UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

AMANDA CRISTINA ZANGIROLAMI

Inativação fotodinâmica aplicada a biofilmes de *S. aureus* formados
em tubo endotraqueal

São Carlos

2018

AMANDA CRISTINA ZANGIROLAMI

Inativação fotodinâmica aplicada a biofilmes de *S. aureus* formados em tubo endotraqueal

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
Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Dr^a. Kate Blanco

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2018

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.

Zangirolami, Amanda Cristina

. Inativação fotodinâmica aplicada a biofilmes de *S. aureus* formados em tubo endotraqueal / Amanda Cristina Zangirolami; orientadora Kate Cristina Blanco - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

149 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Biofilme. 2. *S. aureus*. 3. Inativação fotodinâmica. 4. Curcumina. 5. Luz. I. Blanco, Kate Cristina, orient. II. Título.

Dedico este trabalho a todos que doaram seu tempo, que muitas vezes é tão curto para ajudar de alguma forma com a experiência deste trabalho, com ajuda no manuseio de equipamentos e na discussão dos experimentos e resultados, com ombro amigo para conversas e desabaços, e sou muito grata por tê-los;

A minha família por todo o suporte e compreensão, por nunca deixarem nada faltar.

A minha querida orientadora, por que sem ela nada disso seria possível.

Ao meu amor pelo apoio incondicional em todas as horas.

Aos meus grandes amigos, amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram deste trabalho, desde as simples discussões sobre possíveis problemas com a curcumina ou como onde vamos tomar uma cervejinha?

A minha família, mesmo muitas vezes a distância presente o carinho e o cuidado estão sempre presentes, a minha mãe pela atenção, pelas conversas, risos e desabafos, meu pai pelo exemplo, orientação e cuidado, meu irmão pela parceria e pelos roles. Vocês são a base do meu crescimento como ser humano e sou imensamente agradecida por toda dedicação, por todos os ensinamentos e conselhos. Obrigada por sempre estarem presentes.

A minha queridíssima orientadora, Kates, por todas as discussões e contribuições no trabalho. Sempre encontrando alternativas e ideias. Pela parceria, pelas risadas (porque foram várias), pelos conselhos, sempre orientando, na vida e no trabalho, e pela compreensão e tranquilidade sempre. Você é um exemplo a ser seguido, sempre levando a simplicidade e a alegria por onde passa. Pretendo levar você sempre comigo, no trabalho ou na vida. Você é uma grande pessoa. Obrigada por tudo.

Ao professor Vanderlei por todo o suporte no trabalho, pelas reuniões e discussões no intuito de melhorar os resultados. Obrigada por me acolher ao seu laboratório. Você é um exemplo de pessoa e sou muito agradecida por fazer parte da sua equipe.

A Dr^a Natalia, Natis, por todo o apoio e suporte ao longo do trabalho. Sempre disponível e atenciosa para ajudar no que fosse necessário. Muito obrigada por toda a ajuda e conselho. Você é uma pessoa com garra e tenho você como exemplo a ser seguido.

A Prof^a Cristina por todo o suporte e ajuda com o trabalho.

Ao meu amor Lucas. Cresci muito ao seu lado e espero que possamos crescer mais juntos. Você é uma pessoa incrível. Obrigada por todos os momentos, pelas tarefas do dia-a-dia, pelos roles, em casa ou no bar, ou nas madrugadas fazendo companhia e ajudando para terminar as discussões da dissertação. Você é meu melhor companheiro, parceiro de todas as horas e eu te amo por você ser simplesmente você. Obrigada pela coragem de ter escolhido São Carlos como sua segunda casa, mesmo estando tão longe da sua família. Te amo.

Aos meus grandes amigos do laboratório.

A Lari e a Camilinha por todas as conversas e risadas. Sem vocês o laboratório seria muito vazio. Adoro a companhia de vocês e sou muito feliz por tê-las na minha vida.

A Paulinha por toda a amizade. A primeira pessoa que conheci no laboratório, trabalhamos juntas, viajamos juntas. Altas risadas com você, animada e bem humorada, contagia quem esta ao seu redor. Obrigada por toda a ajuda e pela amizade.

Ao querido Didi. São tantos agradecimentos que nem sei como começar. Obrigada pelas conversas, pelo apoio e ajuda. Sempre meu bom ombro amigo. Obrigada pelas horas de

conversa, com café ou no bar, por me fazer ver as coisas de um outro ângulo. Obrigada pela atenção e pelo carinho. Amo você.

A Hildes pelo exemplo e pela amizade. Aprendi muita coisa com você, obrigada pelos ensinamentos e exemplo. Obrigada pelas conversas e por me ajudar a ver sempre os dois lados.

Ao Renan, babai, por toda a ajuda no trabalho. Obrigada pela brotheragem e pelas risadas.

Ao meu amigo Vicente. Meu primeiro amigo em São Carlos, desde 2010. Graduação juntos, muitas histórias, emoções e arrependimentos. Obrigada pela ajuda nas matérias, nas conversas, na paciência e no carinho. Você é muito importante para mim. Quero levar você sempre comigo.

Aos meus amigos, Leo e Drama. Meninos vocês estão no meu coração sempre. Obrigada pela paciência e pela “brotheragem”. Vocês são demais.

Aos meus amigos da Biomol, Lari, Rapha, Erica, Cris, Jade, da biomol para vida. Obrigada pelo companheirismo e pelo carinho. Vocês são família.

Pelos meus amigos de Rio Preto. Obrigada por toda mensagem e ligação. Não é fácil manter amizade com a distância, mas estamos bons nisso. Thalita, Cindy, Gustavo, Rafael, obrigada por todo o carinho, “Brothers” sempre!

A Lili pela ajuda nos equipamentos e ideia para o trabalho.

A todos os funcionários do campus, IFSC e IQSC, que contribuíram neste trabalho.

A Capes pelo auxílio financeiro, que sem não é possível fazer pesquisa.

As bibliotecárias Neusa e Cris, por toda ajuda na escrita do texto. Sempre disponíveis e atenciosas.

Obrigada a todos!

RESUMO

ZANGIROLAMI, A. C. **Inativação fotodinâmica aplicada a biofilmes de *S. aureus* formados em tubo endotraqueal**. 2018. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A capacidade dos micro-organismos formarem biofilme em superfícies pode afetar diretamente a saúde do homem. A formação de biofilme microbiano pode ocorrer em superfícies como em tubos de água, ar condicionado, dispositivos médicos como endoscópios, cateteres e tubos endotraqueais (TE). Pacientes debilitados por causas diversas como traumas e insuficiência respiratória podem ser portadores do TE. Este tubo é instalado na traqueia e facilita a troca gasosa no organismo debilitado. Na superfície deste tubo endotraqueal, células bacterianas, gram positivas ou negativas, podem se anexar e formar colônias, desenvolvendo assim, um biofilme. Essas células formam uma matriz extra polimérica (EPS) que protege as colônias contra agentes externos. A Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) pode ocorrer entre 48 a 72h após a instalação do TE no paciente. *Staphylococcus aureus* é a principal bactéria que causa esta doença, a qual apresenta linhagens resistentes a antibióticos. A resistência microbiana faz parte do processo evolutivo de adaptação destas células. Uma das estratégias para combater as infecções hospitalares é a inativação fotodinâmica. A terapia utiliza uma molécula fotossensível, luz e oxigênio celular. O fotossensibilizador, na presença da luz e oxigênio pode formar espécies reativas de oxigênio que levam a célula a morte. Não existe relatos que esta terapia cause resistência microbiana, sendo assim uma alternativa ao insucesso de alguns antibióticos. A curcumina, derivada da *Curcuma longa*, é uma molécula natural, hidrofóbica e que apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias e antitumorais com absorção de luz na região de 430 nm. O presente estudo combina o uso da inativação fotodinâmica associada a molécula de curcumina para a eliminação de biofilme de *S. aureus* desenvolvidos em TE. Métodos diversos foram testados para inativar o biofilme. Formulações com hidrogel, filme, nanoskin foram sintetizados com curcumina e testados no biofilme. Formulações utilizando curcumina natural são mais eficazes para inativar biofilme de *E. coli* e *S. aureus*. A inativação fotodinâmica foi otimizada utilizando solução de curcumina sintética, com auxílio de um planejamento experimental. A curcumina sintética em solução se mostrou mais estável e com melhores resultados de inativação comparada com curcumina natural em solução. Uma nova forma de entrega da curcumina sintética foi testada, a nebulização, e esta se mostrou eficaz e com resultados satisfatórios de morte do biofilme de *S. aureus*. Reações de funcionalização entre FS e o TEH foram testadas utilizando curcumina e porfirinas substituídas. As reações foram possíveis e foram otimizadas. Os resultados microbiológicos destes tubos funcionalizados indicam que os mesmos podem evitar a anexação das células microbianas. Este estudo mostra que a curcumina natural e as formulações são estáveis e podem inativar biofilmes bacterianos. A solução de curcumina sintética é eficaz quando associada a técnicas que também desestruturam o biofilme alcançando assim uma redução total de células. A nebulização é uma forma eficaz de transportar a curcumina sem alterar suas propriedades físico-químicas e pode ser usada para a entrega da curcumina. As reações de funcionalização foram otimizadas, não indicando a deformação na estrutura do tubo e este tubo funcionalizado pode ser uma alternativa futura em uma aplicação clínica, evitando a adesão de células microbianas com a luz a ação fotodinâmica pode ocorrer, levando as células a morte.

Palavras-chaves: Biofilme. *S. aureus*. Inativação fotodinâmica. Curcumina. Luz.

ABSTRACT

ZANGIROLAMI, A. C. **Photodynamic inactivation applying at *S. aureus* biofilm developed at endotracheal tube.** 2018. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The capacity of the bacteria develop a biofilm at surfaces can direct affect the human's health. Microbial biofilm formation can occurs on surfaces such as water pipes, air conditioning, medical devices as endoscope, catheters and endotracheal tubes (ET). Patients debilitated by causes such as traumas and respiratory insufficiency can be the cause for the patient can be carried by ET. This tube is installed in the trachea and facilitates gas exchange in the weakened organism. Bacterial cells, gram positive or negative, can attach and form colonies at the tube surface, developing a biofilm. This cells form an extra polymeric matrix (EPS) that protect the colonies against external agents. The Ventilator Associated Pneumonia (VAP) can occurs between 48-72 hours after the tube installation. *Staphylococcus aureus* is the main bacteria it can cause this disease and is an antibiotic resistant. The microbial resistance is a part of the microbial evolution and adaptation of the cells. The strategy designed to combat nosocomial infection is the photodynamic inactivation. The therapy combines the photosensitive molecule, light and cellular oxygen. The photosensitizer, in the presence of light can produce oxygen reactive species and this species can leave the microbial cells to death. There are no relates that this treatment cause microbial resistance, therefore is an alternative to the failure of some antibiotics. The curcumin, derivate of the *Curcuma longa*, is a natural molecule, hydrophobic molecule with antioxidant, anti-inflammatory and antitumor properties, with absorbance in the 430 nm region. This study associate the curcumin application in the photodynamic inactivation to eliminate *S. aureus* biofilm formed at endotracheal tubes. Different methods were tested to inactivate the biofilm. Formulations with hydrogel, a film, nanoskin were synthesized with curcumin and tested at the biofilm. Formulation prepared with natural curcumin were more efficient to *E. coli* e *S. aureus* biofilm inactivation. Photodynamic inactivation was optimized testing synthetic curcumin in solution with the aid of the experimental design. The synthetic curcumin in solution showed to be more stable and with the best inactivation results compared to the natural curcumin in solution. A new form of delivery the synthetic curcumin was tested, the nebulization, and this prove efficient and with satisfactory results of *S. aureus* biofilm death. Functionalization reactions between FS and TE were tested using curcumin and substituted porphyrins. The reactions were possible and optimized. The microbiological results of these immobilized tubes indicate that these tubes can avoid the bacterial cells attached. This studies show that the natural curcumin and the formulations were stables and inactivate bacterial biofilm. The synthetic curcumin in solution is effective when associated with techniques that also helps to de-structure the biofilm thus achieving a total reduction of cells. The nebulization is an effective form to transport without alters the physical-chemical properties of the curcumin. The functionalization reactions were optimized not indicating the deformation in the tube structure and this functionalized tube may be a future alternative in a clinical application, avoiding the adhesion of microbial cells with the light the photodynamic action can occur, leading the cells to death.

Keywords: Biofilm. *S. aureus*. Photodynamic inactivation. Curcumin. Light.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de lavagens do pré-inóculo para a formação do biofilme no T	
E. Após o pré-inóculo estar pronto, o meio de cultura é retitado e	
adiciona-se a mesma quantidade de PBS para lavagem de células. A	
lavagem é feita duas vezes e 100 µL desta solução é adicionada em	
cada poço da placa de 24 poços, junto a 900 µL de meio de cultura	
líquido e o pedaço de tubo cortado.	43
Figura 2 - Ilustração de uma Biotable emitindo em 450 nm.	44
Figura 3 - Metodologia de lavagem do TEH e diluições feitas para a contagem de	
placas.	44
Figura 4 - Esquema da TFD feita com filme ou a Nanoskin® com curcumina. O	
tubo foi envolto pelo filme ou pela pele, dentro e fora durante o tempo	
de incubação. A iluminação veio a seguir. Os experimentos com filme	
de Photogem® e seguiu-se o mesmo protocolo.....	47
Figura 5 - Biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> desenvolvidos em SS durante 7 dias	
tratado com filme de curcumina natural com concentração de 0,75	
mg/mL durante 30 minutos e iluminado pela Biotable de 450 nm com	
irradiância de 35 mW/cm ² totalizando 15 J/ cm ²	49
Figura 6 - Biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> desenvolvidos em SS e TEA durante 4	
dias tratado com filme de curcumina natural com concentração de	
0,75 mg/mL durante 30 minutos e iluminados pela Biotable de 450	
nm com irradiância de 35 mW/cm ² totalizando 15 J/ cm ²	50
Figura 7 - Biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> desenvolvidos em SS e TEA durante 3	
dias tratado com filme de curcumina natural com concentração de	
0,75 mg/mL durante 30 minutos e iluminado pela Biotable de 450 nm	
com irradiância de 35 mW/cm ² totalizando 15 J/ cm ²	50
Figura 8 - T.E.H tratado com filme CSS nas concentrações de 0,75; 1,25 e 5	
mg/mL e desenvolvido o biofilme de <i>S. aureus</i> no PVC tratado	
durante 24 horas. Dose de luz foi de 15 e 50 J/cm ² com potência de 40	
mW/cm ²	52
Figura 9 - Biofilmes de <i>S. aureus</i> desenvolvidos no TEH para adultos durante 24	
horas tratado com filme de CSS nas concentrações de 1,25 e 5 mg/mL	
com 2h de incubação nas doses de luz 15 e 50 J/cm ²	52

Figura 10 - Biofilme de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> desenvolvido em S.S e TEA. durante 4 dias tratado com filme de Photogem® com concentração de 0,03 mg/mL e iluminado por um Laser diodo com 32 mW/cm ² em 635 nm por 8min20s, totalizando uma dose de 15 J/cm ² .	53
Figura 11 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH. durante 7 dias tratado com Nanoskin® exposta a uma solução de curcumina com concentração de 0,5 mg/mL durante 1 minuto. O tempo de contato entre a Nanoskin® com curcumina no biofilme foi de 30 minutos e dose de energia igual a 15 J/cm ² .	54
Figura 12 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 4 dias, tratado com hidrogel com curcumina Natural de concentração de 1mg/mL durante 30 minutos e irradiado por 35 mW/cm ² por 7min14s totalizando 15 J/cm ² .	55
Figura 13 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 7 dias tratado com uma solução de Tween 80 com curcumina durante 2 horas. A concentração do Tween foi variada de 0,75 a 1,25% do volume total enquanto a concentração da curcumina foi de 0,75 mg/mL.	56
Figura 14 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH, durante 24 horas, tratado com uma solução de Tween 80 com curcumina por um tempo de 2 horas. A concentração da curcumina foi de 0,75 mg/mL enquanto a concentração do Tween foi fixada em 1,25%. A iluminação foi feita pela Biotable em 450 nm, com totalizando uma dose de energia de 50 J cm ² .	57
Figura 15 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com uma solução de Tween 80 com curcumina durante 2 horas. A concentração da curcumina foi variou de 0,75 a 1,25 mg/mL, enquanto a concentração do Tween foi fixada em 1,25%. A iluminação foi feita pela Biotable em 450 nm, com totalizando uma dose de energia de 50 J cm ² .	57
Figura 16 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com uma solução de Plurônio com curcumina durante 2h30min. A concentração da curcumina foi de 1,25 mg/mL e a concentração do Plurônio foi de em 15%.	58
Figura 17 - Esquema ilustrativo do sonicador utilizado nos experimentos.	61

Figura 18 - Planejamento experimental fatorial em 2^3 por planejamento composto central.	68
Figura 19 - Biofilme de <i>E. coli</i> desenvolvido no TEH durante 7 dias, tratado com solução de curcumina natural em três concentrações 0,15; 0,5 e 0,75 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² durante 7min14s, totalizando 15 J/cm ²	71
Figura 20 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 7 dias, tratado com solução de curcumina natural nas concentrações: 0,15; 0,5 e 0,75 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450 nm a 35 mW/cm ² durante 7min14s, totalizando 15 J/cm ²	72
Figura 21 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com solução de curcumina natural com concentração 5 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm ²	73
Figura 22 - Teste de comparação entre as curcuminas natural e sintéticas testadas com concentração de 0,75 mg/mL. Iluminação com Biotable de 450 nm recebendo uma dose total de energia igual a 15 J/cm ²	74
Figura 23 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com solução de CSC nas concentrações: 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² durante 7min14s, totalizando 15 J/cm ²	75
Figura 24 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH cortado ao meio durante 24 horas, tratado com solução de CSS nas concentrações: 1,0; 1,25 e 1,5 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm ²	76
Figura 25 - Biofilme de <i>E. coli</i> desenvolvido no TEH, cortado ao meio, durante 24 horas, tratado com solução de CSS com concentração de 1,25 mg/mL durante 2 horas de incubação e mais 30 minutos no sonificador. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm ²	77
Figura 26 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido noTEH, cortado ao meio, durante 24 horas, tratado com solução de CSS com concentração de 1,25 mg/mL durante 2 horas de incubação e mais 30 minutos da amostra no	

sonicador. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² recebendo uma dose de 15 e 50 J/cm ²	78
Figura 27 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido noTEH, cortado ao meio, durante 24 horas, tratado com solução de curcumina 1 e ambas CSC com concentração de 1,25 mg/mL durante 2 horas de incubação e mais 30 minutos da amostra no sonicador. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² recebendo uma dose de energia igual a 50 J/cm ²	79
Figura 28 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com solução de CSV com concentração de 1,25 mg/mL durante 2 horas de incubação e 30 minutos no sonicador. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm ²	80
Figura 29 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com duas soluções de CSV com as concentrações de 1,0 e 1,5 mg/mL durante 2 horas de incubação. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm ² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm ²	81
Figura 30 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com solução de 0,1 mg/mL de PDZ com dois tempos de incubação, 0,5 e 2horas irradiados com 50 J/cm ² com Biotable em 660 nm com irradiância de 30 mW/cm ²	82
Figura 31 - Diagrama de Pareto do 3º planejamento experimental. A variável dose de luz foi a que mais influenciou nestes experimentos, permanecendo na primeira coluna do gráfico.	85
Figura 32 - Valores experimentais da quantidade de colônias em relação aos valores preditos pelo software Statistica referentes a equação de regressão linear do modelo.....	85
Figura 33 - Superfície de resposta entre as variáveis concentração e tempo de incubação em relação ao fator resposta.....	86
Figura 34 - Superfície de resposta entre as variáveis dose de luz e tempo de incubação em relação ao fator resposta.....	86
Figura 35 - Superfície de resposta entre as variáveis concentração e dose de luz em relação ao fator resposta.....	87
Figura 36 - Gráfico dos experimentos 1, 2, 3 e 4 do planejamento experimental. Dose de luz de todos os experimentos foi de 15 J/cm ²	88

Figura 37 - Gráfico dos experimentos 9, 10, 13, 14, 15 e 16 do planejamento com concentração de 1 mg/mL e as doses de luz foram: o grupo 13 recebeu 0,6 J/cm ² , o grupo 14 recebeu 59,4 J/cm ² e os grupos 9, 10, 15 e 16 receberam uma dose total de 30 J/cm ²	88
Figura 38 - Gráfico dos experimentos 11 e 12 do planejamento experimental. Dose de luz dos grupos foi de 30 J/cm ² .Concentração do grupo 11 foi de 0,58 mg/mL e do grupo 12 a concentração foi igual a 1,42 mg/mL.....	89
Figura 39 - Gráfico dos experimentos 5, 6, 7 e 8 do planejamento. Dose de luz dos grupos TFD foi 50 J/cm ² . Os tempos de incubação dos grupos 5 e 7 foram 1h30min, e dos grupos 6 e 8 2h30min. Os grupos 5 e 6 testaram a concentração de 0,75 mg/mL e os grupos 7 e 8 testaram 1,25 mg/mL.....	89
Figura 40 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido em período de 1 a 7 dias no TEH tratado com CSV com 1,25 mg/mL durante 2 horas com uma dose total de 50 J/cm ²	90
Figura 41 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido em TEH durante 24 e 48h utilizados para o teste de resistência bacteriana após a aplicação de PDT.....	91
Figura 42 - Crescimento planctônico de <i>S. aureus</i> desenvolvida durante 24 horas na placa de 24 poços tratado com CSV com concentração de 1,25 mg/mL durante 24 horas irradiados por um conjunto de 6 Led's com irradiância 4 mW/cm ² em cada led com um total de 345,6 J/cm ²	91
Figura 43 - Imagem do nebulizador usado.	94
Figura 44 - Matriz elaborada pelo software Statistica [®] com planejamento fatorial do tipo 2 ² (2 fatores) com dois pontos centrais realizado por planejamento composto central	96
Figura 45 - a) Teste de cinética do Biofilme de <i>S. aureus</i> em TEH sem tratamento durante 11 horas. Gráfico plotado pelo programa Origin [®] , com P valor<0,05 e valor de Chi-quadrado= 0,01207; b) Teste de cinética do Biofilme de <i>S. aureus</i> em TEH sem tratamento durante 11 dias. Gráfico plotado pelo programa Origin [®] , com P valor<0,05 e valor de Chi-quadrado=0,103.	98
Figura 46 - Experimento sobre a cinética entre os tubos tratados e não tratados durante 10 horas, com CSV nebulizada com 5 mg/mL de	

concentração e iluminação pela ponteira(79) com 70 mW/cm ² durante 12min30s a 450 nm totalizando 50 J/cm ²	100
Figura 47 - Medidas de pH durante o experimento de cinética durante 3 horas. As medidas foram realizadas com um pHmetro.....	102
Figura 50 - Diagrama de Pareto do 2º planejamento experimental. A variável dose de luz foi a que mais influenciou nestes experimentos, permanecendo na primeira coluna do gráfico.	104
Figura 51 - Valores experimentais da quantidade de colônias em relação aos valores preditos pelo software Statistica referentes a equação de regressão linear do modelo.....	104
Figura 52 - Superfície de resposta das variáveis tempo de nebulização e dose de luz no 2º planejamento experimental.	105
Figura 53 - Experimentos com tubo nebulizado com 5 mg/mL de CSV e formação do biofilme de <i>S. aureus</i> após 24 horas. Iluminação com ponteira(79) em 450 nm, com 70 mW/cm ² totalizando 20 e 80 J/cm ² nos grupos TFD.	106
Figura 54 - Experimentos com tubo nebulizado com 5 mg/mL de curcumina sintética e formação de biofilme de <i>S. aureus</i> após 24 horas. Iluminação com ponteira de descontaminação da garganta em 450 nm, com 70 mW/cm ² totalizando 50 J/cm ²	106
Figura 55 - Experimentos com tubo nebulizado com 5 mg/mL de curcumina sintética e formação de biofilme de <i>S. aureus</i> após 24 horas. Iluminação com ponteira de descontaminação da garganta em 450 nm, com 70 mW/cm ² totalizando 7,7 e 92,3 J/cm ² dependendo do grupo TFD.	107
Figura 48 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido em TEH durante 1, 180, 360 e 1440 minutos. Tratamento com CSV nebulizada com 5 mg/mL durante 25 minutos. Iluminação com ponteira(79) com 70 mW/cm ² durante 12min30s, totalizando 50 J/cm ²	108
Figura 49 - Biofilme desenvolvido por <i>S. aureus</i> em 24 horas em TEH. nebulizado por 25 minutos e irradiado por 12min30s totalizando uma dose de 50 J/cm ² . Iluminação feita por uma ponteira(79) com 70 mW/cm ²	109

Figura 56 - Diagrama de Pareto do 3º planejamento experimental. A variável tempo nebulização foi a que mais influenciou nestes experimentos, estando na primeira coluna do gráfico.	111
Figura 57 - Valores experimentais da quantidade de colônias em relação aos valores preditos pelo software Statistica referentes a equação de regressão linear do modelo.	112
Figura 58 - Superfície de resposta das variáveis tempo de nebulização e dose de luz no 3º planejamento experimental.	112
Figura 59 - Experimentos realizados no 3º planejamento experimental, os grupos e seus respectivos resultados.	113
Figura 60 - Experimentos com desenvolvimento do Biofilme de <i>S. aureus</i> em 24 horas e tubo tratado por nebulização, com 5 mg/mL de curcumina sintética. Iluminação com ponteira de descontaminação da garganta em 450 nm, com 70 mW/cm ² totalizando 20 e 80 J/cm ² nos grupos TFD.	114
Figura 61 - Experimentos com desenvolvimento do Biofilme de <i>S. aureus</i> em 24 horas e tubo tratado por nebulização, com 5 mg/mL de curcumina sintética. Iluminação com, ponteira(79) em 450 nm, com 70 mW/cm ² totalizando 50 J/cm ² , 7,7 e 92,3 J/cm ² nos grupos TFD.	114
Figura 62 - Esquema geral da síntese da meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina. A partir de uma porfirina fluorada, adicionando ácido diclorossulfônico sintetizou-se a meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfuofenil) porfirina a uma temperatura de 100°C.	119
Figura 63 - Esquema da síntese da 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil) porfirina. A reação foi sintetizada com os componentes nitrobenzeno, hidroxibenzaldeído, pirrol e o ácido acético a 120°C. a reação é de condensação para síntese de porfirina.	120
Figura 64 - Esquema das duas reações feitas no TEH: primeira etapa reação do PVC com a base; segunda etapa realizada entre o tubo com a base ligada covalentemente mais a reação com a porfirina.	121
Figura 65 - Esquema da reação de síntese para funcionalização do PVC.	121
Figura 66 - Esquema geral da Reação. A partir da molécula curcumina (CSC) foi proposta uma reação com CsCO ₃ , e curcumina e DMSO como	

solvente da reação. Reação feita com temperatura de 30°C, testando vários tempos de reação.	124
Figura 67 - Testes de estabilidade do TEH em solventes orgânicos: a) Tubo imerso em tetraidrofurano; b) tubo imerso em diclorometano; ambos os tubos foram dissolvidos pelos solventes testados.	126
Figura 68 - a) FT-IR do TEH sem tratamento; b) FT-IR do tubo tratado com DMSO durante 6 h.	127
Figura 69 - Resultado do experimento (AZ01) entre a etilenodiamina e o PVC. Devido a altas temperaturas e tempo de reação os tubos alteraram toda a sua estrutura física.	128
Figura 70 - a) FT-IR do TEH sem tratamento; b) FT-IR do TEH com etilenodiamina (AZ01); c) FT-IR do TEH com etilenodiamina (AZ02); d) FT-IR do TEH com etilenodiamina (AZ03).	129
Figura 71 - a) FT-IR do TEH sem tratamento; b) FT-IR do TEH com a porfirina.	131
Figura 72 - Espectro UV-Vis no estado sólido do tubo ligado a 5,10,15,20-tetra(3- hidroxifenil) porfirina (amostras AZ16 e AZ07).	131
Figura 73 - a) FT-IR do TEH sem tratamento; b) Curcumina; c) FT-IR do TEH com curcumina.	133
Figura 74 - Espectros de UV-Vis no estado sólido da amostra AZ06, curcumina e AZ15.	134
Figura 75 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura nos tubos dos grupos controle e teste: a) TEH sem tratamento na região interna; b) TEH pré- tratado com CsCO ₃ e DMSO na região interna; c) TEH funcionalizado com curcumina e uma ampliação dentro da imagem com destaque para uma possível ligação entre a curcumina e as moléculas de PVC; d) TEH funcionalizado com curcumina e irradiado pela ponteira por 12min.	134
Figura 76 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido durante 24h em TEH. Cada grupo descrito recebeu um tratamento diferente. Tubos controle com e sem luz estão acima: controle, controle com tratamento com a base e solvente e o tubo apenas com a síntese da curcumina. Os mesmos grupos controle, foram feitos grupos com aplicação da luz.	135
Figura 77 - Biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TEH sem tratamento e no TEH com tratamento ao longo de 6 dias. A iluminação interna realizada	

com a ponteira emitindo em 450 nm com 70 mW/cm ² totalizando uma dose de energia de 50 J/cm ² . A iluminação externa realizada com a Biotable emitindo no mesmo comprimento de onda, totalizando a mesma dose de 50 J/cm ²	136
Figura 78 - Desenvolvimento do biofilme de <i>S. aureus</i> durante 24h no tubo imobilizado com curcumina e irradiado uma vez. Na região abaixo a direita observa-se as colônias remanescentes da pós TFD.	137
Figura 79 - Imagens de fluorescência por microscopia confocal do tubo imobilizado com curcumina. Imagem mostra resultados qualitativos da quantidade de curcumina que penetrou na estrutura do PVC; a) imagem de fluorescência na parte de dentro do tubo; b) espectro emitido pela região do tubo analisada.	137
Figura 80 - Imagens de fluorescência por microscopia confocal do tubo imobilizado com curcumina e irradiado. Imagem mostra resultados qualitativos da quantidade de curcumina que penetrou na estrutura do PVC; a) imagem de fluorescência na parte de dentro do tubo; b) espectro emitido pela região do tubo analisada.	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos dados nos experimentos variando o Tween e a concentração da curcumina.....	46
Tabela 2 - Tabela com os parametros correspondentes aos experimentos referentes ao Capitulo 1. O tipo de curcumina e de tubo usado, tempo de biofilme formado e o de incubação do FS, concentração do FS, potência e dose de luz são os parâmetros descritos. Todos os experimentos foram irradiados com a Biotable em 450 nm, com irradiância de 35 mW/cm ²	48
Tabela 3 - Parâmetros usados nos experimentos com biofilmes de <i>S. aureus</i> desenvolvido em TEH tratados com curcuminas naturais e sintéticas nas concentrações testadas e dois tipos de iluminação diferentes.	65
Tabela 4 - Parâmetros e intervalos usados no primeiro planejamento experimental fatorial (ponto central, níveis -1 e +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central utilizando solução de curcumina sintética Vetec e desenvolvendo biofilme em <i>S. aureus</i> durante 24 horas.....	69
Tabela 5 - Matriz do Planejamento experimental com as variáveis codificadas e reais de cada experimento.....	69
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental com as variáveis reais e o valor resposta de cada experimento.	83
Tabela 7 - Resultados da regressão linear feita para a inativação de biofilme de <i>S. aureus</i> com os valores de p-valor, valor de F, valor do R ²	84
Tabela 8 - Parâmetros e intervalos usados no primeiro planejamento experimental fatorial (2 pontos centrais) usados no planejamento composto central utilizando solução de curcumina sintética Vetec e desenvolvendo biofilme em <i>S. aureus</i> durante 24 horas.	97
Tabela 9 - Matriz do Planejamento experimental com as variáveis codificadas e reais de cada experimento.....	97
Tabela 10 - Valores dos parâmetros calculados pelo programa Origin [®] . O valor de R ² é de 0,9.....	99

