

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

Jennifer Machado Soares

**Combinação de antimicrobianos com inativação
fotodinâmica para o tratamento de infecções bacterianas**

São Carlos

2023

Jennifer Machado Soares

**Combinação de antimicrobianos com inativação
fotodinâmica para o tratamento de infecções bacterianas**

Tese 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 Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular

Orientadora: Profa. Dra. Kate Cristina Blanco

Versão corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2023

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

Soares, Jennifer Machado

Combinação de antimicrobianos com inativação fotodinâmica para o tratamento de infecções bacterianas / Jennifer Machado Soares; orientadora Kate Cristina Blanco - versão corrigida -- São Carlos, 2023.

106 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Inativação fotodinâmica. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Staphylococcus aureus. 4. Falha de antibióticos. 5. Técnicas fotônicas. I. Blanco, Kate Cristina, orient. II. Título.

Ao meu pai Eli, que sempre apoiou meus sonhos. À minha mãe Luciana, que sempre lutou pelas minhas melhores oportunidades. Ao meu marido Lucas, que sempre me deu suporte para não desistir. À minha bebezinha Amélie, que me deixa com coração feliz.

AGRADECIMENTOS

Meu pai diz todos os dias aprendemos algo novo, mas morremos sem aprender tudo. A Jennifer que começou esse projeto a quatro anos atrás é diferente mas, ao mesmo tempo, é a mesma de hoje. Muitas coisas aconteceram ao longo desses anos, tanto pessoalmente quanto mundialmente. Cada momento nos deixa uma marca e molda quem somos, quem eu sou. Por isso, sou grata a Deus por sempre estar comigo e por todas as oportunidades que Ele providenciou em minha vida, me guiando até aqui e além.

Esse caminho foi construído pela minha família. Meu pai, que sempre me deu toda a força e motivação para não desistir das minhas conquistas, independente da grandiosidade. Como quando sentou comigo na escada para me ensinar a divisão de dois números da chave, porque voltei chorando da escola por não saber fazer a lição. Minha mãe, que sempre buscou me proporcionar as melhores experiências para meu crescimento e desenvolvimento. Quem ligou na TV para que houvesse vagas na pré-escola, buscava os livros na biblioteca para mim, me matriculou em aulas de dança, pintura e cursos. Meu maridinho Lucas, que sempre esteve ao meu lado me ajudando com as minhas dificuldades, sendo minha zona segura nos momentos em que sempre preciso e naqueles em que eu nem sabia que estava precisando. Muito obrigada pelo suporte de vocês, sem isso eu não poderia ter chegado até aqui.

Eu não sabia que me tornaria cientista quando crescesse, mas sem dúvidas minha querida Kate é uma das minhas inspirações. Você não foi apenas minha orientadora, que meu deu a direção dos planejamentos acadêmicos, você me ensinou a como ser integra e manter o coração amável apesar das circunstâncias. Assim como o professor Vanderlei, que me inspira a acreditar que a ciência transforma o mundo, e que nós podemos sim fazer a diferença na sociedade, mesmo com todos os desafios ao longo do caminho.

Um doutorado não se faz sozinho, existe toda uma rede de apoio que estão conosco em reuniões, no laboratório, nos corredores, agradeço a todos vocês. Obrigada Thaila e Natália por estarem sempre disponíveis quando eu precisei de conselhos. Agradeço em memória dos meus avôs(ós). Aos meus tios(as), primos (as), madrinhas, padrinhos, a Marlene e Valder. Obrigada Ana, André, Brenda, Ederson, Emanuel, Hans, Isabela, Miguel, Raiena, Ricardo e Shirly por todos os momentos que compartilhamos.

Eu agradeço aos brasileiros que contribuíram pelo financiamento da pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, assim como o apoio do centro de pesquisa em ótica e fotônica (CEPOF - Fapesp 2013/07276-1, 2014/50857-1) e ao CNPQ (465360/2014-9).

*"Está tudo bem parar
Não há necessidade em correr sem ao menos saber o motivo.
(...)
Um sonho não precisa ser algo grandioso
Você pode se tornar qualquer um
Nós merecemos uma vida
Seja grande ou pequeno, você é você"
Paradise, BTS*

RESUMO

SOARES, J. M. **Combinação de antimicrobianos com inativação fotodinâmica para o tratamento de infecções bacterianas.** 2023. 106p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Bactérias multirresistentes (BMR) a antimicrobianos (ATBs) são hoje um dos grandes desafios relacionados ao controle de infecções. Muitas tentativas de quebrar essa resistência por meio de modificações químicas ou adição de outros compostos conjugados têm sido realizadas sem o sucesso esperado. Nesse contexto, a inativação fotodinâmica (IFD) emerge como uma alternativa promissora. Através do seu mecanismo de ação é capaz de eliminar células microbianas indesejáveis sem induzir à resistência bacteriana. O presente estudo se propôs a investigar a combinação de diferentes classes de ATBs e protocolos de IFD em bactérias Gram-positivas, com ênfase na *Staphylococcus aureus*. Protocolos de inativação fotodinâmica (curcumina 10 μM , 10 J/cm^2 , comprimento de onda 450 nm) e seu efeito na presença de amoxicilina, eritromicina e gentamicina. Foram analisados, considerando efeitos sinérgicos e antagônicos referente aos parâmetros de cada terapia, assim como a ordem de combinação. A interação entre curcumina, ATB e bactérias foi avaliada por meio de técnicas fotônicas como microscopia confocal, espectroscopia de fluorescência e absorção no infravermelho, ultravioleta e visível. Além disso, ciclos de tratamentos combinados de IFD e ATB foram estabelecidos para recuperar a suscetibilidade aos ATBs pelas cepas resistentes. Os resultados demonstraram um efeito potencializador dos ATBs pela ação fotodinâmica, com redução de até 2-8533 vezes nas concentrações inibitórias mínimas para BMR. A ordem de combinação das terapias impactou a resposta sinérgica e antagônica do tratamento. Mas, independente do protocolo aplicado, foram observadas modificações nos modos vibracionais das biomoléculas bacterianas, assim como o efeito na permeabilização da membrana foram observados. De modo geral, os resultados apresentados demonstram que a IFD pode atuar como adjuvante nos casos de falhas a ATBs, podendo prolongar o uso dos ATBs disponíveis atualmente.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica. Resistência antimicrobiana. *Staphylococcus aureus*. Falha de antibióticos. Técnicas fotônicas.

ABSTRACT

SOARES, J. M. **Combination of antimicrobials with photodynamic inactivation for the treatment of bacterial infections.** 2023. 106p. Thesis (Doctor in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Multidrug-resistant bacteria (MDR) have become a major challenge in infection control. Many attempts to overcome this resistance through chemical modifications or addition of other conjugated compounds have been made without the expected success. In this context, photodynamic inactivation (PDI) emerges as a promising alternative, given its mechanism of action capable of eliminating undesirable microbial cells without inducing bacterial resistance. The present study aimed to investigate the combination of different classes of antibiotics (ATBs) and PDI protocols in Gram-positive bacteria, with emphasis on *Staphylococcus aureus*. PDI protocols (10 μ M curcumin, 10 J/cm², 450 nm wavelength) and their effects in the presence of amoxicillin, erythromycin, and gentamicin were analyzed, considering synergistic and antagonistic effects based on the parameters of each therapy, as well as the order of combination. The interaction of curcumin, ATBs, and bacteria was evaluated using photonics techniques such as confocal microscopy, fluorescence spectroscopy, and infrared, ultraviolet, and visible absorption. In addition, combined PDI and ATB treatment cycles were established to recover susceptibility to ATBs in resistant strains. The results demonstrated a potentiation effect of ATBs by photodynamic action, with reductions of up to 2-8533 times in the minimum inhibitory concentrations for MDR. The order of therapy combination impacted the synergistic and antagonistic response of the treatment. Regardless of the applied protocol, modifications in the vibrational modes of bacterial biomolecules were observed, as well as effects on membrane permeabilization. Overall, the results presented demonstrate that PDI can act as an adjuvant in cases of ATB failure, potentially extending the use of currently available ATBs.

Keywords: Photodynamic inactivation. Antimicrobial resistance. *Staphylococcus aureus*. Antibiotics failures. Photonic techniques.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMO	Amoxicilina
ATB	Antimicrobiano
ATBT	Antibioticoterapia
BHI	Ágar Infusão Cérebro e Coração (do inglês Brain Heart Infusion)
BMR	Bactérias Multirresistentes
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CUR	Curcumina
ERI	Eritromicina
FDA	Food and Drug Administration
FLIM	Imagem do tempo de vida de fluorescência (do inglês, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)
FRAP	Recuperação de fluorescência após fotodegradação (do inglês, Fluorescence Recovery After Photobleaching)
FS	Fotossensibilizador
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)
GEN	Gentamicina
IFD	Inativação Fotodinâmica
LPS	Lipopolissacarídeos
MDK ₉₉	Índice de duração mínima para matar 99% da população (do inglês, Minimal Duration for Killing 99%)
MH	Mueller Hinton
MIC	Concentração inibitória mínima (do inglês, Minimum inhibitory concentrations)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês, Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)

OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	<i>Ácido Para-Aminobenzoico</i>
PBP	Proteínas de Ligação à Penicilina (do inglês, Penicillin-Binding Proteins)
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês, Phosphate Buffered Saline)
POA	Processos Oxidativos Avançados
SOD	Superóxido Dismutase
TCSPC	Contagem de Fótons Únicos Correlacionados Com o Tempo (do inglês, Time Correlated Single Photon Counting)
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por Mililitros

LISTA DE SÍMBOLOS

η	Eficiência na viabilidade da recuperação do tratamento
λ	Comprimento de onda
S_0	Estado singleto fundamental
S_1	Estado singleto excitado
T_1	Estado tripleto excitado
O_2	Oxigênio molecular
OH^-	Hidroxila
1O_2	Oxigênio singleto
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
O_2^-	Superóxido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da ação da inativação fotodinâmica (IFD) e terapia com antimicrobianos (ATBs)	26
Figura 2 – Mecanismo de ação dos antimicrobianos	30
Figura 3 – Mecanismo de resistência aos antimicrobianos	33
Figura 4 – Diagrama de Jablonski	35
Figura 5 – Inativação Fotodinâmica <i>S. aureus</i> a 5 J/cm ²	44
Figura 6 – Inativação Fotodinâmica <i>S. pyogenes</i> a 5 J/cm ²	46
Figura 7 – Curva de crescimento de IFD + ATB de <i>S. aureus</i>	47
Figura 8 – Avaliação do efeito sinérgico ou antagônico para <i>S. aureus</i>	48
Figura 9 – Curva de crescimento de IFD + ATB de <i>S. pyogenes</i>	49
Figura 10 – Avaliação do efeito sinérgico ou antagônico para <i>S. pyogenes</i>	50
Figura 11 – Espectros de fluorescência da CUR com ATBs	52
Figura 12 – Fotodegradação da CUR com ATBs	53
Figura 13 – Inativação Fotodinâmica: concentração FS fixa	62
Figura 14 – Concentração inibitória mínima	63
Figura 15 – Permeabilidade da membrana	64
Figura 16 – Efeito da sequência de combinação de terapias	65
Figura 17 – Microscopia de fluorescência confocal	67
Figura 18 – Microscopia confocal de fotodegradação	68
Figura 19 – Tempo de vida de fluorescência da curcumina	69
Figura 20 – Ciclo de tratamentos	70
Figura 21 – Espectro de absorvância FTIR da bactéria	72
Figura 22 – Dendograma do espectro de FTIR	73
Figura 23 – Indução de resistência aos ATBs	82
Figura 24 – Aumento da suscetibilidade aos ATBs	84
Figura 25 – MIC de cepas de <i>S. aureus</i> resistentes e descendente	86
Figura 26 – Taxa de sobrevivência de bactéria persistentes	87
Figura 27 – Biomassa aderida de biofilmes antes e após IFD	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima de <i>S. aureus</i>	45
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima de <i>S. pyogenes</i>	46
Tabela 3 – Taxa de crescimento <i>S. aureus</i> e <i>S. pyogenes</i>	51
Tabela 4 – Concentração de ATB para tratamentos combinados	59
Tabela 5 – Taxa de quebra de resistência	85

SUMÁRIO

1	MOTIVAÇÃO	25
1.1	Introdução	25
1.2	Objetivo	27
1.2.1	Objetivo geral	27
1.2.2	Objetivos específicos	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	Antibioticoterapia	29
2.1.1	Antimicrobianos	29
2.1.2	Mecanismos de ação dos antimicrobianos	30
2.1.3	Problemas da resistência antimicrobiana	32
2.2	Inativação Fotodinâmica	34
2.2.1	Inativação fotodinâmica	34
2.2.2	Mecanismo de ação da inativação fotodinâmica	35
2.2.3	Estresse oxidativo	37
2.3	Combinação de terapias	38
2.3.1	Sinergismo e antagonismo	38
2.3.2	Efeito da ação combinada da IFD e ATBT	39
3	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMBINATÓRIOS DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM A ANTIBIOTICOTERAPIA	41
3.1	Metodologia	41
3.1.1	Cultivo microrganismo	41
3.1.2	Inativação fotodinâmica	42
3.1.3	Concentração inibitória mínima	42
3.1.4	Curva de crescimento com terapia combinada	42
3.1.5	Fotodegradação da curcumina com antimicrobianos	43
3.1.6	Análise estatística	43
3.2	Resultados	43
3.2.1	Inativação fotodinâmica e concentração inibitória mínima de <i>S. aureus</i>	43
3.2.2	Inativação fotodinâmica e concentração inibitória mínima de <i>S. pyogenes</i>	45
3.2.3	Avaliação de efeitos sinérgicos e antagônicos	47
3.2.4	Fotodegradação da curcumina com antimicrobianos	51
3.3	Discussão	53
3.4	Conclusão	55

4	POTENCIALIZAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS POR EFEITOS FOTODINÂMICOS	57
4.1	Metodologia	57
4.1.1	Cultivo microrganismo	57
4.1.2	Inativação fotodinâmica	57
4.1.3	Concentração inibitória mínima	58
4.1.4	Combinação da inativação fotodinâmica e antibioticoterapia	58
4.1.5	Permeabilidade da membrana citoplasmática	59
4.1.6	Ciclo de tratamento	59
4.1.7	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	60
4.1.8	Microscopia confocal	60
4.1.9	Análise dos dados	61
4.2	Resultados	61
4.2.1	Inativação fotodinâmica e antibioticoterapia	61
4.2.2	Protocolos de terapias combinadas	64
4.2.3	Dinâmica de interação bacteriana com fotossensibilizador e ATBs	66
4.2.4	Resposta bacteriana a ciclo de tratamentos	69
4.3	Discussão	74
4.4	Conclusão	76
5	AÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA NAS FALHAS DE ANTIMICROBIANOS	79
5.1	Metodologia	79
5.1.1	Microrganismo	79
5.1.2	Concentração inibitória mínima	80
5.1.3	Indução de resistência a antimicrobianos	80
5.1.4	Ciclo de inativação fotodinâmica parcial	80
5.1.5	Ensaio de persistência	80
5.1.6	Quantificação biomassa de biofilme	81
5.1.7	Análise estatística	81
5.2	Resultados	81
5.2.1	Indução da resistência bacteriana ao antimicrobiano	81
5.2.2	Aumento da suscetibilidade bacteriana	83
5.2.3	Concentração inibitória mínima em células descendentes após IFD	85
5.2.4	Efeito da IFD na persistência bacteriana	87
5.2.5	Quantificação biomassa de biofilme	88
5.3	Discussão	89
5.4	Conclusão	93
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	95

REFERÊNCIAS 97

1 MOTIVAÇÃO

1.1 Introdução

Bactérias resistentes a antimicrobianos (ATBs) são um grande problema de saúde pública mundialmente, podendo ser o próximo agente de uma pandemia. Infecções por bactérias resistentes a ATBs, associadas a biofilmes, ou adquiridas por pacientes imunocomprometidos não respondem a antibioticoterapia (ATBT). O ATB é o tratamento que revolucionou a medicina por auxiliar no aumento da expectativa de vida dos seres humanos, reduzindo as mortes por doenças infecciosas, predominando as causadas por doenças cardiovasculares e câncer.¹ A falha de ATBs nos tratamentos clínicos está cada vez mais frequente, para cada cinco infecções por *Staphylococcus aureus*, um paciente tem falha de tratamento, sendo previsto para 2030 até 225 milhões de casos, ou seja, um problema alarmante de saúde global.^{2,3} Como agravante, são poucas as novas classes de ATB ou aprimoramento das moléculas existentes.^{4,5}

A falha de ATB pela resistência ocorre por mecanismos como redução da permeabilidade de membrana, aumento da atividade de bombas de efluxo, modificações dos alvos de ligação, síntese de enzimas para inativação dos ATBs.⁶ Essas mudanças estruturais e metabólicas resultam no aumento da concentração inibitória mínima (MIC, em inglês) para atingir valores inviáveis para o tratamento seguro e eficaz.^{7,8} Mas, existem alguns traços fenotípicos em uma subpopulação que podem afetar a resistência aos antimicrobianos, e conseqüentemente a inatividade dos ATBs, dentre elas as bactérias persistentes são capazes de sobreviver em altas concentrações de ATB e re-infectar os pacientes.^{9,10} Ademais, os sintomas graves do paciente em uma infecção ocorre em decorrência da expressão dos fatores de virulência, como as toxinas e a formação de biofilmes, e dependendo da dosagem de ATB a expressão dos fatores de virulência podem ser estimulados.^{10,11}

O problema da resistência a ATBs é complexo pois em geral a cepa será resistente a uma ou mais classes de ATBs, sendo que cada classe age em um alvo celular especificamente, ou seja, em geral uma bactéria resistente não responde a diversas moléculas de ATBs. Quando as cepas são multirresistentes, a escolha de medicamento para se obter um tratamento realmente efetivo é dificultado, pois as moléculas de ATB possíveis para a escolha do tratamento ficam limitadas. A principal estratégia no combate das infecções bacterianas tem sido no desenvolvimento de novos antimicrobianos, mas independente da ação dos novos fármacos as falhas de ATB em tratamentos tendem a acontecer.¹² Desse modo, abordagens multifacetadas para combater a falha dos ATBs são necessárias.

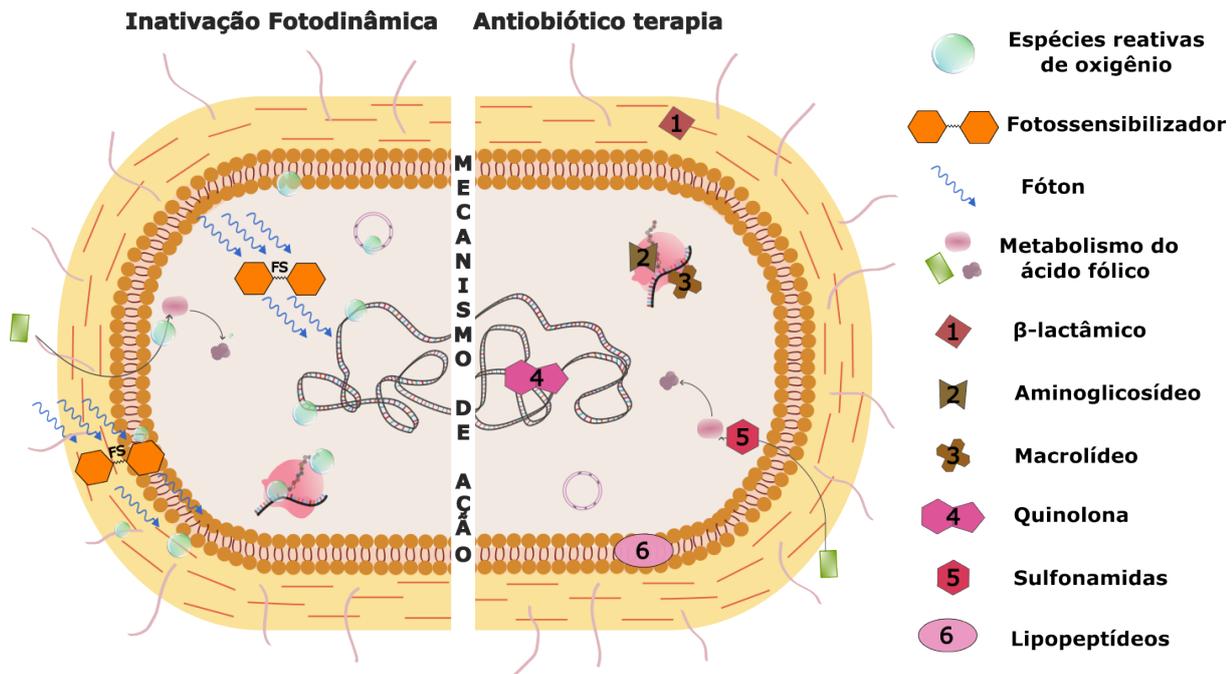


Figura 1 – Esquema da ação da inativação fotodinâmica (IFD) e terapia com antimicrobianos (ATBs) em uma célula bacteriana. A IFD age através da absorção de luz pelo fotossensibilizador (FS) internalizado pelas bactérias, o qual produz espécies reativas de oxigênio (bolhas na figura) que oxidam várias estruturas moleculares e celulares, desencadeando a inativação bacteriana. Por outro lado, a ação do ATB pode ser bactericida ou bacteriostática e depende da estrutura da molécula do ATB, que interage especificamente com componentes celulares, tais como 1) β -lactâmicos na parede celular, 2) aminoglicosídeos na síntese proteica (50S), 3) macrolídeos na síntese proteica (30S), 4) quinolonas no DNA, 5) sulfonamidas no metabolismo do ácido fólico e 6) lipopeptídeos na membrana plasmática.

Fonte: Elaborada pela autora.

