez que não se trabalharia com subdose de FS e luz.

Após cada ciclo da TFDA, as colônias foram coletadas e utilizadas como inóculo do próximo ciclo, onde antes de cada sessão e em cada experimento a densidade óptica da suspensão

bacteriana foi verificada para que não houvesse influência nos resultados de inativação. A função logística (Equação 3.1) foi escolhida para descrever a fração de morte celular (f(dth)) em todas as sessões (Figura 22) pois, dentre as funções comumente usadas para modelar crescimento e morte populacional, <sup>69</sup> foi a que melhor se ajustou aos dados com o menor valor de  $\chi^2$ .

Para cada sessão, os parâmetros da função logística foram distintos, visto que a cinética de mortalidade teve pequenas variações, mas quando os dados foram sobrepostos (Figura 23.a) a variação para cada dose aplicada foi de até  $\pm 8$ , 7%, o que implica em não haver diferença estatística entre os ciclos de TFDA. Essa análise reflete na dose limiar de cada sessão (Figura 23.b), que estatisticamente não há diferença ao longo dos ciclos, ou seja, a mínima dose necessária para eliminar metade da população bacteriana permanece constante, sendo o limiar de dose médio de 70,  $2J/cm^2$  para todas as sessões.

Geralmente, a aplicação da TFDA na clínica consiste em uma única sessão ou em um tratamento de curto período, diferente dos antibióticos que precisam de períodos contínuos de média a longa duração. Apesar de ser uma vantagem da TFDA, é válido ressaltar que em situações de subdose não há a eliminação de todas as bactérias, pois a concentração do FS ou a dose de luz são insuficientes para que uma quantidade expressiva de EROS seja formada. Nesta situação, estes microrganismos formarão uma nova geração de células sobreviventes a um estresse oxidativo, que é o mecanismo de ação para a morte celular promovido pela TFDA.

<sup>70</sup>Portanto, mais do que prezar pela eficiência deve-se atentar em criar protocolos nos quais a subdose não ocorra, pois a exemplo dos antibióticos, estes casos estão associados ao processo de seleção artificial para microrganismos resistentes. <sup>16, 65</sup>

Além das concentrações aplicadas, a taxa disponível de EROS para os alvos celulares é dependente da localização do FS. Quanto mais internalizado maiores os danos provocados, diferentemente de quando o FS fica localizado no exterior porque haverá poucos alvos celulares, diminuindo os danos provocados semelhante a condição de TFDA. <sup>70</sup> No caso da curcumina, como discutido no Capítulo 2, tem-se uma tendência em se localizar na membrana celular da bactéria, ou seja uma região intermediária entre interior e exterior.

O ambiente oxidativo não é incomum para células, incluindo as bacterianas, visto que as atividades respiratória e metabólica de microrganismos aeróbicos geram como subprodutos EROS. Assim sendo, exitem diversos mecanismos moleculares e celulares que eliminam esses subprodutos naturais antes que intoxiquem a bactéria, como é o caso das enzimas catalisadoras.

<sup>21</sup> Contudo, o mecanismo de produção de EROS através da TFDA sobrecarrega a defesa celular desencadeando um estresse oxidativo por toda a célula, uma vez que a indução de genes ativados pelas EROS para síntese de enzimas redutoras demoram alguns minutos. Por essa razão, tem se discutido atualmente a veracidade da não resistência de microrganismos à TFDA quando exposto à múltiplas sessões, dado que existem mecanismos moleculares intrínsecos para defesa ao estresse oxidativo.

Todavia, o oxigênio singleto produzido pelo mecanismo tipo 2 da TFDA geralmente é



Figura 22 – Curva de distribuição de limiar de dose (g(Dth) - derivada) e fração de morte celular de S. pyogenes (f(Dth) - pontos) totalizando 10 sessões de TFDA com diferentes doses de luz aplicadas em 450 nm com xarope de curcumina a 2,25 mg/ml. Cada gráfico representa a resposta bacteriana em cada sessão de 1 a 10, identificados na devida ordem no respectivo gráfico. Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 23 – a)Sobreposição de todas as curvas de mortalidade celular de S. pyogenes em múltiplas sessões de TFDA com FS de 2,25 mg/ml. b) Valores dos limiar de dose e a média ao longos das 10 sessões de TFDA em S. pyogenes. Fonte: Elaborada pela autora.

a EROs de maior interesse, uma vez que além de ser mais reativo, não há nenhum mecanismo molecular e celular descrito até o momento na literatura sobre a inativação dos efeitos provocados por esta molécula. <sup>70</sup> De fato, a vantagem ainda prevalece pelo modo de ação ser inespecífico, sem alvos determinados, diferente dos antibióticos que possuem o mecanismo de ação específico geralmente descrito pelo modelo chave fechadura. <sup>25</sup> Além disso, não há informações na literatura que descrevam casos em que a síntese das enzimas tenha sido suficiente para controlar o estresse oxidativo provocado pela TFDA. <sup>71</sup>

Para garantir que os efeitos observados são decorrentes da TFDA, grupos controles de FS e luz foram realizados em cada sessão e seus resultados foram plotados em boxplot, de modo que todos os valores coletados dos controles estivessem compreendidos nos retângulos incluindo o controle (apenas bactéria sem luz e sem FS) e separados por cada ciclo. Por meio da análise estatística Anova 2 way (p < 0, 05), não houve diferença na resposta de mortalidade induzida pela luz fracionada entre as 10 sessões, ou seja, a resposta bacteriana devido a luz permanece igual em múltiplas sessões, mostrados na Figura 24.a. Todavia, comparando cada dose individual, independente do número de sessões, houve diferença quando comparado os valores de dose (grupo luz) com a ausência de luz (grupo controle), pois, os tratamentos com apenas luz forneceram redução de no máximo 9%, que pode estar associado com porfirinas endógenas livres que absorve na região da luz azul, como relatados por AMIN. <sup>48</sup> Contudo, essa redução é inferior a  $1/oq_{10}(U F C/ml)$ , de modo que a contribuição no resultado da TFDA seja desprezível.

Os tratamentos com apenas FS apresentados na Figura 24.b reduzem no máximo 0,4  $log_{10}(U \ F \ C/ml)$  as bactérias presentes, ou seja, a concentração de 2,25 mg/ml do xarope de curcumina estatisticamente (Anova 1 way p < 0, 05) não possui ação bactericida entre os 10



Figura 24 – Boxplot dos grupos controles das múltiplas sessões de TFDA em S. pyogenes.a) Controle das doses de luz fracionada em 450 nm. b) Controle do FS na concentração de 2,25mg/ml. Cada caixa corresponde a todos os dados (N) dos grupos tratados, onde no controle da luz inclui todas as doses aplicadas e no controle do FS a concentração de 2,25 mg/ml, na respectiva sessão. Fonte: Elaborada pela autora.

ciclos.

O mesmo experimento com múltiplas sessões foi realizado com a cultura de microrganis-mos isolados de pacientes com faringotonsilites. Esse inóculo contém de 3 a 5 espécies, visto ter características morfológicas distintas, embora não tenham sido identificadas. A Figura 25 mostra o comportamento sigmoide da fração de morte celular (f(dth)) e a curva de distribuição de dose (g(dth)) ao longo de 10 ciclos de TFDA. O perfil de redução bacteriana não teve variações significativas a cada tratamento.