Tabela 11 - Valores dos parâmetros calculados pelo programa Origin®. O valor de R^2 é 0,49.	99
Tabela 12 - Valores dos parâmetros calculados pelo programa Origin® para os modelos de curvas de crescimento em cada grupo do experimento de cinética de crescimento bacteriano no TEH.	101
Tabela 13 - Experimentos do 2º planejamento experimental com os parâmetros tempo de nebulização, dose de luz e fator resposta de cada experimento. O fator resposta é média da quantidade de colônias contadas em cada grupo.	103
Tabela 14 - Resultados da regressão linear feita para a inativação de biofilme de <i>S. aureus</i> com os valores de p-valor, valor de F, valor do R^2	103
Tabela 15 - Experimentos do 3º planejamento experimental com os parâmetros tempo de nebulização, dose de luz e fator resposta de cada experimento. O fator resposta é média da quantidade de colônias restantes em cada grupo.	110
Tabela 16 - Resultados da regressão linear feita para a inativação de biofilme de <i>S. aureus</i> com os valores de p-valor, valor de F, valor do R^2	111
Tabela 17 - Síntese meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina	119
Tabela 18 - Dados da síntese da meso-tetra hidroxilada porfirina.	120
Tabela 19 - Dados da reação 9 após os pré-tratamentos dos experimentos 2 e 3.	123
Tabela 20 - Teste estabilidade entre PVC e os solventes testados.	126
Tabela 21 - Ligação Dietilamina ao PVC.	128
Tabela 22 - Reação PVC e porfirina hidroxilada dos experimentos 7 (50°C, 14h), 12 (50°C, 2h30) e 14 (50°C, 11h).	130
Tabela 23 - Dados dos experimentos 16, 18, 20, 23 e 24.	130
Tabela 24 - Dados dos experimentos 4, 6, 10, 11 e 13 a 30°C durante 10h.	132
Tabela 25 - Dados dos experimentos 15, 17, 19 e 21 a 30°C durante 4h.	132

LISTA SIGLAS E ABREVIATURAS

CN	Curcumina Natural
CSC	Curcumia sintética feita por Carmona(1)
CSS	Curcumina sintética Sigma®
CSV	Curcumina sintética Vetec
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EPS	Extra polymeric substrate
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fotossensibilizador
h	hora
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LAT	Laboratório de Apoio Tecnológico
LED	Diodos emissores de luz
Mg	miligrama
Mg/mL	miligramas por mililitro
Min	minuto
mW/cm ²	miliwatts por centímetro quadrado
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
nm	nanômetro
PBS	Phosphate Buffer Solution
PDT	Photodynamic Therapy
PDZ	Photodithazine®
RPM	rotação por minuto
SS	Sonda Siliconada
TE	Tubo Endotraqueal
TEA	Tubo Endotraqueal para animais
TFD	Terapia Fotodinâmica
TEH	Tubo Endotraqueal para humanos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
µL	microlitro
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

CAPITULO 1	CONTEXTUALIZAÇÃO	29
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
1.1.1	Biofilme Microbiano	31
1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	32
1.2.1	<i>Biofilme em Dispositivos médicos</i>	33
1.2.2	<i>TEH em PAV</i>	33
1.2.3	<i>Terapia Fotodinâmica</i>	34
1.2.4	<i>Mecanismos de ação</i>	35
1.2.5	<i>Histórico</i>	35
1.2.6	<i>Aplicações da técnica</i>	36
1.2.7	<i>Fotossensibilizadores</i>	37
1.2.7.1	<i>Curcumina</i>	37
1.2.8	<i>Fontes de luz</i>	40
CAPÍTULO 2	FORMULAÇÕES DE CURCUMINA	41
2.1	INTRODUÇÃO	41
2.2	OBJETIVO	41
2.2.1	Objetivo Geral:	41
2.2.2	Objetivos Específicos:	42
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.3.1	Micro-organismo	42
2.3.1.1	Pré inóculo	42
2.3.1.2	Formação do Biofilme	42
2.3.2	Fonte de luz	43
2.3.3	Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	44
2.3.4	Filme de FS	45
2.3.4.1	<i>Preparação do Filme de Curcumina Natural e Sintética</i>	45
2.3.4.2	<i>Preparação de Filme de Photogen®</i>	45
2.3.5	Nanoskin®	45
2.3.6	Solução de Curcumina Natural em Hidrogel	45
2.3.7	Solução de Curcumina Sintética em Tween 80	46
2.3.8	Solução de Curcumina Sintética com Plurônio®	46
2.3.9	Inativação Fotodinâmica	47
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
2.4.1	Filme de FS	49

2.4.1.1 Filme de Curcumina Natural	49
2.4.1.2 Filme de Curcumina Sintética.....	51
2.4.1.3 Filme de Photogem [®]	53
2.4.2 Nanoskin [®]	54
2.4.3 Solução de Curcumina em Hidrogel.....	54
2.4.4 Solução de Curcumina com Tween 80.	56
2.4.5 Solução de Curcumina com Plurônio.....	58
2.5 CONCLUSÃO	59
CAPITULO 3 OTIMIZAÇÃO TFD COM SOLUÇÃO DE CURCUMINA NATURAL E SINTÉTICA	61
3.1 INTRODUÇÃO.....	61
3.1.1 Solução de Photodithazine.....	61
3.1.2 Sonicador	61
3.1.3 Planejamento experimental.....	62
3.2.1 Objetivo geral.....	62
3.2.2 Objetivos específicos	62
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.4.1 Pré inóculo	62
3.4.2 Formação do Biofilme.....	63
3.4.3 Solução de Curcumina Natural e Sintética.....	63
3.4.4 Solução de Photodithazine [®]	63
3.4.5 Sonicador	63
3.4.6 Inativação Fotodinâmica	64
3.4.7 Teste de Resistência Microbiana	66
3.4.8 Teste com Iluminação Constante.....	67
3.4.9 Planejamento Experimental.....	67
3.4.10 Análise Estatística de Dados.....	70
3.5 RESULTADOS.....	71
3.5.1 Solução Curcumina Natural	71
3.5.2 Solução de Curcumina Sintética	74
3.5.3 Sonicador	77
3.5.4 Teste Efeito Pós TFD	80
3.5.5 Testes com Solução de Photodithazine [®]	81
3.5.6 Planejamento experimental.....	82
3.5.7 Teste resistência Microbiana.....	90

3.6 CONCLUSÃO.....	92
CAPÍTULO 4 NEBULIZAÇÃO DA CURCUMINA NO TEH	93
4.1 INTRODUÇÃO	93
4.2 OBJETIVOS	93
4.2.1 Objetivo Geral	93
4.2.2 Objetivos Específicos.....	93
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	94
4.3.1 Pré inóculo.....	94
4.3.2 Formação do Biofilme	94
4.3.3 Nebulização do Tubo.....	94
4.3.4 Inativação Fotodinâmica.....	94
4.3.4.1 Teste Cinética dos TEH com Curcumina Nebulizada	94
4.3.4.2 Teste de Formação do Halo	96
4.3.4.3 Planejamento experimental.....	96
4.3.5 Análise Estatística de Dados	97
4.4 RESULTADOS	97
4.4.1 Nebulização Antes da Formação de Biofilme Microbiano	97
4.4.1.1 Testes Cinética Biofilme não Nebulizado	97
4.4.1.2 Teste de Cinética do TEH Nebulizado.....	99
4.4.1.3 Planejamento Experimental.....	102
4.4.1.4 Teste de Formação do Halo	107
4.4.2 Nebulização Após a Formação de Biobfilme Microbiano	107
4.4.2.1 Efeito da nebulização de curcumina em biofilme formado em TEH.....	107
4.4.2.2 Planejamento experimental.....	110
4.5 CONCLUSÃO.....	115
CAPÍTULO 5 IMOBILIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR NO TEH.....	117
5.1 INTRODUÇÃO	117
5.2 OBJETIVOS	117
5.2.1 Objetivo Geral	117
5.2.2 Objetivos Específicos.....	117
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	118
5.3.1 Testes de Estabilidade entre TEH e solventes.....	118
5.3.2 Síntese de Porfirinas.....	118
5.3.2.1 Síntese da Meso-Tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) Porfirina.....	118
5.3.2.2 Síntese da Meso Tetra Hidróxi Porfirina	119

5.3.3 Porfirinas	120
5.3.3.1 Reação de funcionalização do TEH com 1,2 Etilenodiamina.....	120
5.3.3.2 Ligação Dietilamina ao PVC.....	121
5.3.3.2.1 EXPERIMENTO 1 (AZ01)	122
5.3.3.2.2 EXPERIMENTO 2 (AZ02)	122
5.3.3.2.3 EXPERIMENTO 3 (AZ03)	122
5.3.4 Reação de Funcionalização do TEH Ligado a 1,2 Etilenodiamina com Meso-Tetra (2, 6, 3-Cloro Sulfluorofenil) Porfirina.....	122
5.3.5 Reação de funcionalização do TEH com Porfirina Hidroxilada.....	123
5.3.5.1 EXPERIMENTO 1 (AZ07).....	123
5.3.5.2 EXPERIMENTO 2 (AZ12).....	123
5.3.5.3 EXPERIMENTO 3 (AZ14).....	123
5.3.5.4 EXPERIMENTO 4 (AZ16).....	124
5.3.4 CURCUMINA	124
5.3.4.1 EXPERIMENTO 1 (AZ04)	124
5.3.4.2 EXPERIMENTO 2 (AZ06)	124
5.3.4.3 EXPERIMENTO 3 (AZ10)	124
5.3.4.4 EXPERIMENTO 4 (AZ11)	125
5.3.4.5 EXPERIMENTO 5 (AZ13)	125
5.3.4.6 EXPERIMENTO 6 (AZ15)	125
5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	125
5.3.6 Avaliação dos tubos imobilizados com curcumina por microscopia confocal de fluorescencia.....	125
5.4 RESULTADOS	126
5.4.1 Testes de Estabilidade entre TEH e Solventes	126
5.4.2 Ligação Dietilamina ao Tubo.....	127
5.4.3 Reação de funcionalização do TEH ligado a 1,2 Etilenodiamina com meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina.	129
5.4.4 Reação de funcionalização do TEH com Porfirina Hidroxilada.....	129
5.4.5 Curcumina.....	131
5.4.6 Inativação Fotodinâmica.....	135
5.5 CONCLUSÃO.....	138
REFERÊNCIAS.....	141

CAPITULO 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

As bactérias são um dos seres vivos mais antigos no planeta, logo tiveram inúmeras evoluções para perpetuarem a espécie e sobreviverem. As bactérias utilizam vários mecanismos para sobreviver e se proteger contra defesas dos hospedeiros. Apresentam como mecanismos de patogenicidade apêndices como cílios e flagelos para locomoção e anexação(2) em uma superfície podendo liberar fatores de virulência tóxicos para o hospedeiro como homem e animais. Devido a sua alta capacidade de adquirir resistência(3) contra fatores externos prejudiciais às células, as bactérias podem se adaptar a fatores diversos e povoar lugares diversos como mares, rochas, árvores, telhado de uma casa, maca em centro cirúrgico ou até mesmo em materiais médicos instalados em pacientes.(4)

As bactérias possuem a capacidade de se instalar em superfícies estáveis e formarem colônias que pode dar origem aos biofilmes microbianos. Os biofilmes são comunidades de micro-organismos aderidos a uma superfície e entre si e cobertas por uma matriz extracelular polimérica (EPS) que confere estabilidade contra agentes externos como temperatura e pH. Esta matriz pode ser composto por água, enzimas, açúcares, ácidos nucléicos e metabólito das bactérias que a compõe.(5) Por isso, os micro-organismos em biofilmes estão associados a infecções onde há superfícies de materiais como sonda, cateter e implantes, principalmente em hospitais em Unidade de Tratamento Intensivo (UTIs). *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*(6) são exemplos de micro-organismos que também podem se anexar no TEH acoplado ao paciente.

O ambiente hospitalar é altamente propício no desenvolvimento de contaminações por micro-organismos resistentes por apresentar alta densidade de pacientes debilitados e imunossuprimidos, além do alto índice do uso de técnicas invasivas. Além do alto risco de contaminação cruzada nesses ambientes, os micro-organismos podem ser transmitidos e colonizarem esses locais por meio de vias como: a água e ar condicionado. A pneumonia associada a ventilação é uma doença que é causada pela colonização de bactérias, principalmente *S. aureus* em tubo endotraqueal (TEH), que pode formar o biofilme e ser um grande problema para o hospedeiro.(7)

Portanto, os biofilmes microbianos são uma comunidade organizada dessas células que se comunicam entre si e estimulam o processo de multiplicação e crescimento mesmo em um ambiente com falta de nutrientes e excesso de substâncias tóxicas.(8) Devido a essa complexidade do biofilme considerada uma forma de resistência microbiana é difícil de destruí-lo pelas terapias convencionais. Além disso, os agentes antimicrobianos como antibióticos estão começando a não mostrarem efetividade devido resistência microbiana, sendo assim necessário novos métodos como alternativas de tratamento, ou para serem usados em sinergia aos antibióticos. A terapia fotodinâmica (TFD) surge neste contexto para atuar como protagonista na inativação fotodinâmica para alcançar a descontaminação microbiana.

O uso da TFD tem registro desde de 1900 quando um cientista descreveu sobre o efeito do corante acridina sob o protozoário *Paramecia* na presença da luz solar.(9) Três componentes são necessários para a aplicação da TFD: luz, molécula fotossensível e oxigênio celular. A molécula fotossensível chamada fotossensibilizador (FS) é irradiado em um

comprimento de onda ideal para a absorção da luz na molécula fotossensível. Os elétrons que estão no nível fundamental da molécula do FS recebem esses fótons e passam para o estado excitado. No decaimento destes elétrons eles podem ir para o estado tripleto e ocorrer dois tipos de reações que ocorrem por transferência de energia (1) ou transferência de elétrons. (2) O produto da reação do tipo 1 transfere elétrons originando radicais livres que são espécies reativas de oxigênio. Na reação do tipo 2, a transferência de energia é dada ao oxigênio presente na célula, originando o oxigênio singlete. Estas espécies de produtos são citotóxicas e podem levar a célula a morte. O FS pode ser aplicado de forma tópica ou sistêmica sob a lesão, tecido ou em um local a ser fotossensibilizado. O tempo de interação entre o FS e o local tratado é chamado de tempo de incubação. Neste tempo a molécula entra nas células desejadas, para que quando a luz for irradiada, o efeito ocorra dentro das células e as mesmas sejam mortas. Estudos relatam que o FS é atraído para o tecido com maior atividade celular.(10) As células tumorais que apresentam alta taxa metabólica apresenta uma afinidade do FS. Normalmente, em células microbianas, o acesso é tópico, o FS é aplicado sob a contaminação desejada.

A curcumina é um derivado natural da planta Açafrão da Terra. O açafrão é uma planta originalmente de países tropicais e subtropicais e o teor dos curcuminóides variam de 2-9%. Essa variação dependerá das condições geográficas da planta. (11) Desde tempos antigos a curcumina foi comercializada, principalmente na Ásia. Na China e na Índia a sua produção e consumo é alta. Na culinária, curcumina é utilizada como especiaria e na medicina tradicional indiana é utilizada para tratamento de tosse, anorexia, sinusite, distúrbios biliares, inflamação, inchaço e feridas.(11) A curcumina apresenta de 3-5% de outros dois curcuminóides, a demetoxicurcumina (aproximadamente 17%) e a bis-demetoxicurcumina (aproximadamente 3%). A curcumina é um curcuminóide, com coloração alaranjada, hidrofóbica e fotossensível, com uma maior absorção no espectro visível na região do azul, aproximadamente em 430 nm. Curcumina tem baixa solubilidade em meios aquosos, sendo mais biodisponibilizada em solventes orgânicos, como isopropanol, etanol, dimetil sulfóxido e acetona. (12) Neste estudo, a curcumina foi escolhida para o estudo como o principal FS utilizado para a inativação do biofilme de *S. aureus*. A luz azul, por ter um menor comprimento de onda atinge camadas mais superficiais de uma amostra ou mesmo de um tecido. A curcumina é uma molécula aprovada pela Food and Drug Administration (FDA).(13) A curcumina apresenta características interessantes como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antitumoral e antioxidante.(14) A estabilidade da curcumina na variação do pH se altera, em soluções mais básicas a molécula permanece mais instável comparada com valores de pH mais baixos. (12)

A proposta deste estudo foi associar a TFD em biofilmes microbianos presentes em tubos endotraqueais com o objetivo de desestruturá-los além de causar a morte de bactérias. A dissertação foi dividida em quatro capítulos devido a variabilidade de experimentos realizados com diferentes formulações, otimização da TFD, entrega do FS e para uma melhor apresentação dos resultados e discussões de cada etapa do trabalho. Esta característica para o trabalho é importante devido a aplicação do projeto.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Biofilme Microbiano

O biofilme é um dos responsáveis pelas infecções que causam PAV nos pacientes com ventilação mecânica. O biofilme é de 1,000 to 1,500 vezes mais resistente a antibióticos do que as células planctônicas, a forma de vida livre bacteriana. É um filme composto por vários micro-organismos anexadas e aderidas a uma superfície recoberto por uma matriz polimérica extracelular composta por proteínas exopolissacarídeos, DNA(4-5) e fatores de expressão. A matriz é altamente hidratada e quimicamente complexa, serve como facilitador de armazenamento de nutrientes e pode aprisionar outros micro-organismos e materiais não celulares.(7)

A formação do biofilme ocorre em 4 etapas. Inicialmente as células se anexam reversivelmente em uma superfície que pode ocorrer através do movimento de líquidos transportando bactérias, ou pelo movimento ativo de células móveis ou pelas interações físicas e eletrostáticas entre a parede celular bacteriana e o substrato.(16-17) A superfície de anexação é escolhida pela sua capacidade de adsorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos, além de conferir proteção para as células se anexarem e formarem o biofilme.(2,18) esta estabilidade é gerada pelo tubo devido ao fato de não haver movimento no tubo, não há alterações bruscas na temperatura e variação de pH neste ambiente, sendo propício para o micr-organismo se instalar. Após o micro-organismo se anexar na superfície, o processo começa a se tornar irreversível devido a produção da matriz EPS com a estimulação de proteínas sensoriais da parede celular da bactéria.(19) As células planctônicas se multiplicam e crescem formando microcolônias que são aprisionadas e o biofilme se forma.(20) A arquitetura do biofilme é complexa e heterogênea ao longo da superfície com as microcolônias intercaladas com EPS com canais onde passa água carregando nutrientes e resíduos.(12-13) Há hipóteses que forças de cisalhamento turbulento podem ser responsáveis pela desanexação das células e transferi-las ao longo da superfície ou para outras superfícies para que se anexam. Bactérias gram positivas e gram negativas podem desenvolver um biofilme. As bactérias podem se diferir através da composição da parede celular. Uma bactéria gram positiva apresenta uma maior quantidade de peptideoglicano em sua estrutura, enquanto a gram negativa apresenta uma camada mais fina de peptideoglicano, porém apresenta uma membrana externa que confere uma maior resistência deste tipo de bactéria a agentes externos. Esse nome, gram, foi devido ao primeiro pesquisador que coloriu as bactérias e as diferenciou. As gram positivas, ao serem coradas com violeta de genciana absorvem este corante e apresentam uma coloração roxa. As gram negativas não absorvem este corante devido a diferença na estrutura da parede celular e permanecem em uma coloração mais rosada. (22)

O biofilme é uma forma de estratégia microbiana que funciona como uma forma de resistência contra agentes externos como falta de nutrientes, pH, temperatura e agentes antimicrobianos, facilitando assim as interações com o organismo hospedeiro e o comportamento e interações entre as comunidades bacterianas. Biofilmes são altamente resistentes a exposição a luz ultravioleta, toxicidade de metais, ácidos, fagocitose e

desidratação.(14-15) As células podem se aderir em qualquer superfície que proporcione estabilidade e proteção, assim como equipamentos e materiais médicos. A inativação das células do biofilme por antibióticos é um grande desafio. Além da EPS funcionar como uma barreira para a entrada de substâncias tóxicas as células, as bactérias podem desenvolver resistência contra os agentes antimicrobianos.

Biofilmes podem se desenvolver não somente em equipamentos médicos, mas também em sistemas de distribuição de água, ar condicionado e feridas. Portadores de prótese de voz artificial, prótese de articulações, válvulas cardíacas prostéticas, marcapasso, tubos endotraqueais, cateteres urinários, de diálise e venosos, lentes de contato e implantes para disfunção erétil são materiais propensos a desenvolverem biofilme em suas superfícies. Em tanques de armazenamento de água quente, chuveiros, piscinas hidroterápicas, sistemas água de diálise, umidificadores (25) são os locais propensos a formar biofilme, e sua contaminação pode ser por inalação, ingestão ou aerossolização desta água contaminada. O endoscópio é uma fonte de contaminação principalmente por contaminação cruzada entre pacientes(17-18) e a dificuldade de descontaminação do material é devido a sua sensibilidade e complexidade, além do biofilme não ser facilmente removido por detergentes e agentes antimicrobianos.(28) Biofilmes em feridas se desenvolvem pela imunidade comprometida do hospedeiro, e o tempo de formação do biofilme pode levar poucas horas.(29) A matriz EPS confere resistência bacteriana a antibióticos, uma vez penetrada, a inativação se torna mais fácil.

1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (do grego *staphylo*= cacho, *aureus*= relacionada a pigmento) é uma bactéria gram positiva, esférica com 0,5-1,5 μ m de diâmetro, não esporulada, aeróbia ou anaeróbia facultativa, quimiorganotrófica com metabolismo respiratório e fermentativo, e a coloração da colônia pode variar de branco, creme, amarelo e laranja. Esta espécie é caracterizada por formar biofilme, sendo uma das principais causadoras de PAV. Além de poder causar pneumonia também pode causar doenças como gastroenterite, impetigo, foliculite, síndrome do choque tóxico, osteomielite e endocardite que tem alto potencial de mortalidade.(21-22) Essas espécies bacterianas representam um grande risco de saúde devido a possibilidade de desenvolver um biofilme, seus fatores de virulência. Estes fatores de virulência são: proteína A; cápsula; enterotoxinas; toxina alfa, beta, esfoliativa e da síndrome do choque; ácido teicóico e outras. A proteína A se encontra na parede celular bacteriana e é um dos fatores mais graves devido a sua habilidade em interagir e se ligar a imunoglobinas, além de poder se ligar a proteínas de mamíferos e inibir a opsonização e fagocitose. (32) A toxina da síndrome do choque é uma enterotoxina que pode ligar-se diretamente a uma região das células T, estimulando-as, o que leva a uma proliferação exagerada e a liberação de citocinas. As quais, induzem também a uma superprodução de linfocinas levando a uma lesão tecidual. As toxinas liberam fator de necrose tumoral e citocinas que induzem o choque cardiovascular.(31) A toxina alfa lisa hemácias de algumas espécies animais. A toxina beta é uma enzima que age sinergicamente com outras toxinas e enzimas destruidoras da membrana celular, permitindo a degradação tecidual.(33) O ácido teicóico protege os micro-organismos da opsonização e reduz os componentes necessários do hospedeiro a interação com as bactérias.

1.2.1 *Biofilme em Dispositivos médicos*

Os dispositivos médicos vêm se reinventando e se aperfeiçoando. Entretanto, estes possuem a combinação de um meio líquido nutritivo, a presença de micro-organismos e a superfície, muitas vezes porosa, de polímeros. A intubação endotraqueal é uma prática comum no ambiente hospitalar e pode ocorrer em situações variadas como: vias aéreas obstruídas; hipoventilação; em estado de inconsciência (coma); cirurgia sob anestesia geral; choque pneumático; relaxamento muscular em cirurgias; politraumatismo; falência respiratória; necessidade de respiração com pressão positiva; intermitente como no caso de patologias no sistema respiratório e cirurgia cardiotorácica, parada cardiorrespiratória; insuficiência respiratória; controle da ventilação; administração de medicamentos indicados para parada cardiorrespiratória. (34) Porém, a intubação pode apresentar riscos que são nocivos à saúde do paciente como a pressão positiva nos pulmões, instabilidade hemodinâmica que pode prejudicar mais pacientes hipovolêmicos e uma maior probabilidade de frequência de infecções respiratórias pela diminuição dos mecanismos de defesa local pela presença do tubo. (35) Além disso, os pacientes hospitalares já podem apresentar um quadro de imunossupressão com a doença de base. A figura 1 ilustra o TEH e o encaixe realizado do tubo no paciente.

Figura 1- Esquema da introdução do TEH no paciente que precisa da respiração mecânica.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.2.2 *TEH em PAV*

Estas alterações provocadas pelo tubo podem gerar uma maior morbidade, elevados custos relacionados à internação, incluindo gastos hospitalares e de medicamentos, e uma maior mortalidade dos pacientes usuários do tubo. A PAV encontra-se neste contexto médico e apresenta dificuldade de ser tratada devido à gravidade da infecção e da resistência bacteriana a antibióticos podendo assim levar pacientes à morte. Estudos realizados em uma UTI de um hospital universitário em São Paulo mostraram que 69% dos pacientes que apresentavam diagnóstico da infecção, 31% destes pacientes desenvolveram a doença na UTI e 58,5% infecções eram respiratórias. (1) Segundo um estudo conduzido no hospital universitário do Rio de Janeiro que visou verificar a prevalência de PAV em pacientes com ventilação mecânica durante 18 meses foi apresentado que 38,1% dos pacientes desenvolveram PAV. A PAV aumentou o tempo de internação e de permanência da ventilação mecânica nos pacientes. (36) Este tipo de pneumonia traz ao paciente uma maior permanência do uso do tubo e da ventilação mecânica por mais de dez dias devido à imunodepressão, síndrome do desconforto respiratório agudo, sinusite aguda e atelectasia (36) e colapso pulmonar que altera a relação ventilação e perfusão. (37)

Um dos problemas da PAV é a falta de um diagnóstico rápido e eficaz, que ocorre na maioria das vezes em um estado avançado da doença. Tanto o diagnóstico e tratamento errôneo, assim como o diagnóstico tardio podem ser fatais para o paciente. Em um estudo realizado em hospitais brasileiros revelam que a pneumonia atingiu uma proporção de 28,9% dentre as infecções nosocomiais, sendo 50% destas infecções que acometeram pacientes usuários da ventilação mecânica.(36) *S. aureus* esta no ranking das principais bactérias que causam a PAV(38-39), com a maior recorrência nos estudos, entretanto *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*(36), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pneumococci*, *Serratia marcescens* também são causadoras da doença e podem estar presentes nas infecções respiratórias.

A peste negra e a tuberculose na primeira guerra mundial mataram mais de milhões de pessoas em virtude de infecções causadas por bactérias. Com a descoberta da penicilina muitas infecções foram detidas, trazendo avanços significativos no campo microbiológico. Iniciou-se uma nova era, a era dos antibióticos que tem salvado muitas vidas. Existem várias classes de antibióticos, entre elas os que podem atacar a parede celular bacteriana, lisando-a, os que podem atacar os cromossomos e impedir que a célula se multiplique. Entretanto, as bactérias também estão evoluindo e sofrendo mutações, ultrapassando as barreiras destas moléculas, criando resistência aos antibióticos. O alto poder de mutação e recombinação gênica, que pode ser transmitido durante a reprodução bacteriana é uma das causas da resistência bacteriana. O uso abusivo e indiscriminado de antibióticos por automedicação ou má indicação também favorece a resistência de bactérias.(36) Portanto, as bactérias estão se tornando cada vez mais resistentes contra agentes antibióticos.(36) Assim se faz necessário novas opções de terapia ou mesmo para o uso em sinergia com estas.

1.2.3 **Terapia Fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica é considerada como uma reação fotoquímica e tem três fatores atuantes capazes de inativar células e levando-as à morte. Os agentes são moléculas fotossensível, o fotossensibilizador, a luz e o oxigênio presente na célula. A terapia consiste em duas etapas: 1) o fotossensibilizador acumula-se nas células após a administração tópica ou sistêmica; 2) a célula fotossensibilizada é exposta a luz com comprimento de onda que coincide ao espectro de absorção do fotossensibilizador. A ação da luz com a molécula fotossensível desencadeia duas reações diferentes. Primeiramente, ocorre a excitação eletrônica da molécula pela luz e em seguida dois mecanismos reacionais ocorrem a partir do estado excitado.(40–42) A figura 2 esquematiza abaixo ilustra o mecanismo da inativação fotodinâmica:

Figura 2- Ilustração do mecanismo da inativação fotodinâmica, assim como seus produtos formados.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.2.4 Mecanismos de ação

O mecanismo do tipo I é a transferência de elétron entre a molécula fotossensível no estado triplete excitado e os componentes presentes no meio geram radicais livres que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados. Os processos de transferência de elétron tendem a ser muito rápidos porque a sobreposição dos orbitais eletrônicos é máxima durante o processo de formação do complexo excitado. O mecanismo de reação II ocorre quando há transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete com a geração de oxigênio singleto, altamente citotóxico. O oxigênio singleto é a espécie mais citotóxica dos produtos de ambos os mecanismos. É composto por três estados eletronicamente excitados superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental. O tempo de vida do oxigênio singleto depende da natureza do meio onde está inserido. Em água, o tempo de vida é aproximadamente 4 μs e em água deuterada cerca de 70 μs . (42) O tempo de vida do oxigênio singleto, em meios que não possuem ligações C-H e grupos hidroxila em sua estrutura, é maior. Como exemplo o oxigênio singleto em meio com clorofórmio e tetracloreto de carbono, seu tempo de vida é de 250 μs e 30 ms, respectivamente. (42) A causa da diferença entre os tempos de vida é pela possibilidade de transferência de energia eletrônica do oxigênio singleto para alguns estados vibracionais associados a espécies supressoras.(43) Já em sistemas biológicos, o oxigênio singleto tem o tempo de vida muito curto, inferior a 0,04 μs (41,44) e seu raio de ação é menor que 0,02 μm , bem baixo em relação a outros meios.(41,44)

1.2.5 Histórico

A origem da terapia foi no século XX durante um experimento onde foi observado uma fotossensibilização de um paramécio com corante de acridina. Observações feitas durante o experimento mostraram a morte rápida do parasita com a aplicação de luz. Assim, o professor Von Tappeiner descobriu que a presença do oxigênio era fundamental para a ação fotodinâmica. Inicialmente a TFD foi utilizada para tratamento tumoral e as espécies reativas tendem a se difundir nas proximidades do tecido ou célula afetada, resultando assim em uma série de reações bioquímicas gerando danos nestas células, inativando-as.

A primeira geração de fotossensibilizadores eram baseados em derivados de porfirinas.(45,46) Estes derivados vêm sendo substituídos por uma segunda geração de fotossensibilizadores que possuem uma alta absorvidade molar na região do vermelho, para uma melhor resposta fototerapêutica. A segunda geração tem as clorinas e ftalocianinas(34-36), tem se mostrado com alto potencial fotossensibilizador para neoplasias atualmente.(37-38)

A técnica tem sido muito difundida nos países desenvolvidos(3,39-40) ao longo do mundo, principalmente para tratamento de neoplasias. A técnica tem sido autorizada pelos governos do Japão, Holanda, França, Canadá, Estados Unidos. Em 1994 o governo do Japão autorizou o uso do Photofrin, fármaco com fotossensibilizador derivado de porfirina, para tratamento de câncer no esôfago(52) e em 1996 foi a vez da França autorizar o tratamento. Nos Estados Unidos o tratamento paliativo com pacientes com tumores obstruídos e câncer de esôfago parcialmente obstruídos e certos tipos de câncer de pulmão são autorizados. Na França a autorização para tratar câncer de pulmão e esôfago, na Holanda o tratamento de câncer de pulmão obstruído e em estágio inicial e esôfago, câncer gástrico e cervical e no Canadá tratamento de câncer de esôfago, de bexiga, redução de tumores obstruídos e tratamento paliativo de disfagia em pacientes com esôfago completamente ou parcialmente obstruído. Em 2006, no Brasil, a TFD foi aprovada para tratamento para câncer de pele não melanoma.