A combinação do ATB com a inativação fotodinâmica (IFD) podem resultar em efeitos sinérgicos ou antagônicos na inativação bacteriana considerando que atuam por mecanismos distintos, vide Figura 1. O mecanismo de ação da IFD produz espécies reativas de oxigênio (EROs) em decorrência da absorção de um fóton pelo fotossensibilizador (FS). Todas as EROs formadas reagem com as biomoléculas tais como proteínas, lipídeos e ácido nucleicos promovendo a morte celular microbiana,¹³ não havendo estratégia celular e molecular que mitigue a ação fotodinâmica, ou seja, a IFD não seleciona bactérias, o que é um diferencial notável em relação a antibioticoterapia.¹⁴ A presença de EROs durante o tratamento com IFD pode potencializar a ação de ATBs. Desse modo, a IFD pode ser um coadjuvante a ATBT prolongando o uso dos ATBs disponíveis no mercado.¹⁵

Neste trabalho foi proposto avaliar a interação da curcumina como FS em combinação com três diferentes classes de antimicrobianos: a amoxicilina (AMO) um β -lactâmico que age na inibição da síntese da parede celular; a eritromicina (ERI) e gentamicina (GEN) macrolídeo e aminoglicosídeo que inibem a síntese proteica atuando na subunidade 50S e 30S do ribossomo, respectivamente.¹⁶ Nós buscamos compreender como diferentes protocolos de combinações podem afetar a interação entre as moléculas antimicrobianas e o FS com a bactéria *Staphylococcus aureus*, *in vitro*. Desse modo, buscar resultados que evidenciem o potencial de aplicação clínica das terapias combinadas e identificar alternativas para que as bactérias resistentes aos ATBs retornem às propriedades originais de não resistência. Assim, este estudo traz resultados/discussões que demonstram o potencial da IFD em ser uma terapia coadjuvante à ATBT, prolongando o uso dos ATBs disponíveis no mercado.

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito da combinação da terapia convencional, a antibioticoterapia, com o tratamento adjuvante, a inativação fotodinâmica, na bactéria *Staphylococcus aureus* utilizando a curcumina como fotossensibilizador.

1.2.2 Objetivos específicos

- Definir o limiar de sobrevivência da bactéria ao protocolo de IFD utilizando curcumina e comprimento de onda de 450 nm.
- Quantificar as concentrações inibitória mínimas de amoxicilina, eritromicina e gentamicina.
- Determinar e otimizar protocolos de combinação entre as terapias quanto as respostas sinérgicas ou antagônicas.
- Estudar possíveis efeitos da combinação de terapias na célula bacteriana por meio de técnicas fotônicas.
- Avaliar mudanças na suscetibilidade da *S. aureus* aos ATBs pela ação fotooxidativa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antibioticoterapia

2.1.1 Antimicrobianos

No início do século XX a medicina foi revolucionada devido a uma das mais importantes descobertas científicas: os antibióticos, substância produzida por microrganismos para inibir o crescimento de outros microrganismos. Até então, doenças infecciosas como varíola, pneumonia, tuberculose, sífilis, cólera estavam entre as principais doenças mortais no mundo e tornavam a expectativa média de vida inferior a 50 anos em países desenvolvidos.¹

O conceito de uma “bala mágica” com toxicidade seletiva foi introduzido por Paul Ehrlich. Mas apenas em 1928 Alexander Fleming constatou acidentalmente que placas inoculadas com *Staphylococcus aureus* apresentavam halos inibitórios ao redor das colônias devido a presença de um bolor contaminante, posteriormente identificado como o fungo *Penicillium notatum*.⁶ Durante o período da Segunda Guerra Mundial, baseado em resultados promissores em camundongos, soldados foram tratados com composto sintético de sulfanilamida para controlar infecções bacterianas sistêmicas. Em 1942, Ernst Chain e Howard Florey isolaram e purificaram o composto ativo produzido pelo fungo *Penicillium* sp., a Penicilina G, sendo possível o início dos estudos clínicos para tratamento de doenças infecciosas.^{1,17} Os anos que se seguiram foram denominados de “era de ouro dos antibióticos” com a produção de inúmeros compostos identificados com ação antimicrobiana, principalmente obtidos dos microrganismos com a capacidade de esporular. Esses compostos foram aprimorados e sintetizados quimicamente como base para a produção e aprimoramento de novas moléculas eficazes contra patógenos, os antimicrobianos (ATBs).^{14,18}

A classificação dos ATBs é descrita pela sua estrutura química, uma vez que influencia sua ação devido a alvos moleculares e celulares dos microrganismos. Os mecanismos de atuação são comumente comparados a uma chave e fechadura dado a interação específica entre um antibiótico e seu alvo de ação. Portanto, a atividade de um ATB será dependente da sua concentração, da espécie bacteriana e da presença de outras drogas.^{19,20}

Os antibióticos representaram uma revolução na medicina, tendo um impacto significativo ao salvar inúmeras vidas no combate às infecções bacterianas. No entanto, atualmente a resistência bacteriana é um problema crescente, tornando alguns antibióticos menos eficazes e dificultando o tratamento de infecções. Portanto, é fundamental a conscientização sobre a importância do uso adequado de ATBs, seguindo as orientações médicas como as doses e tempo de tratamento prescritos, a fim de preservar sua eficácia a longo

prazo e garantir a saúde da população.²¹

2.1.2 Mecanismos de ação dos antimicrobianos

Em uma célula bacteriana existem alguns alvos moleculares e celulares que não são encontrados em células eucarióticas. Desse modo os ATBs agem pela i) inibição da síntese de parede celular, ii) inibição da síntese de proteínas, iii) inibição da síntese de ácido nucleico, iv) inibição de enzimas bacterianas e v) danos à membrana celular, sendo cada um dos mecanismos dependente da classe do ATB, representados na Figura 2.^{16,22}

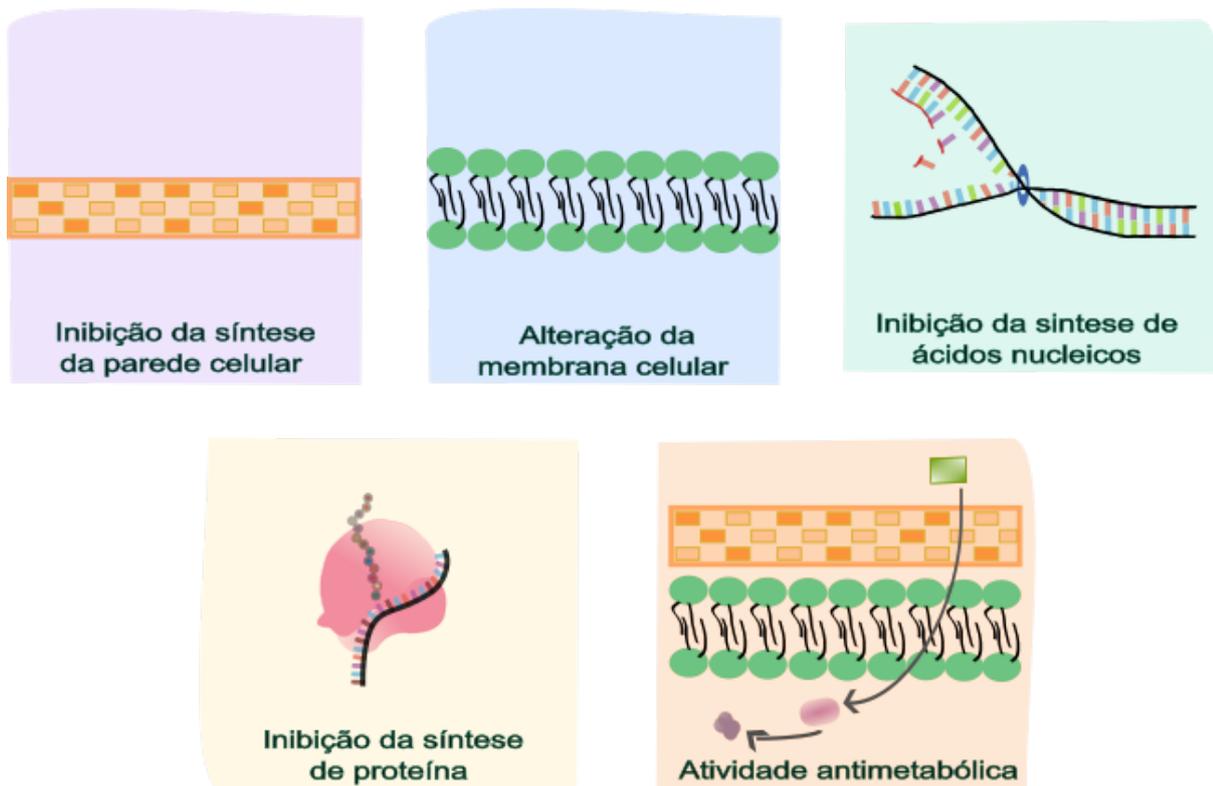


Figura 2 – Ilustração esquemática dos mecanismos de ação dos antimicrobianos (ATBs) em células bacterianas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os antibióticos da classe β -lactâmicos, como as penicilinas, e os glicopeptídeos agem inibindo a síntese da parede celular bacteriana. Esses medicamentos possuem em sua estrutura química um anel β -lactâmico que interage com as enzimas chamadas transpeptidases ou proteínas de ligação à penicilina (PBPs, em inglês), bloqueando sua atividade na formação das ligações cruzadas do peptidoglicano. Como resultado, a parede celular bacteriana fica enfraquecida, levando a uma instabilidade osmótica. A parede enfraquecida não consegue regular adequadamente a entrada e saída de substâncias, o que resulta na lise e morte da bactéria.²³ Outra via de inibição da síntese da parede celular ocorre pela ligação de glicopeptídeos no terminal D-alanil-D-alanina dos precursores do

peptidoglicano, o que impede a ação da enzima transpeptidase, a qual forma as ligações cruzadas do peptidoglicano. A integridade estrutural e a estabilidade da parede celular bacteriana estão relacionadas com essas ligações cruzadas.²⁴

A ruptura da membrana externa das bactérias Gram-negativas pode ser causada pelas moléculas de polimixinas. Esses antibióticos possuem afinidade pela porção lipídica A dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa. Ao se ligarem aos LPS, as polimixinas interagem com os fosfolípidios da membrana, ocasionando na perda de sua integridade, devido a formação de poros que aumentam a permeabilidade da membrana; também interferem nas bombas de íons e nos canais iônicos da membrana, perturbando o gradiente eletroquímico necessário para o funcionamento normal da célula bacteriana.²⁵ Semelhantemente, as daptomicinas levam à formação de poros, ruptura do gradiente eletroquímico e despolarização da membrana. Esses efeitos são desencadeados pela inserção das daptomicinas na cadeia lipofílica da membrana bacteriana, sendo essa inserção facilitada pela presença de cálcio, que reduz a carga negativa residual da daptomicina e favorece o aumento de sua superfície hidrofóbica.²⁶

Diversas classes de ATB atuam no ribossomo bacteriano. Os aminoglicosídeos ligam-se na subunidade 30S de forma irreversível, ocasionando falha de tradução do RNA mensageiro (mRNA), de modo a induzir erros na incorporação dos aminoácidos à cadeia polipeptídica, afetando a funcionalidade das proteínas sintetizadas que são essenciais para a sobrevivência bacteriana.³ Tetraciclina também atua na subunidade 30S dos ribossomos, ligando no sítio A do RNA ribossômico 16S. O alongamento da cadeia polipeptídica e a síntese proteica bacteriana é comprometido pela presença das tetraciclina que impedem a aminoacil-tRNA entrar no sítio A do ribossomo, onde ocorre a adição do aminoácido ao polipeptídeo em síntese.²⁷ Diferentemente, os macrolídeos impedem a translocação dos peptídeos do sítio A para o sítio P no ribossomo durante o processo de síntese proteica ao se ligarem ao RNA 23S da subunidade 50S. Isto interfere no alongamento da cadeia polipeptídica, desencadeando proteínas não funcionais ou truncadas.²⁸

Ácidos nucleicos também são alvos de ATB. A rifampicina impede a elongação do RNA durante a transcrição ao se ligar a subunidade beta da RNA polimerase bacteriana. O bloqueio da síntese de RNA impossibilita a síntese de proteínas que são essenciais para o funcionamento celular.²⁹ No caso do DNA pode ser prejudicado a pela ligação de quinolonas nas enzimas topoisomerase bacterianas, seja a topoisomerase II (DNA girase), que regula o supercoiling do DNA bacteriano durante a replicação, transcrição e recombinação; ou a topoisomerase IV que separa os cromossomos replicados durante a divisão celular bacteriana. Desse modo, a inibição das topoisomerasas interrompem a replicação e a transcrição do DNA bacteriano, causando danos no DNA que resultam na morte bacteriana.³⁰

Vias metabólicas específicas da bactéria também são alvos de ATBs, como as

sulfonamidas que inibem a síntese do ácido fólico. As sulfonamidas são estruturalmente semelhantes aos ácidos para-aminobenzoicos (PABA, em inglês), que atuam na reação de catalise enzimática da formação do ácido di-hidropteroico, precursor do ácido fólico. Como bloqueio da enzima pela ligação da sulfonamida, a disponibilidade do ácido fólico é comprometida e prejudica a síntese de bases nitrogenadas, como a timina, a guanina e a adenina, conseqüentemente, a síntese de ácidos nucleicos.³¹

Independentemente da via em que o ATB atua na célula bacteriana, seu objetivo é afetar o crescimento, a reprodução e, em última instância, induzir a morte celular. Cada estrutura celular e molecular é essencial para a viabilidade do microrganismo, mas os alvos terapêuticos dos ATBs são limitados, ou seja, há um número finito de vias de ação para esses medicamentos.⁷

2.1.3 Problemas da resistência antimicrobiana

A capacidade de uma bactéria sobreviver ou crescer a um tratamento antimicrobiano em altas doses de medicamento é denominado de resistência, a qual é uma grande preocupação de saúde pública.¹⁹ Nos Estados Unidos foram relatadas 99 mil mortes por infecções associadas aos cuidados de saúde, considerando os gastos com tratamento e o impacto pela inatividade durante o período de hospitalização do paciente, gerou déficit de até 35 milhões na economia. A perspectiva para 2050 é que o número de mortes por infecção de bactérias resistentes causará até 10 milhões de mortes por ano, superando a mortalidade por câncer.³²

Diversos patógenos são relatados mundialmente com resistência aos antibióticos, sendo alguns de prioridade global para vigilância devido a casos de mortalidade, prevalência de resistência e transmissibilidades. Nesta lista estão incluídas as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, por exemplo *Escherichia coli*, com prioridade crítica; *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori* representantes da prioridade alta; *Streptococcus pneumoniae* com prioridade média. Diante deste cenário mundial, a priorização de novas descobertas antimicrobianas seja por novos antibióticos ou novas terapias é extremamente estimulada e necessária.^{32,33}

Os mecanismos de resistência aos ATBs estão relacionados com modificações genéticas em biomoléculas receptoras: alterando sua interação com o ligante e conseqüentemente a resposta biológica; modificando a permeabilidade da membrana, restringindo a absorção do fármaco; inibindo a síntese proteica; inibindo a replicação do DNA e da polimerização de RNA; além de modificações metabólicas e estruturais na parede celular.^{7,20,34} De fato, o mecanismo de resistência bacteriana pode ser intrínseco, pois a bactéria não possui o alvo de ação, ou a estrutura é naturalmente diferente da qual o antibiótico age. Outra possibilidade é de ser adquirida pela mutação espontânea do DNA ou transferência de genes horizontais via conjugação de plasmídeo ou por bacteriófagos,

e também pela presença de elementos móveis.³⁴

A resistência adquirida ou intrínseca pode afetar significativamente a ação dos agentes ATBs ilustrado na Figura 3, sendo alguns dos mecanismos diretamente associados a uma classe específica, como a inativação dos ATBs, o aumento da expressão dos alvos celulares ou a modificação dos sítios de ação. Além disso, existem mecanismos que podem afetar várias classes de ATBs, tais como a impermeabilização da parede celular, o aumento da expressão de bombas de efluxo e a formação de biofilmes.^{10,35}

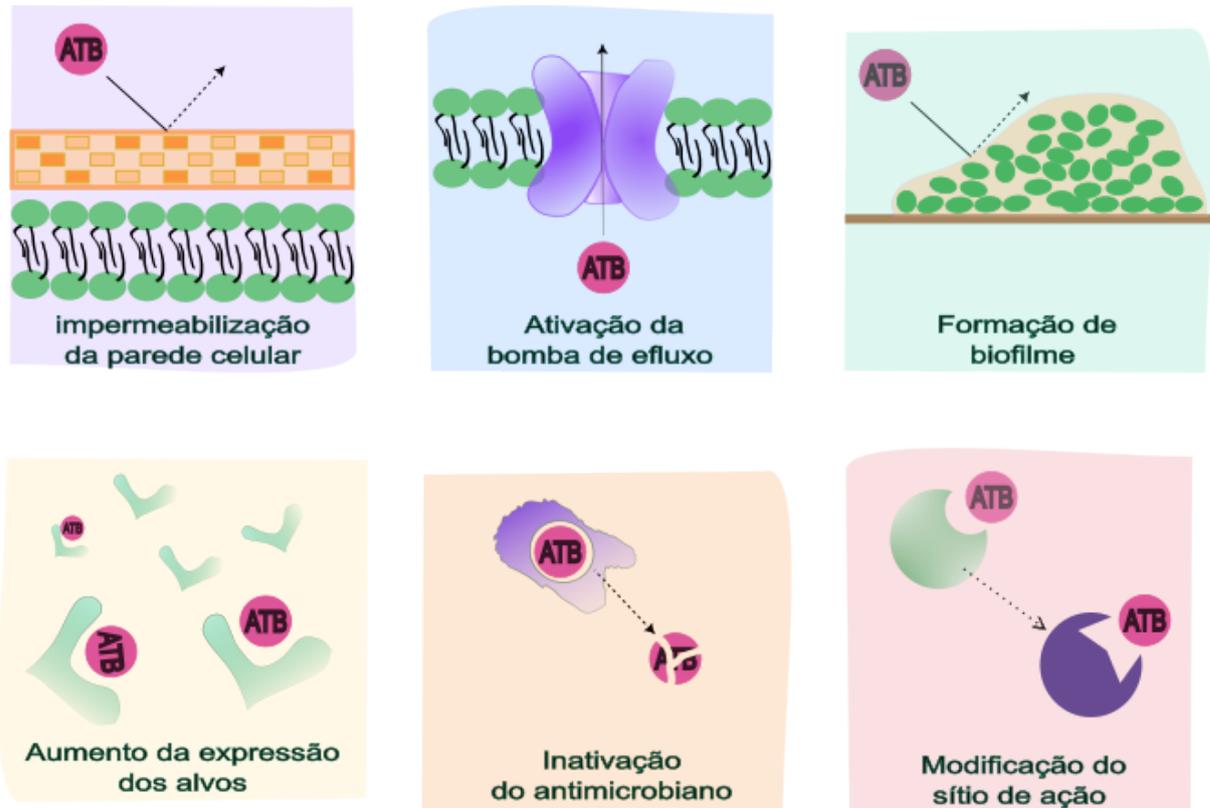


Figura 3 – Ilustração esquemática das estratégias adotadas pelas bactérias resistentes para se defenderem da ação dos agentes antimicrobianos (ATBs).

Fonte: Elaborada pela autora.

OS mecanismos de resistência se propagam através do processo de seleção artificial, causado pela ineficiência do antibiótico nas células que possuem esse mecanismo intrinsecamente ou adquiridos. As células que possuem essas características resistem ao tratamento e tornam-se a maioria da população microbiana.^{1,7,36}

A resistência aos antibióticos é ainda mais complexa, pelo fato de que nas últimas décadas não houve inclusão de uma nova classe de ATBs no mercado.³⁷ Embora a resistência bacteriana seja um problema crescente e preocupante, a descoberta de novos ATBs tem sido escassa. As empresas farmacêuticas têm demonstrado diminuição no interesse em investir no desenvolvimento de novas classes de ATBs, principalmente devido às

complexidades e aos altos custos envolvidos no processo de pesquisa e desenvolvimento.⁴ Esforços globais são necessários para impulsionar a pesquisa e o desenvolvimento de novos ATBs, juntamente com uma abordagem abrangente para promover o uso responsável desses medicamentos.

2.2 Inativação Fotodinâmica

2.2.1 Inativação fotodinâmica

Em 1900, o cientista alemão Oscar Raab acidentalmente descobriu a associação entre a luz e uma molécula fotossensível. Durante um experimento, ele expôs luz branca a uma cultura de *Paramecium caudatum* contendo acridina e notou que os efeitos citotóxicos eram mais intensos quando a luz branca era combinada com as moléculas de acridina. Com base nessa descoberta e na compreensão da fluorescência, Raab propôs que a citotoxicidade resultava da transferência de energia da luz para a molécula fotossensível, que por sua vez convertia os produtos da fluorescência em substâncias tóxicas para as células, seguindo um mecanismo semelhante ao observado nas clorofilas.³⁸ No mesmo ano, o neurologista francês Jean Prime relatou que a administração oral de eosina em um paciente com epilepsia, quando exposto à luz solar, causava dermatite. Esse foi o primeiro relato do uso clínico da associação entre a luz e um fotossensibilizador em seres humanos. Posteriormente, Raab, Jodlbauer e von Tappeiner demonstraram que a presença de um terceiro elemento, o oxigênio, era necessário para que ocorressem efeitos tóxicos nas células. Esse mecanismo de ação foi então denominado fotodinâmica.^{39,40}

No início do século XX, tanto a inativação fotodinâmica (IFD) quanto a ATBT foram descobertas, mas os esforços para o tratamento de doenças infecciosas foram direcionados principalmente na descoberta de novos antibióticos com o surgimento da penicilina, enquanto o desenvolvimento de fotossensibilizadores (FS) foi limitado. Todavia, com a crescente resistência aos diversos tipos de ATBs, a busca por alternativas eficazes tornou-se urgente. Isso resultou em um renovado interesse e avanço nas pesquisas relacionadas aos FS.^{37,41}

Para desencadear a fotoinativação de microrganismos, é necessário ativar os FSs utilizando a luz em um comprimento de onda adequado. Geralmente, a IFD é aplicada utilizando-se a região azul, verde ou vermelha do espectro eletromagnético, combinando as bandas de Soret (região de máxima absorção de uma molécula) dos FSs com as fontes de luz disponíveis. Além disso, é importante selecionar um comprimento de onda que não ative os cromóforos naturais presentes no tecido ou nos microrganismos. Dessa forma, é preferível realizar a aplicação dentro da janela óptica terapêutica, que abrange o intervalo de 650 a 1300 nm do espectro visível.^{37,40} Essa faixa apresenta baixa absorção pelas biomoléculas e pela água. Essa abordagem é especialmente relevante no caso de infecções internas, pois garante que o tratamento não seja tóxico para as células eucarióticas.