A Figura 26.a mostra a sobreposição de todos os ciclos, evidenciando a variação de no máximo  $\pm 15\%$  da resposta à terapia (f(Dth)), sendo principalmente nas doses mais elevadas. Contudo, a diferença entre as sessões não foram estatisticamente significativas uma vez que a mínima dose necessária para atingir 50% da morte celular (Dth) não teve grandes variações sendo a média de 71,  $7J/cm^2$ , apresentado na Figura 26.b. Tanto a margem de diferença do f(Dth) quanto do Dth são maiores quando comparadas ao resultado do S. pyogenes, pois o isolado clínico possui a proteção da interação entre os microrganismos, de modo que a dinâmica aos estímulos externos sejam diferentes comparados a uma cultura pura.<sup>72</sup>

Com a finalidade de garantir que a ação isolada da luz ou do FS não tenham atividades bactericidas, foram realizados os grupos controles em cada sessão e seus resultados foram plota-dos em boxplot. Cada caixa corresponde ao *Log*<sub>10</sub>*U F C/ml* para cada tratamento sendo doses de luz ou FS, mas todos incluem o valor do controle (bactéria + PBS), para auxiliar a visualização da variação de cada tratamento. A Figura 27.a mostra o controle da luz fracionada para o isolado clínico, no qual houve diferença significativa entre as doses de 96 e 115, 2*J/cm*<sup>2</sup> com a ausência de luz. Contudo, a resposta bacteriana devido a luz permanece igual em múltiplas sessões. Os tra-



Figura 25 – Curva de distribuição de limiar de dose (g(Dth) - derivada) e fração de morte celular de isolado clínico (f(Dth) - pontos) totalizando 10 sessões de TFDA com diferentes doses de luz aplicada, em 450 nm com xarope de curcumina a 2,25 mg/ml. Cada gráfico representa a resposta bacteriana em cada sessão de 1 a 10, identificados na devida ordem no respectivo gráfico. Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 26 – a) Sobreposição de todas as curvas de mortalidade celular de isolado clínico em múltiplas sessões de TFDA com FS de 2,25 mg/ml. b) Valores dos limiar de dose e a média ao longos das 10 sessões de TFDA em isolado clínico. Fonte: Elaborada pela autora.

tamentos com apenas FSs apresentados na Figura 27.b reduzem no máximo 0,  $5log_{10}(UF C/ml)$ , ou seja, a concentração de 2,25 mg/ml do xarope de curcumina estatisticamente não possui ação bactericida entres os 10 ciclos (Anova 1 way p < 0, 05).



Figura 27 – Boxplot dos grupos controles das múltiplas sessões de TFDA em isolado clínico.
 a) Controle das doses de luz fracionada em 450 nm. b) Controle do FS de 2,25mg/ml. Cada caixa corresponde a todos os dados (N) dos grupos tratados, onde no controle da luz inclui todas as doses aplicadas e no controle do FS a concentração de 2,25 mg/ml, na respectiva sessão.
 Fonte: Elaborada pela autora.

As análises estatística realizadas até aqui utilizando ANOVA, consistiu em comparar a variação da média de Dth obtidas em cada tratamento. Desse modo, como não houve diferença estatística, conclui-se que o valor de Dth é semelhante dentro de 10 sessões de TFDA. Esse resultado é consistente com a literatura, no qual alguns autores investigaram a eficiência da

TFDA ao longo de sessões para diferentes espécies de bactéria e não visualizaram diminuição da reposta de mortalidade, como mostrado na Tabela 2.

Microrganismo	Sessões	Fotossensibilizador	Luz	Ref.	
Acinetobacter	10	norfiringo ondogóngo	415 nm	68	
baumannii	10	porminas enuogenas	55.8 J/cm <sup>2</sup>		
	11	azul da matilana	670 nm	63	
Eschenchia coli		azul de metileno	20,6 <i>J/cm</i> <sup>2</sup>		
Escherichia coli	10	Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF	luz branca	67	
		(5 μM)	6 J/cm <sup>2</sup>		
Enterococcus		azul de metileno;	660 nm	65	
	10	azul de toluidina;	665 nm		
Idecalls		indocianina verde	810 nm		
Pseudomonas	40	noufinin eo oudou ón eo	415 nm	48	
aeruginosa	10	portirinas endogenas	48 J/cm <sup>2</sup>		
Staphylococcus	10	Tetra-PyC-M	luz branca	73	
aureus(MRSA)	10	(5 μM)	14,4 <i>J/cm</i> <sup>2</sup>		
Staphylococcus	25	azul da matilana	670 nm	63	
aureus (MRSA)	20		20,6 <i>J/cm</i> <sup>2</sup>		
Vibrio	10	Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF	luz branca	67	
fischeri	10	(5 μM)	6 J/cm <sup>2</sup>		

Tabela 2 – Múltiplas sessões de TFDA da literatura para diferentes microrganismos que não apresentaram perda da eficiência. \* O estudo foi composto por diferentes doses de luz e FS.

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma outra análise foi feita com o intuito de quantificar a associação entre o valor do limiar de dose com o número de sessões aplicadas. Para isso, foi utilizado o coeficiente de correlação de Person (R), o qual avalia a relação linear entre as variáveis, ou seja, se a mudança de uma está relacionada proporcionalmente com a outra. <sup>74</sup> O grau de relação é dito inexistente quando o coeficiente está entre 0,10 a 0,29, fraco para R entre 0,30 a 0,49, moderado para 0,5 a 0,69 e alto entre 0,7 a 1. O sinal indica se a correlação é positiva (+) quando ambas aumentam ou negativa (-) quando uma das variáveis diminui enguanto que a outra aumenta. <sup>75</sup>

A Tabela 3 mostra a evolução da correlação conforme o aumento do número de sessões, com a classificação realçado por cor. É válido destacar que poucos pares podem resultar em uma conclusão de correlação errônea, por exemplo, considerando apenas duas sessões tanto para S. pyogenes e isolado clínico apresentaram correlação perfeita, o que não representa um cenário real. A partir de um N significativo de pares de variáveis (número de sessões, limiar de dose) temos correlação moderada a alta. Para S. pyogenes após 10 sessões obteve-se R= 0,71, que corresponde a uma alta correlação positiva, ou seja, a medida em que se aumenta o número de sessões pode-se aumentar moderadamente o valor de Dth porque há uma variância

compartilhada entre as variáveis. Opostamente, o isolado clínico após 10 sessões obteve R= -0,67, que corresponde a uma correlação negativa moderada, em outras palavras a medida em que se aumenta o número de sessões, o valor de Dth pode decrescer levemente. Contudo, para ambos os caso um modelo linear não seria indicado para predizer o limiar de dose para uma determinada sessão, uma ver que o coeficiente de determinação para ambos foi de  $R^2$ = 0,5, considerando as 10 sessões e seus respectivos Dth.

N⁰ de		
sessões	S. pyogenes	Isolado clínico
2	-1	1
3	-0,62	0,99
4	0,10	0,03
5	0,35	-0,60
6	0,70	-0,78
7	0,83	-0,60
8	0,50	-0,76
9	0,60	-0,73
10	0,71	-0,67

Tabela 3 – Evolução do coeficiente de Pearson em múltiplas sessões de TFDA. Grau de cor-relação indicado por cor, vermelho: inexistente; laranja: fraca; amarelo: moderado e verde: alta.

Fonte: Elaborada pela autora.

A heterogeneidade da população bacteriana pode ser obtida por meio da largura à meia altura da curva de distribuição de dose. Esse parâmetro é comumente descrito como FWHM (Full Width at Half Maximum). Para uma cultura pura como a de S. pyogenes, a heterogeneidade pode estar relacionada com a diferença metabólica de cada célula bacteriana e, consequentemente, a resposta aos estímulos externos. Apesar de uma cultura bacteriana pura conter várias células clones, a alta taxa de replicação faz com que pequenas variações genéticas sejam recorrentes e resultem em grupos de clones distintos. <sup>76</sup> No caso da cultura bacteriana mista, como o isolado clínico, além destas características, a heterogeneidade descreve principalmente a diversidade das espécies presentes, que relaciona diretamente com as diferenças entre cada células presentes na cultura.

Como resultado, a Figura 28.a apresenta os valores de FWHM para S. pyogenes e a Figura 28.b para isolado clínico. A correlação de Pearson para S. pyogenes entre a FWHM e os ciclos de TFDA foi de R= 0,16, o que implica na ausência de correlação entre eles. Enquanto o isolado clínico tem R= -0,53, o qual indica uma correlação negativa moderada, ou seja, à medida em que aumenta o número de sessões há uma tendência moderada em diminuir a heterogeneidade da população, reduz a diversidade de espécies na cultura microbiana, fato observado visualmente.