1.2.6 Aplicações da técnica

Para aplicação, a técnica compõe-se em dois processos: molécula fotossensível se acumula na célula-alvo durante um tempo, chamado tempo de incubação, para que alcance regiões intracelulares de interesse. A aplicação da luz após este tempo gera as reações fotoquímicas necessárias para levar a morte celular. Existe uma agregação maior de moléculas de fotossensibilizadores em células tumorais, não se sabe exatamente o motivo. A hipótese é de que exista uma seletividade entre o fotossensibilizador e as lipoproteínas do plasma, que transporta preferencialmente para células tumorais pela alta taxa metabólica. Estas células possuem um número alto de receptores de lipoproteínas de baixa densidade, resultando em uma elevada demanda de colesterol.(42-43)

O diâmetro atingido pelos fotoprocessos é por volta de 10 a 50 nm.(31-33) Fatores bioquímicos tendem a propagar os efeitos a outros locais, mais distantes. Logo, dependendo do tipo de célula e onde ela se encontra para a ação da terapia é necessário um controle da biodistribuição do fotossensibilizador e como ele é aplicado, tópico ou sistêmico. Locais intracelulares ricos em elétrons tendem a ser alvos mais facilmente modificados. Cadeias laterais de aminoácidos com anel aromático e enxofre, lipídeos insaturados, ligações duplas de esteróides e a guanina são exemplos de regiões facilmente modificadas. O resultado são danos a parede celular, em mitocôndrias e lisossomos, que pode comprometer a integridade celular. Mutações em células atingidas não foram observadas(55), o que significa a segurança para aplicação da terapia e a repetição se necessária.

Embora a primeira observação tida do efeito da terapia tenha sido em um parasita, a TFD tomou um rumo maior na área de neoplasias. Porém, a terapia está expandindo seus

efeitos em células microbióticas, resultando em estudos satisfatórios na inativação microbiana.

O efeito apenas da curcumina e da molécula associada a luz tem sido testado em várias áreas. Inativação fotodinâmica com a curcumina como fotossensibilizador vem sendo muito aplicada para descontaminação bucal, como inativação de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.(56) Devido a baixa estabilidade da curcumina em meios aquosos associações entre a curcumina e estruturas como lipossomos, surfactantes e ciclodextrina são feitas para que a ação fotodinâmica seja otimizada com maior rendimento do FS.(57) Estudos com curcumina associada a ciclodextrina testadas em *E. coli* apresentou uma eficiente inativação destas células gram negativas.(58) trabalho realizado para tratamento de onicomicose com curcumina resultou em ótimos resultados de inativação do fungo dermatófito, leveduras e não dermatófitos.(59)

Não se sabe exatamente o mecanismo de reação que leva as células microbianas a morte, porém estudos estão sendo realizados. Estudos com os micro-organismos *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermis*, *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum* e a *Propionibacterium acnes* são exemplos de foco de estudo da inativação fotodinâmica com azul de metileno, rosa de bengala, fenotiazina e porfirinas com fotossensibilizadores.(60)

Como já descrito não há relatos de resistência bacteriana em relação a terapia, o que ocorre com os antibióticos. Logo, para tratamentos com micro-organismos resistentes a agentes antimicrobianos, a aplicação da terapia é uma alternativa para o controle de infecções. Muitos estudos e aplicações estão sendo feitas contra contaminações por bactérias, fungos, parasitas e larvas. Este trabalho combina a molécula curcumina, corante fotossensível com a luz azul, luz com maior absorção molecular da curcumina, e analisa seus efeitos aplicados em biofilme desenvolvido por *S. aureus* sob o TEH.

1.2.7 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores precisam ter características fundamentais para o sucesso na aplicação da técnica. Entre as principais características de um bom fotossensibilizador estão a pureza química e capacidade da molécula se concentrar na área de interesse, possuindo assim um tempo de vida de longa duração do seu estado tripleto excitado ($T > 500$ ns).(41) Agindo eficientemente com as moléculas próximas e na presença de oxigênio para produção de produtos citotóxicos. Possuem uma alta absorvidade molar na região espectral entre 600 e 1000 nm, conhecida como “janela terapêutica”. Nessa região do espectro as membranas celulares são transparentes à radiação, logo a luz penetra mais no tecido com riscos mínimos de destruição de células e estruturas saudáveis.(31-45)

1.2.7.1 Curcumina

Curcumina, 1,7 bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)- 1,6 heptadieno-3,5 diona é uma molécula natural extraída na planta *Curcuma longa*, conhecida como Açafrão da Terra. De coloração alaranjada é conhecida desde tempos antigos no continente asiático, principalmente na Índia, por ser muito utilizada na culinária para tratamento de feridas e dores. Hoje, a Índia

e China além de outras regiões continuam consumindo teores significativos de curcumina com intuito de recorrer a curcumina como especiaria, complemento nutricional, corante e para propósitos terapêuticos que incluem características anti-inflamatórias, anti-oxidante, anti-coagulante, anti bacteriana(62), antimutagênica(63), anti-cancerígena, anti-reumática(14), antidiabética e anti HIV. Açafrão já era utilizado na medicina tradicional indiana e chinesa desde tempos antigos para inchaços, torções, reumatismo, desordens biliares, coriza, tosse, dores abdominais e sinusite.(64)

A curcumina é composta por três moléculas, a curcumina e os curcuminóides: a demetóxi-curcumina e a bis-demetóxicurcumina. A curcumina é a molécula mais abundante dentre as três, com peso molecular 368,38 mg/mL. Estudos fazem a hipótese de que as 3 moléculas juntas têm um efeito sinérgico terapêutico.(14) Comercialmente, existem duas formas de adquirir a curcumina, natural e sintética. A curcumina natural é extraída da raiz e apresenta a mistura com as 3 moléculas, a curcumina e os curcuminóides, com a curcumina em maior proporção. A curcumina sintética é composta basicamente pela curcumina, com quantidades irrisórias ou quase nula dos curminóides. A extração da curcumina teve início em 1815 quando foi isolada pela primeira vez da raiz porém, até 1970 haviam poucos trabalhos explorando a curcumina.(12) Após esta data as pesquisas *in vitro* e testes pré-clínicos com a molécula começaram a ter um grande avanço. As moléculas dos curcuminóides, a demetoxicurcumina (b) e a bisdemetóxicurcumina (c) tem a seguinte forma estrutural, seguida pela estrutura da curcumina (a):

Figura 3- Estrutura da curcumina e dois curcuminóides.

Fonte: Elaborada pela autora.

A extração da curcumina é feita por uma coluna cromatográfica com solventes polares e apolares. Os solventes orgânicos como os clorados são muito eficientes, porém não são muito utilizados por não serem aceitos na indústria alimentar. Para a etapa de extração, os métodos de pulso ultrassônico e extração assistida por micro-ondas são muito eficientes.(50-51) Temperaturas altas também auxiliam na extração da curcumina, sendo que o intervalo de 60 a 80°C é o ideal.(50-52) A separação da curcumina dos curcuminóides é realizada por colunas de cromatografia por adsorção em gel de sílica usando os solventes diclorometano/ácido acético ou metanol/clorofórmio. A fração de curcumina é purificada no gel de sílica usando clorofórmio/diclorometano e etanol/metanol como eluentes. HPLC (High

performance liquid chromatography) é muito empregado para detecção e estimativa da quantidade de curcumina presente na amostra com detectores no comprimento de onda de 350-450 nm, região espectral absorvida pela curcumina.(12)

A curcumina é uma molécula levemente ácida, solúvel em solventes orgânicos, em solventes extremamente ácidos(63), DMSO, metanol, etanol e isopropanol(12) e acetona. Possui duas formas tautoméricas, keto e enol, dependendo da temperatura e da característica do solvente, prótico ou aprótico, onde a molécula está inserida.(47-50) A forma enol é predominante em meios alcalinos e a forma keto predominante em meio ácido ou neutro, e está relacionada com as atividades terapêuticas da curcumina. (63) O pH apresenta uma alta influência na solubilidade da curcumina. Em meios básicos, a taxa de degradação da curcumina é rápida, se decompondo em menos de 15 minutos. Em meio ácido, a molécula é pouco mais estável por ser levemente ácida (67) e não ocasionar uma degradação tão rápida quanto em meio básico.(14)

Por ser uma molécula hidrofóbica, possui baixa biodisponibilidade celular e baixa permeabilidade intestinal.(46,54-55) Muitos estudos tentam contornar estas características hidrofóbicas utilizando detergentes ou outras moléculas anfifílicas que podem interagir com a curcumina em meio hidrofílico(62) como nanopartículas, fosfolipídeos, micelas poliméricas, surfactantes, ciclodextrinas, hidrogel, lipossomos.(67) Esses agentes auxiliares na diluição de curcumina são utilizados principalmente em estudos clínicos, onde é importante a solubilidade do composto em água para o aumento da biodisponibilidade da molécula e assim o seu efeito terapêutico seja alcançado. A degradação da curcumina pode ocorrer rapidamente por hidrólise logo, estas formulações podem auxiliar na estabilidade e reduzir a taxa de degradação da molécula solubilizada.(67) Os produtos da degradação da curcumina são ácido ferúlico, vanilina e acetona, e surgem na presença de íons hidroxila, íon cloro e água.(12) Pesquisas mais recentes estão propondo outros produtos de degradação em maior quantidade em relação aos produtos da degradação descritos.(14) As biotransformações da curcumina dentro dos organismos são várias e pode se acumular em órgãos diferentes e sofrer reações diferentes em cada um.(63)

Características antioxidantes da molécula se deve ao grupo dicetona em sua estrutura(51-56) pelo mecanismo de inibição de radicais superóxidos, óxido de nítrico e peróxido de hidrogênio, além de realçar a atividade de enzimas anti-oxidativas como catalase, dismutase superóxida, peroxidases e oxidases.(47-57) Processos inflamatórios são causados por stress oxidativo e pelo desencadeamento de reações enzimáticas, os quais a curcumina pode intervir e reduzir a atividade enzimática e capturar as espécies reativas de oxigênio. (55-58)

Devido às suas propriedades anti-oxidativas, anti-inflamatória e efeitos anti-fibrogênicos, a curcumina tem uma ação hepato-protetiva, protegendo o fígado contra inflamações e oxidações. Estudos mostram que a curcumina diminui a atividade de aminotransferase (enzima liberada quando ocorre danos no hepatócito, aumentando a permeabilidade da membrana e aparecimento de hepatopatias agudas) e aumentar a anti-oxidação mitocondrial.(63) Atividade anti-tumoral também está associada as cadeias de reação anti-oxidativas e antiinflamatórias(73) e a curcumina pode ser eficiente no tratamento. Efeitos em específicos genes pode prevenir a promoção e progressão da doença.(47-60)

Estudos associam o efeito da curcumina a ancogênese, invasão, crescimento do tumor, regulação do ciclo celular, apoptose e expressão oncogênica.(47-61) Na área microbiológica, a curcumina tem sido muito testada contra fungos como *Candida* e *Trycoftum rubrum*, inúmeras bactérias patógenas como *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus mutans*, além de *Aedes Aegypt*(76), *Schistosomiasis mansoni* e *Trypanossoma cruzi*. Assim, a molécula utilizada na TFD é promissora e acessível e viabiliza o tratamento de infecções respiratórias associadas ao biofilme formado no tubo.

1.2.8 Fontes de luz

As fontes de luz mais utilizadas são coerentes e incoerentes como lasers, diodos e lâmpada de amplo espectro.(47) O laser, fonte coerente de luz, tem o comprimento de onda específico com pequeno campo de aplicação, correspondente ao pico de absorção do fotossensibilizador, apresentando capacidade de emissão de luz monocromática e colimada, com precisão de foco e permite o tratamento em lesões pequenas em um curto intervalo de tempo. As fontes não coerentes são os diodos e lâmpadas que não são específicas tanto quanto um laser em relação ao comprimento de onda, operando em um intervalo na região do espectro visível, apresentando a vantagem de serem de baixo custo e práticas, além de possuir um campo grande de irradiação, permitindo uma ampliação para iluminação durante o tratamento. (31-35) Estudos estão sendo realizados para comparar se o efeito entre uma fonte coerente e incoerente resulta em diferentes respostas microbianas. Um trabalho de revisão bibliográfica sugere que o tipo de fotossensibilizador empregado é mais influente e determinantes nos resultados do que o tipo de fonte usada. O mesmo estudo sugere que a variação entre a bactéria ser gram positiva e negativa pode influenciar também nos resultados. A conclusão do trabalho sugere que gram positivas tem uma maior redução quando iluminadas com fontes incoerentes, como lâmpadas. (60)

CAPÍTULO 2 FORMULAÇÕES DE CURCUMINA

2.1 INTRODUÇÃO

Neste primeiro capítulo será descrito o estudo sobre as diferentes formulações manipuladas e testadas para o uso de moléculas fotossensíveis aplicadas em três tipos de superfícies: sonda de PVC siliconada; tubo endotraqueal usado em animal (TEA) e o usado em humano (TEH). Os FSs utilizados nesta etapa foram a curcumina e o Photogem[®].

As formulações manipuladas foram: um filme de curcumina natural e sintética; um filme de Photogem[®]; hidrogel manipulado com curcumina natural e sintética, curcumina com Tween 80, curcumina com plurônio, membrana (nanoskin) embebida em curcumina.

O propósito das formulações fotossensíveis seria a liberação aos poucos das moléculas em contato com a superfície de ativação. Quando uma quantidade suficiente for liberada para agir com o biofilme, a iluminação é adicionada ao processo, inativando as células microbianas. A curcumina, já bem descrita na revisão bibliográfica, teve um foco maior nas formulações. Usar a curcumina natural e sintética teve intuito de verificar se ambas teriam a mesma ação nas colônias bacterianas presentes em biofilmes.

O Photogem[®] é um fotossensibilizador de primeira geração derivado de porfirina e uma das primeiras moléculas testadas em TFD com inúmeras aplicações, entre elas, o uso para tratamento clínico em células tumorais. O filme de Photogem[®] foi testado no intuito de comparar a mesma formulação, porém com moléculas fotossensíveis diferentes.

A membrana Nanoskin[®] (São Carlos, São Paulo, Brasil) simula uma pele artificial, sendo maleável e desenvolvida através do chá verde por bactérias. Esta membrana foi exposta uma solução de curcumina e colocada em contato com o biofilme já desenvolvido no tubo, para analisar os efeitos tóxicos nessas células.

Com o uso do hidrogel, o intuito foi a liberação controlada da molécula fotossensibilizadora. Outras duas formulações foram preparadas com surfactantes, uma com Tween 80 e outra com Plurônio para melhorar a solubilidade da curcumina em meios aquosos. O surfactante seria uma molécula ideal por favorecer duas interações diferentes por ser uma molécula anfifílica, uma ligação com cadeia polar e uma com uma cadeia apolar. Acreditava-se que tanto o Tween quanto o Plurônio fariam uma ligação com a curcumina na parte apolar e se ligar com moléculas hidrofílicas na parte polar, dissolvendo assim a curcumina em meios aquosos. A iluminação dos grupos TFD com curcumina em sua formulação ocorreram na Biotable[®], com 35 mW/cm². (Protótipo desenvolvido no LAT/IFSC). O Photogen[®] foi irradiado por um laser de diodo em 635 nm com 35 mW/cm².

2.2 OBJETIVO

2.2.1 Objetivo Geral:

Testar a eficiência de formulações de fotossensibilizadores e a desestruturação de biofilme e a inativação dos micro-organismos presentes em TEH e em sonda siliconada.

2.2.2 Objetivos Específicos:

- Testar o efeito antimicrobiano de TFD por meio de formulações com tipos e
- concentrações diferentes de curcumina;
- Testar formulações com Photogem[®];
- Testar a formação de biofilme a partir de duas bactérias bacterianas em diferentes superfícies de materiais.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Micro-organismo

2.3.1.1 Pré inóculo

Os micro-organismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). O inóculo foi preparado em Falcons de 15 mL em meio de cultura de crescimento, em proporção de 1:9 (bactéria/meio de cultura). O meio de cultura líquido usado para o crescimento do micro-organismo foi Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi[®], Brasil). O tempo de incubação do pré-inóculo variou de 15 a 18 horas em uma Estufa rotativa (Eppendorf Model 5702) a 37°C a 1400 rpm. A concentração inicial com o pré-inóculo preparado é de 1×10^9 ufc/mL.

2.3.1.2 Formação do Biofilme

Para a formação do biofilme (Figura 1) foi realizado as seguintes etapas:

- O micro-organismo foi separado do meio de cultura por centrifugação (1500 rpm e 15 min.);
- Foram realizadas duas sucessivas lavagens com o tampão fosfato PBS (*Phosphate Buffered Saline*) por centrifugação;
- O TEH e a sonda, ambos estéreis, foram padronizados e cortados em um centímetro de comprimento, dentro de um ambiente estéril (Camera de Fluxo, Airstream, Escoclass II bsc) e os pedaços foram inseridos nos poços das placas de 24 poços. Junto aos poços, com os tubos cortados, adicionou-se 900 µL do caldo líquido e 100 µL do inóculo. A solução foi homogeneizada 6 vezes com uma pipeta de 1000 µL em cada poço;
- Todos os ensaios *in vitro* foram realizados no escuro para evitar a decomposição do fotossensibilizador antes do experimento ser iniciado.

Os biofilmes formados foram caracterizados por contagem de colônias bacterianas.

A Figura 4 ilustra a parte inicial dos experimentos para o desenvolvimento do biofilme no TEH ou na sonda.

Figura 4 - Esquema de lavagens do pré-inóculo para a formação do biofilme no TE. Após o pré-inóculo estar pronto, o meio de cultura é retitado e adiciona-se a mesma quantidade de PBS para lavagem de células. A lavagem é feita duas vezes e 100 μL desta solução é adicionada em cada poço da placa de 24 poços, junto a 900 μL de meio de cultura líquido e o pedaço de tubo cortado. Após o biofilme formado o tubo é lavado com PBS 2x e colocado em um tubo Falcon com 10 mL de PBS, agitado para retirar as células anexadas e inicia-se as diluições seriadas que serão plaqueadas em placas de Petri.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.2 Fonte de luz

A iluminação dos experimentos foi realizada com uma fonte de luz composta por 24 LED's desenvolvida pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – LAT/USP (Instituto de física de São Carlos, IFSC/USP), intitulado *Biotable*. A *Biotable* utilizada nos experimentos com curcumina emite radiação em 450 nm, comprimento de onda escolhido devido a escolha do FS, curcumina e projetada para uma irradiação uniforme e contínua em placa de 24 poços, com irradiância de 35 mW/cm^2 .

A iluminação para ativar o Photogem[®] foi uma fibra difusora acoplada ao laser de diodo com emissão em 635 nm, comprimento de onda escolhido de acordo com o FS usado, com uma irradiância de 35 mW/cm^2 de forma contínua.

A medida de irradiação foi feita com auxílio de um potenciômetro Fieldmaster[™] (Coherent, USA), com coletor de raio igual a 0,4 cm, totalizando uma área de 0,5 cm^2 . Para o cálculo da irradiação em cm^2 é usada a equação:

$$I = \frac{P}{A} \quad (01)$$

Onde I= Irradiância do Potenciômetro; P= Potência medida pelo potenciômetro e A= área do potenciômetro.

Para o cálculo do tempo necessário de iluminação para alcançar a dose de energia necessária segue a seguinte equação:

$$T = \frac{D}{I} \quad (02)$$

Onde, T= tempo de iluminação, D= dose desejada de energia e I é a irradiância calculada da *Biotable*.

Durante as iluminações as amostras eram isoladas com papel alumínio para evitar qualquer influência externa que possa vir a ocorrer. A Figura 5 ilustra a imagem de uma Biotable emitindo em 450 nm.

Figura 5 - Ilustração de uma Biotable emitindo em 450 nm.

Fonte: Adaptada de SILVA et al.(77)

2.3.3 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

UFC, Unidades Formadoras de Colônia, é termo utilizado para quantificar o número de bactérias presentes em uma solução. Foi realizado a contagem do número de colônias individuais nas placas de Petri após 24 h a 37°C a partir da realização do experimento. Com a contagem das colônias em diluição específica (Figura 6), a média de cada grupo foi feita pelo cálculo de UFC/mL, realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{ufc}{mL} = \frac{n^{\circ}decolônias \times n^{\circ}dediluições}{Volume} \quad (03)$$

Os valores de ufc/mL são altos por testar em biofilmes, então foram apresentados em % de células vivas e não por log como é utilizada quando se trabalha com células planctônicas.

Figura 6 - Metodologia de lavagem do TEH e diluições feitas para a contagem de placas.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.4 Filme de FS

2.3.4.1. *Preparação do Filme de Curcumina Natural e Sintética.*

A preparação do filme de curcumina, tanto natural, quanto sintética foram realizados seguindo o mesmo protocolo, com a diferença do tipo e concentração de cada curcumina. Os compostos para a formação do filme foram a pectina, glicerina e água destilada e para isso foi seguido o protocolo:

Pesou-se 0,5 gramas de pectina para um volume total de 10 mL de solução;

Adicionou-se a pectina em água destilada sob agitação mecânica;

Na solução homogeneizada foi adicionado 1 grama de glicerina com curcumina. A quantidade de curcumina variou de acordo com a concentração escolhida.

O filme de curcumina natural foi feito a concentração de 0,75 mg/mL. Para curcumina sintética foram testadas as concentrações de 0,75; 1,25 e 1,5 mg/mL.

2.3.4.2 *Preparação de Filme de Photogem[®]*

O mesmo procedimento feito com o filme de curcumina foi realizado com o filme de Photogem[®] na concentração de 0,03 mg/mL. A concentração da porfirina foi menor comparada a concentração da curcumina devido a molécula ser potencialmente mais citotóxica. A iluminação foi através de uma fibra difusora acoplada a um Laser de Diodo (Quantum Tech, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda em 635 nm. A fibra foi inserida internamente ao tubo.

2.3.5 Nanoskin[®]

Dois pedaços (1x2 cm) de Nanoskin[®] foram cortados em um tamanho suficiente para aderir dentro e fora do tubo. O tubo foi cortado longitudinalmente para que a nanoskin fosse aderida melhor nas paredes internas do tubo. A Nanoskin[®] foi embebida em uma solução de curcumina de 0,5 mg/mL durante 1 minuto. O tempo de 1 minuto foi escolhido porque além de ser suficiente para a pele absorver a curcumina, em tempos maiores a mesma começava a se desfazer. A pele foi aderida ao tubo sob um biofilme já desenvolvido durante 7 dias. A iluminação feita com a Biotable de 450 nm com 35 mW/cm² totalizando 15 J/cm². Os grupos controle, controle escuro e TFD foram feitos para este experimento. Os experimentos foram feitos em triplicata.

2.3.6 Solução de Curcumina Natural em Hidrogel

Os compostos e as proporções da solução do tipo hidrogel foram 1% de carboximetil celulose (CMC), 0,5% de Lauril, 10 mL de água e 1% de curcumina. O carboximetil é um polímero derivado da celulose e hidrossolúvel e é a cadeia que dará a forma ao hidrogel. Lauril é um surfactante com função de interagir o polímero, CMC, solúvel em água para interagir com a curcumina que é uma molécula hidrofóbica.

O CMC, lauril e a água foram adicionados em um béquer em agitação constante até a completa dissolução dos componentes. Em outro béquer, a curcumina natural foi triturada com um bastão para dissolver todos os grânulos. Uma solução de 2% de lauril foi homogeneizada em água junto com a curcumina preparada anteriormente e realizada a completa homogeneização dos compostos.

2.3.7 Solução de Curcumina Sintética em Tween 80

Para o uso de curcumina sempre foi preparada uma solução estoque. A solução estoque teve as proporções de 1,5% de curcumina sintética, 25% de DMSO e 25% de Tween 80, diluída para 0,75; 1,25 e 5 mg/mL. O tempo de incubação foi de 2 h e a iluminação feita com a Biotable utilizando duas doses de luz, 15 e 50 J/cm².

Em um segundo experimento foi um teste de solubilidade e toxicidade do Tween 80 em curcumina e água. Foram feitas três soluções com concentrações diferentes de Tween 80 (Tabela 1) usando a mesma concentração de curcumina, de 0,75 mg/mL. As soluções foram preparadas diretamente para o uso, sem a solução estoque. Concentrações de 15, 20 e 25% de Tween 80 foram as escolhidas para o teste. Cada solução tinha sua concentração específica de Tween, dissolvido com 0,075% de curcumina sintética em meio com água. O tempo de incubação foi de 1 hora e a iluminação foi feita com a Biotable em 450 nm, com dose total de energia igual a 50 J/cm². Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com biofilme formado durante 24h. A Tabela 1 descreve todos os parâmetros variados e testados durante os experimentos realizados com Tween 80 e curcumina.

Tabela 1 - Descrição dos dados nos experimentos variando o Tween e a concentração da curcumina.

Concentração Tween 80 (%)	Concentração Curcumina (mg/mL)	Dose de Luz (J/cm ²)
0,75	0,75	50
1,0	0,75	50
1,25	1,25	15
	5	

Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.8 Solução de Curcumina Sintética com Plurônio®

A solução de Plurônio® e curcumina foi realizada com a adição de carbopol a 0,1%; 0,05% de glicerina, dois conservantes (0,1% mL de Nipagin® (metilparabeno) e 0,02 mL de Nipazol® (propilparabeno) e o volume de 10,0085 mL de solução foi completo com água destilada. O Nipagin® e o Nipazol® são utilizados como conservantes. A formulação é feita em duas etapas: na primeira etapa é a mistura de 15% de plurônio® com Carbopol em água; na segunda etapa adiciona-se a glicerina com Nipagin® e Nipazol®. Ambas as soluções são homogeneizadas separadamente e colocadas juntas com a adição da curcumina.

2.3.9 Inativação Fotodinâmica

Todos os experimentos foram realizados dentro de um Fluxo Laminar (Airstream – Escoclass II bsc) para que nenhum tipo de contaminação ocorresse. Os testes de inativação do biofilme microbiano apresentaram dois grupos principais: grupo controle e grupo teste. O grupo controle foi subdividido em três subgrupos:

- Controle (biofilme microbiano formado no material);
- Luz (biofilme microbiano submetido a luz);
- Escuro (biofilme microbiano submetido somente ao fotossensibilizador em formulação)

O grupo teste foi o grupo que recebeu o FS e a luz, simultaneamente.

Para o início dos experimentos cada pedaço de tubo com 0,5 cm² de área com biofilme formado foi lavado 10 vezes com 1 mL de PBS em uma placa de 24 poços para que todas as células não aderidas fossem removidas. Os tubos foram preparados por grupos. A variância dos experimentos foi o tempo de incubação, o tipo e a concentração do fotossensibilizador em diferentes formulações; tipo de iluminação, irradiância e dose total de energia.

Nos testes com o filme, o mesmo foi umidificado com água destilada antes do tempo de incubação para uma melhor adesão do filme ao tubo. Após o crescimento do biofilme os materiais foram colocados separadamente em Falcons com 2 mL de PBS e agitado por 2 minutos por um agitador mecânico (Gehaka AV-02) para que o máximo de células do biofilme se desprendesse do tubo. O tubo foi retirado do falcon (diluição 0) e iniciam-se as diluições, de zero a três. As diluições foram feitas em eppendorfs com 900 µL de PBS em cada. Da diluição zero foi retirado 100 µL do volume total e colocado em um eppendorf com 900 µL. O processo foi feito mais 4 ou 5 vezes até alcançar a quarta e quinta diluição. Um volume de 25 µL é retirado de cada eppendorf e colocado em uma parte de quatro de placas de Petri devidamente divididas em 4 partes iguais. A Figura 7 e 8 ilustram os procedimentos de interação entre o tubo, o filme e as soluções de surfactantes durante o tempo de incubação e a irradiação realizada.

Figura 7 - Esquema da TFD feita com filme ou a Nanoskin[®] com curcumina. O tubo foi envolto pelo filme ou pela pele, dentro e fora durante o tempo de incubação. A iluminação veio a seguir. Os experimentos com filme de Photogem[®] e seguiu-se o mesmo protocolo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8- Esquema da TFD realizada com as soluções dos surfactantes aplicada sob o tubo com biofilme formado. Após o tempo de incubação os tubos testados foram iluminados na biotable.

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 2 ilustra os parâmetros dos experimentos testes com filme de curcumina natural em biofilmes de *S. aureus* e *E.coli* desenvolvidos em superfícies sólidas.

Tabela 2 - Tabela com os parametros correspondentes aos experimentos referentes ao Capítulo 1. O tipo de curcumina e de tubo usado, tempo de biofilme formado e o de incubação do FS, concentração do FS, potência e dose de luz são os parâmetros descritos. Todos os experimentos foram irradiados com a Biotable em 450 nm, com irradiância de 35 mW/cm².

Tipo tubo	de Tipo curcumina usada	de Tempo Formação Biofilme (dia)	[Filme curcumina] (g/mL)	Tempo Incubação (min)	Dose luz (J/cm ²)
SS	Curcumina natural	7			
		3	0,75	50	15
		4			
		7			
TEA		3	0,75	50	15
		4			
TEH	Curcumina sintética		0,75		
		1	1,25	120	50
			5		

Fonte: Elaborada pela autora.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Filme de FS

2.4.1.1 Filme de Curcumina Natural

As Figuras 9, 10 e 11 mostram os resultados obtidos com filme de curcumina natural com a concentração de 0,75 mg/mL e receberam uma iluminação durante 7min14s, totalizando 15 J/cm² pela Biotable em 450 nm. A diferença entre os experimentos foi o tempo de desenvolvimento dos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* em superfícies de materiais diferentes. Na Figura 5 o tratamento foi feito com biofilme formado em 7 dias. Na Figura 6 em 4 dias e Figura 7 em 3 dias.

Figura 9 – Quantidade de células vivas dos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* desenvolvidos em SS durante 7 dias tratado com filme de curcumina natural com concentração de 0,75 mg/mL durante 30 minutos e iluminado pela Biotable de 450 nm com irradiância de 35 mW/cm² totalizando 15 J/ cm². N=9 em cada grupo descrito. *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

O biofilme com 7 dias de formação parece estar mais susceptível a influencia externa, como a TFD. Houve uma grande queda de células vivas de *S. aureus* com uma baixa dose de energia. A bactéria gram negativa, já neste experimento, se mostrou mais resistente a técnica, com uma grande porcentagem de suas células sobreviventes com a aplicação da técnica neste tipo de sonda. As células gram negativas apresentam uma composição diferente em sua membrana, contando com uma proteção maior devido a uma membrana mais resistente em comparação com a gram positiva.(78) Além da dificuldade do FS ultrapassar sua membrana, a matriz do biofilme de *E.coli* pode ser mais resistente com 7 dias de formação em comparação com a matriz do *S. aureus* neste tempo de formação do biofilme.

Um estudo analisou os anexos celulares da gram negativa *E. coli*, como o flagelo e o pili. Estes anexos auxiliam na dispersão e colonização desta bactéria em uma superfície, alcançando uma maior área de contaminação. (79) Um estudo realizado sobre o crescimento

de biofilme de *S. aureus* e sua resistência a alguns químicos, demonstrou o desenvolvimento de um biofilme denso, com um grande volume na camada do biofilme. Esta densidade de células não possibilitou a quantificação das células totais do biofilme. (80) Logo, pode se propor que o biofilme da *E. coli* pode afetar uma maior área, porém possuir uma menor densidade de células em uma mesma área analisada. Enquanto isso, as células de *S. aureus* por não possuírem anexos celulares, como cílios e flagelos, podem não atingir áreas tão extensas quanto a células de *E. coli*, porém desenvolve um biofilme mais denso e complexo, sendo mais resistente para a inativação, quando comparado com o biofilme da *E. coli*.

Figura 10 - Quantidade de células vivas dos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* desenvolvidos em SS e TEA durante 4 dias tratado com filme de curcumina natural com concentração de 0,75 mg/mL durante 30 minutos e iluminados pela Biotable de 450 nm com irradiância de 35 mW/cm² totalizando 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Quantidade de células vivas dos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* desenvolvidos em SS e TEA durante 3 dias tratado com filme de curcumina natural com concentração de 0,75 mg/mL durante 30 minutos e iluminado pela Biotable de 450 nm com irradiância de 35 mW/cm² totalizando 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto maior o tempo de formação do biofilme de *E. coli*, mais resistente este filme parece ficar quando em contato com a superfície dos plásticos estudados em comparação com a *S. aureus*. Já a bactéria gram positiva parece ter um comportamento diferente, quanto o menor tempo de formação do biofilme, mais resistente ele parece ser. Esta hipótese foi tirada observando a diferença dos tempos de 3 e 4 dias, em relação a 7 dias de formação do biofilme. A matriz que envolve as células do biofilme pode estar melhor estruturada e as células mais resistentes com um tempo menor de biofilme é uma hipótese feita. Após um tempo maior, como 7 dias, a matriz pode estar mais susceptível e vulnerável a agentes externos, podendo sofrer os efeitos da TFD com maior intensidade.