Embora a região do espectro azul esteja compreendida no intervalo de 400 a 490 nm, a qual não corresponde à região da janela terapêutica, seu uso no tratamento de infecções superficiais não apresenta toxicidade para as células epiteliais. Isso ocorre devido à baixa penetrabilidade da luz azul nos tecidos, o que impede a ativação indesejada dos cromóforos celulares nessa região.⁴²

A IFD oferece uma promissora alternativa para o tratamento de doenças infecciosas, especialmente aquelas causadas por agentes patogênicos resistentes a ATBs convencionais. Os FS são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio quando ativados pela luz, levando à destruição seletiva de microrganismos indesejados, como bactérias, fungos e vírus.⁴³

2.2.2 Mecanismo de ação da inativação fotodinâmica

A IFD é uma técnica que produz espécies reativas de oxigênio (EROs) que desencadeiam o estresse oxidativo. Os mecanismos moleculares de proteções contra os agentes oxidativos, quando ineficientes, resultam na morte celular. Nesta técnica, a produção das EROs é resultante da absorção de um fóton no comprimento de onda correspondente a banda de absorção da molécula fotossensibilizadora, geralmente correspondente a região azul, verde ou vermelha do espectro eletromagnético,³⁹ esquematizado no diagrama de Jablonski mostrado na Figura 4.

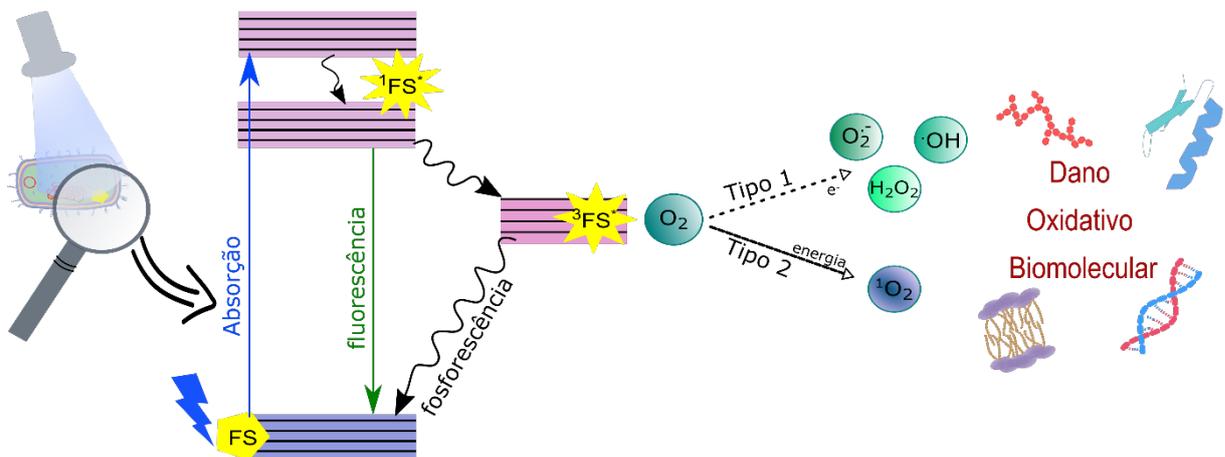


Figura 4 – Mecanismo de ação da IFD representada pelo diagrama de Jablonski. O fotossensibilizador (FS) internalizado na bactéria quando absorver um fóton com a energia suficiente para promover os elétrons a níveis mais energéticos, irá transferir a energia ou elétrons para molécula de oxigênio produzindo espécies reativas de oxigênio que degradarão carboidratos, proteínas, lipídeos e material genético. Fotossensibilizador (FS), estado singlete excitado ($^1FS^*$), estado tripleto excitado ($^3FS^*$), oxigênio molecular (O_2).

Fonte: Elaborada pela autora.

Dependendo do tipo de infecção, a escolha do fotossensibilizador (FS) influenciara na resposta da IFD, pois infecções internas necessitam de FS que absorvam luz em comprimentos de onda maiores para que a luz possa penetrar o tecido até o local da infecção.³⁹ Além disso, dependendo da constituição da parede celular bacteriana, ou seja, se for Gram-negativa ou Gram-positiva, terá diferentes graus de afinidades com alguns FS, que pode favorecer ou diminuir a efetividade da IFD.¹³

A maioria dos FSs são moléculas orgânicas aromáticas com uma extensa deslocalização eletrônica, sendo que ao comparar com moléculas menos decentralizadas a energia necessária para excitar os elétrons do orbital molecular ocupado mais alto (HOMO) para o orbital molecular não ocupado mais baixo (LUMO) é menor. Ou seja, a luz no comprimento de onda na região do visível e infravermelho próximo tem alta probabilidade de ser absorvida pelo FS, promovendo o elétron do estado fundamental (S_0) para o estado singleto excitado (S_1), o qual é instável e com curto tempo de vida na ordem de grandeza de nanossegundos. Por esta razão, vários processos ocorrem para que o FS seja mais estável, por exemplo, ao retornar ao estado inicial (S_0) emitindo calor (conversão interna) ou luz (fluorescência).⁴⁴ A possibilidade de interesse para IFD é o cruzamento intersistema para o estado tripleto excitado (T_1) menos energético que S_1 , de modo que o FS seja mais estável. Esse processo ocorre de forma não radioativa com a inversão do spin do elétron, impedindo o retorno a S_0 pois violaria o Princípio de Exclusão de Pauli, uma vez que os números quânticos seriam idênticos ao de seu elétron emparelhado. Com um tempo de vida maior na ordem de grandeza de microssegundos, o FS excitado pode atuar em reações químicas por duas vias distintas.^{37,45}

Na reação do Tipo I ocorre a transferência de elétrons (ou Hidrogênio, H^+) para biomoléculas tais como aminoácidos, proteínas, lipídios insaturados e bases nitrogenadas. Mesmo após a irradiação, essas biomoléculas podem reduzir ou oxidar outras moléculas iniciando uma cadeia de reação redox. A transferência de elétrons para o oxigênio produz o radical superóxido (O_2^-) que sofre a reação redox e produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), no meio biológico catalizado pela enzima Superóxido Dismutase (SOD). A produção da hidroxila (OH^-) pode ocorrer via reação Fenton com a redução de íons metálicos, tais como os íons ferrosos (Fe^{+3} , Fe^{+2}), sendo o superóxido o agente redutor. Outra possibilidade de geração de radical hidroxila é pela reação direta do peróxido de hidrogênio como superóxido, denominada de Heber Weiss.^{13,14}

O fotoproceto do tipo II resulta na produção do oxigênio singleto (1O_2), por meio da transferência de energia do FS no estado tripleto excitado para o oxigênio no estado tripleto (3O_2), seu estado basal. O oxigênio singleto possui o orbital π^*2p desocupado, por isso é altamente reativo com compostos ricos em elétrons, tem um curto tempo de vida (10^{-4} a 10^{-8} s) e uma baixa difusão (> 200 nm), por esta razão sua reação ocorre com as biomoléculas próximas ao FS.^{44,45}

Ambas as reações tipo I e II ocorrem simultaneamente, variando a eficiência dependendo do FS e da disponibilidade de moléculas de oxigênio presente no meio. Contudo, a reação do tipo II tende a ser a de maior interesse, uma vez que os mecanismos de proteção ao estresse oxidativo não se aplicam ao oxigênio singlete, sendo assim a IFD eficiente e de baixa probabilidade de resistência.⁴³

2.2.3 Estresse oxidativo

A energia necessária para a sobrevivência celular é obtida pela respiração aeróbica, que também é a principal fonte de geração de EROs no interior de uma célula, seja procarionte ou eucariótica. O oxigênio molecular é essencial na cadeia respiratória, pois atua como o receptor final de elétrons do processo respiratório.³⁶ Contudo, uma pequena fração de elétrons pode interagir com o oxigênio molecular, formando EROs como o superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).⁴⁶

O estresse oxidativo ocorre no caso em que há um aumento exacerbado da presença de EROs no interior celular, e/ou quando a capacidade antioxidante da célula é limitada.⁴⁴ Por exemplo, a oxidação lipídica promovida pelo H_2O_2 , principalmente nos ácidos graxos poli-insaturados devido a insaturação e os grupos de metileno ($\sim CH_2 \sim$), desencadeia reação em cadeia de radical livre, ou seja, a partir de uma reação oxidativa os outros lipídeos são oxidados sequencialmente, em efeito cascata.⁴⁷

Como resposta, as bactérias produzem enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxidase. A SOD é responsável por converter o O_2^- em H_2O_2 , enquanto a catalase e a peroxidase atuam na decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio.⁴⁸ Além disso, a bactéria pode responder impedindo a formação de radicais com controle enzimático e regulação da disponibilidade de substratos, de modo a minimizar a formação de EROs como subprodutos. A síntese de SOD é regulada por SoxRS, que também regula os genes que codificam enzimas de reparação de DNA e do metabolismo de carbono.⁴⁴ Em geral, o sistema SoxRS é ativado em resposta ao estresse oxidativo para neutralizar radicais livres e reparar danos oxidativos em macromoléculas. Assim como o gene OxyR, que atua como um sensor de redox em níveis elevados de H_2O_2 .⁴⁹ O regulador OxyR ao ser oxidado muda sua conformação, de modo a ativar sequências específicas de DNA de enzimas antioxidantes, como a SOD, a catalase e a peroxidase. Além disso, o OxyR também regula outros genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, como aqueles relacionados à reparação de DNA e à homeostase redox.^{46,48}

Na IFD, o oxigênio singlete produzido na reação do tipo II é a EROs mais reativa. O metabolismo celular não produz o oxigênio singlete, mas pode ser produzido pelos FSs endógenos como flavinas e porfirinas na presença de luz.⁵⁰ No caso das células fotossintéticas, a produção ocorre devido a excitação dos pigmentos clorofilas ou bacterioclorofilas.⁴⁴ Entretanto, o entendimento de proteção contra o oxigênio singlete ainda é escasso. Em

alguns microrganismos foi observado que a presença de oxigênio singlete pode ativar os genes regulados por SoxRS, mas não foi identificado a ativação de OxyR.⁴⁹

A reação fotodinâmica do tipo I produz EROs que comumente são produtos secundários nos processos metabólicos em uma célula, portanto, existem mecanismos de proteção intrínsecos capazes de combater as EROs advindas da reação tipo I.⁵⁰ No caso do oxigênio singlete, não há relatos de enzimas que o degradem.³⁶ Entretanto, a ação fotoxidativa da IFD ocorre no interior da célula bacteriana em grande escala, de modo que a expressão das enzimas de controle do estresse oxidativo seja insuficiente para evitar os danos promovidos pelas EROs.⁵⁰ Por essas razões, a IFD é descrita como uma técnica que possui baixa probabilidade em desencadear resistência ao seu mecanismo de ação. Mas ressalvas devem ser feitas quanto aos componentes da técnica, por exemplo, a interação da bactéria e FS,⁵¹ que em essência é uma interação molécula e célula e pode estar sujeita a ação de bombas de efluxo, por exemplo.⁵²

2.3 Combinação de terapias

2.3.1 Sinergismo e antagonismo

A resistência antimicrobiana emergente supera a introdução de novos medicamentos, motivando a busca por estratégias que maximizem os efeitos dos tratamentos existentes com a combinação de terapias, a qual visa melhor eficácia pelo efeito sinérgico, ampliar o espectro de ação antimicrobiana, minimizar efeitos colaterais e suprimir o desenvolvimento da resistência antimicrobiana.⁵³ Neste cenário, a interação pode ser entre compostos, ou seja, combinação de diferentes ATBs e adjuvantes, ou até mesmo a combinação de ATBs com outros tratamentos seja a IFD, peptídeos antimicrobianos, bacteriófagos e nanopartículas.⁵⁴

Idealmente, espera-se que ao combinar técnicas o resultado a ser obtido seja um efeito de sinergia. Entretanto, uma resposta potencializada não significa um resultado sinérgico entre as terapias combinadas, pois sinergia requer uma definição cautelosa conforme determinado em 1992 na Finlândia, descrito no acordo de Saariselkä.⁵⁵ O sinergismo refere-se a uma interação entre duas substâncias ou elementos que resulta em um efeito maior do que a soma dos efeitos individuais de cada um. Em outras palavras, a ação combinada é mais intensa ou mais eficaz do que se cada terapia atuasse isoladamente.^{55,56} Por outro lado, o antagonismo refere-se a uma interação entre duas substâncias ou elementos que resulta em um efeito menor do que o esperado com base nos efeitos individuais de cada um. Nesse caso, as terapias têm efeitos opostos ou contrários, neutralizando ou diminuindo a atividade uma da outra.^{57,58}

Portanto, categorizar a resposta em sinérgico e antagonístico está associado com o resultado da análise do efeito por meio de modelo de referência, o qual pode incluir outras definições intermediárias e diferenciar a interpretação de uma resposta em sinérgica.^{53,55}

Por exemplo, o modelo de aditividade de Loewe supõe que os efeitos das terapias individuais em uma combinação são independentes e podem ser somados aritmeticamente. Ou seja, se as terapias A e B forem aditivas, a resposta combinada delas será igual à soma das respostas individuais esperadas das substâncias A e B, quando utilizadas nas mesmas concentrações. Isso implica que as terapias atuam independentemente uma da outra, supondo que não haja sinergismo ou antagonismo na combinação. Embora seja uma análise simples de sinergia, pode não ser verdadeira quando existem interações não lineares ou mecanismos complexos de ação.^{57,59}

Por outro lado, o índice de Bliss considera que o efeito combinado de dois tratamentos é determinado pela probabilidade da resposta ser afetada por pelo menos um dos tratamentos. Isto é, o índice de Bliss quantifica a sinergia entre duas terapias ao considerar a sobreposição dos seus efeitos individuais, sendo o grau de sinergismo a probabilidade de que a combinação de ambas terapias tenha um efeito maior do que o esperado quando agem de forma independente, ou seja, que sua ação conjunta é mais eficaz do que a soma de suas ações individuais.^{60,61}

Independentemente das técnicas utilizadas na combinação, é importante adotar abordagens metodológicas apropriadas e selecionar um modelo de referência para categorizar os resultados em relação ao grau de interação, para garantir a validade dos resultados e uma interpretação adequada do nível de interação alcançado.⁵⁶

2.3.2 Efeito da ação combinada da IFD e ATBT

Ao longo dos anos, diversos estudos combinando ATBs e IFD são apresentados na literatura considerando diferentes microrganismos, FS, fonte de luz, ATBs, de modo a totalizar em mais de 80 parâmetros distintos associados.⁶² Todavia, a minoria dos estudos abordaram as metodologias (tabuleiro de xadrez, efeitos pós-antibióticos, tempo de morte) ou modelos de análise (Loewe, Bliss) para classificar os resultados em efeitos sinérgicos e antagônico apropriadamente.⁶³

Apesar disso, esses estudos têm demonstrado a capacidade da IFD em potencializar a ação dos ATBs na maioria dos casos.^{54,62,63} Por exemplo, o FS meso-tetra (4-aminofenil) porfina, uma porfirina catiônica, associada a cloranfenicol e tobramicina apresentam resultados aditivos para *S. aureus* e *E. coli*, e sinérgicos para *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*).⁶⁴ O FS rosa bengala apresenta sinergia com gentamicina (GEN) e ciprofloxacino em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.⁶⁵ O FS azul de metileno aumentou a susceptibilidade de MRSA para cloranfenicol e tetraciclina.⁶⁶ E efeito significativos na redução da concentração inibitória mínima (MIC) de ciprofloxacino em *E. coli* foi obtido com IFD utilizando FSs imidazol catiônicos.⁶⁷

Entretanto, algumas combinações são indiferentes, ou seja, não apresentam um

efeito potencializador da ação bactericida, por exemplo, GEN, vancomicina, rifampicina, ácido fusídico e ceftriaxona combinados com o FS azul de metileno em *S. aureus*.^{64,68} Assim como é relatado antagonismo para vancomicina combinado com IFD utilizando rosa bengala em *E. faecium*.⁶⁵ Apesar de poucos os casos relatados, nem todas as associações, de fato, serão sinérgicas.⁶²

Estudo em biofilmes foi realizado combinando ATBs e IFD utilizando azul de metileno como FS. Nos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* com subconcentrações de ciprofloxacino, os resultados indicaram que independente do grau de resistência dos microrganismo, a associação de IFD e ATB foi mais eficaz que a monoterapia na redução do biofilme.⁶⁸ Por outro lado, a combinação com GEN mostrou atividade antimicrobiana na cultura planctônica de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas quanto a cultura de biofilme apenas a *P. aeruginosa* apresentou resultado significativo para associação.⁶⁹

Além disso, análises de tratamentos combinados em longos prazos foram avaliados para IFD com azul de metileno e amoxicilina (AMO) durante 5 dias em *S. aureus*. Os resultados demonstraram que nenhuma resistência bacteriana significativa foi desenvolvida.⁷⁰ Entretanto, a redução da concentração inibitória mínima (MIC, do inglês Minimum inhibitory concentrations) de oxacilina em MRSA promovida pela combinação de IFD com deuteroporphyrin como FS não foi mantida para gerações descendentes das células tratadas.⁷¹

Em geral, os estudos relatados na literatura têm buscado demonstrar a potencialização da ação dos ATBs pela IFD, explorando combinações sinérgicas entre diferentes classes de ATBs e FSs, bem como a ordem de associação, seja simultânea ou sequencial.⁶² Esses parâmetros têm impacto direto nos resultados obtidos no tratamento. No entanto, é importante destacar que poucos estudos têm adotado metodologias e análises adequadas.⁶³ Além disso, a literatura ainda carece de embasamento mecanístico dos efeitos da associação da IFD com ATBs, a fim de garantir que essa abordagem combinada seja uma alternativa eficaz para combater a resistência bacteriana, e não contribuir para sua propagação.^{36,37}

3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMBINATÓRIOS DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM A ANTIBIOTICOTERAPIA

A resistência bacteriana aos ATBs representa uma grave ameaça à saúde pública global no século atual. É crucial fortalecer e estar de acordo com as conformidades do tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, por meio do desenvolvimento de novos métodos antimicrobianos eficazes, comprovados para uso clínico. A IFD surge como uma alternativa à antibioticoterapia (ATBT) convencional, o tratamento padrão para infecções, devido ao seu mecanismo de ação que permite a eliminação de células microbianas indesejáveis sem promover a seleção de linhagens bacterianas resistentes e com baixos efeitos colaterais. Nos últimos anos, o Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF-IFSC/USP) tem realizado diversos estudos de controle microbiológico visando aprimorar o potencial da aplicação clínica da IFD. No entanto, a pesquisa clínica para o tratamento de infecções bacterianas requer grupos comparativos com uso de antimicrobianos (ATBs) para também avaliar possíveis interações medicamentosas antagônicas ou sinérgicas que podem acontecer. Neste contexto, este capítulo teve como objetivo investigar a combinação de diferentes classes de ATBs, assim como protocolos de IFD em *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, ambas bactérias Gram-positivas. Os resultados indicaram que os protocolos de IFD utilizando CUR como FS mostraram-se eficientes, em condições de baixa dose de luz, dependendo da concentração de FS. Além disso, a aplicação de subdose de IFD previamente à ATBT (antibioticoterapia) apresentou resultados promissores, pois reduziu a Concentração inibitória mínima (MIC) da maioria dos ATB estudados. Os iniciais apresentados são fundamentais para o desenvolvimento dos próximos capítulos da pesquisa científica desenvolvida nesta tese.

3.1 Metodologia

3.1.1 Cultivo microrganismo

A bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus pyogenes* coletada de paciente diagnosticado com faringotonsilites em pesquisa clínica (Comitê de Ética Humana da Santa Casa, São Carlos-São Paulo, Brasil CAAE 83082018.4.0000.8148) foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion Ágar (BHI) por 24 h. As colônias foram suspensas em tampão fosfato salino (PBS) para teste de IFD. Para tratamentos contendo ATB foram suspensas em meio Mueller Hinton Control Cátion (MH). O inóculo foi ajustado em 10^8 UFC/ml por meio da absorbância em 600 nm (Cary UV-Vis50, Varian).

3.1.2 Inativação fotodinâmica

A solução estoque da curcumina sintética (CUR, PDTPharma[®]) foi preparada em álcool etílico em 5 mM e diluída em água destilada nas concentrações de interesse. Desta forma, a concentração de álcool etílico foi substancialmente reduzida para evitar possíveis efeitos adversos em estudo futuros, com concentração final de 0,2%. Realizou-se três grupos controles: Controle Geral (bactéria), Controle Escuro (bactéria + FS), Controle Luz (bactéria + luz) e o grupo tratamento IFD (bactéria + FS + luz). O volume final do poço foi de 400 μ l. Para os grupos IFD e grupo escuro as bactérias foram incubadas com 2,5 a 160 μ M de CUR por 15 min. Posteriormente, os grupos luz e IFD foram submetidos a dose de luz 5 J/cm² utilizando o dispositivo LED de 450 nm (Biotable[®]). As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI para contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) sobreviventes. Condições abaixo do limiar de dose da IFD foram usadas para os experimentos de combinação, garantindo a sobrevivência das células bacterianas para continuidade do estudo.