Uma cultura de multiespécies bacterianas possui características e comportamentos dis-



Figura 28 – Valores de FWHM para cada curva de distribuição de dose com as respectivas sessões. a) S. pyogenes. b) Isolado Clínico. Fonte: Elaborada pela autora.

tintos de uma cultura pura, além de ser um cenário mais realístico, uma vez que as bactérias se encontram em comunidade com outros microrganismos na natureza. A interação entre as espécies é dependente do ambiente como espaço e nutrientes disponíveis, por conseguinte influenciará na relação de cooperação ou competição.<sup>72</sup> A percepção do ambiente é dado através do quorum sensing da bactéria, que consiste na liberação de moléculas indutoras para, por exemplo, a movimentação bacteriana e formação de biofilme tanto em uma cultura mista ou pura.<sup>77</sup> Em uma situação competitiva, há a liberação de substâncias tóxicas no meio com o objetivo de diminuir a diversidade de espécies, contudo, as cepas resistentes podem auxiliar a sobrevivência das bactérias sensíveis, dependendo do tempo de exposição à toxina. Sob o mesmo ponto de vista, a relação cooperativa promove o auxílio entres as células bacterianas, por exemplo, troca

antibióticos, degradação de metabolitos tóxicos e estímulo para taxa de crescimento.<sup>78</sup>

Possivelmente, a diferença do comportamento dos parâmetros da distribuição de dose entre a cultura pura de S. pyogenes comparada com a multiespécie de isolado clínico está associada com as respostas individuais das células bacterianas que afetam as demais presentes no meio, fornecendo cooperação para os ambientes de estresse como o oxidativo, principalmente devido a variabilidade gênica e metabólica presente no meio.<sup>77</sup>

A razão entre os parâmetros FWHM e Dth apresenta uma correlação moderada com o número de sessões aplicadas em S. pyogenes com valor R =-0,544, diferentemente do isolado clínico com R= -0,061, a qual há ausência de correlação segundo a interpretação de significância destes coeficientes por DANCEY. <sup>75</sup> Além disso, o comportamento dos dados ao longo da sessão para S. pyogenes apresentado na Figura 29.a possui uma pequena tendência de decrescer ao longo das sessões ( $R^2 = 0$ , 296), ressaltado pela reta. Contudo, no isolado clínico a razão permanece aproximadamente constante ( $R^2 = 0$ , 004) ao longo das sessões como mostrado na Figura 29.b,

ou seja, quando a heterogeneidade da população é menor, há uma diminuição do limiar de dose, visto ser uma razão diretamente proporcional.



Figura 29 – Resposta da interação dos parâmetros de heterogeneidade da população e de dose limiar ao longo das 10 sessões de TFDA. a) S. pyogenes. b) isolado clínico. Fonte: Elaborada pela autora.

Em suma, os parâmetros sofreram pequenas variações que estatisticamente são insig-nificantes, de modo que a TFDA pode ser utilizada como múltiplas sessões sem perda na efetividade.

#### 3.5 Conclusão

Para que um protocolo de TFDA possa ser empregado é necessário ir além de apenas verificar a porcentagem de mortalidade, mas deve também compreender como as variáveis se comportam, principalmente em caso de múltiplas sessões. O uso da distribuição de dose limiar permite analisar parâmetros como heterogeneidade da população, taxa de morte e mínima dose necessária para eliminar ao menos 50% das células bacterianas, além de estudar sua dinâmica ao longo dos ciclos de TFDA, pois estes são fatores que influenciam ou descrevem a resposta do tratamento.

Com o uso do xarope de curcumina na concentração de 2,25 mg/ml e luz no comprimento de onda de 450 nm aplicada em S. pyogenes e isolado clínico obteve-se um limiar de dose para 10 sessões de TFDA de 70, 2*J/cm*<sup>2</sup> e 71, 7*J/cm*<sup>2</sup>, respectivamente. O perfil de redução bacteriana permaneceu similar ao longo dos ciclos para ambas culturas, validando a não tolerância ao mecanismo de ação do tratamento, que se manteve eficaz nestas dosagens. Além disso, foi verificado que a concentração de 0,75 mg/ml de xarope de curcumina não permitiu atingir valores de fração de morte próximo a 100%, no qual, nesta situação a terapia seria ineficiente.

De modo geral, a bactéria S. pyogenes e o isolado clínico apresentaram resultados similares, apesar do isolado clínico ser levemente mais tolerante uma vez que a dinâmica de comunidade permite melhores estratégias de proteção a agentes externos. Ademais, existe uma tendência ao longo das sessões em diminuir a heterogeneidade da população de isolado clínico.

# 4 RESPOSTA DAS BACTÉRIAS SOBREVIVENTES A MÚLTIPLAS SESSÕES DE TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

#### 4.1 Contextualização

Os microrganismos remanescentes ao tratamento de infecções é de grande preocupação atualmente, considerando que estes podem proliferar e dificultar a recuperação de um paciente. Existem poucos trabalhos na literatura que investigam as respostas das bactérias sobreviventes a TFDA, principalmente quando são submetidas a múltiplas sessões do tratamento. É importante considerar que ainda não é claro se essas colônias remanescentes podem trazer efeitos benéficos ou maléficos relacionados a patogenicidade microbiana.

Sabe-se que a ação da TFDA pode gerar a morte celular bacteriana, mas também pode afetar alguns fatores de virulência, como toxinas, proteases,  $\beta$ -hemolisina, proteínas e lipopolissacarídeo, os quais são principalmente localizados externamente ou excretados. A eliminação destes fatores diminui a agressividade de uma infecção ou mesmo dos sintomas, visto que algumas enterotoxinas podem ainda estar presentes no paciente mesmo depois da eliminação dos focos de infecção. <sup>22</sup> Além disso, exite outras características que devem ser analisadas como seu metabolismo, atividade em conjunto com antibióticos e demais características fenotípicas.

## 4.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo consiste em analisar se as múltiplas sessões de TFDA afetam al-gumas características bacterianas, tais como efetividade dos antibióticos, metabolismo, aderência de biofilme e características fenotípicas em gerações sobreviventes à TFDA.

## 4.3 Metodologia

#### 4.3.1 Preparo do Microrganismo

O microrganismo S. pyogenes utilizado neste capítulo foi preparado conforme descrito em 2.3.1. As bactérias de múltiplas sessões foram obtidas a partir do estoque descrito em 3.3.4.

#### 4.3.2 Incorporação do Xarope de Curcumina

As bactérias de sessão zero (nunca submetidas a TFDA), submetidas a 1 sessão (S1), a 5 sessões (S5) e a 10 sessões (S10) foram sujeitas ao protocolo descrito em 2.3.3

## 4.3.3 Antibiograma Pelo Método Kirby-Bauer

Após a padronização do inóculo, 100  $\mu$ l foram plaqueados em placas de Petri com auxílio da alça de Drigalski. Sobre a superfície do ágar foram colocados os discos de difusão de amoxicilina (10 $\mu$ g), azitromicina (15 $\mu$ g), ciprofloxacina (5 $\mu$ g) e estreptomicina (10 $\mu$ g) da

Sensidisc<sup>®</sup>. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante 24 horas para posterior realização de medidas do tamanho do halo de inibição utilizando um paquímetro.