A superfície dos tubos também podem ser fatores influenciadores na dinâmica do biofilme como na anexação das células e a manutenção da sua estrutura. Em tempos intermediários de 3 e 4 dias a bactéria *S. aureus* sofreu uma inibição maior na superfície da SS do que durante o tempo de 7 dias. Já a *E. coli* teve uma redução celular maior na superfície do TEA. Embora ambos serem todos compostos por polímeros sintéticos de mesma origem, a SS foi tratada com silicone, enquanto o TEA é composto em sua maioria por Policloreto de Vinila – PVC. Esta diferença de composição molecular pode gerar uma diferença na dinâmica de aderência das células gram positivas e negativas em ambos os tubos, levando a comportamentos diversos.

Os estudos com *E. coli* foram realizados devido a esta bactéria também ser causadora de infecções e formação de biofilme na área médico-hospitalar, principalmente em infecções no trato urinário através dos cateteres instalados.(81)

2.4.1.2 Filme de Curcumina Sintética

Os resultados do filme de CS foi comparado com os resultados do filme de CN. O tempo de incubação para o filme de CS foi 2 horas. O tempo de incubação foi maior que o tempo usado nos testes com a CN para que a terapia fosse otimizada. O tempo de 30 minutos não foi suficiente para a completa inativação celular de acordo com as Figuras 5, 6 e 7. Logo, o tempo foi extrapolado para ser suficiente para que o FS penetrasse mais na estrutura o biofilme. O tempo de 2 horas foi escolhido por ter sido estudado anteriormente na interação curcumina e biofilme de *S. aureus* em solução, neste mesmo trabalho (resultados mostrados no capítulo 2). Os testes iniciais da interação curcumina natural e biofilme, foram testadas as concentrações baixas e doses baixas de energia também. Os testes com a curcumina sintética tentaram otimizar a terapia testando tempos e concentrações maiores do que as já testadas. Logo, as concentrações escolhidas da curcumina sintética Sigma® (CSS) foram 3 concentrações de 0,75; 1,25 e 5 mg/mL e irradiadas pelas doses de luz iguais a 15 e 50 J/cm². A fonte de luz foi Biotable®, com uma irradiância de 40 mW/cm² e comprimento de onda de 450 nm.

Os gráficos construídos na Figura 12 descreve os resultados do tudo estéril tratado com filme de CSS e formação do biofilme após este tratamento.

Figura 12 - Quantidade de células vivas dos TEH tratado com filme CSS nas concentrações de 0,75; 1,25 e 5 mg/mL e desenvolvido o biofilme de *S. aureus* no PVC tratado durante 24 horas. Dose de luz foi de 15 e 50 J/cm² com potência de 40 mW/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 13 mostra os resultados com tratamento do biofilme no tubo com filme de CSS durante 2h e grupos teste iluminados com Biotable® em 450 nm totalizando 15 e 50 J/cm².

Figura 13 - Quantidade de células vivas dos biofilmes de *S. aureus* desenvolvidos no TEH para adultos durante 24 horas tratado com filme de CSS nas concentrações de 1,25 e 5 mg/mL com 2h de incubação nas doses de luz 15 e 50 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando os gráficos da terapia utilizando o filme de curcumina natural e sintética, observou-se uma diferença significativa nos grupos TFD entre os experimentos. O uso do filme de curcumina sintética das duas formas não tiveram resultados significativos de inativação bacteriana como esperado, além de diferirem os resultados da CN.

Uma possível explicação para o resultado é a estrutura molecular de ambas curcuminas. A curcumina dita natural é composta pela curcumina e os curcuminóides. Os curcuminóides, pela sua estrutura molecular são menos solúveis em água em relação a molécula de curcumina(82) e a CS é composta somente pela molécula de curcumina.

Os compostos da formulação dos filmes são hidrofílicos, porém com cadeias de carbonos em sua composição. Na interação com as curcuminas, os compostos como a glicerina e a pectina podem ter interagido melhor com os curcuminóides do que com a curcumina, dissolvendo estes compostos mais homogeneamente e disponibilizando assim melhor o FS. Essa biodisponibilidade pode aumentar a eficiência da técnica, levando a uma melhor inativação fotodinâmica.

2.4.1.3 Filme de Photogem®

A Figura 14 mostra os resultados do experimento com o filme de Photogem®.

Figura 14 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* e *E. coli* desenvolvido em SS e TEA. durante 4 dias tratado com filme de Photogem® com concentração de 0,03 mg/mL e iluminado por um Laser diodo com 32 mW/cm² em 635 nm por 8min20s, totalizando uma dose de 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

O experimento utilizou todos os tubos testados para comparar os resultados entre os tubos, micro-organismos e a diferença entre os efeitos da curcumina e do Photogem®.

O filme de Photogem® mostrou resultados parecidos entre os tipos de micro-organismo e tipos de materiais. Este filme foi bem eficiente na maioria dos grupos TFD. O resultado com maior redução celular foi com o micro-organismo *E. coli* desenvolvido em TEA com uma inativação de aproximadamente 92%.

A superfície do TEH foi a que manteve uma porcentagem maior dos dois tipos de micro-organismos. Provavelmente, este resultado pode ser devido a estrutura física do tubo, o TEH tem um diametro maior que a SS e o TEA, possuindo uma maior superfície de contato para as colonias bacterianas se anexarem e formaram o biofilme.

2.4.2 Nanoskin®

A Nanoskin® é uma membrana utilizada para tratamento de lesões na pele, como feridas. Em casos reportados esta estrutura obteve bons resultados em úlceras causadas por diabetes, ajudando na desinfecção de micro-organismos e na cicatrização.(83) A Figura 15 apresenta o tratamento do biofilme de *S. aureus* com a Nanoskin durante 30 minutos® e recebeu uma dose de energia de $15\text{J}/\text{cm}^2$.

Figura 15 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH. durante 7 dias tratado com Nanoskin® exposta a uma solução de curcumina com concentração de $0,5\text{ mg/mL}$ durante 1 minuto. O tempo de contato entre a Nanoskin® com curcumina no biofilme foi de 30 minutos e dose de energia igual a $15\text{ J}/\text{cm}^2$. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora a estratégia de usar a pele artificial tenha alcançado uma inativação de aproximadamente 45%, não houve uma diferença significativa entre os grupo escuro e TFD. Para que a estratégia de utilizar a técnica seja justificada, o uso da Nanoskin® para a TFD foi descartada. Os resultados podem ter sido prejudicados devido a dinâmica de envolver a pele no tubo com biofilme. A pele não se aderiu adequadamente ao biofilme, acredita-se que devido a geometria tubo, embora muitas tentativas tenham sido testadas para otimizar este processo. Se não houvesse uma boa interação entre a curcumina e o biofilme, a TFD teria altas possibilidades de não ocorrer como desejado. Logo, o uso da nanoskin não teve continuidade.

2.4.3 Solução de Curcumina em Hidrogel

Após os experimentos com o filme de CN foi estudado uma formulação para otimizar os resultados filme de curcumina para reduzir a quantidade celular presente no tubo. Uma nova formulação foi proposta seguindo a mesma ideia original. O hidrogel foi a segunda formulação realizada (Figura 16). A formulação foi escolhida para simular o mesmo efeito

que o filme teria, liberar o fármaco aos poucos para o biofilme, melhorando a disponibilidade do FS e melhor distribuí-lo sobre o tubo.

Figura 16 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 4 dias, tratado com hidrogel com curcumina Natural de concentração de 1mg/mL durante 30 minutos e irradiado por 35 mW/cm² por 7min14s totalizando 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A formulação do hidrogel com curcumina natural teve um resultado parecido aos resultados do filme de curcumina com redução de cerca de aproximadamente 73% de células do biofilme de *S. aureus* sem apresentar citotoxicidade no escuro. A mesma formulação foi testada com CS, porém não houveram diferenças na contagem de colônias entre os grupos controle e grupo TFD (dados não mostrados). Os resultados tiveram semelhanças: o experimento com o filme e com o hidrogel manteve uma inativação bacteriana melhor utilizando CN do que com o uso da CS.

O carboximetil é um polímero, derivado da celulose, e hidrossolúvel e é a cadeia que gera a forma ao hidrogel. Lauril é um surfactante, com função de interagir com uma cadeia apolar e uma polar. A curcumina natural apresenta os curcuminóides em sua composição, que são menos solúveis em água em relação a molécula de curcumina. Os curcuminóides em contato com estes compostos como o CMC e o lauril podem ter sido melhores solubilizados enquanto que a curcumina sintética é apenas composta pela molécula de curcumina, sendo mais hidrossolúvel que os curcuminóides. Uma hipótese seria que a curcumina não ter alta estabilidade como os curcuminóides(82) em formulações compostas pelos componentes utilizados no hidrogel manipulado e com os componentes do filme. A CN pode ter melhor solubilidade em formulações com polímeros e surfactante em comparação com a CS devido a composição molecular e interação intermolecular de cada uma. A interação da curcumina com e sem os curcuminóides altera características como solubilidade, taxa de degradação e estabilidade em pH e temperatura.(82)

2.4.4 Solução de Curcumina com Tween 80.

O tween foi escolhido para uma melhor solubilização da curcumina em solução, uma vez que sua hidrofobicidade dificulta os experimentos in vitro.(14)

Como descrito, a solubilidade da curcumina é um fator limitante para a sua disponibilidade em meios aquosos. O Tween 80, conhecido na literatura e usado para dissolver a curcumina, foi escolhido para dissolvê-la e biodisponibilizar a molécula para uma melhor penetração da mesma no biofilme.

Foram testadas três concentrações diferentes do surfactante, sem ultrapassar o limite de 25%(84). Valores acima desta concentração poderiam ser citotóxicos as células microbianas, dado não desejável. Seguindo o mesmo protocolo, as quantidades de DMSO também não ultrapassaram 25% devido a sua capacidade de também ser citotóxico em altas concentrações. As Figuras 13, 14 e 15 mostra os experimentos realizados com a solução de curcumina mais Tween 80. A Figura 17 mostra os resultados com variação na concentração do Tween com a mesma concentração de 0,75 mg/mL da curcumina.

Figura 17 - Quantidade de células vivas dos biofilmes de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 7 dias tratado com uma solução de Tween 80 com curcumina durante 2 horas. A concentração do Tween foi variada de 0,75 a 1,25% do volume total enquanto a concentração da curcumina foi de 0,75 mg/mL. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela análise dos resultados não houve uma diferença significativa entre os grupos controle na presença de Tween e dos grupos que foram tratados com curcumina dissolvidas em Tween. A continuidade dos experimentos era aumentar a concentração da curcumina usada. Portanto, foi adotada a formulação com maior concentração de Tween para que a curcumina fosse melhor dissolvida e alcançar melhores resultados. As Figuras 18, 19 mostram os gráficos com os resultados com a formulação de curcumina e Tween com concentração de 0,75 e 1,25 mg/mL.

Figura 18 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH, durante 24 horas, tratado com uma solução de Tween 80 com curcumina por um tempo de 2 horas. A concentração da curcumina foi de 0,75 mg/mL enquanto a concentração do Tween foi fixada em 1,25%. A iluminação foi feita pela Biotable em 450 nm, com totalizando uma dose de energia de 50 J cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com uma solução de Tween 80 com curcumina durante 2 horas. A concentração da curcumina foi variou de 0,75 a 1,25 mg/mL, enquanto a concentração do Tween foi fixada em 1,25%. A iluminação foi feita pela Biotable em 450 nm, com totalizando uma dose de energia de 50 J cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos resultados apresentados utilizando curcumina dissolvida em Tween foram citotóxicos para as células bacterianas, tanto no escuro quanto na presença da luz.

Apesar do grupo com concentração de 0,75 mg/mL ter uma diferença relativamente maior que os grupos na concentração de 1,25 mg/mL, não existe uma diferença significativa entre os grupos escuro e TFD em ambos os gráficos. A similaridade entre os grupos escuro e

TFD podem mostrar que a CN dissolvida em Tween nestas concentrações pareceu citotóxico para as células testadas, encerraram-se os experimentos com o Tween.

O tempo de incubação pode ter influenciado nos resultados. Quanto maior o tempo de interação entre o biofilme e o FS, maior o tempo de interação das moléculas de curcumina e de tween, o que pode ter influenciado na morte celular.

Embora o Tween 80 não tenha atingido um resultado esperado, foi planejada uma tentativa com um segundo surfactante, o plurônio, também um composto anfifílico. Esta molécula apresenta as mesmas características do tween, e foi testado para verificar sua citotoxicidade no escuro e comparar os resultados com o Tween.

2.4.5 Solução de Curcumina com Plurônio

O Plurônio foi a segunda molécula anfifílica escolhida para melhorar a solubilidade da curcumina, com intuito de melhorar os resultados de citotoxicidade no escuro obtidos com o Tween 80 em células do biofilme de *S. aureus*. A Figura 20 descreve os resultados com o Plurônio seguindo a mesma metodologia dos testes com o Tween 80.

Figura 20 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com uma solução de Plurônio com curcumina durante 2h30min. A concentração da curcumina foi de 1,25 mg/mL e a concentração do Plurônio foi de 15%. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um estudo realizado com curcumina solubilizada em pluronio testados em células, mostrou que a solução testada no escuro em células do tipo HT1080 pode ser citotóxica, reduzindo a quantidade de células sobreviventes no experimento.(85)

Equivalente os resultados com o Tween 80, o plurônio pareceu seguir o mesmo comportamento, os grupos escuros e TFD tiveram quase a mesma porcentagem de inativação. O pluronio, embora tenha reduzido a quantidade de células do biofilme, também teve resultados tóxicos no escuro. As novas estratégias foram traçadas para otimizar a inativação do biofilme de *S. aureus*.

O próximo capítulo testou uma solução de curcumina utilizando métodos diversos e com adição de instrumentos para auxiliar na desestruturação do biofilme, auxiliando assim a terapia fotodinâmica.

2.5 CONCLUSÃO

As principais conclusões deste capítulo foram:

- Formulações (filme e hidrogel) utilizando curcumina natural são mais estáveis que utilizando curcumina sintética;
- Curcuminóides influenciam no efeito antimicrobiano das formulações;
- Formulação do filme de curcumina natural inativam as células de *S. aureus*;
- Filme de Photogem reduz quantidades celulares próximas de *S. aureus* e *E. coli*;
- A Nanoskin não foi ideal para o uso descontaminar biofilme em TEH;
- Soluções preparadas com tween 80 e Plurônio com curcumina foram citotóxicos no escuro em biofilme de *S. aureus*.

A partir dos testes de sintetizar a curcumina associada a formulações, o próximo passo do estudo foi avaliar e otimizar os parâmetros da inativação fotodinâmica utilizando uma solução de curcumina natural e sintética, além de comparar os resultados entre ambas. Testes associando uma técnica para auxiliar a desestruturação do biofilme também foi feito. O sonificador foi o dispositivo estudado para estes experimentos de desestruturação do biofilme, sem levar as células a morte.

CAPITULO 3 OTIMIZAÇÃO TFD COM SOLUÇÃO DE CURCUMINA NATURAL E SINTÉTICA

3.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo será explorado a otimização de parâmetros da terapia fotodinâmica para a inativação de biofilme bacteriano em TEH. A variância dos parâmetros foi o tempo de formação do biofilme, concentração de curcumina, tempo de incubação do FS no tubo, forma de iluminação, irradiância, dose total de energia, a forma de distribuição de luz no tubo, e o uso de técnicas para desestruturação do biofilme.

3.1.1 Solução de Photodithazine

A molécula N-metil-D glucosamina, conhecida pelo nome comercial Photodithazine[®], é um fotossensibilizador sintetizado na Rússia. FS de segunda geração derivado da clorina e6, obtido da cianobacteria *Spirulina platensis* (86) e muito utilizado pelo seu alto potencial de gerar oxigênio singleto e possuir baixa toxicidade no escuro. A molécula possui uma absorção maior em comprimentos de onda maiores que 650 nm.(87) Estudos vem testando este FS principalmente na área da oncologia para diversos tratamentos tumorais pela sua alta capacidade de reter nas células tumorais(88) e por ser rapidamente eliminado do organismo onde foi inserido.(89) Na área da descontaminação o Photodithazine vem sendo bem utilizado para tratamento de *Candida albicans*.(90)-92)

3.1.2 Sonicador

O sonicador funciona de acordo com o princípio de cavitação ultrassônica que por meio de uma elevada frequência gera uma vibração mecânica em meios líquidos, formando compressões e expansões por meio de bolhas, gerando elevada pressão e impacto na superfície do material testado. O equipamento tem a função de limpar a superfície de materiais e remover partículas difíceis de serem retiradas. Devido a matriz do biofilme ser uma barreira protetora celular, o sonicador foi escolhido no intuito de desestruturar esta matriz, sem danificar as células, para que quando o FS fosse aplicado as células estariam mais acessíveis para uma terapia mais eficiente. A Figura 21 ilustra a imagem do sonicador usado nos experimentos.

Figura 21 - Esquema ilustrativo do sonicador utilizado nos experimentos.
Fonte: SONITECH (92)

3.1.3 Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma ferramenta para avaliar a influência e o grau de relevância dos parâmetros nos experimentos. O intuito de montar um planejamento experimental é reduzir o tempo e o material usado para os experimentos, reduzir a variabilidade do processo e obter uma melhor concordância entre os dados, bem como melhorar o rendimento do experimento total em termos de informação e resultados obtidos. No capítulo 1 houve grandes variações nas concentrações, doses de luz e tempos de incubação. Entretanto, não se tinha uma melhor combinação entre os 3 parâmetros de modo a otimizar os resultados e, portanto, escolheu-se utilizar uma técnica de planejamento experimental. A realização do planejamento também indica a variável que mais influencia nos experimentos, e descreve a influência das interações entre as variáveis no fator resposta.

Um planejamento experimental tem três princípios básicos: réplica, aleatoriedade e formação de blocos. As réplicas são as repetições de experimentos idênticos, necessárias para comprovar o resultado observado; a aleatoriedade garante a igualdade de distribuição entre todos os fatores em termos de sequência e escolha dos materiais que serão usados; e a formação de blocos forma unidades experimentais (os “blocos”) com intuito de aumentar a precisão dos experimentos e reduzir a influência de variáveis incontrolláveis como erros experimentais aleatórios, como exemplo a alteração de um experimento realizado por pessoas diferentes.(93)

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Otimizar a inativação fotodinâmica de biofilmes bacterianos em tubos endotraqueais por meio de planejamento experimental.

3.2.2 Objetivos específicos

- Estudar o comportamento da curcumina natural e sintética em biofilme de *S. aureus* e *E. coli*;
- Associar técnicas para desestruturação do biofilme;
- Ajustar parâmetros para aplicação de um planejamento experimental.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Pré inóculo

Protocolo descrito na seção 2.1 do capítulo 2.

3.4.2 Formação do Biofilme

Protocolo descrito na seção 2.2 do capítulo 2.

3.4.3 Solução de Curcumina Natural e Sintética

A solução estoque de curcumina, tanto natural quanto sintética foi padronizada nas concentrações de curcumina 1,5%, DMSO 1% e dissolvidos em etanol absoluto. Inicialmente a curcumina foi dissolvida em DMSO e colocada no sonicador durante 5 minutos a 40°C. nesta primeira etapa a solução apresenta uma coloração alaranjada. Então o etanol é adicionado e homogeneizou-se a solução. A partir da solução estoque, as soluções foram diluídas em água destilada para as concentrações escolhidas.

As curcuminas utilizadas foram:

- Curcumina natural (CNP) produzida pela PDT Pharma[®], constituída por 57,64% de curcumina, 16,5% de demetóxicurcumina e 25,99% de bisdemetoxicurcumina;
- Curcumina sintetizada (CSC) pela rota de produção descrita por Carmona (CC) pelo Laboratório de Química Bio-orgânica (Departamento de Química) da Universidade Federal de São Carlos(1);
- Curcumina sintética produzida pela Sigma Aldrich (CSS), com 99,5% de curcumina;
- Curcumina sintética produzida pela Vetec (CSV), com 99,5% de curcumina.

3.4.4 Solução de Photodithazine[®]

O PDZ foi testado na concentração de 0,1 mg/mL com os tempos de incubação igual a 30 minutos e 2 horas. A irradiação da luz foi feita através da Biotable emitindo em 660 nm com uma irradiância de 30 mW/cm² com um total de dose de luz de 50 J/cm².

3.4.5 Sonicador

O sonicador (Sonitech Ultrasonic Cleaning, Brasil), com volume de 2,5 litros, com frequência ajustável de 20 a 40 khz. O tempo que a amostra permaneceu no sonicador foi 30 minutos. A figura 22 ilustra o esquema do uso do sonicador após o desenvolvimento do biofilme no tubo.

Figura 22- Esquema da associação do uso do sonicador para auxiliar na destruturação do biofilme.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.6 Inativação Fotodinâmica

Os experimentos padronizados em biofilmes desenvolvidos durante 24 horas de acordo com a literatura. Houveram experimentos com tempos maiores de biofilme para estudar a resistencia do biofilme e sua resposta diante a terapia. Os experimentos testaram os quatro tipos de curcumina descritas na seção 1.3 do capítulo 2, todas em solução.

De acordo com os resultados analisados no capítulo 1 notou-se que a formulação onde a molécula está disponível influenciou na resposta da inativação celular, isso quer dizer que, a disponibilidade da molécula no meio onde estava dissolvida influenciou na resposta em contato com o micro-organismo e seu biofilme. A nova estratégia foi abordar o problema variando a concentração dos FS (0,15 a 5 mg/mL), doses de luz (0,6 a 59,4 J/cm²), tempo de incubação (30 a 2880 minutos), tipo de iluminação, irradiância (4 a 63,7 mW/cm²) e o tempo de biofilme formado (24 a 168 horas).

A estrutura do biofilme se caracteriza pela alta resistência a agentes externos, como temperatura e agentes antimicrobianos, portanto as células ficam inacessíveis devido a esta matriz edificada e dificulta a penetração do FS na membrana celular e com a iluminação ocorra a TFD. O sonificador foi sugerido neste contexto para a desestruturação desta matriz extra polimérica. Devido a formação de colônias e a estruturação desta matriz que aumenta a complexidade do meio de vida das bactérias o biofilme se difere das células planctônicas apresenta uma estrutura dinâmica bem diversa. A Tabela 3 descreve os experimentos realizados no capítulo 2 e os parametros relativos a cada experiemnto. Abaixo da tabela estao descritos observações dos experimentos. Na tabela consta dois tipos de iluminação: Biotable em 450 nm (BIO) (35 mW/cm²) e Iluminação com Ponteira acoplada a um suporte(94) (63,7 mW/cm²) e a iluminação constante realizada por um conjunto de 6 LEDs com potência de 4 mw/cm².

Tabela 3 - Parâmetros usados nos experimentos com biofilmes de *S. aureus* desenvolvido em TEH tratados com curcuminas naturais e sintéticas nas concentrações testadas e dois tipos de iluminação diferentes.

Experimento	TEMPO BIOFILME (h)	TIPO CURCUMINA	[FS] (mg/mL)	TEMPO INCUB (min)	TIPO ILUMIN	DOSE LUZ (J/cm ²)
5	24	CNP	0,15 0,5 0,75	30	BIO	15
6						
7						
8						
9						
10	24	CNP, CSC, CSS	0,75 1; 1,25;	30	BIO	15
11	24	CSC	1,5	30	BIO	15
12	24	CSC	0,75; 1; 1,25	30	BIO	15
13	24	CSC	1; 1,25; 1,5	30	BIO	50
14	24	CSV	1,25	120 *	BIO	50
15						
16			1,25			
17	24	CSV	1,25	120	BIO	50
18	24	CSC	1,25	120	Ponteira	50
19	24	CSV	1,25	120 150	Ponteira	50
20	24	CSV	1; 1,5	120	Ponteira	
22		CSV	0,75; 1,25	150	BIO	15
23			0,75;	150		
24			0,58 1,25	120		
	24	CSV			BIO BIO	
25	24	CSV	0,75; 1,25	60	BIO	50
26	24	CSV	0,75; 1,25	90 90	BIO	15
27	24	CSV	0,75; 1,25		BIO	50
28	24	CSV	1	76; 194	BIO	30
29	24	CSV	1	120	BIO	30
30	24	CSV	1	120	BIO	0,6; 59,4
31	24	CSV	0,75; 1,25	90	BIO	50
36	24/48	CSV	1,25	120	BIO	50
37	48	CSV	1,25	2880	Led's	41472
38-43	24/168	CSV	1,25		Led's	50
			0,75	120		50
79	24	CNP	1,25		BIO	
81		CNP	5	120	BIO	15

Fonte: Elaborada pela autora.

As observações referentes aos experimentos detalhados na Tabela acima estão descritos abaixo:

- **Experimentos 1-9:** Testes com curcumina natural e sintética;
- **Experimentos 10:** Testes para comparação entre as curcuminas;
- **Experimentos 11-13:** Testes com CSV e CSC com várias concentrações;
- **Experimentos 14, 16-17, 19:** Experimento adicionou TEH cortados ao meio no sonicador durante 30 minutos;
- **Experimentos 15:** Experimento adicionou TEH cortados ao meio no sonicador durante 30 minutos antes e depois da TFD;
- **Experimentos 18:** Experimento adicionou TEH cortados ao meio no sonicador durante 30 minutos e a iluminação ocorreu com os tubos cobertos com alumínio ao seu redor;
- **Experimentos 20:** TEH cortados ao meio e plaqueados imediatamente pós TFD e após 2h30 da TFD;
- **Experimentos 22:** TEH cortado ao meio;
- **Experimentos 23-31:** Experimentos do 1º Planejamento Experimental;
- **Experimentos 36:** Grupo que recebeu a terapia foi recolocado em meio de cultura para observar se ocorreria o crescimento de novas colônias;
- **Experimentos 37:** Experimento iluminado constantemente em baixa potência (4 mW/cm^2) durante 48 horas;
- **Experimentos 38-43:** Estudo do biofilme desenvolvido em TEH nos tempos de 1 a 7 dias;
- **Experimentos 79-80:** Experimentos com curcumina natural.

3.4.7 Teste de Resistência Microbiana

Um experimento para estudar se o micro-organismo pudesse desenvolver resistência pela terapia fotodinâmica. O experimento contou com os grupos controle e TFD como descritos em experimentos anteriores. O biofilme foi desenvolvido em 24h e o grupo teste recebeu a CSV com concentração de $1,25 \text{ mg/mL}$ durante 2 horas de incubação e iluminados na Biotable com 35 mW/cm^2 totalizando 50 J/cm^2 . O intuito do experimento foi verificar se as células que não foram inativadas pela terapia, porém poderiam ter algum tipo de problema foi capaz de se reproduzir. Os grupos foram controle e TFD (24 e 48h)

A luz foi irradiada em ambos os grupos TFD no primeiro dia de experimento. O grupo de 24h foi plaqueado, enquanto os grupos 48h foram recolocados na placa de 24 poços com $900 \text{ }\mu\text{L}$ de BHI e armazenado na estufa a 37°C . no segundo dia de experimento os tubos foram somente lavados e plaqueados. Nenhum tratamento foi aplicado no dia 2 de experimento.

3.4.8 Teste com Iluminação Constante

Um experimento foi traçado com iluminação constante durante 48h. Um conjunto de 6 Leds foi construído pelo Laboratório de Apoio (LAT/IFSC) com uma potência de 4 mW/cm^2 com cada LED emitindo no comprimento de onda de 450 nm. O total de dose recebida pela amostra foi de $345,6 \text{ J/cm}^2$.

Um crescimento planctônico foi feito em uma placa de 24 poços. Em cada poço foi adicionado 900 μL de BHI e 100 μL do inóculo. No grupo TFD, além destes componentes foi adicionada a CSV com concentração de 1,25 mg/mL.

3.4.9 Planejamento Experimental

O planejamento fatorial é um tipo de planejamento utilizado quando mais de um fator precisa ser estudado, além de investigar todos os tipos de combinação entre os níveis dos fatores. O planejamento fatorial 2^3 foi escolhido devido às variáveis escolhidas serem três ao total: tempo de incubação (h), concentração de FS (mg/mL) e dose de luz (J/cm^2). Planejamento com oito pontos no cubo, com duas repetições nos pontos centrais (descritos na Tabela 3, abaixo), seis pontos com uma distância axial ao centro de $\pm \alpha$ (1,68) para um fator, e 8 pontos entre os níveis superiores e inferiores, totalizando 16 experimentos, cada um feito em triplicata. O fator α é calculado de acordo com o número do experimento fatorial usado, como este planejamento foi usado 2^3 o fator $\pm \alpha$ é igual a $\pm 1,68$. O planejamento traçado foi o composto central (PCC), com os experimentos descritos na Figura 16, com ajuda do software Statistica® (Tulsa, EUA).

A técnica da superfície resposta gera gráficos e superfícies de contorno ilustrando os fatores que influenciam no valor resposta, levando a uma melhor combinação entre os níveis e assim uma melhor resposta experimental. Neste planejamento experimental a proposta foi encontrar a melhor combinação para reduzir o número de células vivas como fator resposta, utilizando a solução de curcumina sintética. A Figura 18 ilustra a matriz elaborada pelo programa para este tipo de planejamento.

<i>Y1</i>	<i>Y2</i>	<i>Y3</i>	
-1	-1	-1	Planejamento fatorial 2 ³
-1	-1	+1	
-1	+1	-1	
-1	+1	+1	
+1	-1	-1	
+1	-1	+1	
+1	+1	-1	
+1	+1	+1	
- α	0	0	Pontos axiais 2k
+ α	0	0	
0	- α	0	
0	+ α	0	
0	0	- α	
0	0	+ α	
0	0	0	Pontos Centrais
0	0	0	

Figura 23 - Planejamento experimental fatorial em 2³ por planejamento composto central.

Fonte: Elaborada pela autora.

A organização do planejamento selecionou os fatores (variáveis independentes) e os níveis (valores assumidos pelas variáveis) estudados e testados. As variáveis foram divididas da seguinte forma:

*Y*₁: Tempo de incubação (h)

*Y*₂: Concentração (mg/mL)

*Y*₃: Dose de luz (J/cm²)

Foram 5 níveis estudados e colocados na forma codificada na Tabela 3, utilizando a equação 4:

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}}$$

Onde:

*X*_n é o valor da variável no experimento na forma codificada;

X é o valor real da variável a ser calculado;

*X*_n é o valor real da variável no ponto central;

X₊₁ é o valor real da variável no nível superior;

X₋₁ é o valor real da variável no nível inferior

Uma equação polinomial do segundo grau é traçada para encontrar este ponto ótimo. Além deste ponto, esta equação investigou a influência dos fatores e variáveis e da interação dos parâmetros na resposta procurada.

Para avaliar a inativação fotodinâmica com o planejamento fatorial foram traçados 16 experimentos, entre eles dois níveis com três variáveis, com duas réplicas no ponto central, 6

experimentos nos pontos axiais (α). A Tabela 4 descreve os experimentos com suas variáveis e níveis.

Tabela 4 - Parâmetros e intervalos usados no primeiro planejamento experimental fatorial (ponto central, níveis -1 e +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central utilizando solução de curcumina sintética Vetec e desenvolvendo biofilme em *S. aureus* durante 24 horas.

Variáveis Independentes	-α	-1	0	+1	+α
Y₁	1,16	1,5	2	2,5	2,84
Y₂	0,58	0,75	1	1,25	1,42
Y₃	0,6	15	30	50	59,4

Fonte: Elaborada pela autora

No nível superior, +1, ficou definido 2,5 horas no tempo de incubação, 1,25 mg/mL de concentração de FS e 50 J/cm² de dose de energia total. No nível inferior ficou definido 1,5h no tempo de incubação, 0,75 mg/mL de concentração de FS e 15 J/cm² de dose de energia total. O ponto central ficou definido por 2h de incubação, 1 mg/mL de concentração de FS e 30 J/cm² de dose de energia total.

Após a descrição dos níveis de cada variável o software Statistica[®] gerou uma tabela (Tabela 5) para descrever cada experimento sugerido de acordo com o tipo de planejamento escolhido. Cada linha é um experimento montado, de acordo com seu nível e suas variáveis, com os valores reais e codificados.

Tabela 5 - Matriz do Planejamento experimental com as variáveis codificadas e reais de cada experimento.