3.1.3 Concentração inibitória mínima

Os experimentos foram adaptados conforme a recomendação do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).⁷² Soluções estoque de 5 mg/ml de amoxicilina (AMO) em tampão fosfato, eritromicina (ERI) em álcool etílico e gentamicina (GEN) em água foram preparadas. A partir da solução estoque, foi preparada a solução na concentração de interesse em meio MH. Foram adicionados 50 μ L de meio MH nos poços da placa de 96 poços, com exceção do primeiro poço da primeira coluna. Os ATBs foram distribuídos por meio da diluição sequencial, sendo 100 μ L no primeiro poço e transferido 50 μ L para os poços adjacentes de uma mesma fileira. Posteriormente, o inóculo bacteriano em 10⁸ UFC/ml foi diluído em concentração final de 20 %, sendo 50 μ L adicionados aos poços, totalizando o volume final de 100 μ L. Em conjunto foi realizado o controle positivo de crescimento bacteriano e controle negativo do meio de cultura, a placa foi armazenada a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, 30 μ L de solução de resazurina (0,0015%) foi adicionada por 4 horas a 37 °C. A concentração inibitória mínima (MIC, em inglês) foi definida como a menor concentração do ATB com capacidade de inibir o crescimento visível das cepas bacterianas, indicada pela atividade metabólica da resazurina.

3.1.4 Curva de crescimento com terapia combinada

De acordo com os procedimentos descritos na seção 3.1.2 e 3.1.3 foram realizados os ensaios de interação com a MIC de todos os ATBs determinadas separadamente e as correspondentes doses de IFD. Para isso, diferentes gradientes de concentração de ATB e FS foram utilizados. As bactérias foram submetidas primeiramente a IFD e, posteriormente transferidas para cubetas com adição de ATB com concentrações próxima da MIC,

definindo o tempo zero. A densidade óptica foi medida em 600 nm em cada grupo das respectivas monoterapias e o grupo controle durante um período de 8 horas, para verificar a curva de crescimento dos respectivos tratamentos.⁷³

3.1.5 Fotodegradação da curcumina com antimicrobianos

A partir da solução estoque de CUR preparada em álcool etílico em 5 mM, preparou-se nova solução em água destilada na concentração de 20 μM . As soluções estoques do ATBs AMO, ERI e GEN foram diluídas em água para uma concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$. Em uma placa de 24 poços foram adicionados 250 μl de CUR (20 μM) e 250 μl de um dos ATBs, totalizando 4 poços para AMO, ERI e GEN. E 4 poços contiveram 250 μl de CUR (20 μM) e 250 μl de água. A placa de 24 poços foi submetida a irradiação no dispositivo de LED (Biotable[®]) de 450 nm e 40 mW/cm² em doses de luz de 0, 20, 40 e 80 J/cm². A cada intervalo, as amostras foram transferidas para cubeta de quartzo e a fluorescência foi coletada no comprimento de onda de excitação de 430 nm no fluorímetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer[®].

3.1.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata com n=9 para cada grupo estudado. Os resultados foram analisados utilizando a ANOVA associada ao teste de Tukey post hoc. Os valores foram considerados significativamente diferentes com um intervalo de confiança de 95%. Para analisar os efeitos sinérgicos e antagônicos da combinação de terapias, foi aplicado o modelo de independência de Bliss⁷³ conforme a equação 3.1:

$$S_{bliss} = F_{sobrev}^{ATB} * F_{sobrev}^{IFD} - F_{sobrev}^{Comb} \quad (3.1)$$

3.2 Resultados

3.2.1 Inativação fotodinâmica e concentração inibitória mínima de *S. aureus*

A Figura 5 mostra a resposta de sobrevivência de *S. aureus* na IFD com dose de luz fixa em 5 J/cm², variando a concentração do FS (CUR). Os grupos controle luz (L5) e escuro (FS2,5-FS160) indicam que não há atividade tóxica da CUR no escuro e da luz no comprimento de onda de 450 nm quando aplicado sobre as bactérias nas condições estudadas, pois não houve redução estatisticamente significativa da carga bacteriana, garantindo que os resultados de IFD são decorrentes das espécies reativas de oxigênios formadas. Para a IFD observou-se uma redução da carga bacteriana de 1,90 Log (UFC/ml) para 2,5 μM de CUR, a menor concentração avaliada. Para 10 e 20 μM foi reduzido 2,64 e 3,30 Log (UFC/ml) respectivamente, e a redução completa foi obtida na concentração 160 μM de FS, a maior avaliada, considerando a mesma dose de 5 J/cm².

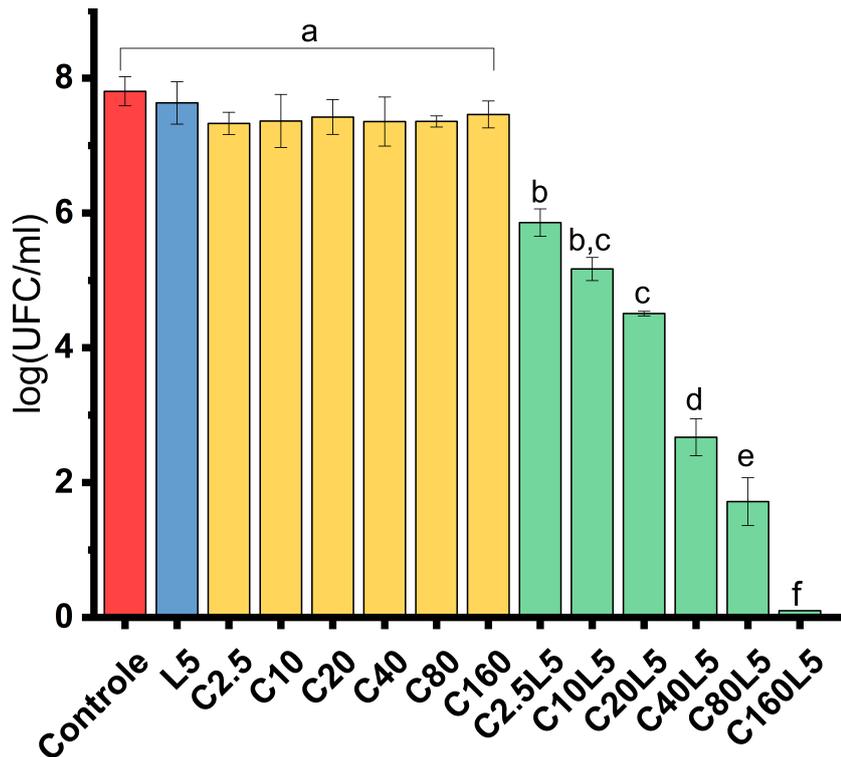


Figura 5 – Inativação Fotodinâmica (IFD). Sobrevivência de *S. aureus* com controle escuro curcumina de 2,5 a 160 μM (C), controle dose de luz de 5 J/cm^2 (L5) e IFD com dose de luz fixa para diferentes concentrações de curcumina (CL5). Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. Fonte: Elaborada pela autora.

A concentração inibitória mínima foi determinada para AMO, ERI e GEN em *S. aureus* e classificada como sensível e resistente de acordo com os valores de referência do BrCAST.⁷⁴ Além disso, foi avaliado o efeito da IFD nos valores de MIC para as concentrações de CUR na fluência de 5 J/cm^2 , inativando menos de 50% da população. Os dados são apresentados na Tabela 1.

De modo geral, a cepa estudada é sensível aos ATBs avaliados antes e depois da IFD com exceção da ERI, ao qual a *S. aureus* se mostrou resistente quando não submetida previamente a IFD. Quando o ATB é entregue junto com a CUR no escuro há uma pequena tendência em aumentar os valores da MIC comparado aos grupos controles, sendo que a combinação AMO+FS2,5 apresentou classificação como resistente ao invés de sensível. Além disso, todos os grupos que receberam subdose de IFD antes do antibiótico AMO e ERI, a *S. aureus* apresentaram menores valores de MIC, diferentemente da GEN que mostrou valores maiores, porém dentro da classificação sensível ao antimicrobiano para essa bactéria.

É válido ressaltar que embora a cepa avaliada originalmente tenha sido obtida da coleção ATCC, o número de passagens do estoque utilizado são superiores a cinco,

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (MIC) e classificação da Amoxicilina (AMO), Eritromicina (ERI) e Gentamicina (GEN) para *S. aureus* em sensível (S) ou resistente (R). Valores para controle e com diferentes concentrações de curcumina no escuro (FS) e com dose de luz de 5 J/cm² (IFD).

Grupos	(μg/ml)					
	Amoxicilina		Eritromicina		Gentamicina	
Controle	0,125	S	32	R	0,5	S
FS2.5	2	R	64	R	0,5	S
FS10	0,25	S	64	R	1	S
FS20	0,25	S	16	R	0,25	S
IFD2.5	0,125	S	0,5	S	2	S
IFD10	0,125	S	0,5	S	2	S
IFD20	0,063	S	0,5	S	2	S

Fonte: Elaborada pela autora.

de modo que a cepa não mantém as mesmas características fenotípicas e aumentem as probabilidades de mutação comparada a cepa ancestral.⁷⁵

3.2.2 Inativação fotodinâmica e concentração inibitória mínima de *S. pyogenes*

Na Figura 6, é apresentada a resposta de sobrevivência de *S. pyogenes* à IFD com uma dose de luz fixa de 5 J/cm², variando a concentração do FS (CUR). Os grupos controle de luz (L5) e escuro (C) evidenciam a ausência de atividade tóxica da CUR quando aplicada às bactérias assim como a dose de luz de 5 J/cm² no comprimento de onda de 450 nm, isso é comprovado pela falta de redução estatisticamente significativa da carga bacteriana. A inativação obtida nos grupos de IFD é, portanto, em decorrência da ação fotooxidativa. Para dose de luz de 5 J/cm² e FS nas concentrações de 2,5, 10 e 20 μM foram obtidas reduções de 2,76, 2,90 e 3,35 Log (UFC/ml), respectivamente.

A MIC dos ATBs AMO, ERI, e GEN foi avaliada para *S. pyogenes*, assim como a influência dos parâmetros da IFD, conforme a Tabela 2. A cepa é classificada como resistente para AMO e ERI, não apresentou alteração do MIC quando previamente exposto a CUR. Entretanto, houve redução de 256 vezes em relação ao controle (bactéria sem tratamento) quando a IFD foi aplicada previamente no *S. pyogenes*. No caso da ERI, a cepa também foi classificada como resistente, sendo que a presença de CUR nas concentrações de 10 e 20 μM aumentaram a MIC em 2 vezes. Contudo, a aplicação prévia de IFD alterou a classificação da cepa de resistente para sensível à ERI com a redução dos valores de MIC. No caso da GEN, a *S. pyogenes* é considerada suscetível, mas não existe um ponto de corte estabelecido, porém valores típicos de MIC da GEN para essa bactéria estão na faixa de 0,25 a 4 μg/ml,⁷⁶⁻⁷⁸ ou seja, embora tenha tido um aumento do MIC quando aplicada a IFD, ainda estão dentro dos valores reportados.

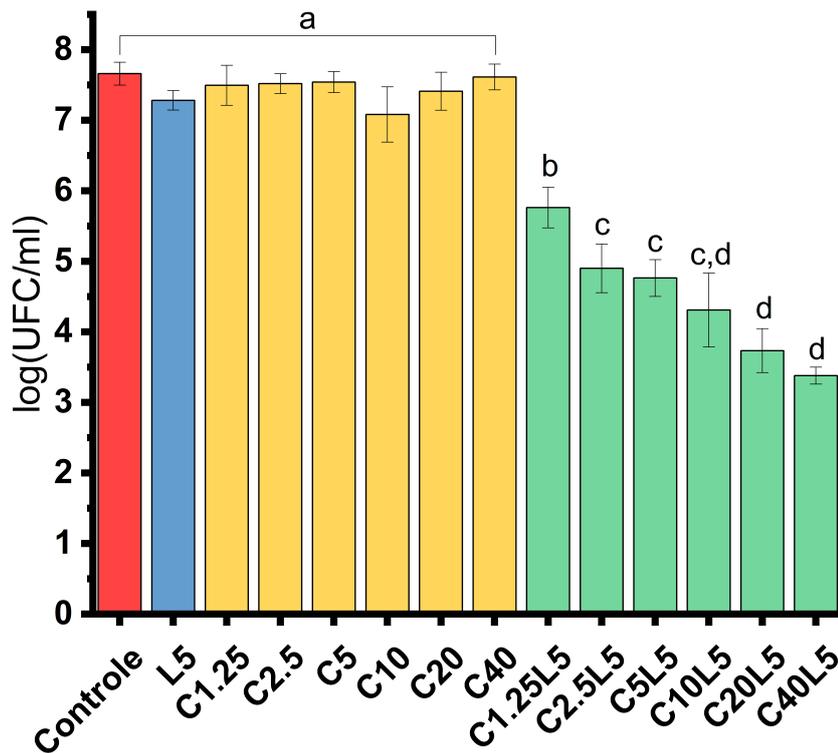


Figura 6 – Inativação Fotodinâmica (IFD). Sobrevivência de *S. pyogenes* com controle escuro curcumina de 2,5 a 160 μM (C), controle dose de luz de 5 J/cm^2 (L5) e IFD com dose de luz fixa para diferentes concentrações de curcumina (CL5). Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (MIC) e classificação da Amoxicilina (AMO), Eritromicina (ERI) e Gentamicina (GEN) para *S. pyogenes* em sensível (S) ou resistente (R). Valores para controle e com diferentes concentrações de curcumina no escuro (FS) e com dose de luz de 5 J/cm^2 (IFD).

Grupos	(μg/ml)					
	Amoxicilina		Eritromicina		Gentamicina	
Controle	128	R	8	R	0,125	-
FS2.5	128	R	8	R	0,125	-
FS10	128	R	16	R	0,125	-
FS20	128	R	16	R	0,125	-
IFD2.5	0,5	R	0,5	S	0,5	-
IFD10	0,5	R	0,5	S	0,5	-
IFD20	0,5	R	0,125	S	0,5	-

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.3 Avaliação de efeitos sinérgicos e antagônicos

A curva de crescimento microbiano da combinação de IFD com ATBT foi realizada tanto para *S. aureus* quanto para *S. pyogenes*. Os protocolos de IFD empregados foram os que apresentaram menos de 50% de inativação. Primeiramente, foi aplicada a IFD e posteriormente a adição dos ATBs. A taxa de crescimento foi avaliada para as 27 combinações e as 12 monoterapias, além do grupo controle.

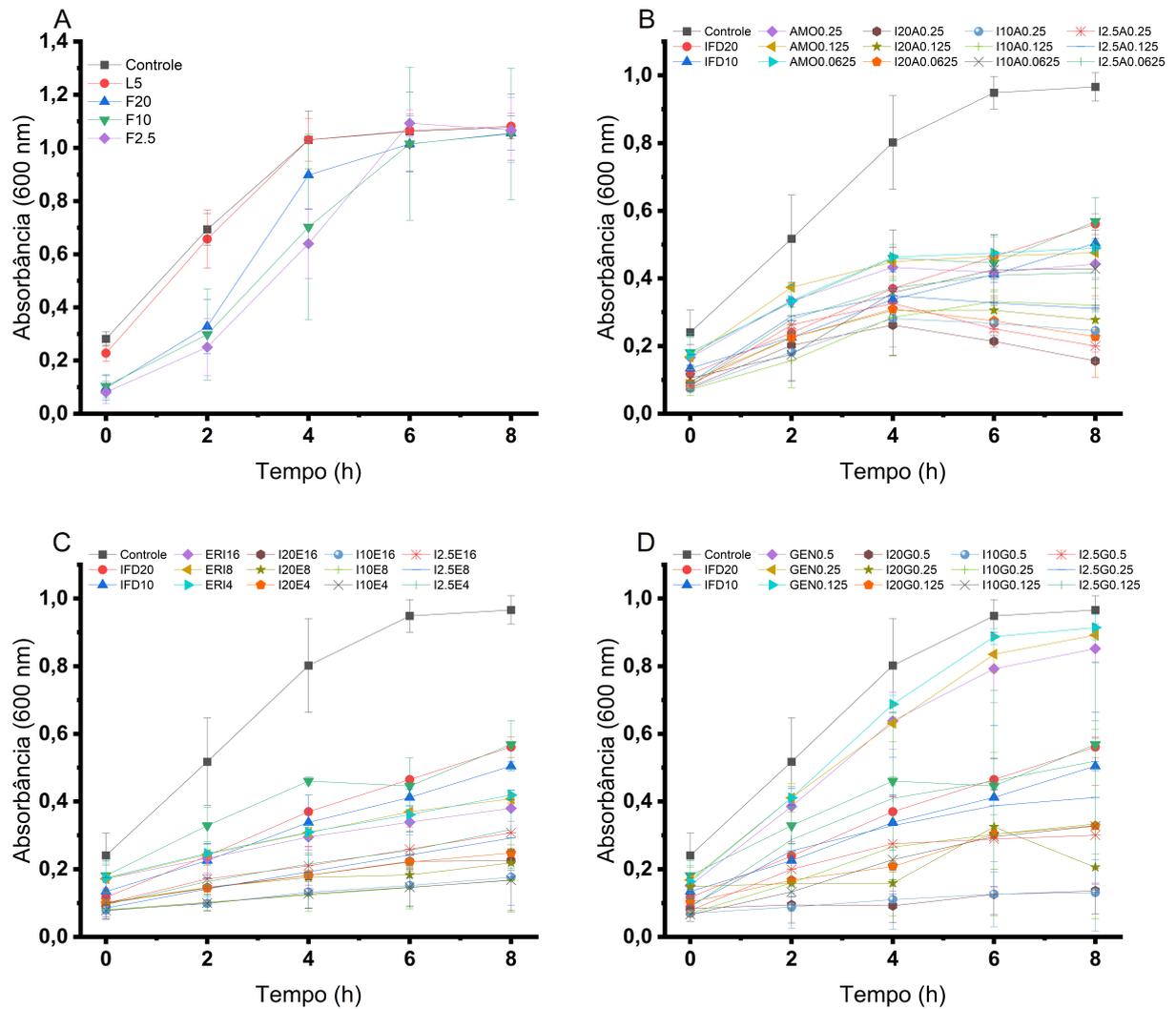


Figura 7 – Curva de crescimento da combinação da inativação fotodinâmica (IFD) e da antibioticoterapia em *S. aureus* com fluência (L) 5J/cm² em 450 nm, com grupo controle e respectivas monoterapias. Variação da concentração do fotosensibilizador (F) de 2,5, 10 e 20 μ M e das concentrações das ATBs em MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC. A) Controles dos parâmetros de IFD, B) combinação com amoxicilina (AMO), C) combinação com eritromicina (ERI) e D) combinação com gentamicina (GEN).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para *S. aureus*, conforme mostra a Figura 7, as terapias reduziram a taxa de crescimento da bactéria quando comparada com o grupo controle, que possui um crescimento mais acelerado. O grupo luz não modificou o padrão de crescimento de *S. aureus*, enquanto que apenas o FS retardou o início do crescimento exponencial, porém a saturação em 8 h é atingida semelhantemente ao grupo controle (Figura 7.A). Nos demais painéis (Figura 7.B-D) verificou-se que a taxa de crescimento dos grupos combinados é menor do que as monoterapias, com a saturação não alcançando 60% em relação ao grupo controle.

O efeito combinado de dois tratamentos representado pelo índice de Bliss (Figura 8) é definido como a probabilidade do microrganismo ser afetado por pelo menos um dos tratamentos, os quais agem independentemente.

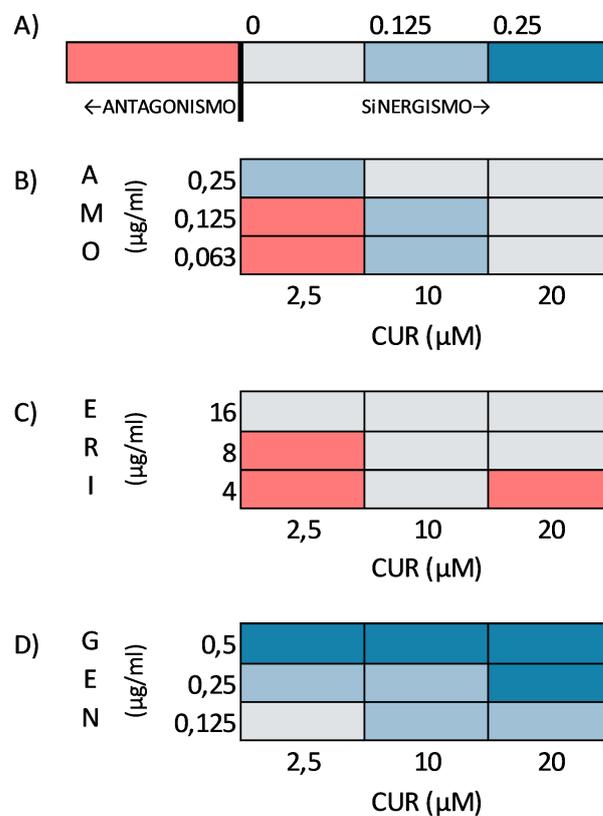


Figura 8 – Avaliação do efeito sinérgico ou antagônico para *S. aureus* pelo índice de Bliss (Equação 3.1) para IFD (curcumina (CUR) de diferentes concentrações, 5 J/cm²) e ATB. Sinergia (S > 0) está representado em escala azul e antagonismo (S < 0) está representado em vermelho. A) Escala de cor. B) Grupo com Amoxicilina (AMO). C) Grupo com Eritromicina (ERI). D) Grupo com Gentamicina (GEN).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 8 foi observado a combinação sinérgica em 81,5% dos grupos combinados (N=27), ou seja, embora as monoterapias usadas sejam subdose, as combinações resultaram em uma inativação bacteriana promissora. As combinações antagônicas foram

observadas nos grupos cujo uma das monoterapias (ATB ou IFD) possuíam baixa efetividade e, desse modo, o efeito não foi suficiente para promover uma inativação bacteriana significativa mesmo combinando as terapias.