## 4.3.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

O inóculo foi cultivado em meio ágar e incubado a 37 °C por 24 horas, a fim de coletar as colônias para análise no equipamento de no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, em inglês) por Reflexão Total Atenuada (ATR, em inglês) da Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer<sup>®</sup>. A colônia bacteriana foi distribuída uniformemente sobre a superfície do cristal. A amostra seca foi escaneada 250 vezes e o resultado foi a média das medidas. O espectro de FTIR foi medido no intervalo de 4000 a 650  $cm^{-1}$ . As medidas foram realizadas em três amostras diferentes. O espectro resultante das bactérias foi submetido a normalização pelo pico em 3280  $cm^{-1}$ , e posteriormente ao cálculo da primeira e segunda derivada. <sup>79</sup>

## 4.3.5 Adesão de Biofilme

Os inóculos de S. pyogenes S0, S1, S5 e S10 foram transferidos para cubetas de plástico contendo meio BHI. Posteriormente, foram incubados durante 48 horas a 37 °C e 100 rpm. Um grupo controle foi usado contendo apenas meio BHI. Após a formação do biofilme na cubeta, as células planctônicas foram descartadas e adicionou-se etanol 95% durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionada a solução cristal violeta 0,2% (CV) por 10 minutos. Após esse tempo, o CV foi removido e a células lavadas duas vezes com PBS. As células aderidas foram ressuspendidas

em ácido acético 33% para leitura da absorbância em 570 nm no espectrômetro Carv UV-Vis50. Varian. <sup>80, 81</sup>

## 4.3.6 Análise Estatística

Os experimentos foram realizadas em triplicatas. O desvio padrão é apresentado como barra de erros. Para verificar a distribuição normal dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram avaliados pelo teste t student. Um valor de p < 0, 05 foi considerado significativo.

## 4.4 Resultados e Discussão

Como mostrado no Capítulo 3, a TFDA não seleciona nem aumenta a tolerância bac-teriana. Contudo, as células sobreviventes podem ter outros elementos alterados, tais como permeabilidade de membrana, metabolismo, taxa de crescimento, entre outros, que podem afetar o processo de infecção. Por isso, em situações de sub TFDA, quando a concentração de FS ou dose de luz não eliminam todas as bactérias, é necessário analisar o impacto do tratamento das bactérias sobreviventes.

#### 4.4.1 Sensibilidade a Antibióticos

Embora tenha muitos relatos promissores na literatura sobre a eliminação de diversas bactérias por TFDA, independente de serem multirresistentes a antibióticos, a técnica permanece como um tratamento alternativo. Para que a TFDA seja aprovada, uma etapa fundamental no estudo clínico é a administração conjunta do antibiótico com a TFDA. Por esta razão, foi analisada a influência da ação do antibiótico após a bactéria ter sido submetida a sessões de TFDA, analisando o diâmetro de inativação bacteriana pelo método de sensibilidade aos antibióticos amoxicilina (AMO  $10\mu g$ ), azitromicina (AZI  $15\mu g$ ), ciprofloxacina (CIP  $5\mu g$ ) e estreptomicina (EST  $10\mu g$ ). A escolha dos antibióticos foi feita para ter um representante de cada classe, uma vez que apresentam mecanismos de inibição distintos, conforme apresentados na Tabela 4.

Antibiótico	Classe	Diâmetro (mm)			Mecanismo de inibição
		Res	Int	Sen	Mecallishio de mibição
Amoxicilina	β-lactâmico	-	-	> 24	síntese parede celular
Azitromicina	Macrolídeo	6 13	14 - 17	> 18	proteína ribossomal 50 s
Ciprofloxacina	Quinolona	6 13	14 - 16	> 17	topoisomerase bacteriana
Estreptomicina	Aminiglicosideo	6 16	17-20	> 21	proteína ribossomal 30 s

Tabela 4 – Classifica	ção dos antibiótico	s segundo UFG	<sup>o2</sup> e LABORCLIN <sup>o</sup>	ю <sub>.</sub>
	1			

00

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 30 mostra o resultado do halo de inibição em S. pyogenes sem TFDA (S0) e em sobreviventes a uma sessão (S1), cinco sessões (S5) e dez sessões (S10) de TFDA. Conforme apresentado, a amoxicilina apresentou diâmetro inferior ao esperado para todos os grupos tratados, uma vez que essa bactéria é comumente sensível à classe  $\beta$ -lactâmico. Esse resultado pode ser em decorrência do meio ágar utilizado, uma vez que pode ter dificultado a difusão do antibiótico. Tanto a azitromicina quanto a ciprofloxacina mantiveram o diâmetro de inibição acima do mínimo sensível, ou seja, em todas as sessões o antibiótico permaneceu eficiente na inibição microbiana. No caso da estreptomicina, o halo obtido esteve na faixa de bactérias intermediárias, ou seja, foram necessárias doses maiores de antibiótico para um resultado mais efetivo com exceção da S5 que apresentou o halo médio característico de resistente, mas estatisticamente não significativo.

Esse resultado demonstra que não há evidências de contraindicação do uso de antibióticos em conjunto com a TFDA, dado que ao longo das sessões não houve redução na efetividade dos antibióticos testados nas cepas sobreviventes, comprovado estatisticamente pela diferença entre as médias das sessões, considerando p < 0, 05. Estudos anteriores foram realizados com intuito de verificar a efetividade antimicrobiana de tratamentos combinados. Como elucidado na revisão de WOZNIAK,<sup>84</sup> a maioria dos trabalhos apresenta resultados que comprovam o potencial redução no tempo de tratamento tanto de TFDA como de antibióticos, quando administrado

00



Figura 30 – Antibiograma por disco de difusão de antibióticos em bactérias sem TFDA (S0) e sobreviventes a uma sessão (S1), cinco sessões (S5) e dez sessões (S10) de TFDA. Os dados são agrupados por antibiótico sendo amoxicilina (AMO 10µg), azitromicina (AZI 15µg), ciprofloxacina (CIP 5µg) e estreptomicina (EST10µg). A linhas tracejadas indicam o diâmetro minimo tabelado para classificar como sensível (azul) e máximo diâmetro para não ser considerado resistente (vermelho). Fonte: Elaborada pela autora.

em conjunto, e o aumento de inativação bacteriana com menores índices de desenvolvimento de resistência a antibióticos. É válido ressaltar que, até o momento, estes estudos não foram apresentados com a bactéria S. pyogenes.

# 4.4.2 Adesão Bacteriana

Cerca de 80% das infecções bacterianas que ocorrem no corpo humano são ocasionadas por biofilme, que consiste em uma comunidade séssil de microrganismos envoltos em uma matriz polimérica. Neste modo de vida, as bactérias presentes no biofilme apresentam transcrição gênica e taxa de crescimento distintas quando comparadas com as células planctônicas. <sup>85</sup> Já foram identificados mais de 50 fatores de virulência em bactérias do grupo A ( $\beta$ )-hemolítico do gênero Streptococcus. Assim, o biofilme por ser uma forma de vida bacteriana modula a expressão dos fatores diferente da forma de vida livre.

A proteína M é um dos principais fatores de virulência de S. pyogenes e o mais conhecido na literatura. Está relacionada com a formação de biofilme, uma vez que auxilia na adesão bacteriana seja na infecção de um hospedeiro ou em uma superfície inerte. <sup>86</sup>

O experimento com CV apresentado na Figura 31, não relaciona a quantidade de bactérias vivas ou mortas, mas é uma medida da biomassa aderida à superfície (*A*570), uma vez que o CV liga-se às moléculas carregadas negativamente, como os polissacarídeos da matriz extracelular. Desse modo, os dados são normalizados pela absorbância da densidade celular bacteriana presente no biofilme (*A*600). <sup>87</sup>

Como apresentado na Figura 31, há uma redução significativa da aderência do biofilme


Figura 31 – Quantificação da adesão do biofilme por meio da absorção do cristal violeta em 570 nm normalizado pela densidade ótica da célula bacteriana em 600nm. indica diferença significativa de *p* <0.05. Fonte: Elaborada pela autora.

de células sobreviventes a TFDA (S5 e S10), quando comparada com as bactérias sem tratamento. A S1 teve uma redução de 50,1%, a S5 de 50,6%, enquanto que a S10 de 53,7%. É valido ressaltar que não é o número de sessão que afeta a formação de biofilme, mas a própria ação da TFDA. Como relatado por POURHAJIBAGHER, <sup>65</sup> a TFDA reduz a atividade metabólica da bactéria, que indiretamente pode afetar a formação de biofilme. Essa diminuição do metabolismo pode ser decorrente do estresse oxidativo, o qual causa desde perda do potencial de membrana até a redução do trifosfato de adenosina. Em suma, mesmo que não ocorra a eliminação de todas as células bacterianas em uma infecção, o grau de patogenicidade pode ser reduzido. <sup>65</sup> Como consequência, o sistema imunológico do hospedeiro pode ser mais efetivo.