Experimento	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	Y₁	Y₂	Y₃	Y₁	Y₂	Y₃
1	-1	-1	-1	1,5	0,75	15
2	-1	-1	+1	2,5	0,75	15
3	-1	+1	-1	1,5	1,25	15
4	-1	+1	+1	2,5	1,25	15
5	+1	-1	-1	1,5	0,75	50
6	+1	-1	+1	2,5	0,75	50
7	+1	+1	-1	1,5	1,25	50
8	+1	+1	+1	2,5	1,25	50
9	- α	0	0	1,16	1	30
10	+ α	0	0	2,84	1	30
11	0	- α	0	2	0,58	30
12	0	+ α	0	2	1,42	30
13	0	0	- α	2	1	0,6
14	0	0	+ α	2	1	59,6
15	0	0	0	2	1	30
16	0	0	0	2	1	30

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.10 Análise Estatística de Dados

Com a matriz do planejamento montada, os experimentos foram executados e cada um teve seu fator resposta. As condições impostas pelo planejamento, como as réplicas (experimentos feitos em triplicata), a aleatoriedade e a distribuição em blocos, foram seguidas para reduzir erros experimentais. Após a fase de teste, os dados foram coletados e receberam um tratamento estatístico.

Inicialmente, uma equação de regressão linear é traçada de acordo com o planejamento realizado, e seu fator resposta variará para cada experimento. A regressão linear tem como função estimar o fator resposta de acordo com as variáveis. A regressão é dita linear porque considera uma função linear entre o fator resposta e suas variáveis. Se esta relação não segue a linearidade, a regressão é dita não linear.(95) O programa gera valores preditos e valores reais. Os valores preditos são os valores calculados pelo software e devem se aproximar dos valores reais se o experimento for bem realizado. A equação de regressão linear está descrita abaixo.

$$Y = \beta_0 + ay_1 + by_2 + cy_3 + dy_1y_2 + fy_1y_3 + gy_2y_3 + hy_1^2 + iy_2^2 + jy_3^2 \quad (05)$$

Onde,

Y= resposta estudada;

β_0 = constante determinada durante o ajuste do modelo;

a,b, c= constantes ou parâmetro da equação;

Y_1 = Tempo de incubação (h)

Y_2 = Concentração do FS (mg/mL)

Y_3 = Dose de energia (J/cm²)

Para cada fator resposta foi realizada uma regressão linear de acordo com o método dos mínimos quadrados. O teste ANOVA foi aplicado com o software Origin[®] realizando o teste de Tukey que faz comparação par a par, com nível de significância de 95%. Variáveis com nível de significância maior que 5% foram eliminadas e para cada efeito das variáveis independentes foi definida uma equação, onde os valores não eliminados foram utilizados para calcular a significância de cada parametro e definir a relação entre o valor estimado de cada parametro e o seu desvio padrão.

Próximo passo foi determinar o valor de F de Fisher. Este valor é calculado pela razão entre o quadrado médio da equação ajustada (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR), como indica a equação 6.

$$F = \frac{QME}{QMR} \quad (06)$$

No teste de hipótese este valor calculado é usado para a adequação dos dados preditos com os dados experimentais. O teste de Fisher compara todas as médias, controla a taxa do erro ao nível de significância para cada comparação. Logo, quanto maior seu valor, melhor será o ajuste do modelo proposto.

O cálculo do quadrado médio da equação (QME) e o cálculo do quadrado médio do resíduo (QMR) são descritos pelas Equações 7 e 8 respectivamente.

$$QME = \frac{\text{Soma dos quadrados dos valores preditos}}{\text{Número de graus de liberdade da equação}} \quad (07)$$

$$QMR = \frac{\text{Soma dos quadrados do resíduo}}{\text{Número de graus de liberdade do resíduo}} \quad (08)$$

Para que a significância do modelo fosse verificada alguns parâmetros são essenciais como o coeficiente de correlação quadrático (R_2) e a comparação entre o valor F do teste de Fisher (FC) e o F tabelado (FT).

O coeficiente de correlação quadrático (R_2) e a comparação entre o F de Fisher calculado (FC) e o F tabelado (FT) foram utilizados para verificar a significância do modelo.

A análise de Pareto é uma ferramenta estatística que utiliza o princípio de Pareto para ordenar a ordem de influencia dos dados no seu experimento. Muito utilizada para tomada de decisões como verificar o problema de algum processo, priorizando os problemas para uma melhor solução. É uma técnica de fácil visualização e de identificação destes parâmetros procurados. Utilizado para dados qualitativos.(96)

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Solução Curcumina Natural

Os primeiros testes com solução de curcumina foram realizados em nos biofilmes *S. aureus* e *E. coli*. Os primeiros gráficos descrevem os experimentos variando a concentração de curcumina. A Figura 24 mostra os resultados do experimento realizado com *E. coli* e a Figura 25 mostra os experimentos com *S. aureus* utilizando curcumina natural a 0,75 mg/mL com 30 minutos de incubação com dose de energia total de 15 J/cm².

Figura 24 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *E. coli* desenvolvido no TEH durante 7 dias, tratado com solução de curcumina natural em três concentrações 0,15; 0,5 e 0,75 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm² durante 7min14s, totalizando 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A TFD aplicada sobre o biofilme de *E. coli* conseguiu uma inativação total das células nas concentrações de 0,5 e 0,75 mg/mL de curcumina natural. Na concentração menor, 0,15 mg/mL, não houve diferença significativa entre os grupos controle e teste, como já era esperado. A concentração de 0,15 mg/mL além de ser baixa pode não ter sido suficiente para penetrar nas células e causar danos.

Figura 25 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 7 dias, tratado com solução de curcumina natural nas concentrações: 0,15; 0,5 e 0,75 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450 nm a 35 mW/cm² durante 7min14s, totalizando 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A terapia aplicada a *S. aureus* mostrou um resultado diverso ao ser comparada com o biofilme de *E. coli*. Nas concentrações de 0,15 mg/mL e 0,5 mg/mL houve uma redução total de células quando a luz foi irradiada sob a amostra. Na concentração mais alta houve uma alta citotoxicidade nos grupos escuro e TFD, mostrando que nesta concentração, mesmo na ausência de luz a molécula é citotóxica para este micro-organismo. A curcumina na concentração de 0,75 mg/mL no grupo teste pode não estar totalmente dissolvida na solução, não leva a uma redução total de células bacterianas.

Houve uma variabilidade significativa entre os grupos tratados com curcumina e os grupos TFD. Os resultados da Figura 25 mostram que a melhor inativação foi na presença da concentração 5 mg/mL, entretanto não houve a inativação total bacteriana como visto no gráfico apresentado na Figura 24, com concentrações menores.

Figura 26 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com solução de curcumina natural com concentração 5 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A diferença entre os gráficos nas Figuras 25 e 26 é a dose de luz e uma maior concentração testada (5 mg/mL) no gráfico 26. Uma possível explicação usada para explicar o resultado observado seria uma baixa solubilização da curcumina natural em água em maiores concentrações.

A curcumina natural é composta pelos curcuminóides, que são mais hidrofóbicos em relação a molécula de curcumina em água.(82) Esta composição pode afetar a solubilização da curcumina quando diluída em água e testada nos tubos com biofilme. Os testes com baixa concentração de curcumina natural tiveram melhores resultados em relação a altas concentrações. Uma explicação poderia ser porque em altas concentrações existem quantidades maiores dos curcuminóides e por serem menos solúveis em água do que a curcumina, eles podem acabar influenciando nos resultados de inativação do biofilme de *S. aureus*.

A baixa solubilidade pode levar a agregação de moléculas(14), não ficando disponíveis para entrar nas células e a terapia acontecer. O resultado para uma maior dose de luz seria um melhor valor na redução celular, o que não foi visto na Figura 26. Uma explicação seria um problema na distribuição da luz na placa, logo a luz não atingiu as células de forma homogênea. A penetração do FS no biofilme também pode ser considerada um problema para a TFD. Como a formação do biofilme não necessariamente é homogênea no TEH.

Focando no problema de solubilização da curcumina natural em água, esta curcumina foi substituída pela curcumina sintética para fins de comparação e otimização de resultados baseados nos testes prévios. Em primeiro instante, foi realizado um teste de comparação entre três curcuminas diferentes: curcumina natural, curcumina sintética produzida na Ufscar(1) (CSC) e a curcumina sintética da Sigma Aldrich®, a qual é considerada produto padrão.

Um biofilme de *S. aureus* foi desenvolvido durante 24 horas em TEH. Em cada grupo foram aplicadas as curcuminas com tempo incubação de 30 minutos e iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm² durante 7min14s, totalizando 15 J/cm². Os resultados observados entre as curcuminas está presente no gráfico da Figura 27.

Figura 27 - Teste de comparação entre as curcuminas natural e sintéticas testadas com concentração de 0,75 mg/mL. Iluminação com Biotable de 450 nm recebendo uma dose total de energia igual a 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Entre as curcuminas natural e sintética houve uma diferença em torno de 20% de redução de células. Entre as curcuminas sintéticas não houve diferença estatística relevante entre ambas. Devido a composição molecular entre os dois tipos de curcumina, pode ser que a curcumina sintética, por ser composta apenas pela molécula de curcumina tenha uma diluição melhor do que a curcumina natural que é composta pela curcumina e os curcuminóides. A curcumina natural foi substituída pela curcumina sintética que deu continuidade aos testes.

Como já descrito sobre a diferença estrutural entre ambas as curcuminas existem estudos comparando a diferença de solubilidade entre as três moléculas, a curcumina, o DMC e o BMC, assim como seus comportamentos em relação ao pH do meio(14). A curcumina com os curcuminóides se mostra mais estável, isto é, na presença deles a taxa de degradação da curcumina é menor. Curcumina em um período de 6h degrada cerca de 75%, enquanto o DMC degrada 35% e o BMC aproximadamente 10%. (82)

3.5.2 Solução de Curcumina Sintética

A primeira variável testada foi a concentração da curcumina sintética em solução. As curcuminas CSC e a CSS foram testadas separadamente em dois experimentos. A partir dos resultados da CSC foi traçado o experimento com a CSS.

O primeiro resultado analisado esta na Figura 19 utilizando a CSC em 4 concentrações diferentes e irradiadas com a dose de luz igual a 15 J/cm² com a Biotable em 450nm durante 7min14s. O gráfico da Figura 28 mostra os resultados com a CSS em uma dose maior de energia de 50 J/cm².

Figura 28 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com solução de CSC nas concentrações: 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm² durante 7min14s, totalizando 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos resultados, a maior redução celular foi com a concentração de 1,25 mg/mL, com aproximadamente 78% de morte celular, entretanto esta concentração de mostrou citotóxica no escuro. A maior concentração obteve a menor inativação antimicrobiana. Embora os testes tenham sido feitos em triplicata, os grupos TFD e controle apresentaram barras de erros consideráveis devido variabilidade entre os dados dos grupos. A formação do biofilme por não ser homogênea neste tipo de grupo pode propiciar a variabilidade entre os tubos do mesmo grupo.

Ao longo dos experimentos notou-se que a não homogeneidade do desenvolvimento do biofilme neste tipo de tubo. A geometria do tubo é redonda e oca, logo as bactérias podem se anexar na superfície externa ou interna do mesmo, sem uma regulação devido a angulação da superfície. Para diminuir a heterogeneidade do tubo foi delineado um experimento com o TEH cortado longitudinalmente, separando duas metades do tubo. O que foi esperado era o aumento da homogeneidade durante a fase de anexação das células e reduzir a variabilidade dos dados durante a contagem de células. O gráfico da Figura 29 foi o resultado com o primeiro experimento realizado com o tubo cortado ao meio.

Figura 29 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH cortado ao meio durante 24 horas, tratado com solução de CSS nas concentrações: 1,0; 1,25 e 1,5 mg/mL durante 30 minutos. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como no gráfico da Figura 27 com teste realizado com CSC, a concentração 1,25 mg/mL teve o melhor resultado na TFD, o que era esperado, uma vez que é a mesma curcumina. Com uma maior dose de luz, a redução bacteriana atingiu um valor de aproximadamente 92% de morte celular. Na maior concentração o resultado se repetiu, não sendo a melhor condição para reduzir a quantidade de células de *S. aureus*. A explicação pode ser a mesma desenvolvida acima, maiores concentrações de curcumina em água pode não ter uma solubilização ideal para que a terapia ocorra com sucesso desejado. Neste experimento, todas as concentrações se mostraram citotóxicas no escuro, onde a concentração de 1,25 mg/mL com a CSS entre as concentrações testadas foi com a menor citotoxicidade considerando a barra de erros. A proposta de cortar o tubo era para diminuir a variabilidade de dados entre os mesmos grupos, e este resultado foi alcançado. A análise do gráfico acima mostra uma redução nas barras de erro entre todos os tubos. Logo houve uma menor heterogeneidade entre os dados dos mesmos grupos, o que era esperado.

A concentração 1,25 mg/mL foi escolhida para a continuidade dos testes, uma vez que seu resultado se repetiu e obteve a maior redução celular de *S. aureus*.

Ao longo dos experimentos observou-se alguns problemas para atingir a inativação total do biofilme de *S. aureus*. A variabilidade entre os dados, variabilidade entre os lotes de curcumina, problema de penetração de FS na camada do biofilme e a distribuição de luz foram os desafios observados durante os experimentos. Estratégias foram traçadas para solucionar estes desafios apresentados. Foram traçadas 3 estratégias para solucionar cada um dos problemas. A primeira testada foi o problema de penetração do FS no biofilme.

A matriz extrapolimérica é a matriz que envolve o biofilme e é um dos principais problemas de saúde para o ser humano por proteger as células de fatores externos e liberar fatores de virulência que podem prejudicar as células do hospedeiro. A matriz além de garantir a segurança das células, protege-as dos fatores externos, tornando-se uma barreira praticamente impenetrável. Esta barreira prejudica a aplicação do FS, uma vez que ela pode

impedir o acesso do FS às células bacterianas. Sem a interação FS e bactérias a terapia não atingi sua função.

3.5.3 Sonicador

Uma alternativa traçada foi desestruturar esta matriz, entretanto sem prejudicar diretamente as células, foi o uso do sonicador antes da aplicação da TFD. A função do sonicador foi apenas alterar a estrutura do biofilme, criando alternativas de acesso do FS encontrar as células microbianas. Portanto, durante a aplicação da luz, a inativação fotodinâmica iria ocorrer como esperada.

Um teste piloto foi delineado, com um tempo inicial testado foi igual a 30 minutos do tubo com o biofilme no sonicador em um teste piloto com o biofilme desenvolvido por *E. coli*. O tempo de incubação foi de 2 horas seguido pela irradiação totalizando 50 J/cm^2 . Os resultados de inativação estão descritos na Figura 30.

Figura 30 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *E. coli* desenvolvido no TEH, cortado ao meio, durante 24 horas, tratado com solução de CSS com concentração de $1,25 \text{ mg/mL}$ durante 2 horas de incubação e mais 30 minutos no sonicador. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm^2 durante $24\text{min}20\text{s}$, totalizando 50 J/cm^2 . $N=9$ em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com $P \text{ valor} < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado do experimento mostrou uma grande redução de células de *E. coli* no grupo TFD. A partir deste resultado, foram traçados experimentos para comprovar que o sonicador não era o causador da morte celular e analisar se a ordem do uso do sonicador causaria alguma diferença durante o tratamento. A intenção foi provar que a TFD estava inativando as células, e não o uso do sonicador. A ordem de aplicação do sonicador no grupo TFD e no grupo controle foi antes e depois da luz irradiada. A hipótese seria se a ordem de aplicação do sonicador e da luz surgiria diferenças quando a inativação fotodinâmica fosse analisada. O gráfico presente na Figura 31 mostra os resultados observados no teste do uso do sonicador em biofilmes. Na figura estão descritos os grupos: sem uso de sonicador (controle e TFD) e com o uso de sonicador (controle, sonicador e TFD), sendo a luz irradiada 15 e 50 J/cm^2 .

O tempo de incubação entre a curcumina e o biofilme foi de duas horas. O tempo da amostra no sonicador foi de 30 minutos. A iluminação foi realizada pela Biotable em 450 nm com 35 mW/cm^2 .

Figura 31 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH, cortado ao meio, durante 24 horas, tratado com solução de CSS com concentração de 1,25 mg/mL durante 2 horas de incubação e mais 30 minutos da amostra no sonicador. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm² recebendo uma dose de 15 e 50 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pela análise do gráfico acima comprovam que o uso do sonicador com a TFD auxilia na total morte celular de *S. aureus* na dose de luz de 50 J/cm². Os grupos controle comprovaram que o sonicador utilizado sozinho ou na presença de luz não provoca morte celular. Existem estudos que afirmam que apenas a ação do sonicador não é suficiente para a morte bacteriana. (97)

O mecanismo do sonicador consiste na formação de ondas longitudinais, formando regiões de compressão e expansão no meio inserido. Ocorrerá uma mudança de pressão e estas mudanças provocam o aparecimento da cavitação com a formação de bolhas no meio. Estas bolhas se expandem até alcançar um tamanho que sofrem condensação. A condensação ocorre rapidamente e as moléculas condensadas colidem fortemente formando ondas de choque. As ondas de choque formam regiões de altas pressões e temperatura, e nas regiões de alta pressão será a principal bactericida na ação do sonicador. (97)

Como nos resultados acima o sonicador não levou a morte celular, a frequência escolhida para o experimento não foi forte o suficiente para ocasionar a morte celular no biofilme de *S. aureus*, ou o tempo da amostra no sonicador não foi o suficiente. Entretanto a ação do sonicador foi suficiente para ocasionar um tipo de dano na matriz extrapolimérica do biofilme porque quando foi utilizada a ação do sonicador mais a inativação fotodinâmica, houve uma redução de 100% de células do biofilme de *S. aureus*. O tipo de espécie de micro-organismo e o tempo gasto no sonicador são parâmetros que podem influenciar nos resultados de morte celular. (97) A técnica de sonificação apresenta melhores resultados quando acoplada a outras ações como calor, variações extremas de pH ou uma cloração. (98)

A inativação ocorre quando o sonicador, a curcumina e a luz são utilizados juntos, não necessariamente ao mesmo tempo. Outro resultado importante é de que a ordem entre o uso do sonicador e a aplicação da luz não fez diferença nos grupos testados.

Para resolver o problema da distribuição de luz foi testada uma nova fonte de luz em 450 nm junto com o uso do sonicador. O 25º experimento foi constituído por duas etapas. A primeira etapa testou um sistema constituído por em uma ponteira acoplada a um LED, com uma irradiância de $63,7 \text{ mW/cm}^2$. Para fins de concentrar os raios de luz da iluminação, os tubos com o biofilme formado foram colocados dentro de um microtubo graduado envolto por papel alumínio. O resultado desse experimento não foi como o esperado, não houve diferença entre os grupos controle e teste. O plástico do microtubo pode ter atrapalhado para que o papel alumínio assumisse sua função de auxiliar a irradiação no tubo. O uso do papel alumínio foi descartada.

A segunda etapa do 27º experimento testou se havia diferença entre os lotes de curcumina sintética. O escopo deste experimento foi analisar se havia diferença entre os lotes de curcumina. A iluminação foi interna pela a ponteira e com o uso do sonicador, porém sem a cobertura do papel alumínio da primeira etapa. O tempo de irradiação foi de 12min30s, totalizando uma dose de energia igual a 50 J/cm^2 . Os resultados estão no gráfico 32.

Figura 32 - Quantidade de células vivas dos biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH, cortado ao meio, durante 24 horas, tratado com solução de curcumina 1 e ambas CSC com concentração de 1,25 mg/mL durante 2 horas de incubação e mais 30 minutos da amostra no sonicador. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm^2 recebendo uma dose de energia igual a 50 J/cm^2 . N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado do 32º experimento mostrou uma diferença significativa entre os dois lotes de CSC. Para evitar problemas com replicação e variabilidade entre os dados a curcumina sintética Vetec foi a escolhida para a continuidade dos experimentos. Esta curcumina foi escolhida por ser uma segunda linha da empresa Sigma Aldrich®, por estar consolidada no mercado. O estudo tentou eliminar todos os tipos de variáveis que poderiam ocasionar uma variabilidade entre os dados dos grupos.

O experimento realizado na Figura 32 foi repetido no 33º experimento, porém com o uso da curcumina da Vetec. Em primeiro instante foi traçado um experimento para comparação da CSV com os outros resultados observados com as curcuminas de outras origens. Além da comparação os testes visaram padronizar a curcumina e reduzir a variabilidade entre os dados do grupo escuro e TFD. O gráfico presente na Figura 33 mostra os resultados com a CSV na concentração de 1,25 mg/mL, tempo de incubação de duas horas

e 30 minutos no sonificador. A iluminação externa com a Biotable em 450 nm durante 24min20s totalizando 50 J/cm².

Figura 33 - Quantidade de células vivas do biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com solução de CSV com concentração de 1,25 mg/mL durante 2 horas de incubação e 30 minutos no sonificador. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A curcumina sintética da Sigma atingiu o 100% de redução bacteriana, enquanto a CSV conseguiu reduzir 70% das células bacterianas com o uso do sonificador. Embora ambas as curcuminas serem da mesma marca, a Vetec é uma segunda linha da Sigma®, logo apesar de terem o mesmo grau de pureza descrito, a curcumina da Vetec pode conter maiores traços de curcuminóides. Esses traços podem influenciar nos resultados de inativação de *S. aureus*.

A partir dos resultados analisados, o uso do sonificador comprovou que auxilia na inativação fotodinâmica. A hipótese sugerida neste estudo foi que a dinâmica do sonificador desestruturou a matriz extrapolimérica do biofilme através da abertura de canais. Logo, as células ficam expostas e acessíveis a agentes externos. Com o contato entre o FS e as células de *S. aureus*, a curcumina entra pela parede celular e com o auxílio da luz as reações de oxidação ocorrem levando as células a morte.

3.5.4 Teste Efeito Pós TFD

A próxima etapa foi reduzir a quantidade celular de *S. aureus* sem o uso do sonificador. O trabalho tem o intuito de inserir a técnica de descontaminação do tubo nas UTI's e associar um aparelho externo como o sonificador causaria grandes complicações para o paciente e para os profissionais da saúde. Comprovado que o sonificador funciona, novos testes foram traçados para atingir a redução total bacteriana sem acoplar outras técnicas.

Uma estratégia adotada foi estudar quanto tempo após a aplicação da luz pode ocorrer morte celular e analisar se os fotoprodutos da curcumina são citotóxicos.

Para testar o tempo de morte após aplicação da luz foi traçado inicialmente experimentos com plaqueamento imediatamente após a aplicação da luz e plaqueamento 2h30

após a aplicação da luz. O gráfico presente na Figura 34 testou a CSV nas concentrações de 1 e 1,5 mg/mL, com 2 horas de incubação e iluminação externa com a Biotable me 450 nm durante 24min20s, com dose total de 50 J/cm². Os grupos testados foram controle, escuro e TFD

Figura 34 - Quantidade de células vivas do biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com duas soluções de CSV com as concentrações de 1,0 e 1,5 mg/mL durante 2 horas de incubação. Iluminação externa com Biotable de 450nm a 35 mW/cm² durante 24min20s, totalizando 50 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados mostram que o tempo pós a irradiação resultou em uma diferença significativa entre os dados de morte celular. Os dados obtidos concordam com um estudo feito com a curcumina nas concentrações de 1 e 2,5 µM e dose de luz de 0,5 J/cm². Após 4 horas do tempo de pós irradiação a sobrevivência celular diminuiu aproximadamente 2 logs da concentração inicial, mesmo comportamento com a Figura 29. Uma explicação sugerida foi que os fotoprodutos da curcumina em DMSO podem não ser os causadores da morte celular por não serem citotóxicos(58). Entretanto, durante a irradiação podem se formar espécies tóxicas com um tempo de meia vida longo ou até mesmos induzir reações em cascata e formar outras espécies tóxicas, mesmo após a irradiação. (57) Neste experimento a hipótese é de que a TFD pode não inativar todas as células, porém pode causar algum tipo de dano na bactéria. Este dano ao longo do tempo pode levar a dificuldade da bactéria se reproduzir e pode leva-la a morte com o dano com a luz.

3.5.5 Testes com Solução de Photodithazine®

Em paralelo aos experimentos com a curcumina, foi traçado um experimento para testar e comparar um fotossensibilizador derivado da clorina, o Photodithazine® (Figura 35). A concentração de PDZ foi de 0,1 mg/mL, diluída em água destilada. A iluminação foi feita com uma Biotable em 660 nm com irradiância de 30 mW/cm² durante 28min20s, com um total de 50 J/cm² de dose de energia.

Figura 35 - Quantidade de células vivas do biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH durante 24 horas, tratado com solução de 0,1 mg/mL de PDZ com dois tempos de incubação, 0,5 e 2 horas irradiados com 50 J/cm² com Biotable em 660 nm com irradiância de 30 mW/cm². N=9 em cada grupo descrito
*Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise do gráfico mostra que não houve diferença significativa entre os grupos escuro e TFD. Estudos na literatura mostram que o PDZ em altas concentrações pode ser citotóxico no escuro. (99) A concentração de 0,1 mg/mL pode se encaixar nestas condições e ser tóxica para as células mesmo no escuro. De acordo com as colunas a Figura 30, não houve diferença entre os grupos analisados imediatamente após a irradiação e os grupos analisados 2h30 após a irradiação. Os fotoprodutos do PDZ são estudados quanto as suas atividades biológicas, como sua citotoxicidade. Os fotoprodutos do PDZ formados após a iluminação são menos citotóxicos no escuro em comparação a molécula de PDZ no escuro antes de ser irradiada.(99) Logo, os grupos analisados após a irradiação da luz não tiveram diferenças em relação aos grupos analisados logo após a iluminação porque além do tempo de incubação ser longo, o efeito do PDZ ocorreu, neste experimento, até em 2 horas.

O PDZ teve um efeito diferente da curcumina quando comparados. Após a irradiação a curcumina pode ter produzido espécies tóxicas que não foram observadas no uso do PDZ nestes experimentos. A alta concentração do PDZ pode ter facilitado a agregação entre suas moléculas e não ter conseguido desempenhado seu total potencial. Quanto maior a agregação menor seu poder de formar espécies citotóxicas.

O intuito do teste no experimento com o PD em biofilme de *S. aureus* foi para fins comparativos entre dados de morte pós irradiação, as análises foram concluídas e os testes com a curcumina deram continuidade.

3.5.6 Planejamento experimental

Como descrito em materiais e métodos, devido ao grande volume de variáveis e intervalos usados, o planejamento experimental foi delineado e seguido. A Tabela 6 é

complementar a Tabela 5, onde estão as variáveis e os níveis usados de cada e fator resposta correspondente a cada experimento o fator resposta deste planejamento foi a contagem de bactérias.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental com as variáveis reais e o valor resposta de cada experimento.

EXPERIMENTO	Y₁	Y₂	Y₃	RESPOSTA (Y)
1	1,5	0,75	15	377
2	2,5	0,75	15	256
3	1,5	1,25	15	381
4	2,5	1,25	15	303
5	1,5	0,75	50	421
6	2,5	0,75	50	204
7	1,5	1,25	50	487
8	2,5	1,25	50	136
9	1,16	1	30	360
10	2,84	1	30	324
11	2	0,58	30	300
12	2	1,42	30	462
13	2	1	0,6	307
14	2	1	59,6	303
15	2	1	30	441
16	2	1	30	682

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 6 descreve todos os experimentos do 1º planejamento experimental, as variáveis e seus respectivos valores resposta. A partir desta tabela com os valores de cada variável e seu valor resposta, os dados são adicionados no software Statistica®. O modelo ajustado foi de Planejamento Fatorial Completo do tipo 2ⁿ onde n=3 neste planejamento.

A partir do teste t-student foi gerada a equação de regressão linear eliminando dados com nível de significância acima de 5%. A interação entre as variáveis tempo e dose de luz (xy) foi descartada devido a baixa influência no fator resposta. A partir dos ajustes foi obtida a seguinte equação:

$$z = -1873,6253 + 2172,1539y_1 - 1039,0064y_1^2 + 18,30378y_2 - 0,2661876y_2^2 + 1138,423y_3 - 314,9047y_3^2 + 2433,1365$$

Analisando a equação, aumentando a dose de luz (y) reduzirá mais o valor de z, que é o fator resposta do modelo. O tempo de incubação vem logo em seguida, a influencia apesar d emenor ainda é significativa. Esta análise tem relação com os dados analisados através da comparação entre os grupos controle e TFD entre os grupos de cada experimento testado. O maior tempo de nebulização causou a menor quantidade de colônias. Pode-se observar que pelos dados na tabela 6, que a mesma dose de luz e mesmo tempo de incubação tiveram resultados parecidos de morte células. A avaliação das três variáveis será melhor discutida nos

gráficos abaixo. A análise com mais de duas variáveis faz parte de um planejamento mais complexo.

Os valores inseridos abaixo são referentes a tabela ANOVA gerada pelo modelo ajustado. Foi considerada a interação entre os parâmetros tempo de incubação, concentração de FS e a dose de luz irradiada.

Tabela 7 - Resultados da regressão linear feita para a inativação de biofilme de *S. aureus* com os valores de p-valor, valor de F, valor do R^2 .

Fatores	Nível de Significância (p-valor)	Valor de F
(1)Tempo (L)	0,044244	5,461119
Tempo (Q)	0,033575	6,275914
(2) Concentração (L)	0,387673	0,824000
Concentração (Q)	0,068763	4,270031
(3)Dose (L)	0,539606	0,406551
Dose (Q)	0,017043	8,523955
$R^2=0,75003$		

(L)= termo linear da equação da regressão múltipla;

(Q)= termo quadrático da equação da regressão múltipla;

Fonte: Elaborada pela autora

Os valores em vermelho são os mais significativos de acordo com a análise feita pelo teste de ANOVA. A tabela 7 mostra os parâmetros que mais influenciam no fator resposta (quantidade de células). Os valores com p-valor < 0,05 são os que mais influenciaram na resposta. A análise dos dados revela que a dose de luz e o tempo de incubação são as variáveis mais influentes na quantidade de colônias presentes no biofilme. A interação entre os parâmetros não influencia positivamente nos experimentos, logo a interação é baixa. Logo, as interações entre as variáveis foram descartadas e o modelo reajustado. Com o modelo ajustado o R^2 que melhor ajusta o modelo foi encontrado. O valor de R^2 calculado pelo programa foi de 0,75003. Este valor de R^2 é razoável, mostrando um ajuste dos dados em relação a resposta. Este parâmetro diz que aproximadamente 75% dos dados experimentais foram explicados pela equação da regressão linear.

O diagrama de Pareto, ilustrado na Figura 36 descreve as variáveis que mais influenciaram nos experimentos por ordem de relevância.

Figura 36 - Diagrama de Pareto do 3º planejamento experimental. A variável dose de luz foi a que mais influenciou nestes experimentos, permanecendo na primeira coluna do gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

O diagrama de Pareto mostra que a dose de luz seguida pelo tempo de incubação foram as variáveis que mais influenciaram o fator resposta, isto é, na quantidade de células contadas nos grupos TFD. Quanto maior a dose de luz irradiada na amostra e maior o tempo entre a curcumina e o biofilme, menor a quantidade de colônias presentes no biofilme.

A Figura 37 ilustra a relação entre valores experimentais e valores observados.

Figura 37 - Valores experimentais da quantidade de colônias em relação aos valores preditos pelo software Statistica referentes a equação de regressão linear do modelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico traçado sobre os valores experimentais e preditos mostra que as respostas experimentais para a quantidade de colônias apresentam altos valores correlacionados, próximos aos valores gerados pela equação empírica, com valor de $r=0,75$. Logo, o ajuste o modelo proposto explica 75% dos dados obtidos nos experimentos. O valor de r foi um valor aceitável para explicar os dados obtidos nos experimentos.

Para ilustrar os efeitos das três variáveis no fator resposta em um intervalo de dose de luz (J/cm^2), tempo de incubação (h) e a concentração de FS (mg/L) foram plotadas superfícies de resposta entre as variáveis. A Figura 38 mostra a superfície de resposta da quantidade de colônias em dois intervalos: de 20 a 60 min no tempo de nebulização e 10 a 90 J/cm^2 . A superfície de resposta segue a equação da regressão linear ajustada.

As Figura 38, 39 e 40 mostram as superfícies de resposta da quantidade de colônias das três variáveis. A superfície de resposta segue a equação da regressão linear ajustada. Para cada superfície plotada segue sua equação de regressão.

Figura 38 - Superfície de resposta entre as variáveis concentração e tempo de incubação em relação ao fator resposta.

Fonte: Elaborada pela autora.