A análise da Figura 9 revela que as terapias, seja a IFD, a ATBT ou a combinação de ambas, reduziram a taxa de crescimento de *S. pyogenes* em comparação com o grupo controle, que apresentou um crescimento mais acelerado.

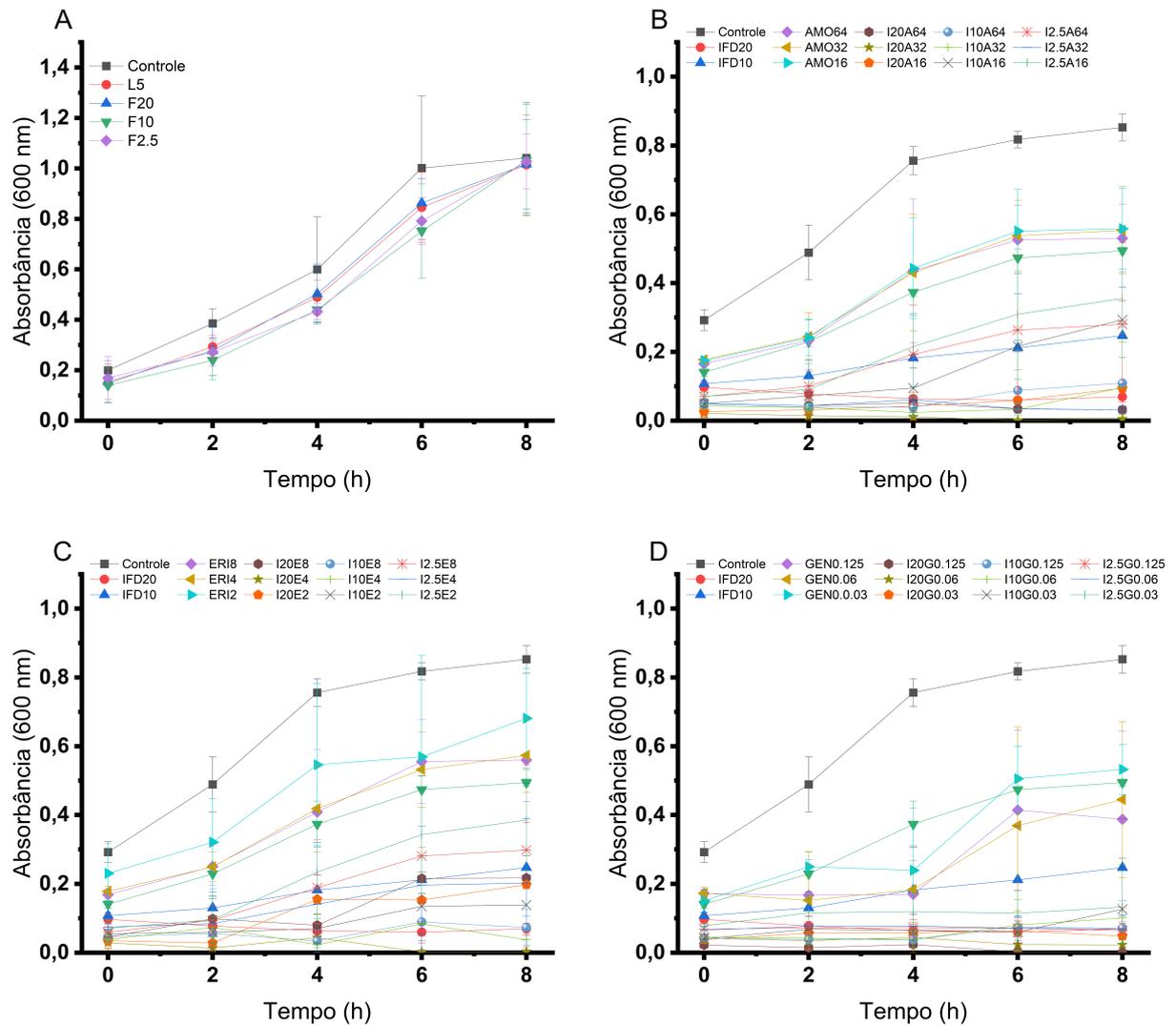


Figura 9 – Curva de crescimento da combinação da inativação fotodinâmica (IFD) e da antibioticoterapia em *S. pyogenes* com fluência (L) 5J/cm² em 450 nm, com grupo controle e respectivas monoterapias. Variação da concentração do fotosensibilizador (F) de 2,5, 10 e 20 μ M e das concentrações dos ATBs em MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC. A) Controles dos parâmetros de IFD, B) combinação com amoxicilina (AMO), C) combinação com eritromicina (ERI) e D) combinação com gentamicina (GEN).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 9.A, observa-se a influência dos parâmetros da IFD na proliferação de *S. pyogenes*, constatando que a luz tem pouca influência. No entanto, apesar de o FS retardar a fase logarítmica de crescimento, a densidade óptica alcança a mesma saturação em 8 horas. Em relação aos grupos que receberam os antibióticos AMO, ERI e GEN, representados na Figura 9.B-D, respectivamente, a saturação não atingiu 60% em relação ao grupo controle.

Para *S. pyogenes*, dos 27 grupos combinados 5 resultaram como antagônicos pelo índice de Bliss, conforme mostra a Figura 10. Majoritariamente, os grupos antagônicos foram obtidos quando uma das monoterapias afeta significativamente a população bacteriana, por exemplo a IFD de 20 μM com 5 J/cm^2 , com o resultado combinado sendo praticamente equivalente ou até mesmo inferior que a monoterapia.

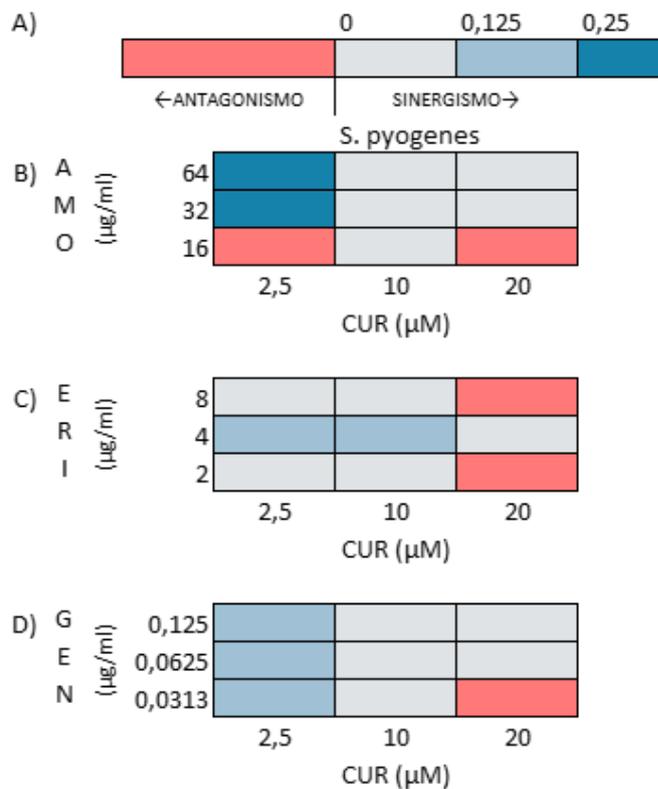


Figura 10 – Avaliação do efeito sinérgico ou antagônico para *S. pyogenes* pelo índice de Bliss (Equação 3.1) para IFD (curcumina (CUR) de diferentes concentrações, 5 J/cm^2) e ATB. Sinergia ($S > 0$) está representado em escala azul e antagonismo ($S < 0$) está representado em vermelho. A) Escala de cor. B) Grupo com Amoxicilina (AMO). C) Grupo com Eritromicina (ERI). D) Grupo com Gentamicina (GEN).

Fonte: Elaborada pela autora.

As curvas de crescimentos das combinações de tratamentos apresentadas na Figura 7 e na Figura 9 não são modeladas por funções sigmóides ou logística adequadamente. Entretanto, foi possível quantificar a taxa de crescimento por um ajuste linear em duas regiões, sendo que há uma inflexão da curva em 4 h, como visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação entre as taxas de crescimento para as combinações de inativação fotodinâmica (IFD) com os antimicrobianos (ATBs): amoxicilina, eritromicina e gentamicina para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* das curvas de crescimento apresentadas na Figura 7 e Figura 9.

Bactérias	IFD - Amoxicilina		IFD - Eritromicina		IFD - Gentamicina	
	0h-4h	4h-8h	0h-4h	4h-8h	0h-4h	4h-8h
<i>S. aureus</i>	<1 Monot.		<Monots		<Monots	
<i>S. pyogenes</i>	<Monots	>Monots	<ATB		<Monots	

Fonte: Elaborada pela autora.

Na IFD+ERI e IFD+GEN, a bactéria *S. aureus* teve taxas de crescimento inferior as monoterapias, independente da região (0h-4h ou 4h-8h). No caso dos tratamentos de IFD+AMO, as combinações apresentaram uma taxa de crescimento menor que pelo menos uma das monoterapias, seja a ATBT ou a IFD. Para *S. pyogenes*, as taxas de crescimento das combinações foram diferentes para cada ATB. O grupo IFD+AMO, apresentou taxa de crescimento menor que as monoterapias na região de 0h-4h, sendo que na região de 4h-8h o crescimento do tratamento combinado foi maior que a monoterapia. Para IFD+ERI, a combinação apresentou taxas de crescimento inferior apenas na monoterapia de ATB, mas foi maior do que a da monoterapia IFD. Contudo a IFD+GEN resultou em taxa de crescimento menor do que todas as monoterapias correspondentes.

3.2.4 Fotodegradação da curcumina com antimicrobianos

A luz é um dos principais componentes da IFD, sendo o efeitos de diferentes doses de luz no espectro de fluorescência da CUR com/sem ATBs foram avaliados e estão apresentados na Figura 11.

A intensidade de fluorescência do FS é cerca de 6 vezes maior quando a CUR está sozinha em comparação com sua presença em combinação com um ATB. O pico de fluorescência apenas da CUR foi de 541 nm, enquanto que na presença de AMO, ERI observa-se um deslocamento do pico de fluorescência para 538 nm, para GEN em 536 nm.

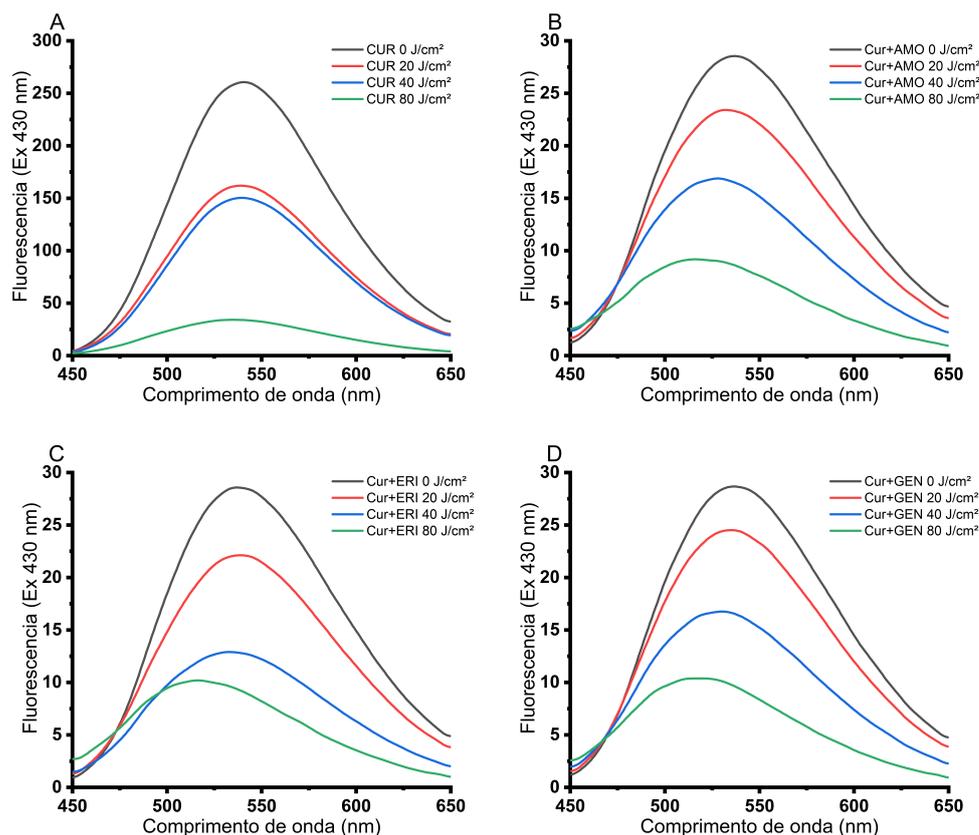


Figura 11 – Espectros de fluorescência com excitação em 430 nm da curcumina (CUR, 10 μ M) com/sem antimicrobianos (5 μ g/ml), fotodegradada com dose de luz de 0 a 80 J/cm². A) Apenas CUR, B) grupo com amoxicilina (AMO), C) grupo com eritromicina (ERI) e D) grupo com Gentamicina (GEN).

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base na área da curva de fluorescência, os valores obtidos ao longo das diferentes dose de luz aplicadas foram normalizadas pela área inicial ($t = 0$ s). Os dados foram plotados na Figura 12 como curva de decaimento exponencial. Desse modo, foi determinada a taxa de fotodegradação da CUR na ausência dos ATB em $2,59 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, e na presença de AMO ($2,54 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), ERI ($8,43 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) e GEN ($2,75 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Para o grupo com AMO e GEN as taxas se mantiveram próximas às obtidas para apenas CUR. Entretanto, o grupo com ERI foi o qual apresentou maior taxa de fotodegradação, sendo até 3 vezes maior do que o grupo apenas CUR.

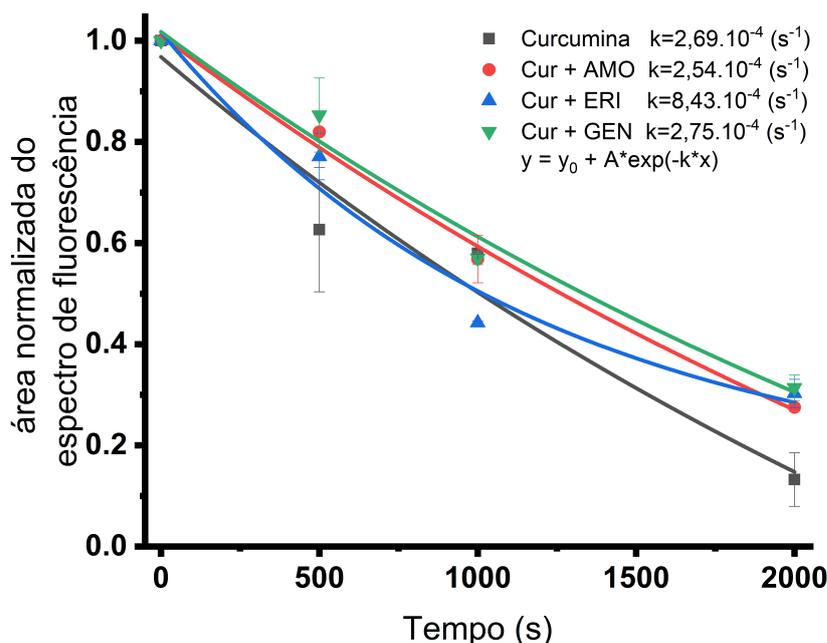


Figura 12 – Curva de fotodegradação normalizada da CUR (Cur, 10 μ M) com/sem amoxicilina (AMO), eritromicina (ERI) e gentamicina (GEN) na concentrações de 5 μ g/ml, com doses de luz de 0 a 80 J/cm², pela área da curva de fluorescência obtida com excitação em 430nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Discussão

Ambas bactérias Gram positivas *S. aureus* e *S. pyogenes* são de relevância clínica devido a doenças causadas em seres humanos. Como agravante, diversas linhagens de *S. aureus* são multirresistentes, ou seja, não respondem a diversas classes de ATBs.⁷⁹ *S. pyogenes*, em geral, são cepas suscetíveis a ATBs, porém frequentemente são identificados isolados que apresentam resistência a penicilinas e macrolídeos.⁷⁶ Idealmente, na rotina clínica, seria necessário identificar a sensibilidade antimicrobiana da cepa para a escolha adequada do medicamento.²² Em alguns casos, podem ser necessários ATBs alternativos ou combinações de tratamentos para combater a infecção, sendo a IFD uma das opções.

A CUR é uma molécula presente na raiz da *Curcuma longa*, amplamente utilizada na culinária e conhecida pelas suas diversas propriedades medicinais, como anti-inflamatórias e antimicrobianas.⁸⁰ Sendo um composto natural que apresenta baixa biodisponibilidade, ou seja, é eliminada rapidamente do organismo, resultando em baixas concentrações sanguíneas, por isso o uso em humanos da CUR é aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA).⁸¹ Além disso, a CUR é caracterizada como FS, pois ao absorver luz no comprimento de onda entre 420 a 450 nm produz EROs, sendo de interesse para tratamentos de infecções bacterianas superficiais como feridas, faringotonsilites entre outras.⁸²

Quando a CUR é combinada com ATBs sem a presença da luz, os resultados podem variar dependendo da concentração em que o FS está presente, conforme apresentados na Tabela 1 e Tabela 2. Em baixas concentrações, é possível que a CUR apresente competição com a ação do ATB, uma vez que ambos podem estar competindo pelo mesmo alvo no microrganismo, ou pela internalização dentro da célula bacteriana. Diferentemente, quando a CUR está em maiores concentrações na ausência de luz, sua propriedade de inibir o crescimento bacteriano auxilia a atividade dos ATBs.

A interação entre a concentração de ATBs ou da IFD e seus efeitos individuais é um aspecto importante a ser considerado. É possível observar que concentrações muito baixas dessas terapias podem não ser eficientes ao inibir o crescimento bacteriano, pois não há quantidade dos parâmetros para combater efetivamente as bactérias. Da mesma forma, concentrações altas podem apresentar resultados antagonistas, ou seja, os efeitos combinados não são superiores aos das monoterapias. Além disso, em alguns casos, concentrações elevadas de ATBs podem levar a um aumento da resistência bacteriana.⁸³

A ação fotooxidativa utilizando a CUR como FS causa danos na estrutura bacteriana, seja membrana celular, proteínas e ácidos nucleicos.⁸⁴ Esses danos podem tornar a membrana mais permeável e comprometer a integridade das células bacterianas. Possivelmente, a internalização dos ATBs pode ser facilitada devido aos danos causados pela IFD, permitindo que os ATBs atinjam seus alvos e exerçam sua atividade de maneira mais eficaz. Além disso, como mostrado na Figura 7 e na Figura 9, a ação combinada da IFD e dos ATBs pode ter um efeito mais prejudicial na replicação celular bacteriana do que as monoterapias, pois os ATBs inibem a síntese de DNA ou de proteínas,⁷ enquanto a IFD pode danificar ainda mais as estruturas moleculares essenciais para a replicação.³⁷ Dessa forma, a combinação das duas terapias pode resultar em efeito sinérgico, conforme a Figura 8 e Figura 10.

Ademais, a presença de ATB durante a absorção da luz pela CUR pode não ser favorável, como elucidado na Figura 11 e Figura 12, pela redução da intensidade de fluorescência dos grupos CUR+ATB em até 90%. Possivelmente, esse efeitos podem ser devido a interações moleculares que resultam em mudanças nas propriedades de absorção da luz pela CUR, levando à diminuição da intensidade de fluorescência.⁸⁵ Outra hipótese pode ser pela transferência de energia para outras moléculas presentes, de modo que o ATB pode atuar como um acceptor de energia, desviando a energia excitada da CUR para outras moléculas próximas. Essa transferência de energia diminui a eficiência da fluorescência do FS.⁸⁶ É válido ressaltar que, em questão, as concentrações molares tanto do FS quanto do ATB estão em concentrações próximas, aproximadamente 1:1, sendo CUR 10 μ M, AMO 13,7 μ M e GEN 10,5 μ M. Concentrações elevadas podem levar a um maior efeito na redução da intensidade de fluorescência com 5 μ g/ml de ERI correspondendo a 6,8 μ M, ou seja a menor proporção de moléculas de ATB e CUR, aproximadamente 2:1. Além

disso, as moléculas de ERI fotodegradadas podem formar complexos de CURs com os grupos oxilas, resultando em diminuição do sinal de fluorescência.

As duas espécies de bactérias estudadas neste capítulo mostraram respostas semelhantes aos tratamentos aplicados. Os resultados apresentados evidenciam que a hipótese da ação fotodinâmica é capaz de potencializar a ação dos ATB, porém é essencial encontrar o equilíbrio adequado nas concentrações de ATBs ou IFD para obter os melhores resultados terapêuticos.

3.4 Conclusão

Em conclusão, os resultados indicam que as concentrações de ATBs ou IFD que não são eficientes na monoterapia têm a tendência de apresentar resultados antagônicos. Portanto, é fundamental encontrar concentrações adequadas que possam fornecer um efeito sinérgico e maximizar a eficácia da terapia combinada, evitando concentrações excessivas que possam levar a efeitos adversos. No entanto, é importante ressaltar que as respostas sinérgicas da combinação da IFD e dos ATBs podem variar dependendo da cepa bacteriana específica, dos tipos de ATBs utilizados, das doses de luz empregadas e das condições experimentais. Além disso, a presença de ATB afeta a fluorescência da CUR, resultando em redução significativa na intensidade de fluorescência. Esses resultados são fundamentais para clarificar as melhores abordagens para investigar mais a fundo a interação entre a IFD e os ATBs e suas implicações.