#### 4.4.3 Incorporação do Fotossensibilizador

Como apresentado no Capítulo 2, a incorporação do FS é influenciada pela atividade metabólica, além da permeabilidade da membrana celular. Visto que, a aderência de biofilme pode estar relacionada com a redução do metabolismo bacteriano, foi investigado a incorporação do xarope de curcumina nas bactérias sobreviventes a múltiplas sessões de TFDA. A Figura 32 mostra que a medida em que se aumenta o número de sessões, há um decaimento da taxa de incorporação do FS. Quando comparado com S0, que não sofreu tratamento, há uma diminuição de 30% da incorporação do FS em S1, 44% em S5 e de 57,5% em S10. Além de fatores metabólicos, esse resultado pode advir do fato das colônias sobreviventes já possuírem de antemão uma taxa de capturamento do FS menor, visto que a população pode ter pequenas heterogeneidades. Além disso, uma menor taxa de incorporação pode ter influenciado o leve aumento no limiar de dose nas últimas sessões testadas, apresentadas na Figura 23.b.

Apesar deste resultado, deve se salientar que a internalização não é uma condição necessária para atividade antimicrobiana, ainda que contribua para eficácia. Embora tenha sido



respectivamente. Fonte: Elaborada pela autora.

pressuposta a influência do metabolismo na diminuição da taxa de incorporação, não se descarta a atuação de bombas de efluxo. Por exemplo, a classe de FS classificada como fenotiazínicos é considerada substrato para algumas bombas de efluxo. Independentemente deste mecanismo bacteriano, a ação da TFDA depende de três componentes sendo a luz, FS e o *O*<sub>2</sub> e por mais que a bactéria possua recursos contra o FS, ela ainda precisaria barrar a luz e eliminar a presença do

*O*<sub>2</sub>, para efetivar um quadro de resistência. <sup>22</sup>

Haja vista, as diferenças encontradas tanto na adesão de biofilme como na taxa de incorporação do FS, após serem submetidas a TFDA, constataram a necessidade de verificar outros possíveis danos fenotípicos nas bactérias sobreviventes.

### 4.4.4 Espectroscopia de FTIR

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica moderna, que tem sido cada vez mais empregada ao longo dos anos, para análise fenotípica de bactérias multirresistentes a antibióticos. <sup>88</sup> A radiação infravermelha, principalmente no intervalo de 2, 5 a  $25\mu m$ , possui frequência compatível com os modos vibracionais das molé-culas. Quando a frequência da radiação infravermelho coincide com a frequência dos modos vibracionais, por exemplo, estiramento da ligação O-H, ocorre a absorção. A intensidade do pico no espectro infravermelho é proporcional à variação do momento dipolar causada pela absorção desta radiação pela molécula. Os diferentes ângulos e força de ligação entre os átomos conferem bandas de absorção específicas, semelhantes a uma impressão digital, que podem ser identificadas no espectro infravermelho e relacionadas com os grupos funcionais para a caracterização de um composto. Geralmente a apresentação do eixo x é dado por número de onda ( $cm^{-1}$ ), que está relacionado com o comprimento de onda, pois, deste modo oferece uma proporção gráfica direta da energia absorvida. <sup>89</sup>

A aquisição do espectro de FTIR pode ser obtido por meio da reflexão total atenuada (ATR), no qual o contato da amostra sobre o cristal altera o padrão de reflexão interna. Neste caso a magnitude da atenuação depende das bactérias em contato com o feixe e a penetração da radiação na amostra é limitada por uma fração do comprimento de onda. Esse método é eficiente e barato, podendo ser palicado em amostras líquidas ou sólidas. Essa vantagem favorece o uso da técnica em comparação ao método de reação em cadeia da polimerase (PCR), considerado padrão ouro para estudos genotípicos, porém, de alto custo e necessidade de sondas específicas par cada bactéria analisada. <sup>89</sup>

Desde a década de 50, o FTIR tem sido usado na identificação de microrganismo, mas o desenvolvimento dos equipamentos e softwares permitiu o avanço da técnica na caracterização qualitativa da composição bioquímica celular, assim como na diferenciação das células microbia-nas com base em seus componentes. <sup>88</sup> Um exemplo de aplicação tem sido o uso comparativo entre a mesma espécie com diferentes níveis de sensibilidade e resistência a antibióticos, visto que essas alterações resultam em fenótipos distintos. <sup>90</sup>

Os espectros de FTIR podem trazer informações da ligação química, interações mo-leculares, geométrica e conformação molecular. Os picos são muito sensíveis a alterações do microambiente em que as moléculas se encontram. Com este intuito, foi realizado o espectro de FTIR por ATR com a finalidade de verificar possíveis diferenças nas biomoléculas ao longo das sessões de TFDA, como uma alternativa às técnicas moleculares.<sup>88</sup> Com esta técnica, foi possí-vel analisar as biomoléculas presentes nas bactérias sobreviventes a TFDA tais como lipídeos, proteínas e carboidratos.

A análise qualitativa baseia-se na comparação visual dos espectros. De modo geral, os espectros de FTIR apresentaram diferentes intensidades em alguns picos e vales, mas não foram estatisticamente significativas. A avaliação estatística foi realizada considerando os valores de intensidade dos principais picos e comparados entres os grupos. A análise com as derivadas do espectro original favorecem uma melhor interpretação, visto que a primeira derivada corresponde à taxa de variação do desenho espectral a cada passo (Figura 33.b) e a segunda derivada evidencia a variação dos picos e vales do espectro (Figura 33.c).

A região compreendida entre 3100 a 2800  $cm^{-1}$  corresponde a ligações de carbono, tais como *CH*<sub>3</sub>, *CH*<sub>2</sub> e  $\equiv$  *CH*. <sup>89</sup> Essas ligações estão presentes nos ácidos graxos da membrana bacteriana. Ao analisar a região entre 3100 a 3060  $cm^{-1}$  verificam-se pequenas flutuações na intensidade de picos e vales, sendo a S0 com menor intensidade e S5 com a mais elevada, mas o comportamento é similar entre as sessões estudadas. Isso é confirmado pela primeira e segunda derivada da região.

A segunda região entre 1800 a 1500  $cm^{-1}$  corresponde às ligações amidas I e amida II presente em proteínas e peptídeos. <sup>79</sup> Na Figura 33.a destaca-se nesta região os picos do intervalos de 1600 a 1560  $cm^{-1}$ , pois, a intensidade de S0 é menor quando comparada com as demais sessões, que também é visível na primeira derivada, mas S0 e S5 tem intensidades semelhantes



Figura 33 – Espectros de FTIR para bactérias sem TFDA (S0) e sobreviventes a uma sessão (S1), cinco sessões (S5) e dez sessões (S10) de TFDA. a) Espectro de FTIR das colônias em triplicata. b) Primeira derivada do espectro FTIR . c) Segunda derivada do espectro FTIR. Desl significa deslocamento de pico ou vale. Fonte: Elaborada pela autora.

em 1662 e 1556  $cm^{-1}$ . A segunda derivada desta região mostra picos e vales majoritariamente conservados, com pequenas diferenças na intensidade. Contudo, é válido ressaltar que entre 1640 a 1630  $cm^{-1}$ , região da amida I, a intensidade de S0 é maior e mais definida enquanto a S5 tem um vale mais alargado, sem um vale em 1638  $cm^{-1}$ . A maior diferença está em 1565  $cm^{-1}$ , pois, as S1, S5 e S10 adquirem um pico largo que está quase ausente em S0.

O intervalo de 1500 a 1200 *cm*<sup>-1</sup> corresponde a alguns modos vibracionais de Iligações químicas que constituem biomoléculas como proteínas, ácidos graxos e transportadores de fosfato. <sup>79</sup> O desenho espectral nesta região se mantem semelhante entre as sessões estudadas, assim como a intensidade, com exceção da S5 que apresenta diferentes intensidades em alguns picos, sem que o desenho seja perdido, como melhor observado na Figura 33.b.