A equação de regressão linear que descreve a superfície é:

$$z = 1873,653 + 1138,42786x - 314,90474x^2 + 2172,1539y - 1039,0016y^2 + 282,747$$

Figura 39 - Superfície de resposta entre as variáveis dose de luz e tempo de incubação em relação ao fator resposta.

Fonte: Elaborada pela autora.

A equação de regressão linear que descreve a superfície é:

$$z = -1873,63 + 1138,42786x - 314,90474x^2 + 18,3037y - 0,2961876y^2 + 1133,1523$$

Figura 40 - Superfície de resposta entre as variáveis concentração e dose de luz em relação ao fator resposta.

Fonte: Elaborada pela autora.

A equação de regressão linear que descreve a superfície é:

$$z = -1873,63 + 2172,1539y - 1039,0016y^2 + 18,3037y - 0,2961876y^2 + 1017,237$$

Com a análise dos resultados do planejamento experimental, pode-se notar que a variável dose de luz e tempo de incubação, que é o tempo de contato entre o FS e o biofilme foram as variáveis mais influentes na morte celular. O tempo de incubação era o parâmetro esperado por ser o mais influente nos resultados de inativação. Entretanto, pelo problema de penetração do FS no biofilme, a dose de luz foi a variável mais influente nos resultados. Este resultado é explicado pela característica do biofilme apresentar uma camada da matriz extra polimérica e várias células juntas, a penetração da curcumina pode ser mais lenta em relação a células planctônicas. (100) Se a interação entre as células de *S. aureus* e o FS não ocorrer, a TFD tem chances improváveis de ocorrer.

Os gráficos referentes as Figuras 41, 42, 43 e 44 são dos experimentos descritos na Tabela 6. Os gráficos foram separados e analisados de acordo com a dose de luz que cada grupo foi irradiado. O gráfico 41 são os grupos que receberam uma dose de energia igual a 15 J/cm². O gráfico 42 são os grupos que receberam 0,6; 30 e 59,4 J/cm² e todos com a mesma concentração igual a 1 mg/mL. No gráfico 38 todos os grupos foram iluminados com 30 J/cm². Os grupos presentes no gráfico 44 foram irradiados com 50 J/cm².

Figura 41 - Gráfico dos experimentos 1, 2, 3 e 4 do planejamento experimental. Dose de luz de todos os experimentos foi de 15 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 42 - Gráfico dos experimentos 9, 10, 13, 14, 15 e 16 do planejamento com concentração de 1 mg/mL e as doses de luz foram: o grupo 13 recebeu 0,6 J/cm², o grupo 14 recebeu 59,4 J/cm² e os grupos 9, 10, 15 e 16 receberam uma dose total de 30 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 43 - Gráfico dos experimentos 11 e 12 do planejamento experimental. Dose de luz dos grupos foi de 30 J/cm². Concentração do grupo 11 foi de 0,58 mg/mL e do grupo 12 a concentração foi igual a 1,42 mg/mL. *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 44 - Gráfico dos experimentos 5, 6, 7 e 8 do planejamento. Dose de luz dos grupos TFD foi 50 J/cm². Os tempos de incubação dos grupos 5 e 7 foram 1h30min, e dos grupos 6 e 8 2h30min. Os grupos 5 e 6 testaram a concentração de 0,75 mg/mL e os grupos 7 e 8 testaram 1,25 mg/mL. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 45 mostra os resultados referentes a este experimento de 7 dias.

Figura 45 - Quantidade de células vivas do biofilme de *S. aureus* desenvolvido em período de 1 a 7 dias no TEH tratado com CSV com 1,25 mg/mL durante 2 horas com uma dose total de 50 J/cm². *N=9 em cada grupo descrito* *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com a melhor condição do planejamento experimental, isto é, o grupo que teve uma maior redução de células de *S. aureus*, foi escolhido para ser aplicado em biofilme desenvolvido de 1 a 7 dias no TEH. O intuito do experimento é simular o tempo real do uso deste tubo em um ambiente hospitalar. O TEH pode ficar instalado em um período máximo de 7 dias. Com o melhor grupo TFD do planejamento o experimento foi planejado, com 2h30 de tempo de incubação, 1,25 mg/mL de concentração de CSV e 50 J/cm² de dose de luz. A figura 33 mostra os resultados referentes a este experimento de 7 dias. O meio de cultura foi trocado diariamente de todos os grupos testado. Grupos iluminado foi irradiado com a Biotable em 450 nm a 35 mW/cm² durante 24min10s.

Os resultados foram significativos até o período de 4 dias de experimento. De acordo com estudos prévios, a probabilidade do paciente com a ventilação mecânica instalada é do aparecimento da PAV e 48 a 72h no tubo. (36,101) O período de 24 horas é considerado um biofilme desenvolvido de *S. aureus*.(102) O tempo da sua instalação e colonização ocorre bem rapidamente.

3.5.7 Teste resistência Microbiana

Os resultados do teste de resistência realizado com *S. aureus* estão descritos no gráfico da Figura 39. Teste que levou dois dias de experimento, grupos teste tratados foram incubados com CSV com concentração de 1,25 mg/mL durante duas horas de incubação e iluminados na Biotable com 35 mW/cm² totalizando 50 J/cm². O grupo TFD de dois dias recebeu o tratamento apenas no primeiro dia. O segundo dia de experimento foi apenas plaqueado e os resultados estão no gráfico 46.

Figura 46 - Quantidade de células vivas do biofilme de *S. aureus* desenvolvido em TEH durante 24 e 48h utilizados para o teste de resistência bacteriana após a aplicação de PDT. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora em 24 horas a TFD foi parcialmente eficaz, algumas colônias restantes no tubo permaneceram e cresceram em um tempo de 48 horas, porém com crescimento bem baixo. Como o plaqueamento do grupo 24h foi feito em seguida da iluminação, pode ser que tenha ocorrido algum dano celular que levou a célula a morte, por após um tempo grande de intervalo. O que pode se observar é que a TFD não induziu a resistência bacteriana no biofilme de *S. aureus*.

O último teste realizado com células de *S. aureus* planctônicas tratadas com solução de curcumina sintética foi um teste com iluminação constante em células planctônicas. Os LED's tinham comprimento de onda de 450 nm e uma potência bem baixa, 4 mW/cm² cada um. Em cada poço da placa de 24 poços foi preenchido por 900µL de BHI mais 100 µL do inóculo. Nos grupos tratados foi acrescentada a solução de curcumina a 1,25 mg/mL e iluminado durante 48 horas constantemente. A iluminação consistia em um conjunto de uma placa com 6 Led's separadamente A descrição do experimento foi um grupo um grupo controle sem tratamento, teve uma duração de 48 horas. Os resultados estão na Figura 47.

Figura 47 - Crescimento planctônico de *S. aureus* desenvolvida durante 24 horas na placa de 24 poços tratado com CSV com concentração de 1,25 mg/mL durante 24 horas irradiados por um conjunto de 6 Led's com irradiância 4 mW/cm² em cada led com um total de 345,6 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

No primeiro dia de experimento já se notou uma grande redução de células nos grupos controle luz e TFD. Em dois dias os grupos estavam com uma quantidade de ufc/mL bem próxima, então o experimento foi encerrado. A curcumina sintética, por ser composta apenas pela molécula de curcumina, é menos estável em solução durante longos períodos. Ao longo de 24 horas a molécula provavelmente estava degradada. Embora a irradiância de cada led ser baixa (4 mW/cm^2), ao longo de 24h o total foi de $345,6 \text{ J/cm}^2$ que é muita energia dada ao sistema em cada poço. Provavelmente a luz foi a principal causadora da morte celular nos grupos controle luz e TFD.

3.6 CONCLUSÃO

Neste capítulo as principais conclusões foram:

- Solução de curcumina natural em baixas concentrações inativou 100% das células de *E. coli*;
- Solução de curcumina sintética foi tve resultados melhores para inativação do biofilme de *S. aureus*;
- CSS foi a curcumina que teve melhores resultados de inativação, com redução de 92% de células com melhor grupo testado com os parâmetros: concentração de $1,25 \text{ mg/mL}$, 2h de incubação e com uma dose de energia de 50 J/cm^2 .
- O uso do sonicador acoplado a TFD reduziu 100% as células do biofilme de *S. aureus*;
- O planejamento experimental indicou que a dose de luz, seguida pelo tempo de incubação e concentração de FS são as variáveis que mais influenciaram neste experimento.

Com a inativação fotodinâmica otimizada, o próximo passo da pesquisa foi testar uma nova entrega do fotossensibilizador ao tubo, em uma tentativa de aproximar os experimentos da rotina da clínica em uma UTI. A nebulização foi a forma encontrada para realizar os experimentos.

CAPÍTULO 4 NEBULIZAÇÃO DA CURCUMINA NO TEH

4.1 INTRODUÇÃO

Um paciente acamado pode apresentar vários equipamentos acoplados como por exemplo, monitor para batimentos cardíacos, oxímetro de pulso, sonda vesical e naso-enteral, máscara, cateter de oxigênio e TEH. O ventilador mecânico associado ao tubo apresenta um reservatório utilizado para introduzir fármacos por meio de nebulização em pacientes acamados. Adicionar a curcumina ao nebulizador é uma forma de introduzir a curcumina ao tubo para posterior iluminação. Objetivando futuras aplicações clínicas, é possível que o FS siga o mesmo trajeto do medicamento utilizado em ventiladores mecânico, percorrendo a orofaringe atingindo o TEH.

Assim, o capítulo 3 discute uma nova forma de entrega do FS ao TEH. A metodologia foi realizada usando a curcumina sintética nebulizada e compara com os melhores resultados obtidos com os capítulos anteriores. Os experimentos foram traçados com a nebulização no tubo com a curcumina antes e depois da formação de biofilme de *S. aureus*. Testes de cinética foram traçados nos tubos nebulizados ou não, para analisar a diferença da capacidade de crescimento microbiano. Para otimizar os resultados, foi também realizado um segundo planejamento experimental variando dois parâmetros: tempo que o FS foi nebulizador nos tubos e a dose de luz, analisando a interação dessas variáveis.

Além disso, foram também realizados experimentos dentro desse contexto variando a concentração da curcumina, o tempo que os tubos foram nebulizados e a dose de luz. Com intuito de otimizar as variáveis do processo, dois planejamentos experimentais foram realizados, um com desenvolvimento do biofilme de *S. aureus* no tubo sem tratamento e um segundo com desenvolvimento do biofilme sobre o tubo pré-tratado com curcumina nebulizada. Os parâmetros variados foram dose de luz e tempo de nebulização do PVC.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo Geral

Usar a nebulização como uma forma de entrega e incorporação do fotossensibilizador em TEHs.

4.2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os resultados com curcumina nebulizada e em solução;
- Otimizar a distribuição do FS no tubo;
- Otimizar a interação entre a curcumina e o tubo;
- Nebulizar a curcumina antes da formação do biofilme e após a formação do biofilme

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Pré inóculo

Protocolo descrito na seção 2.1 do capítulo 2.

4.3.2 Formação do Biofilme

Protocolo descrito na seção 2.2 do capítulo 2.

4.3.3 Nebulização do Tubo

Os estudos sobre nebulização foram realizados em um inalador compressor comercial da marca Omron (modelo NE-C801) e produz uma névoa com taxa de nebulização de 0,3ml/min constante e tamanho de partícula de 3 μ m. O volume da formulação foi padronizado para 7mL de solução no reservatório. A figura 43 ilustra o nebulizador utilizado nos experimentos com a nebulização dos tubos.

Figura 48 - Imagem do nebulizador usado.

Fonte: OMRON...(103)

4.3.4 Inativação Fotodinâmica

4.3.4.1 Teste Cinética dos TEH com Curcumina Nebulizada

Os testes de cinética foram adaptados de um estudo testando nanopartícula com prata funcionalizada com potencial bactericida(104). Os métodos de preparo do experimento foram adaptados, porém seguindo as mesmas formas de medida, absorbância pelo Espectrofotômetro UV-VIS. As amostras foram lidas no comprimento de onda de 600 nm, como base na literatura, e foram tiradas em tempos diferentes de todos os grupos para comparar a absorbância entre os grupos em relação ao tempo.

Inicialmente testes de cinética adaptados foram traçados em dois tubos diferentes: em tubo sem tratamento e um tubo previamente tratado com curcumina nebulizada.

Um volume igual a 50 mL de BHI líquido e 1 μ L de inóculo foram misturados em um tubo falcon. Dois tubos foram cortados em um comprimento igual a 4 cm. Um pedaço foi nebulizado e o outro não. Tres grupos foram delinados:

- controle (tubo sem tratamento),
- grupo escuro (tubo com a curcumina nebulizada)
- grupo TFD (tubo com curcumina nebulizada e iluminado durante o experimento).

A iluminação ocorreu dentro do TEH inserido no meio de cultura líquido, por meio da ponteira emitindo em 450 nm com 70 mW/cm².

Amostras de 100 μ L foram retiradas dos meios contendo os tubos e colocadas em cubetas de 1 cm de largura para serem lidas no Espectrofotômetro de UV-VIS líquido. O experimento teve duração total de 10 horas e as medidas foram realizadas em 0, 10, 20, 35, 60, 120, 180, 330, 390, 540 e 600 minutos. As figuras 49 e 50 são esquemas do tubo nebulizado antes e depois da formação do biofilme no tubo.

Figura 49- Esquema da metodologia de nebulizar o tubo e usá-lo para desenvolver o biofilme sobre o mesmo. A iluminação veio em seguida ao crescimento do biofilme.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 50 - Esquema da metodologia desenvolver o biofilme no tubo e de nebulizar a curcumina sobre o tubo com biofilme. A iluminação veio em seguida ao crescimento do biofilme.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.4.2 Teste de Formação do Halo

Um tubo nebulizado com CSV com concentração de 5 mg/mL foi colocado em uma placa de Petri previamente contaminada com pré-inóculo de *S. aureus*. O tempo de contato entre o tubo nebulizador e a placa contaminada foi de 1 hora. Os resultados foram analisados a partir do tamanho do halo formado a partir da coloração da placa contaminada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.4.3 Planejamento experimental

Protocolo descrito na seção 3.4.9 do capítulo 3.

A Tabela 7 descreve os experimentos com suas variáveis e níveis.

O segundo planejamento testou tubo com a curcumina nebulizada e formação do biofilme após este tratamento. O terceiro planejamento contou com os tubos endotraqueais com biofilme de *S. aureus* formado e depois tratado com a curcumina nebulizada. A ideia foi comparar estes dois resultados e observar se a curcumina nebulizada no tubo alteraria a formação do biofilme neste tipo de tubo.

O planejamento fatorial completo do tipo 2^2 (2 fatores) com 2 pontos centrais por planejamento composto central. Duas variáveis foram escolhidas para serem testadas, o tempo de nebulização e dose de luz recebida pela amostra testada.

A concentração de curcumina foi 5 mg/mL.

Seguindo os mesmos protocolos da seção 3.8 descrita no capítulo 2 em Materiais e Métodos, o planejamento foi traçado e seguido de acordo com o software. A Figura 44 descreve a matriz elaborada pelo programa Statistica®, organizando os experimentos.

-1	-1	}	Planejamento fatorial 2^2
-1	+1		
+1	-1		
+1	+1		
0	0	}	Pontos Centrais
0	0		

Figura 51 - Matriz elaborada pelo software Statistica® com planejamento fatorial do tipo 2^2 (2 fatores) com dois pontos centrais realizado por planejamento composto central

Fonte: Elaborada pela autora.

As variáveis estudadas foram:

Y_1 : Tempo de nebulização (min)

Y_2 : Dose de luz (J/cm^2)

A Tabela 8 apresenta os intervalos de cada variável testados.

Tabela 8 - Parâmetros e intervalos usados no primeiro planejamento experimental fatorial (2 pontos centrais) usados no planejamento composto central utilizando solução de curcumina sintética Vetec e desenvolvendo biofilme em *S. aureus* durante 24 horas.

Variáveis Independentes	-1	0	+1
Y₁	25	40	55
Y₂	20	50	80

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos gerados pelo software Statística[®] estão contidos na Tabela 9, sendo que cada linha corresponde a um experimento, de acordo com seu nível e suas variáveis, com os valores reais e codificados. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 9 - Matriz do Planejamento experimental com as variáveis codificadas e reais de cada experimento.

Experimento	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	Y ₁	Y ₂	Y ₁	Y ₂
1	-1	-1	25	20
2	-1	+1	25	80
3	+1	-1	55	20
4	+1	+1	55	80
5	0	0	40	50
6	0	0	40	50

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.5 Análise Estatística de Dados

Protocolo descrito na seção 3.4.10 do capítulo 2.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Nebulização Antes da Formação de Biofilme Microbiano

4.4.1.1 Testes Cinética Biofilme não Nebulizado

Os primeiros resultados foram os testes de cinética do desenvolvimento do biofilme no tubo de PVC com e sem curcumina incorporada por meio da nebulização. O crescimento do *S. aureus* foi determinado por meio de densidade ótica, ou seja, correspondentes a concentração de micro-organismos, em tempos diferentes e em medidas de absorbância pelo espectrofotômetro de UV-Vis.

Os experimentos foram realizados com resultados em contagem de ufc/mL e em medidas de absorbância pelo Espectrofotômetro de UV-Vis.

O gráfico da Figura 52 descreve a cinética de formação do biofilme de *S. aureus* no TEH durante 9 dias.

Figura 52 - a) Teste de cinética do Biofilme de *S. aureus* em TEH sem tratamento durante 11 horas. Gráfico plotado pelo programa Origin®, com P valor<0,05 e valor de Chi-quadrado= 0,01207; b) Teste de cinética do Biofilme de *S. aureus* em TEH sem tratamento durante 11 dias. Gráfico plotado pelo programa Origin®, com P valor<0,05 e valor de Chi-quadrado=0,103.

Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento de crescimento da bactéria gram positiva foi exponencial, o que já era esperado, principalmente se tratando de biofilme(105). A exponencial plotada obedece a seguinte equação (9) que descreve a exponencial do Gráfico 52a sobre o crescimento microbiano no TEH em 9 horas:

$$z = A_1 e^{\frac{x}{t_1}} + y_0 \quad (09)$$

A tabela 10 descreve os valores dos parâmetros da equação e o valor de F calculados pelo programa Origin®.

O comportamento de crescimento da *S. aureus* já se inicia exponencialmente, como era de se esperar, tanto em um comportamento analisado ao longo das primeiras horas como ao longo dos dias. No início do desenvolvimento, células planctônicas e células que se aderem em uma superfície tem um comportamento de crescimento exponencial. Este resultado também foi observado em outros estudos sobre a curva de crescimento da *S. aureus* e *E. coli* (106).

O programa descreve a equação que melhor se ajusta nas curvas encontradas:

$$z = A_1 e^{\frac{x}{t_1}} + y_0 \quad (10)$$

Os valores dos parâmetros da equação e o valor de F foram calculados pelo programa Origin® do gráfico44a) estão na tabela 10. Os valores dos parâmetros da equação e o valor de F foram calculados pelo programa de acordo com gráfico 52b estão na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores dos parâmetros calculados pelo programa Origin®. O valor de R² é de 0,9.

Parâmetros	Valores
A ₁	0,12458
t ₁	-4,82631
Y ₀	0,0721

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 - Valores dos parâmetros calculados pelo programa Origin®. O valor de R² é 0,49.

Parâmetros	Valores
A ₁	0,19786
t ₁	9,29953
Y ₀	0,25514

Fonte: Elaborada pela autora.

O valor χ^2 calculado $< \chi^2$ predito que é igual a, logo o modelo proposto é aceitável.

4.4.1.2 Teste de Cinética do TEH Nebulizado

Um teste traçado foi um para o estudo da cinética do biofilme desenvolvido no TEH com a interação com este tubo pré-tratado com curcumina nebulizada.

O gráfico descrito na Figura 53 ilustra os resultados com os 3 grupos com os tubos em diferentes condições. Cada linha tem uma cor diferente, especificando seu grupo de origem. Para cada conjunto de dados foi predita uma equação que origina a curva traçada, para que o comportamento bacteriano em cada tipo de experimento seja testado. O experimento teve duração de 10 horas e as medidas foram realizadas em 0, 10, 20, 35, 60, 120, 180, 330, 390, 540 e 600 minutos. Este teste é o 53° e seus resultados estão expostos no gráfico a seguir.

Figura 53 - Experimento sobre a cinética entre os tubos tratados e não tratados durante 10 horas, com CSV nebulizada com 5 mg/mL de concentração e iluminação pela ponteira(94) com 70 mW/cm² durante 12min30s a 450 nm totalizando 50 J/cm².

Fonte: Elaborada pela autora.

Para descrever as equações que descrevem as curvas foi utilizado uma análise do melhor fitting no software Origin[®]. Foi escolhido o mesmo fitting para todas as curvas para fins de comparação e o que melhor descrevia o comportamento das curvas de acordo com o esperado do experimento. O melhor ajuste, com maior R² foi uma curva com crescimento sigmoidal do tipo dose resposta. A equação que descreve as curvas é descrita como:

$$[]_t = \frac{[]_{max}}{1 + t_0 10^{-t/\tau}} \quad (11)$$

Onde,

$[]_{max}$ = concentração máxima de absorbancia medida

t_0 = porcentagem de crescimento da curva em relação a concentração

$\tau=1/p \Rightarrow$ taxa de crescimento a partir da concentração

A equação relaciona a concnetração de células medidas ao longo do tempo. Se os limites da equação forem explorados, no limite do tempo tendendo ao infinito a equação permanece:

$[]_{max} = []_t$, onde na equação a concnetração máxima é proximo a 0,4, medida real e predita pelo modelo sigmoidal.

No limite do tempo muito pequeno, a equação fica:

$\frac{\square_{max}}{\square_0} = 1 + t_0$, que significa a porcentagem de crescimento celular a partir da concentração inicial.

A tabela 12 descreve os parâmetros dados pelo modelo ajustado pelo software.

Tabela 12 - Valores dos parâmetros calculados pelo programa Origin[®] para os modelos de curvas de crescimento em cada grupo do experimento de cinética de crescimento bacteriano no TEH.

Parâmetros de avaliação do Modelo	Controle	Escuro	TFD
χ^2 reduzido	4,725E-6	2,887E-5	1,12925E-4
R ²	0,99984	0,99926	0,99764
R ² ajustado	0,9998	0,99908	0,99705

Fonte: Elaborada pela autora.

Os parâmetros respectivos para a curva de cada modelo são:

Curva do grupo controle:

- $\square_{max} = 0,4082 \pm 0,00289$
- $t_0 = 479,244 \pm 0,9077$
- $1/\tau = 0,01262 \pm 3,2041E-4$

Curva do grupo escuro:

- $\square_{max} = 0,4145 \pm 0,00486$
- $t_0 = 402,792 \pm 2,4457$
- $1/\tau = 0,0107 \pm 5,5094E-4$

Curva do grupo TFD:

- $\square_{max} = 0,42398 \pm 0,00656$
- $t_0 = 357,2748 \pm 2,9685$
- $1/\tau = 0,01466 \pm 0,00137$

Observa-se um bom ajuste entre os dados e o modelo. Embora os grupos tenham o mesmo tipo de comportamento sigmoidal, o grupo controle tem apenas como fatores limitantes a quantidade de alimento contido no meio de cultura e o espaço que influenciam no crescimento bacteriano. O grupo TFD, além do meio de cultura e espaço, conta também com a presença da curcumina e da luz. Estes fatores influenciaram no experimento de forma que a quantidade de células de *S. aureus* tiveram um maior crescimento nos primeiros minutos, porém estabilizou mais rápido em comparação com o grupo controle. Logo, pode-se dizer que a ação fotodinâmica influenciou no comportamento microbiano no experimento realizado. Uma hipótese para o comportamento da grupo TFD seria que as moléculas de curcumina mais superficiais podem ter sido liberadas aos poucos (porque não se observou uma grande mudança na quantidade de células) e começar a interagir com as colônias próximas ao tubo. Com a aplicação da luz danos podem ser causados na membrana das células, diminuindo a taxa do seu crescimento. Um estudo com funcionalização e partículas de prata (potencial germicida) em zeólito mostrou grande potencial quando testado in vitro em células

planctônicas de *Candida albicans*.(104) Os testes deste estudo foram adaptados para o trabalho em questão.

A absorbância ao longo do tempo aumentou em todos os grupos analisados, como era esperado. Dos tempos 0 a 180 minutos, o grupo PDT se manteve, na maior parte do tempo, com uma menor quantidade de concentração celular. Após 3 horas aumentou seu crescimento e se manteve parecido com os outros grupos.

Medidas de pH foram realizadas durante esse experimento. Assim, analisar se a curcumina e a luz foram responsáveis pela mudança no microsistema e se o comportamento das curvas de crescimento estava relacionado a esta mudança foi realizada com o auxílio do gráfico presente na Figura 54.

Figura 54 - Medidas de pH durante o experimento de cinética durante 3 horas. As medidas foram realizadas com um pHmetro.

Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliando as medidas de pH em 3 horas não se observou uma mudança alta nos valores de cada grupo. Entretanto, foi possível observar a maior variação de pH no grupo controle, o que significa que em cada fase de crescimento as bactérias apresentam produtos diferentes que mudam o pH do meio. Isso não ocorre com a presença da curcumina no meio impedindo assim a proliferação dessas.

4.4.1.3 Planejamento Experimental

Os grupos TFD foram iluminados pela ponteira (94) com irradiância de 70 mW/cm^2 .

O segundo planejamento foi feito com tubo já nebulizado e sobre este tubo pré-tratado foi adicionado as células de *S. aureus* para o crescimento do biofilme.

No terceiro planejamento seguiu com os mesmos experimentos, sendo que a diferença foi o tratamento do tubo. Primeiro o biofilme foi desenvolvido e após 24h o tubo foi nebulizado de acordo com as variáveis do planejamento. A Tabela 13 descreve as variáveis escolhidas nos dois planejamentos experimentais

Tabela 13 - Experimentos do 2º planejamento experimental com os parâmetros tempo de nebulização, dose de luz e fator resposta de cada experimento. O fator resposta é média da quantidade de colônias contadas em cada grupo.

Experimento	Y ₁	Y ₂	Resposta (Y)
1	25	20	90
2	25	80	27
3	55	20	69
4	55	80	16
5	19,15	50	60
6	136	50	92
7	40	7,7	78
8	40	92,3	28
9	40	50	35
10	40	50	44

Fonte: Elaborada pela autora

A tabela 13 descreve todos os experimentos do 2º planejamento experimental, as variáveis e seus respectivos valores resposta. A partir desta tabela com os valores de cada variável e seu valor resposta, os dados são adicionados no software Statistica®. O modelo ajustado foi de Planejamento Fatorial Completo do tipo 2ⁿ onde n=2 neste planejamento.

A partir do teste t-student foi gerada a equação de regressão linear eliminando dados com nível de significância acima de 5%. A interação entre as variáveis tempo e dose de luz (xy) foi descartada devido a baixa influência no fator resposta. A partir dos ajustes foi obtida a seguinte equação:

$$z = 116,5 - 0,533333x - 0,9666667y + 0$$

Analisando a equação, aumentando a dose de luz (y) reduz mais o valor de z, que é o fator resposta do modelo.

Os valores inseridos abaixo são referentes a tabela ANOVA gerada pelo modelo ajustado. Foi considerada a interação entre os parâmetros tempo e dose.

Tabela 14 - Resultados da regressão linear feita para a inativação de biofilme de S. aureus com os valores de p-valor, valor de F, valor do R².

Fatores	Nível de Significância (p-valor)	Valor de F
(1) Tempo	0,163031	3,38575
(2) Dose	0,006871	44,49082
R ² =0,94103		

Fonte: Elaborada pela autora

A Tabela 14 mostra os parâmetros que mais influenciam no fator resposta (quantidade de células). Os valores com p-valor < 0,05 são os que mais influenciaram na resposta. A análise dos dados revela que a dose de luz é a variável mais influente na quantidade de colônias presentes no biofilme. A interação entre o tempo e a dose é muito baixa, não influenciando diretamente os resultados de resposta procurada. Logo, a interação foi

descartada e o modelo reajustado. Com o modelo ajustado o R^2 que melhor ajusta o modelo foi encontrado. O valor de R^2 calculado pelo programa foi de 0,94103, mostrando um alto ajuste dos dados em relação a resposta. Este parâmetro diz que aproximadamente 94% dos dados experimentais foram explicados pela equação da regressão linear.

O diagrama de Pareto, ilustrado na Figura 55 descreve as variáveis que mais influenciaram nos experimentos.

Figura 55 - Diagrama de Pareto do 2º planejamento experimental. A variável dose de luz foi a que mais influenciou nestes experimentos, permanecendo na primeira coluna do gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

O diagrama de Pareto mostra que a dose de luz foi a variável que mais influenciou no fator resposta, isto é, na quantidade de células contadas nos grupos TFD. Quanto maior a dose de luz irradiada na amostra, menor a quantidade de colônias presentes no biofilme.

O gráfico 56 mostra a relação entre os valores préditos e os valores experimentais do fator resposta do modelo.

Figura 56 - Valores experimentais da quantidade de colônias em relação aos valores preditos pelo software Statistica referentes a equação de regressão linear do modelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico traçado sobre os valores experimentais e preditos mostra que as respostas experimentais para a quantidade de colônias apresentam altos valores correlacionados, próximos aos valores gerados pela equação empírica, com valor de $r=0,94$. Logo, o ajuste o modelo proposto explica 94% dos dados obtidos nos experimentos. O valor de R corresponde a uma alta correlação entre os dados preditos e experimentais, podendo explicar com maior confiabilidade o comportamento da influencia das vriáveis no fator resposta em relação a cada experimento.

Para ilustrar os efeitos das duas variáveis no fator resposta em um intervalo de dose de luz (J/cm^2) e tempo de nebulização (min). A Figura 57 mostra a superfície de resposta da quantidade de colônias em dois intervalos: de 20 a 60 min no tempo de nebulização e 10 a 90 J/cm^2 . A superfície de resposta segue a equação da regressão linear ajustada.

Figura 57 - Superfície de resposta das variáveis tempo de nebulização e dose de luz no 2º planejamento experimental.

Fonte: Elaborada pela autora.

O melhor resultado, isto é, a resposta com menor quantidade de colônias aparece quando se aumenta o tempo de nebulização e a dose de luz irradiada. Este tipo de comportamento já era esperado devido a outros testes analisados. Na região de menor tempo de nebulização e menor dose de luz apresenta um valor resposta alto. Como o intuito do experimento é atingir menores quantidades células de *S aureus*, esta região foi evitada nos próximos experimentos.

A Figura 58, 59 e 60 mostram os grupos que receberam uma dose total de 20 a 92,3 J/cm^2 com tempo de incubação de 19 a 136 minutos foram divididos por dose de luz recebida. O primeiro gráfico mostra os grupos que receberam uma dose total de 20 e 80 J/cm^2 , o segundo os grupos receberam 50 J/cm^2 e o último 7,7 e 92,3 J/cm^2 .

Figura 58 - Experimentos com a quantidade de células vivas do tubo nebulizado com 5 mg/mL de CSV e formação do biofilme de *S. aureus* após 24 horas. Iluminação com ponteira(94) em 450 nm, com 70 mW/cm² totalizando 20 e 80 J/cm² nos grupos TFD. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 59 - Experimentos com quantidade de células vivas do tubo nebulizado com 5 mg/mL de curcumina sintética e formação de biofilme de *S. aureus* após 24 horas. Iluminação com ponteira de descontaminação da garganta em 450 nm, com 70 mW/cm² totalizando 50 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 60 - Experimentos com quantidade de células vivas do tubo nebulizado com 5 mg/mL de curcumina sintética e formação de biofilme de *S. aureus* após 24 horas. Iluminação com ponteira de descontaminação da garganta em 450 nm, com 70 mW/cm² totalizando 7,7 e 92,3 J/cm² dependendo do grupo TFD. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

O melhor resultado do 2º planejamento experimental que mostra as menores contagens bacterianas é o grupo descrito na Figura 60, com 55 minutos de nebulização entre a curcumina e o tubo, com uma dose total de 80 J/cm² nas amostras. A redução foi aproximadamente 87% de células, um resultado significativo por ser um tratamento com biofilme de *S. aureus* utilizando inativação fotodinâmica.

4.4.1.4 Teste de Formação do Halo

Não houve a formação de um halo ao redor do tubo, isto é, a molécula de curcumina provavelmente não foi liberada para o meio de cultura com colônias, não desempenhando um papel de germicida. O teste não foi usado como parâmetro para os próximos experimentos.