4 POTENCIALIZAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS POR EFEITOS FOTODINÂMICOS

Alternativas para a falha de ATB em infecções por bactéria resistentes é um dos principais desafios de saúde global. A presença de espécies reativas de oxigênio pode potencializar a ação dos ATBs em cepas sensíveis e resistentes. Todavia, a combinação de técnicas como a ATBT e a inativação fotodinâmica não é trivial devido aos diversos parâmetros, os quais podem modular a resposta em efeitos sinérgicos e antagônicos. Este estudo aplica um método físico-químico ao tratamento padrão para modular a resposta sinérgica a fim de contornar os mecanismos de resistência bacteriana. Protocolos de inativação fotodinâmica (curcumina 10 μM , 10 J/cm^2 , comprimento de onda (λ) 450 nm) e o seu comportamento celular de *Staphylococcus aureus* na presença dos ATBs amoxicilina, eritromicina e gentamicina foram analisados a partir da dinâmica da interação do fotossensibilizador que produz apenas efeitos tóxicos após a absorção de um determinado comprimento de onda da luz. Além da viabilidade bacteriana, a interação de curcumina, ATBs e bactérias foram imageadas e analisadas quimicamente usando microscopia de fluorescência confocal e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A interação entre as terapias dependeu da ordem sequencial de aplicação, atividade metabólica e ligação das biomoléculas da superfície celular bacteriana. Os resultados demonstraram um efeito potencializador do ATB com redução de até 32 vezes nas concentrações inibitórias mínimas e reduções médias de 7 log UFC/ml por ação físico-química em nível bacteriano após o tratamento fotodinâmico. As alterações observadas em decorrência da interação bactéria-ATB, como permeabilização de membrana e aumento da suscetibilidade, podem ser uma possibilidade para solucionar o problema da multirresistência microbiana.²

4.1 Metodologia

4.1.1 Cultivo microrganismo

A bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi cultivada em meio Brain Heart Infusion Ágar (BHI) por 24 h. As colônias foram suspendidas em tampão fosfato salino (PBS) para os ensaios de IFD. Já para os tratamentos contendo ATB, as colônias foram suspendidas em meio Mueller Hinton Control Cations (MH).. O inóculo foi ajustado em 10^8 UFC/ml por meio da absorbância em 600 nm (Cary UV-Vis50, Varian).

4.1.2 Inativação fotodinâmica

O preparo da solução estoque do fotossensibilizador CUR sintética (PDTPharma®) manteve como descrito em 3.1.2. Realizou-se três grupos controles: Controle Geral (bacté-

ria), Controle Escuro (bactéria + FS), Controle Luz (bactéria + luz) e o grupo tratamento IFD (bactéria + FS + luz). Para os grupos IFD e grupo escuro as bactérias foram incubadas com 10 μ M de CUR por 15 min. Posteriormente os grupos luz e IFD foram submetidos a dose de luz no intervalo de 5 a 80 J/cm² utilizando o dispositivo LED de 450 nm (Biotable®). A determinação da dose de luz é dada pela Equação 4.1, onde “D” é a dose de luz, “I” a intensidade do dispositivo de irradiação, “t” o tempo de irradiação.

$$D = I * t \quad (4.1)$$

Em seguida, todas as amostras foram diluídas e semeadas em placas de Petri contendo BHI ágar para determinar a UFC/ml sobreviventes. Condições abaixo do limiar de dose da IFD foram usadas para os experimentos de combinação, garantindo a sobrevivência das células bacterianas. A fração de sobrevivência foi calculada conforme indicado pela Equação 4.2.

$$F_{sobrev} = \frac{\text{Log (UFC/ml)}_{tratado}}{\text{Log (UFC/ml)}_{sem\ tratamento}} \quad (4.2)$$

4.1.3 Concentração inibitória mínima

Os experimentos foram realizados conforme descrito em 3.1.3. Os agentes ATBs amoxicilina (AMO), eritromicina (ERI) e gentamicina (GEN) foram distribuídos em placas de 96 poços por meio da diluição sequencial e posteriormente o inóculo bacteriano com concentração padronizada foi adicionado. Em conjunto foi adicionado o inóculo bacteriano com concentração padronizada como controle positivo de crescimento bacteriano e controle negativo o meio de cultura com ATB, e a placa foi armazenada a 37 °C por 24 horas. Posteriormente a solução de resazurina (0,0015%) foi adicionada por 4 horas a 37 °C. A concentração inibitória mínima (MIC, em inglês) foi definida como a menor concentração do ATB com capacidade de inibir o crescimento visível das cepas bacterianas, indicada pela atividade metabólica da resazurina. No estudo MIC após IFD, a única alteração é do inóculo adicionado que corresponde a bactéria inicialmente tratada seguindo o protocolo de descrito em 4.1.2.

4.1.4 Combinação da inativação fotodinâmica e antibioticoterapia

Tratamento combinado: O primeiro tratamento aplicado em *S. aureus* seguiu o protocolo descrito em 4.1.2. A bactéria foi incubada na presença de 10 μ M de CUR por 15 min. Posteriormente, as amostras foram irradiada em 10 e 20 J/cm². As células bacterianas sobreviventes foram adicionadas ao meio MH contendo AMO, ERI, GEN em diferentes concentrações por 24 h à 37 °C, vide Tabela 4. Após o período de incubação

com os ATBs, as amostras foram diluídas e plaqueadas em meio BHI ágar para contagem de colônia após 24 h.

Tratamento simultâneo: O inóculo bacteriano (PBS) foi incubado à 37 °C na presença de 10 μ M de CUR e diferentes concentrações de ATB em MH por 15 min, vide Tabela 4. Posteriormente irradiada em 10 e 20 J/cm² e após 24h de incubação à 37 °C, as amostras foram diluídas e plaqueadas em meio BHI ágar para contagem de colônia após 24 h.

Tabela 4 – Concentração de antimicrobianos (ATBs) para tratamentos combinados. Os valores centrais correspondem a concentração inibitória mínima de cada ATB.

Antimicrobiano	μ g/ml				
Amoxicilina	1	0,5	0,25	0,125	0,062
Eritromicina	64	32	16	8	4
Gentamicina	2	1	0,5	0,25	0,125

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.5 Permeabilidade da membrana citoplasmática

O protocolo aplicado para avaliar a permeabilização da membrana citoplasmática por meio da medida da absorbância de material genético extracelular foi adaptado de Siriwon *et al.*⁸⁷ A bactéria *S. aureus* foi submetida ao tratamento de IFD descrito em 4.1.2. Após o tratamento, amostras dos grupos tratados incluindo o controle foram coletadas e filtradas através de uma membrana de celulose de nitrato estéril (0,22 μ m) e a absorbância do sobrenadante foi medida em 260 nm (Cary UV-Vis50, Varian[®]).

4.1.6 Ciclo de tratamento

Dois protocolos foram aplicados para tratamentos cíclicos combinando IFD e ATB.

Ciclo simultâneo: a bactéria foi incubada com CUR 10 μ M por 15 min e posteriormente irradiada com 10 J/cm² em 450 nm pela Biotable[®]. Em seguida as células foram suspendidas em MH contendo AMO, ERI, GEN separadamente nas condições de MIC estabelecidas previamente e foram incubadas a 37 °C por 6 horas. Posteriormente a células foram lavadas e uma pequena amostra foi coletada para plaqueamento e determinação da UFC/ml. As demais células lavadas foram submetidas novamente a IFD, seguindo esse protocolo por mais 5 ciclos.

Ciclo alternado: Foi estabelecido a cada 6h a aplicação de um tratamento, iniciando com IFD, crescimento de 6h, aplicação de ATB, crescimento de 6 horas. Ou seja, no tempo 0h a bactéria foi incubada com CUR 10 μ M por 15 min e posteriormente irradiada com 10 J/cm² em 450 nm pela Biotable[®] e as células sobreviventes foram suspendidas em apenas

MH e incubadas a 37 °C por 6 horas. Posteriormente as células foram lavadas e uma pequena amostras coletadas para plaqueamento e determinação da UFC/ml. As demais células lavadas foram suspensas em MH contendo AMO, ERI, GEN separadamente nas condições de MIC estabelecidas previamente e foram incubadas a 37 °C por 6 horas. O procedimento foi repetido totalizando 30 horas, sendo que nos tempos 0, 12, 24 horas *S. aureus* recebeu IFD e nos tempos 6 e 18 horas ATB.

4.1.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As amostras plaqueadas do ciclo de tratamento 4.1.6 a 37 °C por 24 horas, tiveram as colônias coletadas para análise no equipamento de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, em inglês) por Reflexão Total Atenuada da Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer[®]. Uma colônia bacteriana foi distribuída uniformemente sobre a superfície do cristal. A amostra seca foi escaneada 250 vezes e o resultado foi a média das medidas. O espectro de FTIR foi medido no intervalo de 4000 a 650 cm⁻¹. As medidas foram realizadas em três amostras diferentes. O espectro resultante das bactérias foi submetido ao cálculo da segunda derivada, posteriormente a normalização pelo mínimo-máximo.⁸⁸

4.1.8 Microscopia confocal

Para os ensaios na microscopia confocal foi utilizado um microscópio confocal Zeiss LSM 780[®] com um diodo laser de 405 nm, um laser Chameleon Coerente (Ti:Safira) como fontes de excitação para dois fótons com pulso de laser a 80 MHz e uma lente objetiva (63×, abertura numérica 1,2, imersão em água) foram usados nos experimentos. As células bacterianas foram mantidas a 37°C a 7% de CO₂. O volume de medição final para cada poço foi de 200 μL. A viabilidade celular foi medida usando o reagente LIVE/DEADTM com excitação de 2 fótons a 800 nm no modo de canal, a fluorescência foi capturada entre 415 e 540 nm para laranja de acridina e 580 a 620 nm para brometo de etídio. Os experimentos foram realizados para amostras com viabilidade acima de 90%.

Internalização do fotossensibilizador: A potência média do laser foi ajustada entre 1,1% e 4% para que a fluência da emissão de fótons por pixel fosse suficiente para a coleta de imagens no modo canal e espectral. O escaneamento foi ajustado para coleta de imagens a cada 30 segundos por 30 minutos usando baixa dose (<0,5 J/cm²) sem danos mensuráveis por fotodegradação.

Recuperação de fluorescência após fotodegradação (FRAP, do inglês Fluorescence Recovery After Photobleaching): As amostras foram fotodegradadas em uma região retangular específica da imagem e o plano focal da imagem foi sempre fixado em 10 μm acima da interface da lâmina de vidro. A potência do laser de dois fótons a 800 nm na região fotodegradada foi ajustada para 40% da intensidade nominal (300 μW) enquanto 2% da potência foi usada para escanear toda a imagem. O processo de fotodegradação

foi iniciado após a coleta de 5 imagens (7,75 s/imagem). Quinze imagens de recuperação foram coletadas. O comprimento de onda da detecção de emissão variou de 490 a 585 nm.

Imagem tempo de vida de fluorescência (FLIM, do inglês Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy): Para experimentos de imagem do tempo de vida de fluorescência (FLIM), o laser 2P foi pulsado a 80 MHz. A fluorescência foi dividida por um divisor de feixe em dois canais de detecção de um sistema PicoQuant GmbH detectando a fluorescência entre 500 e 550 nm. O método utilizado foi a contagem de fótons únicos correlacionados com o tempo (TCSPC, do inglês Time Correlated Single Photon Counting) utilizando um detector de avalanche, que possui um tempo de resposta limitado em cerca de 100 ps. O ajuste bi-exponencial foi usado para ajustar os dados de decaimento de fluorescência. A escolha da faixa de ajuste foi definida pelo programa de software (Time Trace Analysis by PicoQuant GmbH) considerando a parte de decaimento dos dados dependentes do tempo de acordo com os parâmetros ótimos.

A configuração óptica foi ajustada para a melhor relação sinal-ruído e fixada quando diferentes amostras foram comparadas.

4.1.9 Análise dos dados

Os experimentos foram realizados em três ocasiões com $n=9$ para cada grupo estudado. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando a ANOVA associada ao teste de Tukey post hoc. Os valores foram considerados significativamente diferentes com um intervalo de confiança de 95%. Para os espectro de FTIR, os dados tratados (normalizados e derivados) foram submetidos a análise hierárquica de cluster pelo Origin[®]. Para analisar os efeitos sinérgicos e antagônicos da combinação de terapias, foi aplicado o modelo de independência de Bliss⁷³ conforme a Equação 3.1 (Capítulo 3).

4.2 Resultados

4.2.1 Inativação fotodinâmica e antibioticoterapia

A Figura 13 mostra a resposta de sobrevivência de *S. aureus* com variação da dose de luz em concentração fixa do FS em $10\mu\text{M}$. Não foi constatado toxicidade da CUR no escuro (ausência de iluminação), assim como não houve fotoinativação somente quando aplicado doses de luz (ausência de FS). Como o objetivo é obter condições que apresentem inativações significativas de uma população bacteriana, convencionalmente 3 Log (UFC/ml), mas que não sejam de ação totalmente inibitória para viabilizar a avaliação do efeito combinado com outra terapia, a concentração de $10\mu\text{M}$ de CUR com doses de luz de 10 e 20 J/cm^2 foram estabelecidos para os estudos adiantes resultando em 2,81 e 3,27 Log (UFC/ml) de inativação bacteriana, respectivamente. Além disso, optou-se por variar a dose de luz ao invés da concentração de CUR, uma vez que a ATBT está atrelada

a concentrações de ATBs. Ou seja, altas concentrações poderiam sobrecarregar a bactéria dependendo dos protocolos.

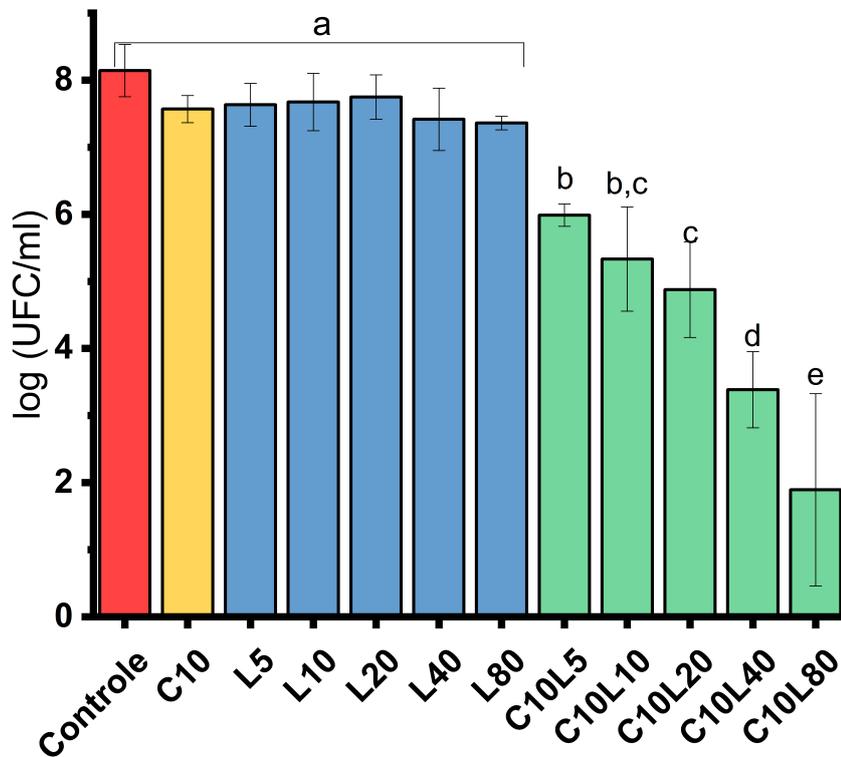


Figura 13 – Inativação Fotodinâmica (IFD). Log (UFC/ml) da sobrevivência de *S. aureus* com controle escuro curcumina 10 μM (C10), controle doses de luz de 5 a 80 J/cm^2 (L) e IFD com concentração de fotossensibilizador fixa para diferentes doses de luz (C10L). Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 14 é apresentado o MIC utilizando amoxicilina (β -lactâmico), eritromicina (macrolídeo) e a gentamicina (aminoglicosídeo), indicando que a cepa estudada é sensível aos ATBs, com exceção da eritromicina que foi classificada como resistente. Enquanto a ATB apresenta uma especificidade dependendo do ATB utilizado, podendo ser observado pelas diferentes MICs, a condições de redução bacteriana da IFD são constantes. A aplicação prévia da IFD potencializou a ação dos três ATBs, pois as células microbianas sobreviventes mostraram-se mais sensíveis com a redução de 2 a 32 vezes dos MICs. A bactéria exposta à presença da CUR no escuro não sofreu alteração nos valores de MIC para AMO e GEN, mas houve uma redução de 8 vezes para a ERI. As reduções dos valores de MIC promovidas pela aplicação prévia da IFD, em geral, permaneceram constantes independente da dose de luz aplicada. Esse resultado demonstrou que combinações sinérgicas podem ser identificadas dependendo das condições de tratamento e da classe de ATB escolhida.

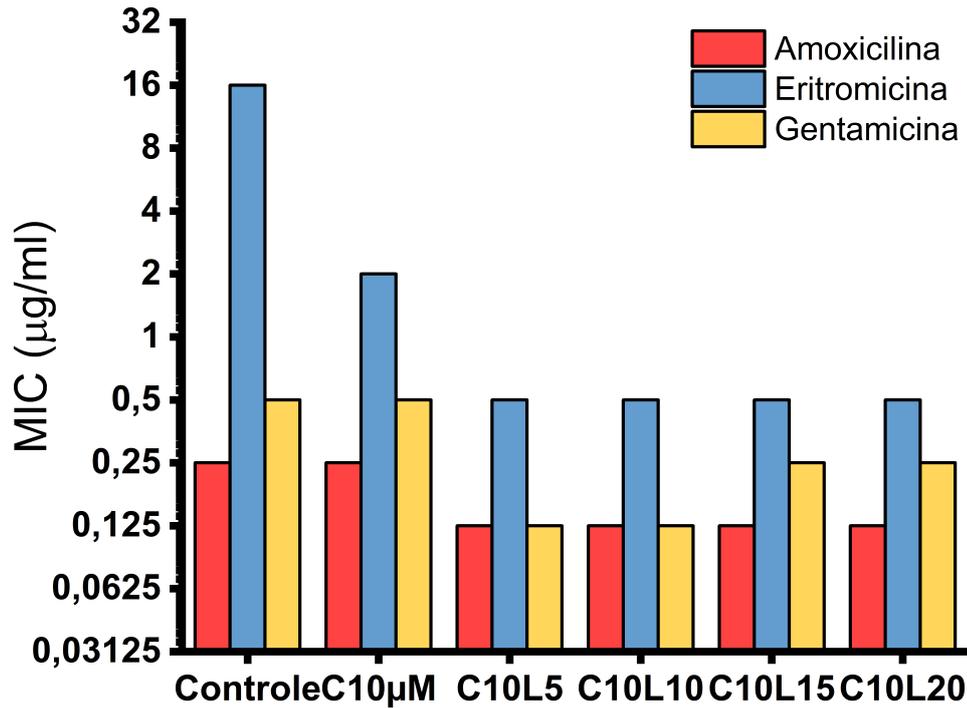


Figura 14 – Valores de e Concentração Inibitória Mínima (MIC) padrão (controle) para amoxicilina, eritromicina e gentamicina para *S. aureus* em combinação (ou não) com IFD (10 μ M (C), 10 J/cm² (L)). Gráficos usando a escala Log₂ do eixo y.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliar os danos causados na membrana plasmática bacteriana pela IFD, a presença do DNA extracelular foi quantificada por absorvância em λ de 260 nm após os tratamentos. A Figura 15 mostra que a presença de material genético é mais proeminente nos grupos tratados com CUR quando comparado ao grupo controle (ausência do tratamento), principalmente para os grupos que receberam irradiação. A maior dose de luz aplicada (20 J/cm²) apresentou a absorvância mais elevada, ou seja, nos grupos IFD há uma maior presença de DNA extracelular no sobrenadante indicando danos na membrana devido ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática bacteriana.

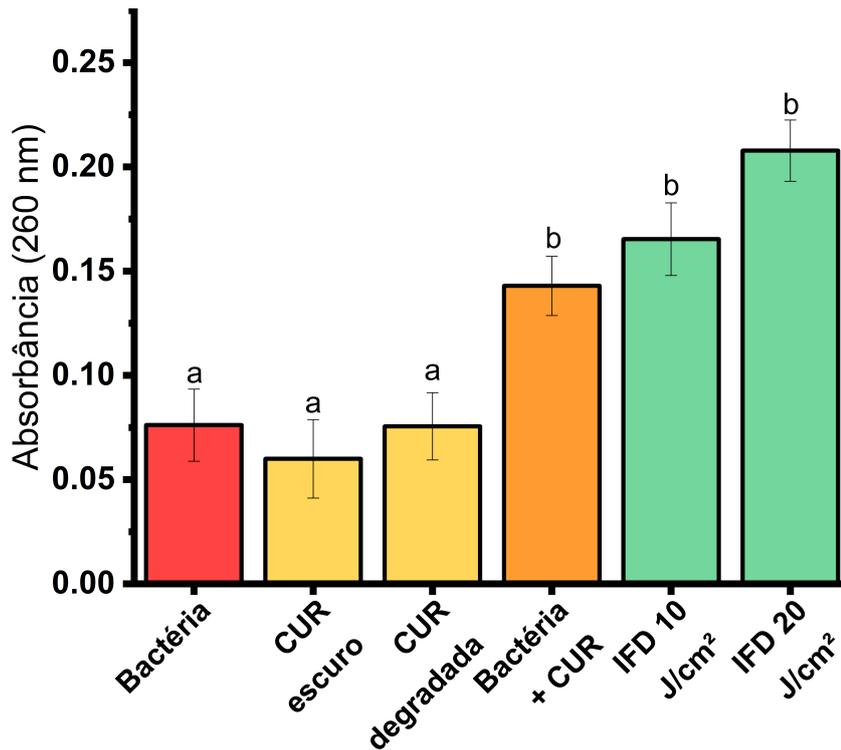


Figura 15 – Determinação da permeabilidade da membrana pela absorbância em 260 nm correspondente a DNA extracelular. Absorbância obtida para *S. aureus* sem tratamento, apenas curcumina (CUR, 10 μ M) sem luz e fotodegradada (10 J/cm²), bactéria com CUR sem luz, e bactéria exposta a inativação fotodinâmica (IFD, 10 μ M de CUR e λ 450 nm). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Protocolos de terapias combinadas

A influência da ordem de combinação de IFD com ATB nas respostas de inativação bacteriana foi avaliada. Na Figura 16, a resposta de sobrevivência de *S. aureus* é apresentada em diferentes concentrações de ATBs próximo ao valor de MIC. No grupo denominado terapia combinada a bactéria recebeu primeiro a IFD e em seguida o ATB. Neste protocolo, todos os grupos tratados apresentaram menor sobrevivência quando comparado com as monoterapias (apenas ATB ou IFD) para a combinação de ERI e GEN com a IFD, ou seja, uma resposta sinérgica. Os grupos tratados AMO combinada com IFD (20 J/cm²) foram sinérgicos, uma vez que apresentaram sobrevivência inferior a monoterapia. Enquanto as maiores concentrações de AMO combinadas com IFD (10 J/cm²) apresentou uma sobrevivência microbiana maior em relação ATB, mas inferior a monoterapia IFD, neste caso não sendo sinérgicos. Em termos de redução logarítmica, o máximo obtido para o grupo terapia combinada (IFD/ATB) foi 5,65 Log (UFC/ml) para IFD₂₀/AMO₁ e 9,5 Log (UFC/ml) para IFD₂₀/ERI₆₄ e IFD₂₀/GEN_{>0.25}.