 Figura 34 – Espectros de FTIR ampliados para bactérias sem TFDA (S0) e sobreviventes a uma sessão (S1), cinco sessões (S5) e dez sessões (S10) de TFDA na região dos polissacarídeos. a)
Espectro de FTIR. b) Primeira derivada do espectro FTIR .
c) Segunda derivada do espectro
FTIR. Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, a região de 1200 a 900  $cm^{-1}$  corresponde aos polissacarídeos, carboidratos da parede celular bacteriana. Como mostrado na Figura 33.a, o desenho espectral manteve o mesmo

ao longo desta região sendo que a intensidade variou em alguns picos, seguindo a sequência de S0 < S5 < S1 < S10, principalmente entre 1100 a 1025  $cm^{-1}$ . A primeira derivada da região evidencia um deslocamento do pico em 980  $cm^{-1}$  de S0 e S5 comparado com S1 e S10. A maior diferença desta região é apresentada através da segunda derivada no intervalo de 985 a 965  $cm^{-1}$ , que corresponde ao dobramento de alcenos dissubstituídos na forma trans, apresentado na Figura 34.

Em resumo, os resultados apresentado não sugerem alterações expressivas nos modos vibracionais das ligações químicas das biomoléculas bacterianas, com exceção dos alcenos de carboidratos.

### 4.5 Conclusão

Em situações de sub TFDA, nem todas as colônias são eliminadas e as sobreviventes tiveram contato com os efeitos da ação da TFDA, ou seja, interagiram com o FS e dose de luz, mas o estresse oxidativo não foi suficiente para sua inativação. O fato de haver colônias remanescentes é devido a TFDA ser uma técnica local e não invasiva, entretanto uma vez que as bactérias patogênicas podem proliferar-se e manter a infecção. Contudo, conforme apresentado neste capítulo os resultados sugerem que as gerações sobreviventes ao tratamento não tem suas biomoléculas significativamente alteradas, tais como as proteínas, lipídios e transportadores de fosfato. Os carboidratos, no entanto, apresentaram diferenças ao longo das sessões e isto se relaciona com o fato da aderência do biofilme poder diminuir conforme se aumenta o número de sessões de TFDA, o que pode ser promissor na eliminação de uma infecção.

Assim como reduzir a aderência do biofilme pode estar relacionada com uma diminuição do metabolismo celular bacteriano, a taxa de incorporação de moléculas, como o FS, consequen-temente também diminuiu ao longo das sessões analisadas. Apesar disso, a eficiência da TFDA não é totalmente comprometida, uma vez que a incorporação do FS não é essencial para a ação fotodinâmica.

Além disso, foi demonstrado que a ação antimicrobiana promovida por antibióticos de diversas classes e alvos de ação, não apresentam sua atividade comprometida nas gerações sobreviventes das múltiplas sessões de TFDA. Desse modo, o uso das duas técnicas pode ser utilizado alternadamente, mas estudos em conjunto para verificação de sinergia ainda são necessários.

## **5 CONCLUSÃO**

Ao longo deste estudo foi utilizado a curcumina natural como FS, pois esta é empregada em estudos de fase clínica, desenvolvido pelo grupo CEPOF para tratamento de faringotonsilites em humanos adultos. Um grande diferencial tanto no estudo clínico, quanto no estudo in vitro, aqui apresentados, é a formulação a base de água e sacarose. Como elucidado, esta formulação permite a solubilização dos curcuminóides, de modo a promover maior taxa de incorporação do FS pelas bactérias S. mutans, S. pyogenes e isolado clínico de faringotonsilites por meio do estímulo metabólico.

Com base neste estudo inicial, foi padronizado a concentração do xarope de curcumina a ser utilizado para ensaios de múltiplas sessões de TFDA, considerando uma concentração abaixo da saturação microbiana, de modo a incluir um fator de subdose ao tratamento.

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar a possível resistência microbiana em relação ao tratamento empregado, ou seja, se o uso repetitivo da mesma concentração de FS e dose de luz alteraria a reposta de morte celular bacteriana a cada sessão. Como constatado, utilizando o modelo de distribuição de dose limiar, a mínima dose de luz necessária para eliminar ao menos 50% das bactérias se manteve estatisticamente constante sendo de 70, *2J/cm*<sup>2</sup> e 71, *7J/cm*<sup>2</sup> para S. pyogenes e isolado clínico, respectivamente, considerando o xarope de curcumina a 2,25 mg/ml e luz no comprimento de onda de 450 nm. Em outras palavras, múltiplas sessões de TFDA não afetam a resposta de mortalidade bacteriana.

Apesar disso, os valores de limiar de dose tem correlação moderada com o número de sessões. Para o isolado clínico houve uma tendência de diminuição dos valores de limiar de dose, possivelmente em consequência da menor heterogeneidade populacional apresentada. Por outro lado, o S.pyogenes apresentou uma tendência de limiar de dose maior ao longo das sessões, possivelmente relacionada com o fato de a sua taxa de incorporação do FS diminuir significativamente, ao decorrer do número de sessões. Porém, como a incorporação não é um requisito, a ação fotodinâmica atua na célula bacteriana, de modo que a fração de morte permanece dentro do intervalo esperado, evidenciando a não diferença estatística das dose limiares obtidas para cada sessão.

Assim como houve uma diminuição da taxa de incorporação do FS, foi constatado uma diminuição da aderência do biofilme das colônias sobreviventes as múltiplas sessões de TFDA. A formação de biofilme requer a ativação de diversas rotas metabólicas e como estudado no Capítulo 2, a incorporação do FS pode estar relacionada com o metabolismo celular, visto que ambos foram diminuídos ao decorrer do número de sessões. Assim, supõe que a TFDA diminui o metabolismo celular bacteriano.

Apesar da possível influência no metabolismo, não foi verificado alteração na sensibili-

dade aos antimicrobianos convencionais de diversas classe, que atuam por diferentes via de ação. Uma vez que, as principais biomoléculas como lipídios, proteínas, transportadores de fosfato não tiveram mudança no estado vibracional das biomoléculas significativas. Pequenas alterações foram verificada em carboidratos localizados externamente a parede celular que auxiliam na ade-rência bacteriana, entre outras coisas. Assim o resultado da diminuição da aderência do biofilme, também pode ser explicado como consequência das alterações dos carboidratos presentes.

Em conclusão, este trabalho mostra diversas hipóteses que a TFDA atua por vias que dificultam a possibilidade de resistência a TFDA, de modo que a célula sofra danos letais irremediavelmente. Apesar disso, ressalta-se que as bactéria remanescente podem ter parâmetros microbianos diferentes da população originalmente tratada. Por esta razão, deve-se sempre criar protocolo nos quais haja inativação total, principalmente em aplicações clínicas, a fim de que a TFDA posse de uma tratamento alternativo seguro.

# REFERÊNCIAS

1 CLARK, M. Microbiologia de Brock. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

2 CASE, G. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

3 RECK, L. Os desafios da escola pública paranaense na perspectiva do professor PDE: produções didático pedagógicas . Paraná: Secretária da Educação, 2013. Disponível em: <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/cadernospde/pdebusca/producoes\_pde/2013/ 2013\_unicentro\_port\_pdp\_serli\_rech\_moleta.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2019.

4 EDITORIAL. Microbiology by numbers. Nature Reviews Microbiology, v. 9, p. 628–628, 2011. doi:10.1038/nrmicro2644

5 BAZZI, A. M.; RABAAN, A. A. Direct rapid antigen test on presumptive non-isolated beta haemolytic Streptococcus colonies on throat culture plates. EC Microbiology, v. 2, p. 431–437, 2016. Disponível em: <a href="https://www.ecronicon.com/ecmi/pdf/ECMI-03-000059.pdf">https://www.ecronicon.com/ecmi/pdf/ECMI-03-000059.pdf</a>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

6 REGLINSKI, M.; SRISKANDAN, S. Streptococcus pyogenes. In: TANG, Y-W. et al. (Ed.). Molecular medical microbiology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2014. v. 2, p. 675–716. doi :10.1016/B978-0-12-397169-2.00038-X.