4.4.2 Nebulização Após a Formação de Biobiofilme Microbiano

4.4.2.1 Efeito da nebulização de curcumina em biofilme formado em TEH

O próximo estudo analisou a resposta da curcumina nebulizada em células de *S. aureus* com diferentes tempos de formação no TEH (Figura 61).

Os primeiros testes variaram o tempo de formação no TEH nos tempos escolhidos foram: 1 minuto, 3, 6 e 24 horas.

O tubo foi inserido no pré inóculo e foram retiradas alíquotas nos tempos escolhidos para o plaqueamento. No tubo controle o tubo inserido foi sem tratamento, no grupo escuro foi inserido o tubo nebulizador com curcumina, tubo teste foi inserido o tubo com curcumina nebulizada e iluminado dentro da solução com o inóculo.

A concentração da CSV nebulizada foi de 5 mg/mL e a irradiação foi realizada com a ponteira emitindo em 450 nm durante 12min30, totalizando uma dose de energia igual a 50 J/cm².

Figura 61 - Quantidade de células vivas do biofilme de *S. aureus* desenvolvido em TEH durante 1, 180, 360 e 1440 minutos. Tratamento com CSV nebulizada com 5 mg/mL durante 25 minutos. Iluminação com ponteira(94) com 70 mW/cm² durante 12min30s, totalizando 50 J/ cm². N=9 em cada grupo descrito
*Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados analisados na Figura 61 são comparativos aos experimentos de cinética que tiveram como resultados medidas de absorbância de cada tubo em cada grupo. O resultado com a maior inativação celular foi com o rápido contato entre o tubo com a bactéria e a curcumina nebulizada. O tempo de 1 minuto não é suficiente para as células se aderirem e formarem colônias. O período de 6h foi o segundo melhor resultado com o tubo tratado. Houve uma redução de aproximadamente 76% de células bacterianas em comparação com o controle do mesmo tempo. Este resultado é muito significativo por ser células de um biofilme em formação. Em um 12h as células do biofilme estavam mais maduras e podem ter formado a matriz EPS, que dificulta a ação do FS atingir as células.(105)

As barras de erro dos grupos controle são grandes devido a variância entre os resultados dos dados de contagem de células (UFC/mL) entre os tubos deste grupo. Como o crescimento microbiano neste tubo não é altamente homogêneo causa estas desproporções entre tubos do mesmo grupo. A análise em períodos curtos de tempo pode ter facilitado para o encontro desproporcional entre alguns tubos do grupo controle. Existe um tempo para que o biofilme se estabeleça e permaneça mais homogêneo. Pode ser que no tempo de 12h, como o biofilme de *S. aureus* no tubo não estava maduro o suficiente provocou o aparecimento das altas barras de erro.

Um estudo nebuliza o antibiótico gentamicina em TEH para evitar a formação de biofilmes e causar infecções. Os resultados são animadores, embora não tenham eliminado

por completo a formação de biofilmes nos tubos. Este resultado pode ser comparado com o estudo realizado, embora os grupos não tenham uma diferença alta, podem mostrar comportamento diferentes, indicando que os resultados nas amostras podem se diferir.

A partir da análise da formação do biofilme em tempos diferentes um experimento variando a concentração da curcumina nebulizada foi traçado (Figura 62). As concentrações testes foram: 3, 5 e 8 mg/mL. Com o melhor resultado seguiria para o segundo planejamento experimental. O tempo de nebulização foi durante 25 minutos e a irradiação realizada com a ponteira totalizando uma dose de energia igual a em 50 J/cm².

Figura 62 - Quantidade de células vivas do biofilme desenvolvido por *S. aureus* em 24 horas em TEH. nebulizado por 25 minutos e irradiado por 12min30s totalizando uma dose de 50 J/cm². Iluminação feita por uma ponteira(94) com 70 mW/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

As concentrações de 3 e 8 mg/mL foram citotóxicas para as células do biofilme. Foram descartadas para a continuidade dos experimentos. Embora a maior concentração (8 mg/mL) apresentar uma melhor inativação, também foi a concentração mais citotóxica no escuro. Além da toxicidade, a concentração de 8 mg/mL foi um valor muito alto. No preparo da curcumina diluída houve dificuldades para a solubilização da solução devido ao comportamento entre a molécula de curcumina e a água, uma vez que a água não solubiliza(14,71). A concentração de 3 mg/mL apresentou resultado parecido com a concentração de 8 mg/mL, porém também foi citotóxica no escuro para as células de *S. aureus* anexadas ao tubo.

A concentração de 5 mg/mL ocasionou uma taxa de inativação por volta de 70% nas células de *S. aureus*, embora não tenha sido a melhor concentração no grupo de TFD. Para otimizar os resultados de inativação, esta concentração foi escolhida para a continuidade dos experimentos.

4.4.2.2 Planejamento experimental

O terceiro planejamento experimental seguiu os mesmos parâmetros e a mesma tabela dos experimentos, a diferença foi a formação do biofilme no tubo antes e nebulização da curcumina sintética após. Este teste foi realizado por ser mais próximo da realidade de um paciente acamado. A Tabela 15 mostra os parâmetros de cada experimento e o fator resposta de cada um.

Tabela 15 - Experimentos do 3º planejamento experimental com os parâmetros tempo de nebulização, dose de luz e fator resposta de cada experimento. O fator resposta é média da quantidade de colônias restantes em cada grupo.

Experimento	Tempo nebulização (minutos)	Dose de luz (J/cm²)	Resposta (Y)
1	25	20	434
2	25	80	368
3	55	20	65
4	55	80	45
9	40	50	408
10	40	50	379

Fonte: Elaborada pela autora

A partir da tabela com os valores de cada variável e seu valor resposta, os dados são adicionados no software Statística[®]. O modelo ajustado foi de Planejamento Fatorial Completo do tipo 2ⁿ onde n=2 neste planejamento.

A partir do teste t-student foi gerada a equação de regressão linear eliminando dados com nível de significância acima de 5%. A interação entre as variáveis tempo e dose de luz (xy) foi descartada devido a baixa influencia no fator resposta. A partir dos ajustes foi obtida a seguinte equação:

$$z = 774,25 - 10,316667x - 1,325y + 0$$

Analisando a equação, aumentando o tempo de nebulização (x) reduz-se o valor de z, que é o fator resposta do modelo. Esta análise tem relação com os dados analisados através da comparação entre os grupos controle e TFD entre os grupos de cada experimento testado. O maior tempo de nebulização causou a menor quantidade de colônias. Pode-se observar que pelos dados na tabela 15, que no mesmo tempo de nebulização, alterando a dose de luz irradiada na amostra (20 e 80 J/cm²) não altera significativamente a média entre os dados. Logo, tem-se uma forte hipótese de que o tempo de nebulização é o parâmetro mais influente na resposta.

Os valores inseridos abaixo são referentes a tabela ANOVA gerada pelo modelo ajustado. Foi considerada a interação entre os parâmetros tempo e dose.

A Tabela 16 mostra os parâmetros que mais influenciam no fator resposta (quantidade de células).

Tabela 16 - Resultados da regressão linear feita para a inativação de biofilme de *S. aureus* com os valores de p-valor, valor de F, valor do R².

Fatores	Nível de Significância (p-valor)	Valor de F
(1) Tempo	0,042118	227,8008
(2) Dose	0,160706	15,0303
1 e 2	0,629350	0,4334
R ² =0,77716		

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores com p-valor < 0,05 são os que mais influenciaram na resposta. A análise dos dados revela que o tempo é a variável que mais influenciou no valor da resposta. A interação entre o tempo e a dose é muito baixa, não influenciando diretamente os resultados de resposta procurada. O modelo foi ajustado e foi encontrado o R² que melhor ajusta o modelo. O valor de R² calculado pelo programa foi próximo de 0,8, mostrando um ajuste razoável dos dados em relação a resposta. Este parâmetro diz que aproximadamente 80% dos dados experimentais foram explicados pela equação da regressão linear.

O diagrama de Pareto, ilustrado na Figura 63 descreve as variáveis que mais influenciaram nos experimentos.

Figura 63 - Diagrama de Pareto do 3º planejamento experimental. A variável tempo nebulização foi a que mais influenciou nestes experimentos, estando na primeira coluna do gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

O diagrama de Pareto mostra que o tempo de nebulização foi a variável que mais influenciou no fator resposta. Quanto maior o tempo de nebulização, menor a quantidade de colônias presentes no biofilme.

O gráfico 64 mostra a relação entre os valores préditos e os valores experimentais do fator resposta do modelo.

Figura 64 - Valores experimentais da quantidade de colônias em relação aos valores preditos pelo software Statistica referentes a equação de regressão linear do modelo.

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico traçado mostra que as respostas experimentais para a quantidade de colônias apresentam valores próximos aos valores gerados pela equação empírica, com valor de $r=0,77716$.

Para ilustrar os efeitos das duas variáveis no fator resposta em um intervalo de dose de luz (J/cm^2) e tempo de nebulização (min). A Figura 65 mostra a superfície de resposta da quantidade de colônias em dois intervalos: de 20 a 60 min no tempo de nebulização e 10 a 90 J/cm^2 . A superfície de resposta segue a equação da regressão linear ajustada.

Figura 65 - Superfície de resposta das variáveis tempo de nebulização e dose de luz no 3º planejamento experimental.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além de descrever os parâmetros que levam a uma redução celular de bactérias, o gráfico também revela que quanto menor o tempo de nebulização e menor a dose, maior a

quantidade de colônias na amostra. Logo, para uma otimização dos resultados estes intervalos foram evitados.

A partir da tabela, os gráficos com os resultados do 3º planejamento estão descritos abaixo. A Figura 66 descreve os todos os dados dos experimentos realizados, com seus respectivos grupos.

Figura 66 - Experimentos realizados no 3º planejamento experimental, os grupos e seus respectivos resultados. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliando os resultados do 2º planejamento experimental realizado, a menor resposta celular foi nos grupos com 55 minutos de nebulização da curcumina nos tubos, com as doses de 20 e 80 J/cm². Entretanto a grupo escuro, que testou a toxicidade da curcumina no escuro apresentou uma alta taxa de morte com os grupos TFD. Esta toxicidade pode ser devido a alta concentração usada nos testes (5mg/mL) neste tempo de 55 minutos de incubação. Isto ocorre porque a curcumina possui propriedades antimicrobianas na ausência da luz, principalmente em altas concentrações.

O resultado com os valores das variáveis que mais inativaram as células bacterianas se repetiu em ambos os experimentos dos planejamentos 2 e 3: 55 minutos de nebulização e 80 J/cm², o que mostra consistência entre os dados.

Os testes microbiológicos estão nos gráficos 67 e 68.

Figura 67 - Experimentos com Quantidade de células vivas do biofilme de *S. aureus* em 24 horas e tubo tratado por nebulização, com 5 mg/mL de curcumina sintética. Iluminação com ponteira de descontaminação da garganta em 450 nm, com 70 mW/cm² totalizando 20 e 80 J/cm² nos grupos TFD. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 68 - Experimentos com quantidade de células vivas do biofilme desenvolvido de *S. aureus* em 24 horas e tubo tratado por nebulização, com 5 mg/mL de curcumina sintética. Iluminação com, ponteira(94) em 450 nm, com 70 mW/cm² totalizando 50 J/cm², 7,7 e 92,3 J/cm² nos grupos TFD. N=9 em cada grupo descrito

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise do 3º planejamento apresenta resultados semelhantes ao 2º planejamento. O 4º grupo apresenta maior inativação de *S. aureus* diante os outros grupos.

4.5 CONCLUSÃO

Neste capítulo as principais conclusões foram:

- Por análises no Origin® foi possível traçar modelos de curvas de crescimento entre os grupos testados;
- Através dos testes de cinética entre os grupos controle e teste observou-se uma diferença no comportamento de crescimento entre as curvas;
- Não houve formação do halo na placa de Petri contaminada;
- Tubo nebulizador com curcumina reduziu aproximadamente 76% das células bacterianas em 6h de formação do biofilme;
- CSV nebulizada no tubo nas concentrações de 3 e 8 mg/mL evitaram a anexação de aproximadamente 90% das células de *S. aureus*;
- No 2º planejamento experimental, a dose de luz irradiada na amostra foi a variável mais influente nos resultados da inativação celular;
 - Melhor resultado foi com 55 minutos de nebulização e 80 J/cm², com redução celular de aproximadamente 87%.
- No 3º planejamento experimental, o tempo de nebulização na amostra foi a variável mais influente nos resultados da inativação celular;
- Houve correlações entre os dados preditos e experimentais estudados pelo programa Statística;
 - Melhor resultado foi com 55 minutos de nebulização e 80 J/cm², com redução celular de aproximadamente 90%.

Testada e encontrada uma maneira nova e eficiente de entrega do FS ao TEH, o próximo passo do estudo foi estabelecer uma ligação mais forte e estável entre fotossensibilizadores e o TEH. Logo, foram realizadas reações de funcionalização no TEH, isto é, interações covalentes entre o TEH e os FS e testando sua atividade bactericida.

CAPÍTULO 5 IMOBILIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR NO TEH.

5.1 INTRODUÇÃO

Por meio de uma parceria do laboratório de Biofotônica (grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo) e o laboratório de Catálise e Química e Fina (Instituto de Química, da Universidade de Coimbra) foi iniciado um estudo para imobilização de moléculas fotossensíveis no TEH. Com a molécula do FS interagindo com o polímero de policloreto de vinila (PVC), a TFD poderia atingir o objetivo final de desestruturar biofilmes microbianos além de leva-los a e morte.

Assim, se teve início a interação de três moléculas fotossensíveis ao PVC: meso-tetra hidroxí porfirina, curcumina e meso-tetra-4-hidroxí-fenil-porfirina. Houveram dois tipos de reações para interação entre as moléculas: uma ligação direta e indireta. A ligação direta foi entre o PVC com a meso-tetra hidroxí porfirina e a curcumina. A reação indireta foi entre a com a meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina através de uma base interagindo com o PVC e esta base interagiu com a porfirina, formando ligações covalentes.

Será descrito neste capítulo a a metodologia usada para a funcionalização do TEH, além da caracterização deste e os primeiros resultados com a eficiência antimicrobiana destes tubos.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que utiliza um feixe de elétrons ao invés de fotos que são utilizados na microscopia óptica convencional, permitindo solucionar problemas de resolução relacionados a fonte de luz branca(107). Os tubos com e sem tratamentos foram submetidos a técnica no intuito de verificar as diferenças estruturais entre cada um.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo Geral

Funcionalizar tubos endotraqueais de PVC com fotossensibilizadores, meso-tetra-4-hidroxí-fenil-porfirina, meso-tetra-4-hidroxí-fenil-porfirina e curcumina.

5.2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar os fotossensibilizadores meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina e meso-tetra-4-hidroxí-fenil-porfirina;
- Realizar testes de estabilidade do TEH, com a exposição do tubo com diferentes solventes, variando tempo e temperatura;

- Otimizar a reação de funcionalização do TEH com os fotossensibilizadores, no que se diz a respeito a concentração de reagentes, tipo de solvente, tempo e temperatura;
- Realizar análises de FT-IR e UV-vís dos novos tubos endotraqueais funcionalizados.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram divididos de acordo com a molécula imobilizada no TEH e com os tipos de reação. A síntese das porfirinas e os experimentos serão descritas em detalhes.

Os experimentos com a meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina foram feitos em duas etapas. A primeira etapa consistiu em ligar o TEH com a base etilenodiamina através de um ataque nucleofílico da base ao carbono do PVC e subsequentemente a segunda reação consistiu em ligar a porfirina ao tubo. Os experimentos com a meso-tetra hidroxil porfirina foram feitos em apenas uma etapa.

Por fim serão discutidas as reações da curcumina ligada ao tubo (3.4).

5.3.1 Testes de Estabilidade entre TEH e solventes

Foram realizados testes para analisar a estabilidade do tubo em cada solvente utilizando Dimetilsulfóxido (DMSO), Dimetoxietano (DME), Diclorometano e Tetrahidrofurano (THF) separadamente. Em cada teste foi adicionado o tubo de PVC de 0,33 g em um volume de 10 mL de cada solvente. Avaliou-se as alterações físicas do tubo em sua estrutura.

O teste com o DMSO foi realizado um espectro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) para uma análise mais completa.

5.3.2 Síntese de Porfirinas

5.3.2.1 Síntese da Meso-Tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) Porphirina

A figura 69 é uma representação do mecanismo da reação para formação de uma meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina.

Figura 69- Esquema geral da síntese da meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina. A partir de uma porfirina fluorada, adicionando ácido diclorossulfônico sintetizou-se a meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfuofenil) porfirina a uma temperatura de 100°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 69 representa a adição de meso-tetra (2, 6 difluorofenil) porfirina em ácido diclorossulfônico em um balão durante 3 h a 100 °C. Em seguida, adicionou-se o clorofórmio para remover o excesso de ácido diclorossulfônico. Adicionou-se bicarbonato de sódio até a porfirina apresentar a cor marrom, indicando a neutralização do composto e o término da lavagem. Filtrou-se a solução o clorofórmio foi evaporado até obter a porfirina sólida. A Tabela 17 apresenta a massa utilizada na síntese da porfirina.

Tabela 17 - Síntese meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina

Reagentes	Massa (g)	MM(g/mol)	Mols (n)
Porfirina	0,2	758,66	0,000264
Ácido diclorossulfônico	17,5	116,52	0,15

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.2.2 Síntese da Meso Tetra Hidróxi Porphirina

A figura 70 ilustra o esquema de uma reação para sintetizar um tipo de porfirina.

a) Ácido Acético, Nitrobenzeno, 120°C, 1h

Figura 70 - Esquema da síntese da 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil) porfirina. A reação foi sintetizada com os componentes nitrobenzeno, hidroxibenzaldeído, pirrol e o ácido acético a 120°C. a reação é de condensação para síntese de porfirina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Num balão de 500mL, colocou-se 140mL de ácido acético e 70mL nitrobenzeno, com agitação a 120°C. Ao entrar em refluxo adicionou-se o 3-hidroxibenzaldeído (4,9g, 40mmol) e o pirrol (3mL, 40mmol), e deixou-se a reagir durante 1h. Em seguida removeu-se o ácido acético por evaporação e precipitou-se com n-hexano. Filtrou-se o sólido e purificou-se a porfirina utilizando uma coluna de sílica com CH₂Cl₂: MeOH (4%). A 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil) porfirina foi obtida com um rendimento de 5%. A Tabela 3 descreve as proporções exatas de cada componente usado para a síntese.

Tabela 18 - Dados da síntese da meso-tetra hidroxi porfirina.

Reagentes	Massa (g)	MM(g/mol)	Mols (n)
Ácido acético	147	60,05	2,45
Nitrobenzeno	84	123,06	0,68
Pirrol	2,9	63,09	0,04
3-Hidroxibenzaldeído	4,9	122,12	0,04

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.3 Porfirinas

5.3.3.1 Reação de funcionalização do TEH com 1,2 Etilenodiamina

Foram realizados três experimentos para a otimização da reação (Figura 71). A funcionalização do tubo com a meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina foi realizada em duas etapas: a primeira etapa em uma reação entre a superfície do tubo com a base 1,2

etilenodiamina e a segunda entre o tubo já ligado a etilenodiamina adicionando a meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina, fazendo assim a ligação entre os três compostos.

1ª ETAPA

2ª ETAPA

Figura 71 - Esquema das duas reações feitas no TEH: primeira etapa reação do PVC com a base; segunda etapa realizada entre o tubo com a base ligada covalentemente mais a reação com a porfirina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os experimentos de síntese foram realizados dentro de balões em banho térmico. A figura 72 ilustra a chapa de aquecimento e agitação com banho de parafina a qual foram realizadas as reações.

Figura 72 - Esquema da reação de síntese para funcionalização do PVC.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.3.2 Ligação Dietilamina ao PVC

Baseado nos experimentos supracitados, foi proposto uma relação entre a massa do PVC com o volume de etilenodiamina usados. Abaixo serão detalhados como cada experimento foi executado.

5.3.3.2.1 *EXPERIMENTO 1 (AZ01)*

Vinte e cinco pedaços de TEH foram cortados em 1 centímetro, pesados e colocados em um balão, juntamente com 1,2-etilenodiamina. Para cada uma grama de PVC foram adicionados 20mL de 1,2-etilenodiamina. A reação permaneceu em um banho térmico a 120°C durante 14 horas. Devido a temperatura de ebulição da 1,2-etilenodiamina ser 118°C um condensador foi acoplado ao balão, seguindo o procedimento experimental da literatura. (7)

O solvente foi filtrado e os tubos lavados, utilizando 200mL de água sob agitação mecânica durante 5 a 8 minutos 10 vezes, totalizando 2L de água destilada utilizada. Em seguida, adicionou-se 25mL de metanol, sob agitação durante 30 minutos e, em seguida, adicionou-se mais 25mL de metanol, mantendo sob agitação durante 1 h e 30 min. A secagem foi realizada utilizando uma bomba a vácuo sob um banho térmico a 50 °C para que toda a água fosse retirada dos tubos.

5.3.3.2.2 *EXPERIMENTO 2 (AZ02)*

Seguiu-se o mesmo protocolo do Experimento 1 do tópico 17.3.2.1, alterando parâmetros como a massa de PVC, a massa da etilenodiamina, tempo de reação e a temperatura. Foram usados 4 tubos, durante 7 h de reação, a 70 °C. Após o término da reação os tubos foram igualmente lavados com água destilada e metanol e secados na bomba a vácuo durante 72h.

5.3.3.2.3 *EXPERIMENTO 3 (AZ03)*

Seguiu-se o mesmo protocolo do Experimento 1 do tópico 17.3.2.1, com alterações na massa do PVC, massa da etilenodiamina, tempo de reação e temperatura. A reação ocorreu durante 23h a 40 °C. As lavagens foram igualmente realizadas com água destilada e metanol, nas mesmas proporções que o primeiro experimento. Os tubos foram secados por 72h na bomba a vácuo. A Tabela 19 apresenta os dados das reações e as observações físicas do tubo.

Como é observado na Tabela 2 verificou-se que com uma temperatura de 118°C e 14h de reação os tubos de PVC degradaram (experimento 1 – AZ01). Fizeram-se duas novas reações, uma a 70°C com 7h de reação (experimento 2 – AZ02) e outra com uma temperatura de 40°C e 23h de reação (experimento 3 – AZ03).

As caracterizações dos tubos foram realizadas a partir de análises po FT-IR.

5.3.4 *Reação de Funcionalização do TEH Ligado a 1,2 Etilenodiamina com Meso-Tetra (2, 6, 3-Cloro Sulfluorofenil) Porfírina.*

Nesta segunda etapa, os tubos preparados nos Experimentos 2 e 3, pré-tratados com a base, foram inseridos em reação com a meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfírina. Foram usados os tubos pré-tratados, a porfírina, DMSO como solvente e a trietilamina para neutralizar a reação. A massa da porfírina, o volume de DMSO e trietilamina usados para cada experimento foram proporcionais a massa de PVC de cada um. Para 240 mg de PVC

foram usados 8 mg de porfirina, 1 mL de DMSO e 1 mL de trietilamina. Os experimentos foram realizados em atmosfera inerte a 30° C. A reação levou 3 dias para se completar. Ao término da reação, os tubos foram lavados com acetato de etila para retirar o excesso de porfirina não ligada a etilenodiamina ligada ao tubo. Tubos foram secos na bomba a vácuo e armazenados a atmosfera inerte.

Tabela 19 - Dados da reação 9 após os pré-tratamentos dos experimentos 2 e 3.

EXPERIMENTO	DADOS DA REAÇÃO				
	MM Porfirina (g/mol)	Mol Tubo (n)	Mol Porfirina (n)	Mol Trietilamina (n)	Mol DMSO (mL)
2	1152,69	0,00227	0,00324	0,042	0,088
3	1152,69	0,024	0,000587	0,0445	0,0873

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.5 Reação de funcionalização do TEH com Porfirina Hidroxilada.

5.3.5.1 EXPERIMENTO 1 (AZ07)

Uma estratégia também recorrida foi a de ligar a porfirina diretamente ao TEH. Os reagentes foram um tubo de PVC, carbonato de cézio, DMSO e a porfirina, adicionando-os a um balão, com a proporção de cada um de acordo com a massa dos tubos. Foi feita a mesma proporção entre os mols da base e da porfirina na Tabela 3. A reação foi feita em meio inerte, em um banho térmico a 50° C por 14h. Em seguida, efetuou-se a lavagem com acetato de etila para retirar as porfirinas não ligadas ao tubo.

5.3.5.2 EXPERIMENTO 2 (AZ12)

Repetiu-se o mesmo procedimento do experimento 1, porém foi testado o DME como solvente. A reação ocorreu em um banho térmico a 50° C em meio inerte durante duas horas e meia.

5.3.5.3 EXPERIMENTO 3 (AZ14)

Foi repetido o experimento 1, com DMSO como solvente, porém com um volume de 3 mL. A reação ocorreu a 50 °C em meio inerte durante 11 horas.

5.3.5.4

EXPERIMENTO 4 (AZ16)

Refez-se o experimento 1, de acordo com as mesmas proporções de cada reagente, entretanto com apenas 4 horas de reação, a 50 °C em meio inerte. A partir deste experimento foi repetido o mesmo protocolo para os experimentos AZ18, AZ20, AZ23 e AZ24.

O experimento 1(AZ07), apesar de não ter alterações os tubos podem ter oxidado ou eliminado HCl uma vez que apresentavam uma cor preta. Logo, propôs se realizar os experimentos em atmosfera inerte.

Embora o experimento 3 (AZ14) não tenha nenhuma alteração física, na lavagem com acetato de etila foi observado uma dilatação no tubo. Nos próximos experimentos os tubos foram lavados somente com DMSO, uma vez que na presença dele nenhuma alteração foi observada.

5.3.4 CURCUMINA

A figura 73 ilustra o esquema da reação entre a base CsCO_3 com a curcumina.

Figura 73 - Esquema geral da Reação. A partir da molécula curcumina (CSC) foi proposta uma reação com CsCO_3 , e curcumina e DMSO como solvente da reação. Reação feita com temperatura de 30°C, testando vários tempos de reação.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.4.1

EXPERIMENTO 1 (AZ04)

Em um balão foi adicionado os tubos, a base CsCO_3 , DMSO e a curcumina sintética. A proporção foi calculada de acordo com a massa do PVC. A quantidade de mols da base foi igual a quantidade de mols da curcumina. Ao adicionar todos os componentes a solução passa a ser azul escuro, isto provavelmente demonstra que a reação entre a base e a curcumina já está ocorrendo. A reação ficou em banho térmico a 30°C por durante 17h. Os tubos foram lavados com DMSO e depois metanol. O DMSO foi utilizado para retirar a curcumina não ligada e o metanol para retirar o excesso de DMSO.

5.3.4.2

EXPERIMENTO 2 (AZ06)

Seguindo o protocolo do experimento 1 foi montado o experimento 2, entretanto agora em atmosfera inerte a 30° C por 10 horas.

5.3.4.3

EXPERIMENTO 3 (AZ10)

Os mesmos reagentes foram adicionados, com uma massa menor de curcumina, a 30° C, em meio inerte por 10 horas.

5.3.4.4 *EXPERIMENTO 4 (AZ11)*

Seguiu-se o protocolo do experimento 10, aumenta a quantidade de tubos.

5.3.4.5 *EXPERIMENTO 5 (AZ13)*

O protocolo do experimento 6 foi repetido, com aumento no número de tubos e com 12h de reação a 30° C.

5.3.4.6 *EXPERIMENTO 6 (AZ15)*

Experimento 6 novamente repetido, porém a reação foi parada após 4 horas e os tubos foram lavados seguindo o protocolo do experimento 6. A reação permaneceu em banho térmico a 30° C em atmosfera inerte. Os experimentos 17, 19 e 21 seguiram a mesma metodologia de 4 horas de reação a atmosfera inerte e a 30° C.

5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As eletromicrografias de MEV foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 15kV, corrente de 2,82A e I probe de 200pA. As amostras foram recobertas com 6nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara = $2,00 \times 10^{-2}$ mbar; corrente = 60mA; taxa de deposição 0,60nm/s).

5.3.6 Avaliação dos tubos imobilizados com curcumina por microscopia confocal de fluorescência

A microscopia foi utilizada com intuito de verificar as moléculas de curcumina na superfície do tubo e saber se a molécula foi capaz de a penetrar na estrutura do tubo, se seria mais superficial ou ela estaria mais profundamente. A microscopia por fluorescência confocal de varredura a laser invertido (Zeiss – LSM780, Zeiss, Jena, Alemanha) realizada no Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP). Emissão feita por um laser de Argônio (Ar^+) emitindo em 458 nm operando em modo contínuo (também chamado de *cw*). Para detecção o microscópio conta com fotomultiplicadoras onde o intervalo de aquisição foi fixado através de filtros ópticos. O intervalo foi escolhido de modo a observar a fluorescência da curcumina, fixado na região de 470-700 nm. Neste modo cada pixel da imagem contém a intensidade de fluorescência da região espectral.

Através de cortes confocais foram realizadas imagens tridimensionais de aproximadamente 1 mm de altura (no eixo Z), esta imagem foi formada por 10 cortes de 100 um cada

As amostras analisadas foram cortadas em pequenos pedaços do tubo para que ficassem o mais reto possível e colocados sob uma lâmina e levado ao microscópio. Os grupos analisados foram: tubo sem tratamento, tubo imobilizado com curcumina com e sem iluminação.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Testes de Estabilidade entre TEH e Solventes

A Tabela 20 descreve o tempo de contato com cada solvente e se houveram alterações físicas em cada tubo.

Tabela 20 - Teste estabilidade entre PVC e os solventes testados.

Solventes	Tempo (h)	Observações Físicas
DMSO	6	Sem alterações físicas no tubo.
DME	3	Dilatou o diâmetro do tubo.
Diclorometano	2	Degradou o tubo.
THF	2	Degradou o tubo.
Acetato de etila	1	Dilatou o tubo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 74 ilustra os resultados através do imagens a ação dos solventes após 2h em contato os TEHs.

Figura 74 - Testes de estabilidade do TEH em solventes orgânicos: a) Tubo imerso em tetridrofluorano; b) tubo imerso em diclorometano; ambos os tubos foram dissolvidos pelos solventes testados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os testes indicaram que o tubo é sensível aos solventes orgânicos utilizados. Com exceção do DMSO que não apresentou modificações físicas ao tubo. Portanto, as próximas reações foram realizadas apenas com o DMSO como solvente. Um espectro no infravermelho

foi realizado para comparação entre tubo sem tratamento e o tubo testado com DMSO para comprovar que o solvente não alterou estruturalmente o tubo de PVC. Técnica de FT-IR foi utilizada para as caracterizações de cada componente na interação com o tubo como mostrado na Figura 75.

Figura 75 - FT-IR do TEH sem tratamento (curva preta), FT-IR do tubo tratado com DMSO durante 6 h (curva vermelha).

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro de IV do PVC obtido concorda com o perfil do espectro de um PVC da literatura(108). O perfil do gráfico tratado com DMSO segue parecido com o perfil do TE sem tratamento. Os picos característicos do PVC estão presentes em ambos os gráficos. O pico em 2921 cm^{-1} é característico de ligações de estiramento $-\text{CH}_2$ ou $-\text{CH}$ e em 1200 cm^{-1} é característico de ligações $-\text{C}-\text{C}$. em 951 cm^{-1} pode ser ligações entre $-\text{CH}$. O pico referente a 606 cm^{-1} é da ligação entre $-\text{CCl}$ (108). O pico não característico do PVC que está presente no TE tratado com DMSO é em 3432 cm^{-1} e pode ser referente a um grupo $-\text{OH}$. O pico em 1017 cm^{-1} é característico da ligação $-\text{CH}_3$ do DMSO(109), por isso esta ressaltado no gráfico com a curva em vermelho. O grupo hidroxila não está presente nem no PVC nem no DMSO, podendo ser decorrente da umidade local no momento de realizar a medida de FTIR. Como não houve nenhum comprometimento entre as ligações do polímero, o DMSO foi escolhido como solvente para a continuidade dos experimentos.

5.4.2 Ligação Dietilamina ao Tubo

Tabela 21 descreve as quantidades de cada parâmetro usado e as observações físicas notadas ao longo do experimento.

Tabela 21 - Ligação Dietilamina ao PVC.