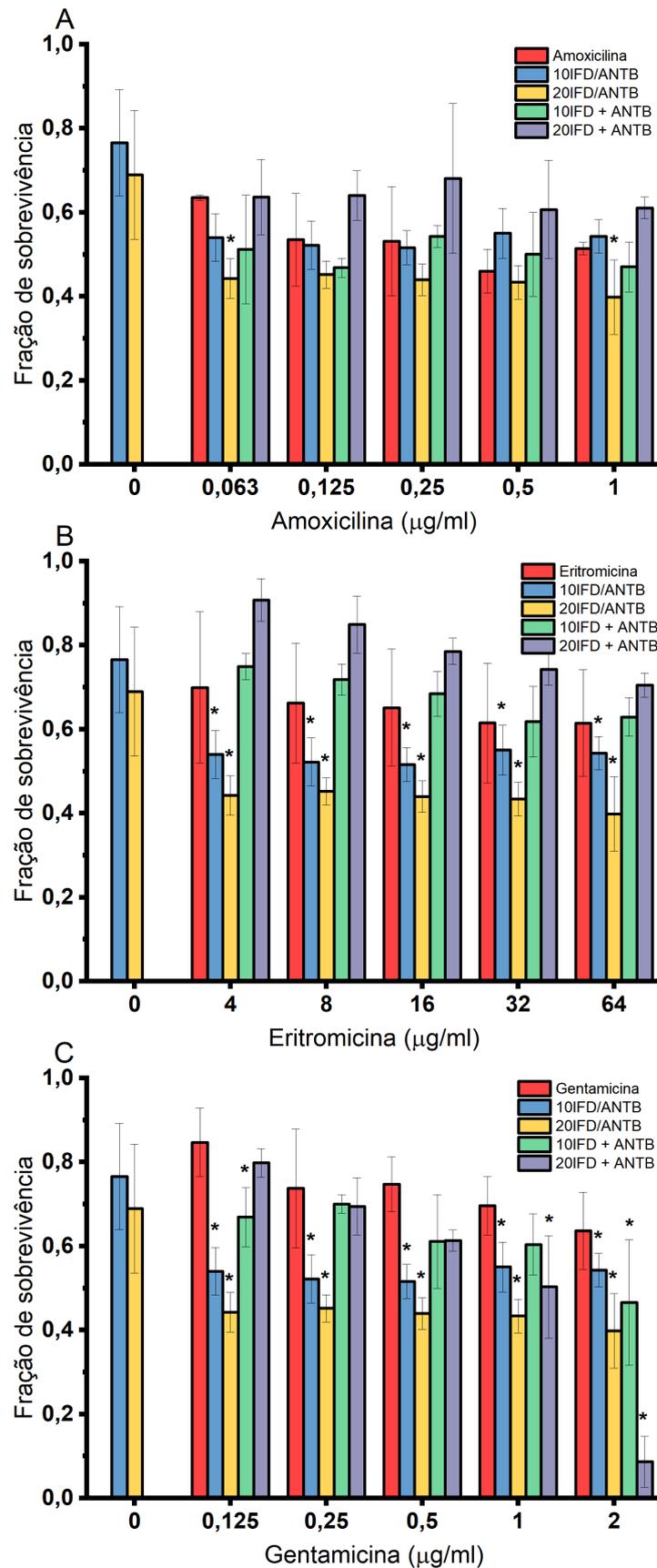


Figura 16 – Fração de sobrevivência do protocolo terapia combinada (IFD/ATB) e terapia simultânea (IFD+ATB), sendo aplicado $10 \mu\text{M}$ de curcumina e 10 e 20 J/cm^2 . A) Amoxicilina, B) Eritromicina, C) Gentamicina. As normalizações são em relação a bactérias não tratadas. * indica combinação sinérgica para independência do Bliss.

Fonte: Elaborada pela autora.

No protocolo denominado de terapia simultânea, o ATB foi irradiado com o FS, ou seja, CUR e ATBs foram aplicados simultaneamente nas células sem tratamento prévio. A maioria dos resultados para AMO e ERI apresentaram-se antagônicos com uma sobrevivência maior que as monoterapias, enquanto a GEN apresentou resultados sinérgicos e antagônicos, principalmente em função da concentração do ATB utilizada. A sobrevivência microbiana decaiu para ambas as doses de luz com o aumento da concentração aplicada. Em termos de redução logarítmica, o máximo obtido para o grupo terapia simultânea (IFD+ATB) foi 5,08 Log (UFC/ml) para IFD₁₀+AMO_{0.125} e 3,65 Log (UFC/ml) para IFD₁₀+ERI₃₂ e IFD₂₀+GEN₂.

De modo geral, a irradiação do ATB no protocolo terapia simultânea leva a resultados majoritariamente antagonistas pois há menores reduções da mortalidade bacteriana decorrente da interação entre a CUR e o ATB de modo a diminuir a disponibilidade para ação antimicrobiana. Esses resultados demonstraram que não apenas as concentrações de ATBs, mas o FS e a dose de luz influenciaram na obtenção de resultados sinérgicos, entretanto o protocolo aplicado pode ser um determinante.

4.2.3 Dinâmica de interação bacteriana com fotossensibilizador e ATBs

Com base nos resultados de terapia simultânea majoritariamente antagonista, o mecanismo da interação da CUR com o ATB seguido pela irradiação foi investigado por meio da microscopia de fluorescência confocal. Na Figura 17.A é mostrado a cinética de incorporação da CUR sem e com a presença dos ATBs AMO, ERI e GEN. Comparativamente, a CUR possui um comportamento distinto na presença e na ausência de ATBs. A concentração inicial incorporada ($t=0$ min) é 40% inferior, mas o aumento da incorporação é de até 2,5 vezes para o FS, uma proporção semelhante à presença de ATBs. A bactéria com CUR e ERI possui uma dinâmica de internalização imediata, enquanto a CUR sem e na presença de AMO e GEN possui um tempo mínimo para iniciar a incorporação ativa, sendo que ao longo desse tempo há indicativos de uma perturbação no controle da permeabilidade da membrana, uma vez que a intensidade de fluorescência do FS internalizado decai. Devido a limitações experimentais, há um intervalo médio inicial de 30s para coleta de fluorescência, que foi o mesmo para todos os grupos em todas as repetições.

Na Figura 17.B, a ação da fotodegradação da CUR incorporada pela bactéria é mais acentuada para a CUR sem ATB, com uma queda de 1,75 vezes maior da intensidade de fluorescência do FS que na presença de ATB. Esse efeito está relacionado com fotodegradação da CUR resultando na produção das EROS, a qual se mostra mais proeminente para o uso da CUR sem ATB (Figura 18). O tempo de recuperação da CUR internalizada com máximo de 85% é de 2,1 min, enquanto na presença dos ATBs a taxa de recuperação média foi aproximadamente de 70% em 0,4 min, sendo mais rápido. Os resultados

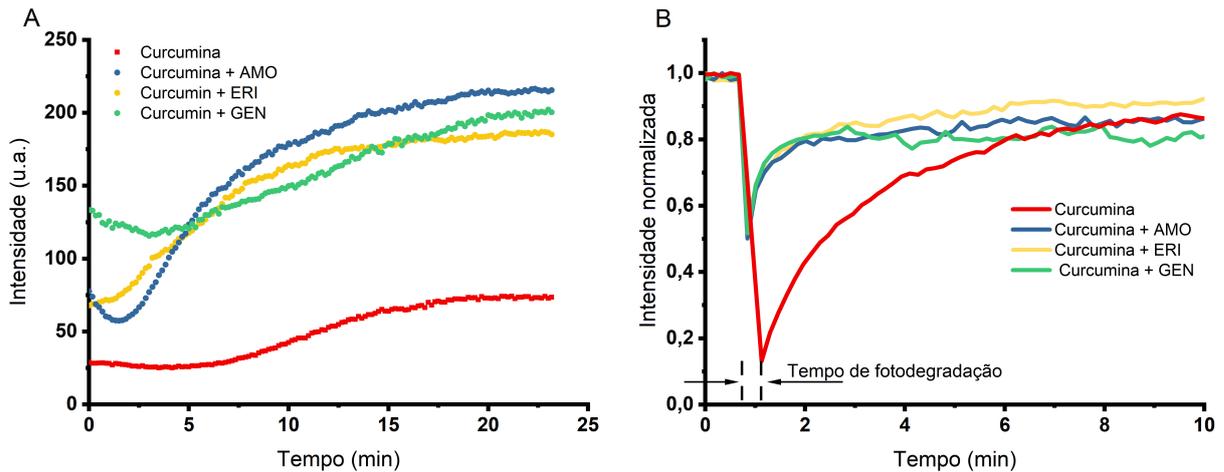


Figura 17 – Microscopia de fluorescência confocal. Intensidade de fluorescência da curcumina na presença e ausência de ATB. A) Cinética de incorporação de curcumina. B) Recuperação da Fluorescência Após Fotodegradação (FRAP) da curcumina.

Fonte: Elaborada pela autora.

corroboram com os da Figura 17.A, tendo em vista que a presença de ATB facilita a internalização do FS, mas não necessariamente favorece a IFD. A baixa fotodegradação da CUR na presença dos ATBs pode estar relacionada com a diminuição da produção de EROS, e isso está de acordo com os resultados mostrados anteriormente (Figura 16), uma vez que o protocolo de terapia simultânea tem menor inativação bacteriana. Na Figura 18 são apresentadas as imagens obtidas no microscópio confocal durante o experimento do FRAP, mostrando a região fotodegradada e a região externa não fotodegradada, com a recuperação da fluorescência ao longo do tempo.

A eficiência de um FS pode ser modulada com o meio em que está presente. No caso da curcumina, por ser uma molécula majoritariamente hidrofóbica, é esperado que no ambiente aquoso as moléculas estejam agregadas como é evidenciado pelo predomínio do tempo de vida curto e o deslocamento para o vermelho no espectro de emissão, também constatado na presença do ATB em meio aquoso (Figura 19.A). No interior de uma célula bacteriana, a curcumina está desagregada, o que aumenta a presença de tempo de vida longo, os quais são indicativos de processos radiativos. Conforme a saturação da curcumina intracelular se manifesta, os tempos de vida longos são abatidos predominando os tempo de vida curto, que culminam em processos não radiativos, ou seja, diminuindo o rendimento de produção de EROs, principalmente para os casos em que o FS é incorporado simultaneamente com o ATB (Figura 19.B) uma vez que favorece um aumento da concentração de CUR intracelularmente.

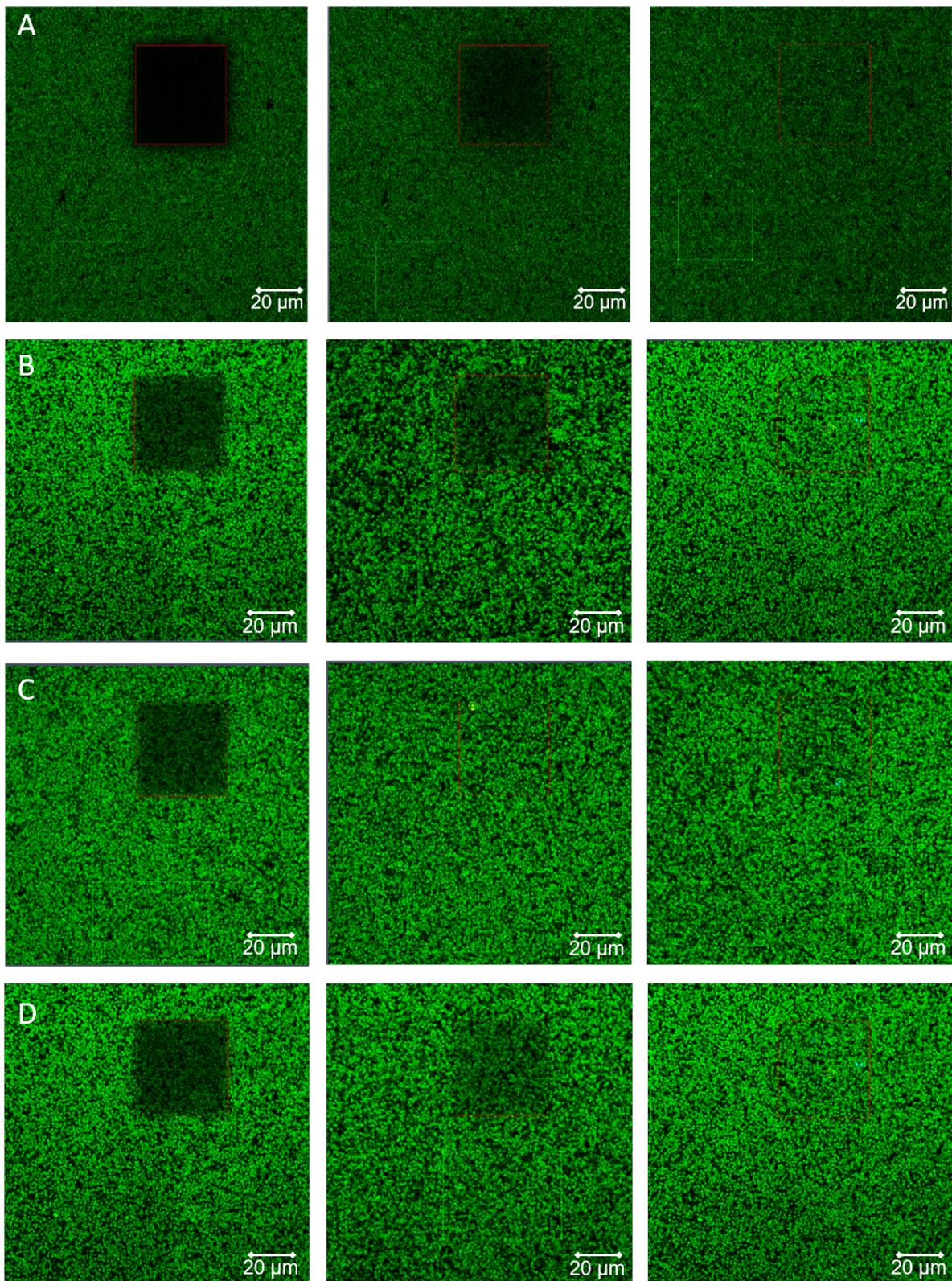


Figura 18 – Imagem de microscopia confocal de fotodegradação e recuperação de fluorescência de curcumina (CUR) internalizada ($10 \mu\text{M}$) por *S. aureus* com a presença dos antibióticos amoxicilina, eritromicina e gentamicina. Imagem da fotodegradação do fotossensibilizador com ampliação de 63x e modo canal com timelapse na sequência 1min7s, 2min7s e 10min1s. Imagem da A) CUR B) CUR + amoxicilina, C) CUR + eritromicina e D) CUR + gentamicina. Fonte: Elaborada pela autora.

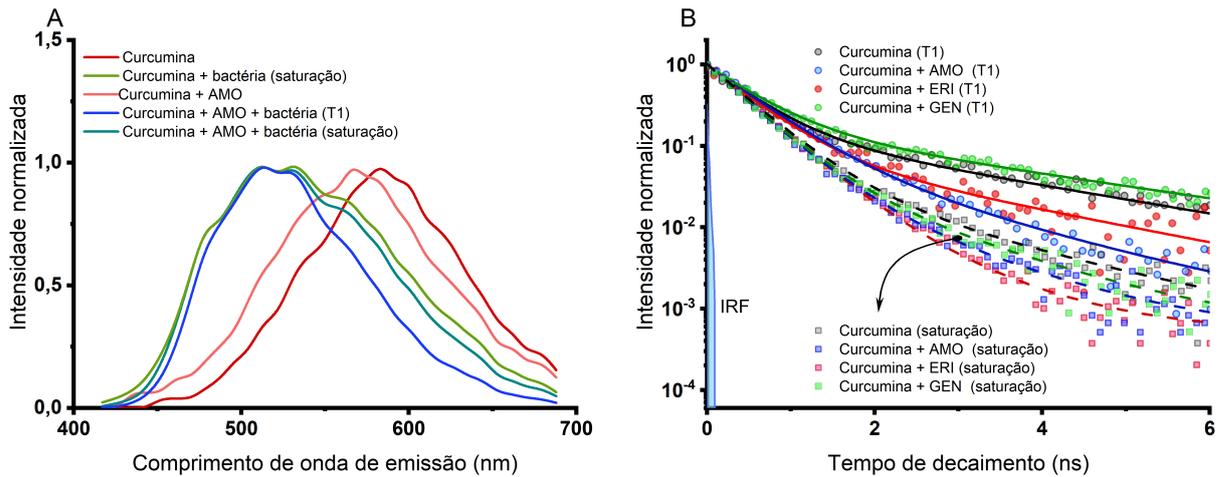


Figura 19 – Tempo de vida de fluorescência da curcumina. A) Emissão espectral da curcumina sem e com a amoxicilina, na ausência e presença de células, em diferentes tempos de internalização. B) Tempo de decaimento temporal da curcumina sem e com a presença do ATB no interior celular, durante 10 min de incorporação (T1) e na saturação de curcumina internalizada (20 min).
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4 Resposta bacteriana a ciclo de tratamentos

Na prática clínica, os ATBs são administrados periodicamente, desse modo ciclos de tratamentos combinados durante 30 h foram simulados neste estudo (Figura 20). A monoterapia IFD nas primeiras horas apresenta resultado de sobrevivência microbiana equivalente a monoterapia de ATB, mas ao longo do tempo a IFD permanece com a resposta constante, com a fração de sobrevivência variando de 0,86 a 0,66 enquanto a sobrevivência do grupo ATB decai, enquanto a sobrevivência de AMO declina de 0,98 para 0,25, ERI diminui de 0,99 para 0,41 e GEN de 1,02 para 0,46. Na Figura 20.A o tratamento combinado consistiu em alternar a cada 6 h entre a IFD e a ATBT (altern.ATB). Nas primeiras horas as células bacterianas são mais debilitadas devido a ação rápida da IFD favorecendo a ação do antimicrobiano apresentando menor sobrevivência quando comparado com as monoterapias. No entanto, ao longo do tempo houve uma maior sobrevivência da bactéria tratada com as terapias alternadas quando comparado com a ATBT. Ou seja, o resultado apresentado evidencia que alternar os tratamentos por longos períodos é mais efetivo quando comparado à monoterapia IFD, mas a monoterapia ATBT se mostra superior a esses dois protocolos.