7 EFSTRATIOU, A.; LAMAGNI, T. Epidemiology of Streptococcus pyogenes. Oklahoma: University of Oklahoma Health Sciences Center, 2017.

8 WINN, W.; KONEMAN, E. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.

9 MCISAAC, W. J. et al. Empirical validation of delines for the management of pharyngitis in children and adults. JAMA, v. 291, n. 13, p. 1587, 2004. doi:10.1001/jama.291.13.1587.

10 MAZUR, E. et al. Utility of clinical differentiation and microbiological examination for appropriate antibiotic therapy of acute pharyngotonsillitis in children. Polski Merkuriusz Lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, v. 31, n. 181, p. 31–6, 2011.

11 BA-SADDIK, I. A. et al. Prevalence of Group A beta-haemolytic Streptococcus isolated from children with acute pharyngotonsillitis in Aden, Yemen. Tropical Medicine & International Health, v. 19, n. 4, p. 431–439, 2014. doi:10.1111/tmi.12264

12 BRUCEBLAUS. Tonsillitis. medical gallery of blausen medical. WikiJournal of Medicine, v. 1, n. 2, 2013. doi:10.15347/wjm/2014.010

13 CRETI, R. et al. emm types, virulence factors, and antibiotic resistance of invasive streptococcus pyogenes isolates from italy: what has changed in 11 years? Journal of Clinical Microbiology, v. 45, n. 7, p. 2249–2256, 2007. doi:10.1128/JCM.00513-07

14 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Streptococcus laboratory. Disponível em: <a href="https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/index.html">https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/index.html</a>. Acesso 10 abr. 2019

15 BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015. doi:10.1038/nrmicro3380

16 SOMMER, M. O. et al. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? Nature Reviews Microbiology, v. 15, n. 11, p. 689–696, 2017. doi:10.1038/nrmicro.2017.75.

17 O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance, 2016. Disponível em: <<u>https://amr-review.org/sites/</u> default/files/160518\_Final%20paper\_with%20cover.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2018.

18 MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 9, n. 8, p. 974–983, 2009. doi:10.2174/138955709788681582

19 ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. Photochemistry and Photobiology, v. 74, n. 5, p. 656–69, nov 2001. doi:10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2

20 RAAB, O. Uber die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien. Zeitschrift fur Biologie, v. 39, p. 524–546, 1900.

21 PRIME, J. Des accidents toxiques produits par l'éosinate de sodium. Paris: Jouve et Boyer, 1900.

22 WAINWRIGHT, M. et al. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? Lancet Infectious Diseases, v. 17, n. 2, p. e49–e55, 2017. doi:10.1016/S1473-3099(16)30268-7

23 HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. Current Opinion in Microbiology, v. 33, p. 67–73, 2016. doi:10.1016/j.mib.2016.06.008

24 BACELLAR, I. O. et al. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015. doi:10.3390/ijms160920523

LIU, Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. Journal of Clinical and Translational Research, v. 1, n. 3, p. 140–167, 2015. doi:10.18053/jctres.201503.002

26 ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. Medical Physics, v. 35, n. 7Part1, p. 3127–3136, 2008. doi:10.1118/1.2937440.

27 VATANSEVER, F. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. FEMS Microbiology Reviews, v. 37, n. 6, p. 955–989, 2013. doi:10.1111/1574-6976.12026

28 ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (pdt): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for pdt. Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001

29 HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochemical & Photobiological Sciences, v. 3, n. 5, p. 436–450, 2004. doi:10.1039/b311900a

30 SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumin, the golden powder from turmeric: Insights into chemical and biological activities. Química Nova, v. 38, n. 4, p. 538– 552, 2015. doi:10.5935/0100-4042.20150035.

31 U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Curcumin from turmeric (Curcuma longa L.) gras notice no. 686. Disponível em: <a href="https://www.fda.gov/media/104050/download">https://www.fda.gov/media/104050/download</a>>. Acesso em: 10 set. 2018

32 NELSON, K. M. et al. The essential medicinal chemistry of curcumin: miniperspective. Journal of Medicinal Chemistry, v. 60, n. 5, p. 1620–1637, 2017. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00975

 BERNABé-PINEDA, M. et al. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate constant of its decomposition.
Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy, v. 60, n.
p. 1091–1097, 2004. doi:10.1016/S1386-1425(03)00342-1

34 COOKSEY, C. Turmeric: old spice, new spice. Biotechnic & Histochemistry, v. 92, n. 5, p. 309–314, 2017. doi:10.1080/10520295.2017.1310924

35 SCHNEIDER, C. et al. Degradation of curcumin: from mechanism to biological implications. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 63, n. 35, p. 7606–7614, 2015. doi:10.1021/acs.jafc.5b00244

36 HOPE-ROBERTS, M.; HOROBIN, R. A review of curcumin as a biological stain and as a self-visualizing pharmaceutical agent. Biotechnic & Histochemistry, p. 1– 9, 2017. doi:10.1080/10520295.2017.1310925

37 HEGER, M. et al. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. Pharmacological Reviews, v. 66, n. 1, p. 222–307, 2014. doi:10.1124/pr.110.004044

38 GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: a recent update. Food and Chemical Toxicology, v. 83, p. 111–124, 2015. doi:10.1016/j.fct.2015.05.022

39 NAJAFI, S. et al. An in vitro comparison of antimicrobial effects of curcumin-based photodynamic therapy and chlorhexidine, on Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Journal of Lasers in Medical Sciences, v. 7, n. 1, p. 21–5, 2016. doi:10.15171/jlms.2016.05

40 PENHA, C. B. et al. Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. LWT - Food Science and Technology, v. 76, p. 198–202, 2017. doi:10.1016/J.LWT.2016.07.037

41 HU, J. et al. Photodynamic inactivation of Burkholderia cepacia by curcumin in combination with EDTA. Food Research International, v. 111, p. 265–271, 2018. doi:10.1016/J.FOODRES.2018.05.042

42 FARKHONDE MASOULE, S. et al. Photodynamic inactivation of endopathogenic microbiota using curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, v. 29, n. 3, p. 205–209, 2018. doi:10.22059/jsciences.2018.67435

43 ARAÚJO, T. S. D. et al. Reduced methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 21, p. 219–223, 2018. doi:10.1016/J.PDPDT.2017.12.011

44 CUSICANQUI MÉNDEZ, D. A. et al. Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 24, p. 102–108, 2018. doi:10.1016/J.PDPDT.2018.09.007

45 HAMBLIN, M.; JORI, G. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications. Royal Society of Chemistry, 2015. doi:10.1039/9781849733083

46 CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy–what we know and what we don't. Critical Reviews in Microbiology, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018. doi:10.1080/1040841X.2018.1467876

47 TABOADA, L. D. Photobiomodulation glossary - therapeutic window. LiteCure. Disponí-vel em: <a href="http://www.litecure.com/about-photobiomodulation/photobiomodulation-glossary/">http://www.litecure.com/about-photobiomodulation/photobiomodulation-glossary/</a> therapeutic-window>. Acesso em: 02 abr. 2019

48 AMIN, R. M. et al. Antimicrobial blue light inactivation of Pseudomonas aeruginosa by photo-excitation of endogenous porphyrins: in vitro and in vivo studies. Lasers in Surgery and Medicine, v. 48, n. 5, p. 562–568, 2016. doi:10.1002/lsm.22474.

49 WANG, Y. et al. Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. doi:10.1038/s41598-017-07525-w.

50 YIN, R. et al. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. Current Opinion in Pharmacology, v. 13, n. 5, p. 731–762, 2013. doi:10.1016/j.coph.2013.08.009.

51 PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C.; GRAFF, R. In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. Photochemistry and Photobiology, v. 51, n. 3, p. 343–349, 1990. do:10.1111/j.1751-1097.1990.tb01720.x.