EXPERIMENTO	DADOS DA REAÇÃO				CONDIÇÕES REAÇÃO	DA	OBSERVAÇÕES FÍSICAS
	MM Tubo (g/mol)	MM dietilamina (g/mol)	Mol Tubo (n)	Mol dietilamina (n)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	
1	62,5	73,14	0,0016	0,1914	118	14	Tubos degradados
2	62,5	73,14	0,0227	0,272	70	7	Sem alterações físicas
3	62,5	73,14	0,0235	0,2814	40	23	Sem alterações físicas

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 76 ilustra os resultados após a reação entre a base e os TEH em 14h a 118°C. os tubos foram desestruturados.

Figura 76 - Resultado do experimento (AZ01) entre a etilenodiamina e o PVC. Devido a altas temperaturas e tempo de reação os tubos alteraram toda a sua estrutura física.

Fonte: Elaborada pela autora.

De forma a caracterizar os tubos efetuaram-se os respectivos espectros de IR. Verificou-se que comparando os espectros de IR dos experimentos 1, 2, 3 (gráfico 77b.c. d) com o do tubo de PVC (gráfico 77a) ocorreram algumas alterações. Contudo, como foi referido anteriormente na Tabela 21, o tubo obtido no experimento 1 degradou (Figura 76). Sendo que em todos os casos o tubo de PVC alterou a sua cor (transparente para preto) na presença de etilenodiamina, o que pode ser indicativo de oxidação. Por este fato, não se efetuou a segunda etapa da ligação do tubo com a 5,10,15,20-tetra(2,6-difluoro-3-clorosulfluorofenil) porfirina.

Figura 77 - a) FT-IR do TEH sem tratamento; b) FT-IR do TEH com etilenodiamina (AZ01); c) FT-IR do TEH com etilenodiamina (AZ02); d) FT-IR do TEH com etilenodiamina (AZ03).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.3 Reação de funcionalização do TEH ligado a 1,2 Etilenodiamina com meso-tetra (2, 6, 3-cloro sulfluorofenil) porfirina.

Embora a temperatura e o tempo de ambos serem diferentes, os espectros do infravermelho foram parecidos e considerou-se que a porfirina foi incorporada.

5.4.4 Reação de funcionalização do TEH com Porfirina Hidroxilada.

A reação de funcionalização da porfirina hidroxilada em PVC seguiu a mesma reação que a interação entre a curcumina e o PVC. Foram adicionados os componentes: base (CsCO_3), DMSO e a porfirina. Todas as quantidades foram calculadas baseadas na quantidade de mols de cada componente. A Tabela 22 descreve as quantidades de mols de cada componente.

Tabela 22 - Reação PVC e porfirina hidroxilada dos experimentos 7 (50°C, 14h), 12 (50°C, 2h30) e 14 (50°C, 11h).

Experimentos	Mols PVC (n)	Mols CsCO₃ (n)	Mols DMSO (n)	Mols Porfirina (n)	Observações
7	0,00523	0,0000767	0,0141	0,0000545	Tubo ficou preto, porém sem alterações físicas
12	0,0058	0,0000767	0,0192 **	0,0000545	Tubo dilatou.
14	0,00544	0,0000767	0,0422	0,00003683	Sem alterações físicas

(*) e (**) O solvente foi DME.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 23 estão descritos os dados usados dos experimentos que foram melhores sucedidos na imobilização da porfirina com o tubo de PVC. As observações físicas analisadas estão descritas na mesma tabela.

Tabela 23 - Dados dos experimentos 16, 18, 20, 23 e 24.

Experimentos	Mols PVC (n)	Mols CsCO₃ (n)	Mols DMSO (n)	Mols Porfirina (n)	Observações
16	0,0056	0,0000767	0,0422	0,0000368	
18	0,0547	0,00075	0,149	0,00036	Sem alterações físicas
20	0,0224	0,028	0,07	0,000147	
23	0,0589	0,000807	0,141	0,0003875	
24	0,057	0,000798	0,17	0,000383	

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 78 descreve os resultados a partir das análises do FT-IR do TEH sem tratamento e do TEH reagido com a porfirina hidroxilada.

Figura 78 - a) FT-IR do TEH sem tratamento; b) FT-IR do TEH com a porfirina.
Fonte: Elaborada pela autora.

Não houve diferenças significativas entre os tubos de acordo com a análise do infravermelho. Logo, possivelmente a reação não alterou a estrutura do tubo, o que era esperado.

A análise do Espectrofotometro UV-Vis sólido no tubo funcionalizado com porfirina está ilustrado na Figura 79.

Figura 79 - Espectro UV-Vis no estado sólido do tubo ligado a 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil) porfirina (amostras AZ16 e AZ07).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando a Figura 72 verificou-se que o espectro de IR obtido na presença era similar ao obtido na sua ausência de porfirina. Por outro lado, analisando o UV-Vis das duas amostras representadas não se observou a presença das bandas típicas da porfirina (por exemplo a banda Soret a 410nm). Não foi possível concluir se ocorreu a ligação da porfirina ao PVC.

5.4.5 Curcumina

Na Tabela 24 foram apresentadas as observações ocorridas nos experimentos 4, 6, 10 11 e 13 que foram realizados durante 10h.

Tabela 24 - Dados dos experimentos 4, 6, 10, 11 e 13 a 30°C durante 10h.

Experimentos	Mols PVC (n)	Mols CsCO ₃ (n)	Mols DMSO (n)	Mols Curcumina (n)	Observações
4	0,00656	0,0000767	0,0141	0,0000543	Tubo preto e uma pequena parte laranja, sem alterações físicas
6	0,00496	0,0000767	0,0141	0,00001357	Sem alterações físicas
10	0,00541	0,0000767	0,0141	0,00001357	Tubos não homogêneos
11	0,0275	0,000132	0,0718	0,000023	Sem alterações físicas
13	0,027	0,00042	0,0704	0,00007329	Tubo preto, sem alterações físicas

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 25 foram apresentadas as observações ocorridas nos experimentos 15, 17, 19 e 21 que foram realizados durante 4h.

Tabela 25 - Dados dos experimentos 15, 17, 19 e 21 a 30°C durante 4h.

Experimentos	Mols PVC (n)	Mols CsCO ₃ (n)	Mols DMSO (n)	Mols Curcumina (n)	Observações
15	0,028	0,000433	0,0796	0,000076	Sem alterações físicas
17	0,054	0,000832	0,153	0,000147	
19	0,0592	0,000921	0,168	0,000163	
21	0,064	0,0010	0,17	0,000176	

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando as Tabelas 24 e 25 verificou-se que as condições ótimas para efetuar a reação com a curcumina eram 30°C e 4h de reação uma vez que nestas condições não ocorreu nenhum tipo de degradação.

Efetuararam-se os espectros de IR (Figura 80) da curcumina e das amostras presentes na Tabela 25.

Figura 80 - Espectro do FTIR do TE sem tratamento (curva preta), da curcumina (curva vermelha) e do TE imobilizado com curcumina (curva azul). Os espectros foram dispostos no mesmo plano para uma melhor comparação entre cada grupo.

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro de IV obtido da curcumina concorda com os espectros comparados com a literatura (110,111). Os principais picos do PVC aparecem no TE sem tratamento e no TE imobilizado em 2921, 1420, 951 e 608 cm^{-1} . O pico em aproximadamente 1400 cm^{-1} está presente em todas as curvas e pode ser correspondente a ligação $-\text{CH}_2$ que está presente em todos os componentes. Assim como os principais picos da curcumina estão presentes no TE imobilizado, que são os picos entre 3400 e 3250 cm^{-1} , característico do estiramento da ligação $-\text{OH}$ e em 1420 cm^{-1} pela ligação $-\text{OH}$ de um álcool ou do fenol presente na molécula de curcumina. O pico em 1025 cm^{-1} esta presente apenas nos gráficos da curcumina e do TE imobilizado e caracteriza a ligação éter e pode estar relacionada a ligação entre o carbono do PVC ao oxigênio, do grupo fenol da curcumina (112) e esta ligação não está presente no TE sem tratamento. Os picos em 800 cm^{-1} podem ser da ligação éter da curcumina e da ligação $-\text{CH}$ do anel aromático, ambos presentes na molécula de curcumina.

A Figura 81 ilustra o espectro UV-visível realizado do tubo funcionalizado com curcumina e da curcumina para comparação dos picos.

Figura 81 - Espectros de UV-Vis no estado sólido da amostra AZ06(curva preta), curcuma (curva vermelha) e AZ15 (curva azul).

Fonte: Elaborada pela autora.

Com a análise do UV-Vis indicou-se uma possível interação entre o PVC e a curcuma, as microscopias foram realizadas para comprovar se as moléculas de curcuma estavam presentes na estrutura do tubo. A Figura 82 ilustra as imagens realizadas por MEV nos tubos com e sem tratamento.

Figura 82- Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura nos tubos dos grupos controle e teste: a)TEH sem tratamento na região interna; b)TEH pré-tratado com CsCO₃ e DMSO na região interna; c) TEH funcionalizado com curcuma e uma ampliação dentro da imagem com destaque para uma possível ligação entre a curcuma e as moléculas de PVC; d) TEH funcionalizado com curcuma e irradiado pela ponteira por 12min.

Fonte: Elaborada pela autora.

A microscopia de varredura mostrou uma grande diferença entre os tubos com e sem tratamento. O tubo tratado com a base e o solvente DMSO apresentou mudanças em sua estrutura, porém foram alterações diferentes das observadas no tubo com a curcumina imobilizada. A Figura 80c mostra grandes aglomerados que parecem estar interagindo com a superfície do PVC. A Figura 80d ilustra o tubo com curcumina imobilizada já irradiado. Embora não observa-se aglomerados como na figura 80c, nos testes microbiológicos indicam que a curcumina pode ainda estar interagindo com o tubo, uma vez que se observa resultados de inativação mesmo após uma irradiação no tubo com curcumina imobilizado.

5.4.6 Inativação Fotodinâmica

A partir dos tubos funcionalizados, os mesmos foram submetidos a testes *in vitro* para testar a citotoxicidade no escuro e na presença da luz a partir de testes com biofilme de *S. aureus*. A fonte de luz para iluminação dos tubos TFD foram a Biotable e uma ponteira(94) de LED, ambas emitindo em 450 nm, e totalizando 50 J/cm² nos testes microbiológicos.

A Figura 83 descreve os resultados com os grupos controle e teste. Nos grupos controle estão descritos os tubos contendo bactérias, bactéria e luz, tubo funcionalizado com a base de reação da funcionalização (C₃CO₃+DMSO), tubo (C₃CO₃+DMSO) e luz. Os tubos testes são: tubo funcionalizado com curcumina e crescimento de biofilme (escuro), tubo funcionalizado com curcumina com crescimento de biofilme com aplicação de luz (TFD).

Figura 83 – Quantidade de célula vivas do biofilme de *S. aureus* desenvolvido durante 24h em TEH. Cada grupo descrito recebeu um tratamento diferente. Tubos controle com e sem luz estão acima: controle, controle com tratamento com a base e solvente e o tubo apenas com a síntese da curcumina. Os mesmos grupos controle, foram feitos grupos com aplicação da luz. N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

As análises do Figura 83 indicam resultados satisfatórios de morte celular no grupo TFD. De acordo com os resultados do grupo controle, devido a baixa toxicidade no escuro e na presença da luz nestes grupos pode-se afirmar que a curcumina na presença da luz é a

responsável pela inativação fotodinâmica do experimento. O grupo controle com tratamento com base e DMSO teve um grande crescimento do biofilme em sua superfície. Através das análises feitas pelo MEV, o tubo na sua superfície mostra modificações estruturais. A base com o DMSO pode ter danificado a estrutura do tubo na sua região mais superficial, propiciando uma maior anexação células, sendo maior quantidade de células no biofilme. Estas modificações estruturais precisam ser melhor estudadas para que afirmações possam ser feitas a respeito deste grupo.

O próximo teste foi delineado para estudar a estabilidade da curcumina no tubo e sobre a degradação da curcumina e com isso descrever a possibilidade do número de iluminações neste tubo. Com isso aproximar este contexto para a realização de um paciente acamado, no qual seriam realizadas iluminações diárias. O estudo visava verificar quanto qual o tempo máximo que a curcumina teria uma ação fotodinâmica suficiente para reduzir a população bacteriana. O Experimento de 7 dias foi traçado e seus resultados estão no gráfico da Figura 84. O gráfico conta com os grupos controle e teste de cada dia de experimento. As fontes de luz foram a Biotable e a ponteira em 450 nm, com dose total irradiada de 50 J/cm².

Figura 84 - Quantidade de célula vivas do biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TEH com e sem tratamento ao longo de 6 dias. A iluminação interna realizada com a ponteira emitindo em 450 nm com 70 mW/cm² totalizando uma dose de energia de 50 J/cm². A iluminação externa realizada com a Biotable emitindo no mesmo comprimento de onda, totalizando a mesma dose de 50 J/cm². N=9 em cada grupo descrito *Condições de redução significativa com P valor<0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

As análises do experimento levam as considerações que a curcumina, embora irradiada mais de uma vez ao longo de todo o experimento, apresentam moléculas que não estão todas degradadas pela luz. Em 5 dias, a ação fotodinâmica da molécula de curcumina persiste, reduzindo sua ação em 6 dias. Os resultados foram positivos, uma vez que a taxa de degradação da curcumina em testes anteriores foi alta. Em um contexto clínico, os resultados conseguem atender as expectativas de pacientes portadores do tubo. A infecção PAV aparece em torno de 48 a 72h após a instalação do TEH(36). Se o paciente portar o tubo com curcumina funcionalizada, os riscos podem altamente reduzir as chances do aparecimento de

infecções indesejadas. A Figura 85 ilustra o tubo imobilizado com curcumina e iluminado uma vez.

Figura 85 - Desenvolvimento do biofilme de *S. aureus* durante 24h no tubo imobilizado com curcumina e irradiado uma vez. Na região abaixo a direita observa-se as colônias remanescentes da pós TFD.
Fonte: Elaborada pela autora.

A figura mostra que após a TFD muitas colônias são inativadas e desanexadas do tubo. Ao longo deste tubo, apenas a pequena parte possuía colônias na superfície do PVC.

Imagens no microscópio confocal foram realizadas nos tubos sem tratamento, tubo imobilizado com curcumina e tubo imobilizado e irradiado dentro e fora como descrito no teste do gráfico 81. Os resultados da análise estão na Figura 86 e 87, com tubos imobilizados com curcumina, sem e com luz, respectivamente.

Figura 86 - Imagens de fluorescência por microscopia confocal do tubo imobilizado com curcumina. Imagem mostra resultados qualitativos da quantidade de curcumina que penetrou na estrutura do PVC; a) imagem de fluorescência na parte de dentro do tubo; b) espectro emitido pela região do tubo analisada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 87 - Imagens do fluorescência por microscopia confocal do tubo imobilizado com curcumina e irradiado. Imagem mostra resultados qualitativos da quantidade de curcumina que penetrou na estrutura do PVC; a) imagem de fluorescência na parte de dentro do tubo; b) espectro emitido pela região do tubo analisada.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir das análises das imagens de fluorescência, observou-se a presença da curcumina em ambos os tubos. Mesmo no tubo iluminado a presença da curcumina continua, justificando o efeito observado da inativação fotodinâmica (gráfico 87) mesmo após iluminação. A curcumina presente dentro do tubo pode apresentar uma estabilidade maior do que quando livre, como em solução. Logo, o tubo pode ser reaproveitado mesmo após a iluminação.

5.5 CONCLUSÃO

Para este capítulo apresentou-se as seguintes conclusões:

- Conseguiu-se sintetizar ambas porfirinas e obter um rendimento razoável para que os experimentos ocorressem.
- Os testes de estabilidade otimizaram o tempo de reação e concluiu-se que o DMSO era o melhor solvente uma vez que não alterou macroscopicamente a estrutura do tubo.
- Através de testes prévios e reações testadas conseguiu-se otimizar as reações para que a imobilização de moléculas fotossensíveis ocorresse. A otimização foi alcançada variando-se temperatura, tempo de reação, concentração dos FS e retirando o oxigênio da reação.
- Verificou-se que com a ligação do tubo a etilenodiamina ocorria oxidação ou liberação de HCl uma vez que a cor do tubo passava de transparente para preto.
- A análise dos espectros de IR e UV-Vis não se concluiu se ocorreu ligação entre o tubo e a 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil) porfirina, sendo necessário futuramente caracterizar utilizando outras técnicas.

- Pela análise dos espectros de IR e UV-Vis foi possível concluir que aparentemente a reação entre o tubo de PVC e curcumina ocorreu.
- Através dos testes *in vitro* o tubo funcionalizado com curcumina reduziu aproximadamente 75% das células bacterianas.

CONCLUSÃO GERAL

A conclusão geral resumida deste trabalho foi:

- Formulações (filme e hidrogel) utilizando curcumina natural são mais estáveis que utilizando curcumina sintética;
- Curcumina sintética da Sigma em solução teve ótimos resultados comparada com a curcumina natural em solução, com uma ação fotodinâmica de 92% de redução celular com 1,25 mg/mL, 2h de incubação e com uma dose de energia de 50 J/cm²;
- O uso do sonicador acoplado a TFD reduziu 100% as células do biofilme de *S. aureus*;
- CSV nebulizada no tubo evitou a anexação de aproximadamente 90% das células de *S. aureus*;
- Foi possível funcionalizar o tubo com porfirina e curcumina;
- Tubo imobilizado com curcumina apresentou resultados satisfatórios de inativação fotodinâmica, alcançando 75% de morte de células de biofilme de *S. aureus*.

Perspectivas Futuras

As perspectivas futuras deste trabalho são:

- Caracterização físico química do TEH imobilizado
- Desenvolver e testar um protótipo de iluminação no tubo;
- Realizar experimentos da eficiência antimicrobiana com nova iluminação;
- Realizar testes de toxicidade em células de mamíferos;
- Testes *in vivo* - modelo animal
- Teste pré-clínico
 - Dano histológico, DNA, urina, sangue
 - Testes de segurança (fase 1 – paciente saudável)

REFERÊNCIAS

- 1 CARMONA-VARGAS, C. C. et al. Combining batch and continuous flow setups in the end-to-end synthesis of naturally occurring curcuminoids. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 3, p. 366–374, 2017.
- 2 DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.
- 3 WOOD, S. et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 50, n. 1, p. 1–7, 1999.
- 4 BOWTON, D. L. et al. The impact of hospital-wide use of a tapered-cuff endotracheal tube on the incidence of ventilator-associated pneumonia. **Respiratory Care**, v. 58, n. 10, p. 1582–1587, 2013.
- 5 DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.
- 6 PERKINS, S. D. et al. Endotracheal tube biofilm inoculation of oral flora and subsequent colonization of opportunistic pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 7, p. 503–511, 2010.
- 7 LINDSAY, D.; HOLY, A. von. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 4, p. 313–325, 2006.
- 8 WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.
- 9 SIMPLICIO, F. et al. Divulgação. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002.
- 10 ISSA, M.C.A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.
- 11 ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin-from molecule to biological function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 2012.
- 12 MONDAL, S. et al. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 158, p. 212–218, 2016. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004.
- 13 HASIMA, N.; AGGARWAL, B. B. Cancer-linked targets modulated by curcumin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, n. 4, p. 328–351, 2012.

- 14 KHARAT, M. et al. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: impact of pH, temperature, and molecular environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1525–1532, 2017.
- 15 COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711–745, 1995.
- 16 LOOSDRECHT, M. C. van. et al. Influence of interfaces on microbial activity. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 1, p. 75–87, 1990.
- 17 FLEMMING, C. A. et al. Cell surface physicochemistry alters biofilm development of pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide mutants. **Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 13, n. 3, p. 213–231, 1998.
- 18 ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–148, 1994.
- 19 BOYD, A.; CHAKRABARTY, A. Pseudomonas aeruginosa biofilm: role of the alginate exopolysaccharide. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, p. 162–168., 1995.
- 20 JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 8, p. 2137–2142, 1994.
- 21 STOODLEY, P. et al. Liquid flow in biofilm systems liquid flow in biofilm systems. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2711–2716, 1994.
- 22 EMMANUEL, S.O.; KAYODE, M.M. Investigation of physicochemical properties and identification of bacteria present in a diesel oil contaminated soil in southwest Nigeria. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 4, n. 3, p. 481, 2015.
- 23 HALL-STOODLEY, L. et al. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.
- 24 HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 7–10, 2005.
- 25 EXNER, M. et al. Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. **American Journal of Infection Control**, v. 33, n. 5 SUPPL. 1, p. 26–40, 2005.
- 26 MACKAY, W. G. et al. Water, water everywhere nor any a sterile drop to rinse your endoscope. **Journal of Hospital Infection**, v. 51, n. 4, p. 256–261, 2002.
- 27 NELSON, D. B. Recent advances in epidemiology and prevention of gastrointestinal endoscopy related infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 326–330, 2005.
- 28 VICKERY, K. et al. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 3, p. 170–176, 2004.

- 29 TREDGET, E. E. et al. Pseudomonas infections in the thermally injured patient. **Burns**, v. 30, n. 1, p. 3–26, 2004.
- 30 BENNETT, R.W. Atypical toxigenic staphylococcus and non-staphylococcus aureus species on the horizon? an update. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1123–1126, 1996.
- 31 BERGDOLL, M. S. et al. a New staphylococcal enterotoxin, enterotoxin f, associated with toxic-shock-syndrome staphylococcus aureus isolates. **Lancet**, v. 317, n. 8228, p. 1017–1021, 1981.
- 32 GÓMEZ, M. I. et al. Staphylococcus aureus protein a induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 842–848, 2004.
- 33 LOWY, F. Staphylococcus aureus infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.
- 34 MATSUMOTO, T.; CARVALHO, W. B. Tracheal intubation. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2, p. 83–90, 2007.
- 35 GOMES, G. Nursing care for patients with orotracheal tube: evaluation performed at intensive care unit. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 3, n. 4, p. 808–813, 2009.
- 36 PAV, D. Pneumonia associada à ventilação mecânica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 4, p.1–3, 2006
- 37 ENGOREN, M. Lack of association between atelectasis and fever. **Chest**, v. 107, n. 1, p. 81–84, 1995.
- 38 ZEITOUN, S. S. et al. Incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes submetidos à aspiração endotraqueal pelos sistemas aberto e fechado: estudo prospectivo - dados preliminares. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 46–52, 2001.
- 39 TEIXEIRA, P. J. Z. et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 6, p. 540–548, 2004.
- 40 FRIMER, A. A. The reaction of singlet oxygen with olefins: the question of mechanism. **Chemical Reviews**, v. 79, n. 5, p. 359–387, 1979.
- 41 OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 39, n. 1, p. 1–18, 1997.
- 42 MACHADO, A. D. H. Relativa ao estado fundamental. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.

- 43 OGILBY, P. R.; FOOTE, C. S. Chemistry of singlet oxygen. 42. effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ($^1\delta g$). **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 11, p. 3423–3430, 1983.
- 44 DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.
- 45 HAMBLIN, M. R.; LUKE NEWMAN, E. New trends in photobiology. on the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: biology**, v. 23, n. 1, p. 3–8, 1994.
- 46 JONES, L. R.; GROSSWEINER, L. I. Singlet oxygen generation by Photofrin® in homogeneous and light-scattering media. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 26, n. 3, p. 249–256, 1994.
- 47 JORI, G. et al. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized processes in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry**, v. 102, n. 1, p. 101–107, 1996.
- 48 SPIKES, J. D. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 43, n. 6, p. 691–699, 1986.
- 49 ROSENTHAL, I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 6, p. 859–870, 1991.
- 50 GOLD, M. H. et al. Split-face comparison of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone for photodamage. **Dermatologic Surgery**, v. 32, n. 6, p. 795–801, 2006.
- 51 FUTSAETHER, C. M. et al. Intracellular pH changes induced in propionibacterium acnes by UVA radiation and blue light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 31, n. 3, p. 125–131, 1995.
- 52 TOUMA, D. J.; GILCHREST, B. A. Topical photodynamic therapy: a new tool in cosmetic dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p. 124–130, 2003.
- 53 JORI, G. et al. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. **Cancer Letters**, v. 24 n. 3, p. 291–297, 1984.
- 54 REDDI, E. Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 37, n. 3, p. 189–195, 1997.
- 55 GOLDSTEIN, J. L. et al. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. **Annual Review of Cell Biology**, v.1, p. 1–39, 1985. doi.org/10.1146/annurev.cb.01.110185.000245.

- 56 DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 2011.
- 57 HAUKVIK, T. et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, n. 10, p. 666–673, 2009.
- 58 HEGGE, A. B. et al. Solid dispersions for preparation of phototoxic supersaturated solutions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): Studies on curcumin and curcuminoids L. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 95–105, 2013.
- 59 SILVA, A. P. et al. A Promising strategy for the treatment of onychomycosis with curcumin and photodynamic therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, n. 9, 2015. doi:10.17265/2328-2150/2015.09.005.
- 60 CALIN, M. A.; PARASCA, S. V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 453–460, 2009.
- 61 ZHANG, X.; RODGERS, M. A. J. Energy and electron transfer reactions of the MLCT state of ruthenium tris(bipyridyl) with molecular oxygen: a laser flash photolysis study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 34, p. 12797–12803, 1995.
- 62 SONG, I. S. et al. Characterization, in vivo and in vitro evaluation of solid dispersion of curcumin containing d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate and mannitol. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1386, 2016.
- 63 PULIDO-MORAN, M. et al. Curcumin and health. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 1–22, 2016.
- 64 AMMON, H. P.; WAHL, M. A. Pharmacology of curcuma longa. **Planta Medica**, v. 57, n. 1, p. 1–7, 1991.
- 65 LI, M. et al. Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. **Food Chemistry**, v. 165, p. 29–34, 2014. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.115.
- 66 KIM, Y. J. et al. Optimization and validation of high-performance liquid chromatography method for individual curcuminoids in turmeric by heat-refluxed extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10911–10918, 2013.
- 67 PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.
- 68 ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.
- 69 YAO, M. et al. Delivery of lipophilic bioactives: assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 53–81, 2014. n. 1, p. 53–81, 2014.

- 70 KIM, J. E. et al. In vitro peroxynitrite scavenging activity of diarylheptanoids from curcuma longa. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 481–484, 2003..
- 71 WANG, Y. J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867–1876, 1997.
- 72 VAJRAGUPTA, O.; BOONCHOONG, P.; BERLINE, L. J. Manganese complexes of curcumin analogues: evaluation of hydroxyl radical scavenging ability, superoxide dismutase activity and stability towards hydrolysis. **Free Radical Research**, v. 38, n. 3, p. 303-314, 2004.
- 73 AGGARWAL, B. B. et al. **Curcumin** - biological and medicinal properties. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Indra_Bhatt/publication/235993633_Curcumin_-_Biological_and_medicinal_properties/links/56fa56c408ae7c1fda31a118/Curcumin-Biological-and-medicinal-properties.pdf. Acesso em 23 jan. 2017.
- 74 CHENG, A. L. et al. Phase I clinical trial of curcumin , a chemopreventive agent , in patients with high- risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, v. 21, n.4B, p. 2895-2900, 2000.
- 75 HOSSEINI, A. G. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. **Avicenna Journal of Phytoedicine**, v. 5, n. 2, p. 84–97, 2015.
- 76 SOUZA, L. M. **Fotossensibilizadores no controle de larvas do Aedes aegypti** (Diptera: Culicidae). 2015. 119 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- 77 SILVA, A. P. **Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica**. 2017. 195 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 78 PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.
- 79 PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, 1998.
- 80 MARQUES, S. C. et al. Formation of biofilms by Staphylococcus aureus on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 538–543, 2007.
- 81 TIBA, M. R. et al. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em Escherichia coli isoladas de pacientes com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 58–62, 2009.

- 82 GORDON, O. N. et al. Oxidative transformation of demethoxy- and bisdemethoxycurcumin: products, mechanism of formation, and poisoning of human topoisomerase II α . **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 989–996, 2015
- 83 ROSA, L. P. et al. Application of photodynamic therapy, laser therapy, and a cellulose membrane for calcaneal pressure ulcer treatment in a diabetic patient: a case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 235–238, 2017. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.011.
- 84 LIU, C.-H. et al. Photodynamic inactivation against *Pseudomonas aeruginosa* by curcumin microemulsions. **Royal Society Advances**, v. 6, n. 67, p. 63013–63022, 2016.
- 85 SINGH, R. et al. The influence of Pluronic® on dark cytotoxicity, photocytotoxicity, localization and uptake of curcumin in cancer cells: studies of curcumin and curcuminoids XLIX. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 12, n. 3, p. 559–575, 2013.
- 86 CORREA, J. C. et al. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity 1. *Lasers Physics*, v. 22, n. 9, p. 1387–1394, 2012.
- 87 OLIVEIRA, K. T. et al. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310–335, 2015.
- 88 ROMANKO, Y. S. et al. Effect of photodynamic therapy with photodithazine on morphofunctional parameters of M-1 sarcoma. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 138, n. 6, p. 584–589, 2004.
- 89 CORREA, J. C. Fotodegradação do photoditazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 90 QUISHIDA, C. C. et al. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers in Medical Science*, v. 30, n. 2, p. 685–694, 2015.
- 91 DOVIGO, L. N. et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*, v. 29, n. 9, p. 1057–1067, 2013.
- 92 SONIYTECH. Sonificador. 2018. Disponível em: <<http://soni-tech.com.br/soni402.html>> Acesso em: 23 jan. 2018.
- 93 COLEMAN, D. E.; MONTGOMERY, D. C. A systematic approach to planning for a designed industrial experiment. **Technometrics**, v. 35, n. 1, p. 1–12, 1993.
- 94 BLANCO, K. C. et al. Treatment of recurrent pharyngotonsillitis by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 138–139, 2017. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.187.
- 95 REIS, E. **Estatística descritiva**. Lisboa: Edições Silabo, 2008.

- 96 ACTION PORTAL. **Diagrama de Pareto.** Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/estatistica-basica/15-diagrama-de-pareto>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- 97 PIYASENA, P. et al. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 207–216, 2003.
- 98 McCLEMENTS, D. J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 9, p. 293-299, 1995.
- 99 CORREA, J. C. **Fotodegradação do photoditazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser.** 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 100 QUISHIDA, C. C. C. **Estudo da eficácia da terapia fotodinâmica, mediada pelos fotossensibilizadores Photodithazine® e Curcumina, sobre biofilmes multi-espécies formados por Streptococcus mutans, Candida albicans e Candida glabrata.** 2013. 153 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.
- 101 COSTA, J. B. et al. Os principais fatores de risco da pneumonia associada à ventilação mecânica em UTI adulta. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 80-92, 2016.
- 102 OLIVEIRA, M. et al. Time course of biofilm formation by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1–2, p. 187–191, 2007.
- 103 OMRON Healthcare Brasil. **Nebulizador.** 2018. Disponível em: <https://www.omronbrasil.com/pt_BR/category/inaladores-nebulizadores#anchor-15>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- 104 SÁNCHEZ, M. J. et al. Antimicrobial properties of ZSM-5 type zeolite functionalized with silver. **Materials Letters**, v. 191, n. 1, p. 65–68, 2017.
- 105 RICE, K. C. et al. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in Staphylococcus aureus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 19, p. 8113–8118, 2007.
- 106 CERI, H. et al. The Calgary biofilm device : new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771, 1999.
- 107 DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- 108 UL-HAMID, A. et al. Failure investigation of an underground low voltage XLPE insulated cable. **Anti-Corrosion Methods and Material**, v. 62, n. 5, p. 281–287, 2015.

- 109 FAWCETT, W. R.; KLOSS, A. A. Solvent-induced frequency shifts in the infrared spectrum of dimethyl sulfoxide in organic solvents. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 6, p. 2019–2024, 1996.
- 110 DERENNE, A. et al. FTIR spectroscopy : a new valuable tool to classify the effects of polyphenolic compounds on cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta: molecular basis of disease**, v. 1832, n. 1, p. 46–56, 2013.
- 111 LESTARI, H. P. Simultaneous analysis of Curcumin and demethoxycurcumin in *Curcuma xanthorrhiza* using FTIR spectroscopy and chemometrics. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 5, p. 2097-2101, 2017.
- 112 PAVIA, G. et al. **Introduction to spectroscopy**. Bellingham, Washington: Cengage Learning, 2013.