52 SABINO, L. G. et al. Experimental evidence and model explanation for cell population characteristics modification when applying sequential photodynamic therapy. Laser Physics Letters, v. 8, n. 3, p. 239–246, 2011. doi:10.1002/lapl.201010119

53 FARIA, C. M. G. de et al. A threshold dose distribution approach for the study of PDT resistance development: a threshold distribution approach for the study of PDT resistance. Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology, v. 182, p. 85–91, 2018. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.03.022.

54 GEORGE, S.; HAMBLIN, M. R.; KISHEN, A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. Photochemical & Photobiological Sciences, v. 8, n. 6, p. 788–795, 2009. doi:10.1039/b809624d

55 BLANCO, K. C. et al. Antimicrobial efficacy of curcumin formulations by photodynamic therapy. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 5, p. 506–511, 2017. doi:10.17265/2328-2150/2017.08.003

56 SUN, Y. et al. The bound states of amphipathic drugs in lipid bilayers: study of curcumin. Biophysical journal, v. 95, n. 5, p. 2318–2324, 2008. doi:10.1529/biophysj.108.133736

57 BARRY, J. et al. Determining the effects of lipophilic drugs on membrane structure by solid-state nmr spectroscopy: the case of the antioxidant curcumin. Journal of the American Chemical Society, v. 131, n. 12, p. 4490–4498, 2009. doi:10.1021/ja809217u

58 INGOLFSSON, H. I.; KOEPPE, R. E.; ANDERSEN, O. S. Curcumin is a modulator of bilayer material properties. Biochemistry, v. 46, n. 36, p. 10384–10391, 2007. doi:10.1021/bi701013n

59 HUNG, W.-C. et al. Membrane-thinning effect of curcumin. Biophysical Journal, v. 94, n. 11, p. 4331–4338, 2008. doi:10.1529/biophysj.107.126888

60 ALLISON, K. R.; BRYNILDSEN, M. P.; COLLINS, J. J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. Nature, v. 473, n. 7346, p. 216–220, 2011. doi:10.1038/nature10069.

61 PENG, B. et al. Exogenous alanine and/or glucose plus kanamycin kills antibiotic-resistant bacteria. Cell Metabolism, v. 21, n. 2, p. 249–261, 2015. doi:10.1016/j.cmet.2015.01.008

62 GAYNES, R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. Emerging Infectious Diseases, v. 23, n. 5, p. 849–853, 2017. doi:10.3201/eid2305.161556

63 PEDIGO, L. A. et al. Absence of bacterial resistance following repeat exposure to photodynamic therapy. Proceedings of the SPIE, v. 7380, 2009. doi:10.1117/12.822834.

64 FLATICON. Designed of vector by Flaticon members and Freepik from. 2019. Disponível em: <a href="https://www.flaticon.com">https://www.flaticon.com</a>. Acesso em: 05 abr. 2019.

65 POURHAJIBAGHER, M. et al. Sub-lethal doses of photodynamic therapy affect biofilm formation ability and metabolic activity of Enterococcus faecalis. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 15, p. 159–166, 2016. doi:10.1016/j.pdpdt.2016.06.003.

66 REGO-FILHO, F. G. et al. Validation of photodynamic action via photobleaching of a new curcumin-based composite with enhanced water solubility. Journal of Fluorescence, v. 24, n. 5, p. 1407–1413, 2014. doi:10.1007/s10895-014-1422-z

67 TAVARES, A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. Marine Drugs, v. 8, n. 1, p. 91–105, 2010. doi:10.3390/md8010091

68 ZHANG, Y. et al. Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infection in a mouse burn model: implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections. Journal of Infectious Diseases, v. 209, n. 12, p. 1963–1971, jun 2014. doi:10.1093/infdis/jit842.

69 XIONG, R. et al. A mathematical model for bacterial inactivation. International Journal of Food Microbiology, v. 46, n. 1, p. 45–55, 1999. doi:10.1016/S0168-1605(98)00172-X

70 KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? Drug Resistance Updates, v. 31, n. July, p. 31–42, 2017. doi:10.1016/j.drup.2017.07.003.

71 MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. Photochemical and Photobiological Sciences, v. 14, n. 8, p. 1518–1526, 2015. doi:10.1039/c5pp00037h.

72 ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. FEMS Microbiology Reviews, v. 36, n. 5, p. 990–1004, sep 2012. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.

73 BARTOLOMEU, M. et al. Effect of Photodynamic Therapy on the Virulence Factors of Staphylococcus aureus. Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1–11, 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.00267

74 FIGUEIREDO FILHO, D. B. ; SILVA JUNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). Revista Política Hoje, v. 18, n. 1, p. 115–146, 2010.

75 DANCEY, C. P.; REIDY, J. Statistics without maths for psychology. Harlow: Pearson Education, 2007.

76 SPROUFFSKE, K. et al. High mutation rates limit evolutionary adaptation in Escherichia coli. PLOS Genetics, v. 14, n. 4, p. e1007324, 2018. doi:10.1371/journal.pgen.1007324

77 KERÉNYI, Á. et al. Stability of multispecies bacterial communities: signaling networks may stabilize microbiomes. PLoS ONE, v. 8, n. 3, p. e57947, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0057947

78 MOONS, P.; MICHIELS, C. W.; AERTSEN, A. Bacterial interactions in biofilms. Critical Reviews in Microbiology, v. 35, n. 3, p. 157–168, 2009. doi:10.1080/10408410902809431.

79 LECHOWICZ, Ł. et al. The use of infrared spectroscopy and artificial neural networks for detection of uropathogenic Escherichia coli strains' susceptibility to cephalothin. Acta Biochimica Polonica, v. 60, n. 4, p. 713–718, 2013. doi:10.1007/s10006-007-0058-4

80 ADETUNJI, V. O.; ISOLA, T. O. Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by Listeria monocytogenes and Listeria spp on wood, steel and glass surfaces. Global Veterinaria, v. 6, n. 1, p. 6–10, 2011. doi:10.5829/idosi.gv.2017.132.136

81 SHUKLA, S. K.; RAO, T. S. An improved crystal violet assay for biofilm quantification in 96-well microtitre plate. 2017. doi:10.1101/100214. Disponível em: <a href="https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2017/01/13/100214.full.pdf">https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2017/01/13/100214.full.pdf</a>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

82 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Hospital das Clínicas. Coordenação de Farmácia. Guia de antimicrobianos. 2012. Disponível em: <a href="http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1415789307Guia">http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1415789307Guia de Antimicrobianos do HC-UFG.pdf</a>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

83 LABORCLIN. Manual para antibiograma: difusão em disco (Kirby and Bauer). 2011. Disponível em: <a href="http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf\_190.pdf">http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf\_190.pdf</a>. Acesso em: 22 set. 2018.

84 WOZNIAK, A.; GRINHOLC, M. Combined antimicrobial activity of photodynamic inactivation and antimicrobials–state of the art. Frontiers in Microbiology, v. 9, 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.00930

85 REGLINSKI, M.; SRISKANDAN, S. Streptococcus pyogenes. In: TANG, Y-W. (Ed.) Molecular medical microbiology. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2016. v.2, cap. 38, p. 675.doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00038-X

86 FIEDLER, T.; KALLER, T.; KREIKEMEYER, B. Streptococcus pyogenes biofilms formation, biology, and clinical relevance. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 5, p. 1–11, 2015. doi:10.3389/fcimb.2015.00015

87 REISNER, A. et al. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic Escherichia coli strains: impact of environmental and genetic factors. Journal of Bacteriology, v. 188, n. 10, p. 3572–3581, 2006. doi:10.1128/JB.188.10.3572-3581.2006

88 LASCH, P.; NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2015. p. 1–32. ISBN 9780470027318. doi:10.1002/9780470027318.a0117.pub2

89 SCHMITT, J.; FLEMMING, H. C. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. International Biodeterioration and Biodegradation, v. 41, n. 1, p. 1–11, 1998. doi:10.1016/S0964-8305(98)80002-4

90 FAGHIHZADEH, F. et al. Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles. Nanotechnology for Environmental Engineering, v. 1, n. 1, p. 1, 2016. doi:10.1007/s41204-016-0001-8