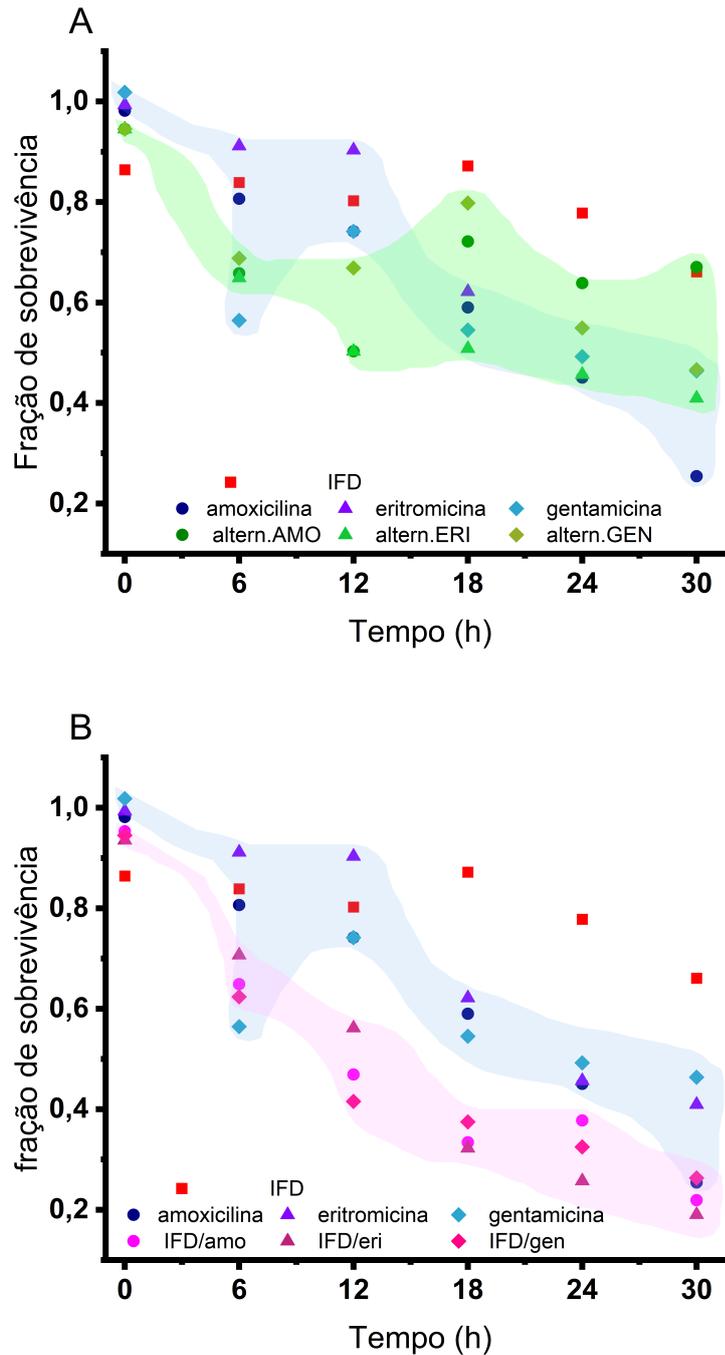


Figura 20 – Ciclo de tratamentos. IFD com $10 \mu\text{M}$ de curcumina e 10 J/cm^2 de cor vermelha, grupo controle de antimicrobiano de cor azul. As normalizações são em relação a bactérias não tratadas A) Tratamento combinado alternando a cada 6 horas iniciando pela IFD. B) Tratamento combinado concomitante (protocolo terapia combinada) a cada 6 horas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 20.B é mostrada a sobrevivência de *S. aureus* tratado com a combinação da IFD e ATB a cada 6 horas, utilizando o protocolo terapia combinada, que se demonstrou mais efetivo (IFD/ATB). O resultado evidencia que a combinação das

terapias diminui significativamente a sobrevivência da bactéria em comparação com as monoterapias, considerando que o mecanismo de ação da IFD é imediato nas células bacterianas e a ação da ATB é efetiva ao longo do tempo. O resultado do ciclo concomitante destaca-se como melhor protocolo, por exemplo, no tempo de 12 hs a monoterapia IFD tem uma redução da sobrevivência bacteriana de 20% e para ATB uma média de 21%, todavia para o ciclo concomitante a redução é em média de 52%, ou seja, a resposta não é um efeito aditivo das monoterapias IFD e ATB, mas sim apresenta um resultado superior de redução.

As colônias sobreviventes após 12 hs dos ciclos de tratamento foram submetidas a espectroscopia de FTIR para avaliar o efeito das monoterapias e das combinações nos modos vibracionais das biomoléculas presentes na superfície da célula bacteriana, seja constituída ou por adesão (Figura 21). A observação de alterações das frequências nas quais as moléculas interagem com a radiação excitando seus modos vibracionais podem dar indicativos das condições locais onde a molécula se encontra. Desse modo, integridade de membrana, proteínas, composição da parede foram investigadas.

A região $900 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ corresponde aos carboidratos,⁸⁸ como mostrado na Figura 22.A, os tratamentos analisados foram arranjados em cinco grupos, cuja a similaridade é maior que 50%. O controle permaneceu com similaridade de 20% com 6 tratamentos (Figura 22.A azul) e não manteve nenhum grau de similaridade com o tratamento IFD/GEN. Em relação as proteínas ($1500 - 1800 \text{ cm}^{-1}$)⁸⁸ foi observado que o controle e a IFD mantêm similaridade de 83,8% e para ambos os grupos as proteínas são totalmente distintas dos demais tratamentos, embora estes possuam similaridade de 86,2% entre si. Neste segundo agrupamento (Figura 22.B azul), o tratamento mais significativo quanto à similaridade entre eles é a ERI e o menos significativo é a AMO. Essa análise é coerente com os mecanismos de ação dos antimicrobianos que está relacionado com as proteínas bacterianas. Na Figura 22.C nenhum tratamento compartilha similaridade com o controle em relação aos ácidos graxos ($2800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$),⁸⁸ sendo que a similaridade entre os tratamentos foi de apenas 64,7% (Figura 22.C azul), com exceção da IFD que apresentou similaridade de 45,6%. Essa análise de alteração nos modos vibracionais dos lipídeos mostra-se condizente com os resultados apresentados na Figura 17, que indicam perturbação na membrana. De modo geral, a aplicação de qualquer tratamento seja combinada ou monoterapia afetou os estados vibracionais das biomoléculas da superfície bacteriana.

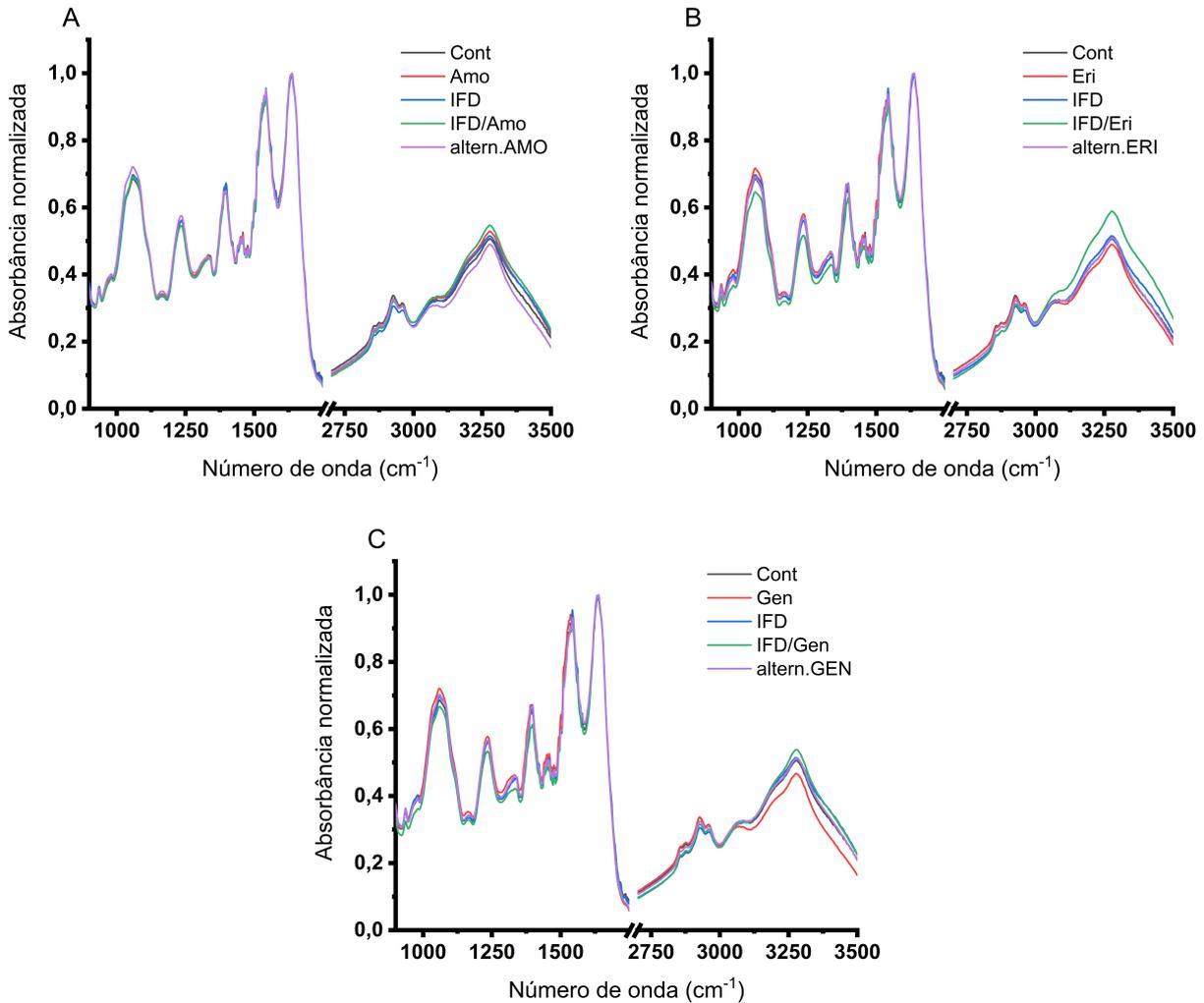


Figura 21 – Espectro de absorbância FTIR das bactérias sobreviventes após 12hs do ciclo de tratamento das monoterapias IFD, amoxicilina (AMO), eritromicina (ERI) e gentamicina (GEN) e dos tratamentos combinado sequencialmente a cada 6 horas (IFD/ATB) e alternando a cada 6 horas (altern.ATB) para grupos tratados com A) amoxicilina, B) eritromicina, C) gentamicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

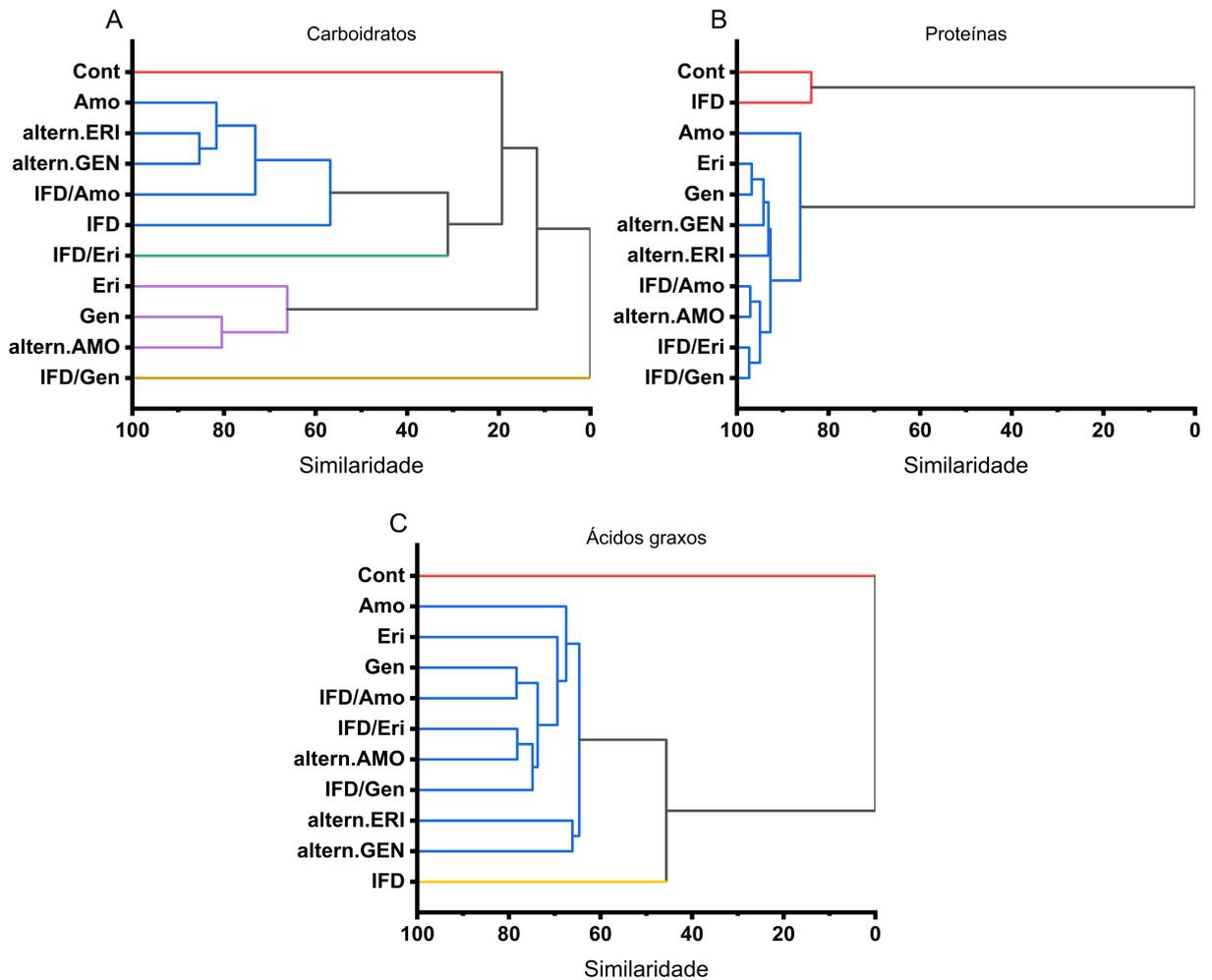


Figura 22 – Dendrograma do espectro de FTIR pela análise hierárquica de cluster da 2^a derivada do espectro de absorção de FTIR das regiões A) 900 – 1200 cm^{-1} correspondente aos carboidratos, B) 1500-1800 cm^{-1} correspondente as proteínas e C) 2800 - 3100 cm^{-1} correspondente aos ácidos graxos. Os grupos teste com a mesma cor do dendrograma indicam similaridade maior que 50% entre os grupos.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Discussão

O número de casos de bactérias resistentes e persistentes tem aumentado significativamente ao longo dos anos, estimulando estudos para potencializar a ação do ATB. O mecanismo de ação dos ATBs visa inativar processos essenciais para a manutenção e crescimento da célula bacteriana.⁸⁹ Tendo em vista que a resistência bacteriana aos ATBs ocorre pela modificação de sítios de ligação dos fármacos, aumentando a expressão de bombas de efluxo ou de enzimas que degradam tais moléculas, é de interesse a combinação de terapias que atuam por outro mecanismo de ação e que em determinadas situações possam potencializar a ação do fármaco. A efetividade do ATB não corresponde apenas a interação ligante-receptor, pois estes também promovem outras respostas metabólicas,⁹⁰ como pelo aumento da produção basal de EROs relatados para alguns ATBs bactericidas da classe β -lactâmico e aminoglicosídeos.^{15,44,91} O estresse oxidativo pode ser potencializado com a introdução da IFD em um tratamento combinado.

Quando a IFD é aplicada antes do ATB em condição sub-inibitória, danos na membrana são provocados afetando sua permeabilidade, principalmente ao utilizar a CUR como FS. Conforme é descrito na literatura essa molécula têm predisposição em interagir com a bicamada lipídica e influenciar a dinâmica dos canais de gramicidina,⁹² uma das razões pelas quais a aplicação prévia de curcumina resultou em maior suscetibilidade a ERI (Figura 15). O aumento da permeabilidade da membrana pode favorecer a internalização do ATB o qual é uma condição para sua efetividade.⁹³ Além disso, a produção de EROs promovida pela interação da CUR com a luz azul afeta não apenas a membrana, mas os diversos componentes celulares, fragilizando ou destruindo a célula bacteriana.⁸² As EROs produzidas podem atuar na peroxidação lipídica, que compromete a integridade estrutural e aumenta a permeabilidade dos íons Na^+ e K^+ , inibem a replicação de DNA e RNA pela oxidação dos açúcares dessas biomoléculas, degradam proteínas e enzimas por danos causados aos resíduos triptofano, metionina e lisina.^{13,45,94}

Comparando ambos os protocolos (Figura 16) fica evidente que os danos prévios causados pela sub IFD tanto na membrana como nos processos metabólicos celulares debilita a bactéria, tornando a mais suscetível à ação de outros ATBs. Por esta razão, mais grupos resultaram em efeito sinérgico utilizando o protocolo de terapia combinada, que também pode ser visualizado com a diminuição dos valores de MIC (Figura 14), fato também observado em culturas planctônicas^{66,67,93} e em biofilmes.^{68,95}

As respostas sinérgicas ou antagônicas são dependentes dos diferentes parâmetros de cada monoterapia. Embora ambas as técnicas antimicrobianas estejam sendo combinadas, provavelmente a ação não é realizada simultaneamente, mas sim como uma sucessão de fatores, tendo em vista que em nossos estudos foi observado que a internalização simultânea de CUR com AMO, ERI e GEN se mostrou menos eficiente na inativação bacteriana, enquanto o protocolo terapia combinada o potencializa. Nós supomos que no protocolo

terapia simultânea os ATBs são expostos a irradiação, o que embora não corresponda a sua região espectral de absorção, pode promover uma perturbação no meio, assim como os ATBs podem ser substratos das EROs semelhante as biomoléculas, o que diminui a efetividade da IFD (Figura 19). No caso da GEN que apresentou resultados sinérgicos em ambos protocolos, pode estar relacionados com a presença de amins, que atuam como oxidante em bactérias.

O uso de processos avançados de oxidação (POAs), tais como oxidação Fenton, oxidação fotocatalítica e oxidação eletroquímica é relatado na literatura para a degradação de ATBs em tratamentos de águas potável, de modo a inibir a ação antimicrobiana e potencializar a sua biodegradabilidade, uma vez que o aumento desses fármacos no ambiente agrava o cenário de bactérias resistentes.⁹⁶ Nesses estudos foram constatados que OH, O₂⁻ e ¹O² promovem a oxidação e redução de diversas classes de ATBs, obtendo como produtos de reação compostos de estrutura central preservada e intermediários.^{97,98} Analogamente, a presença do ATB durante a produção de EROs pela IFD possibilita o mesmo cenário promovido pelos POAs, de modo que os ATBs sofram degradação durante a ação fotodinâmica.

Quando o FS é internalizado, as moléculas estão livres internamente, tendo uma maior eficiência na produção de EROs quando comparada com as moléculas externas em solução, que estão majoritariamente agregadas (Figura 19.A). Nós hipotetizamos que as moléculas de curcumina estão distribuídas espacialmente próximo ao raio de transferência de energia ($R_t = 5$ a 10 nm) devido a concentração intracelular estar aproximadamente na ordem de grandeza de milimolar, Equação 4.3-4.5. Sendo assim, quando a CUR absorve um fóton, tem a eficiência da energia a ser transferida para moléculas de oxigênio diminuída, isso ocorre devido ao aumento das transferências não radiativa entre as CURs. Como resultado, a IFD apresenta uma eficiência menor quando houve alta internalização de FS (na presença do ATBs, protocolo terapia simultânea), quando comparada com menor concentração intracelular de CUR (ausência de ATBs, protocolo terapia combinada).

Volume ocupado por uma molécula,

$$V_T = 4/3 * \pi * R_{T_{rans}}^3$$

$$V_T = 4/3 * \pi * 125 \approx 500 \text{ nm}^3 \quad (4.3)$$

Densidade de moléculas,

$$\frac{\text{molécula}}{V_T} = \frac{1}{500 \text{ nm}^3} = \frac{2 * 10^{-3}}{10^{-21} \text{ cm}^3} = 2 * 10^{19} \text{ moléculas/ml} \quad (4.4)$$

Concentração molar,

$$M = \frac{n}{V} = \frac{2 * 10^{19}}{6 * 10^{23}} = 0,33 \text{ mol/ml} = 33 \text{ mM} \quad (4.5)$$

Ao analisarmos o tempo de decaimento da fluorescência da CUR no interior do microrganismo, notamos que este tempo é severamente afetado pelas condições de concentração bem como a presença dos ATBs. O decaimento mostrado na Figura 19.B é diferente de um monoexponencial, como indicado pela não linearidade das curvas de fluorescência. Isto indica uma situação que vai além da variação do estado excitado com número representado pelas moléculas excitadas. Observa-se inicialmente que o caso não saturado sempre decai mais lentamente que o saturado, demonstrando que o regime de saturação da concentração (fluxo moléculas entrando equivalente ao fluxo de moléculas saindo) leva a um complexo estado de alteração do ambiente para a molécula de CUR, que acelera a transferência de energia pelos métodos não radiativas, acelerando o decaimento natural do estado excitado. Pelo fato desse comportamento estar relacionado ao ATB, sugere-se que tais moléculas têm participação fundamental neste processo. Do ponto de vista de influenciar o tempo de vida do estado excitado da CUR, observa-se que a $AMO < ERI < GEN$.

Estudos tem demonstrado que o mecanismo de ação de IFD não promove a seleção de bactérias resistentes mesmo que condições sub-inibitórias de tratamentos sejam aplicadas, diferentemente da ATBT.^{36,51} Apesar dos êxitos dos tratamentos de IFD, infecções sistêmicas e internas apresentam dificuldades de serem tratadas por tal técnica devido às limitações da penetração da luz no tecido biológico, diferentemente da ATBT que é capaz de tratá-las. Ou seja, qualquer técnica apresenta vantagens e desvantagens, por isso ao fazer a combinação de terapias, além de visar resultados ATBs potencializados, deve-se buscar minimizar as desvantagens como ocorre com a IFD junto a ATBT. Além disso, não só os efeitos inibitórios devem ser analisados durante a combinação de tratamentos, mas também os efeitos sobre as estruturas celulares sobreviventes e sua atividade metabólica devem ser observados.

De acordo com os resultados do presente estudo, os tratamentos combinados levaram a respostas de maior eficiência do que as monoterapias. O uso combinado de IFD com diferentes classes de antibióticos pode resultar em desempenhos distintos do ATBs devido à taxa de incorporação bacteriana e estados vibracionais de biomoléculas.

4.4 Conclusão

A IFD pode potencializar a ação do ATB quando ambos são combinados. Os ATBs atuam a partir da internalização das moléculas para o interior celular, uma vez que os alvos de ação desses fármacos são nas estruturas intracelulares. A redução da MIC com aplicação prévia da IFD demonstrou que o dano da célula bacteriana, principalmente na membrana, afeta a permeabilidade celular, favorecendo a captação de ATBs por aumentar a suscetibilidade das bactérias aos antibióticos. Esses resultados são promissores na perspectiva de reverter o cenário de microrganismos resistentes e persistentes.

Diferentes protocolos de combinação de ambas as terapias exercem efeitos sinérgicos ou antagônicos. As EROs produzidas pela IFD podem enfraquecer a célula, facilitando a ação dos ATBs, ou degradá-los, diminuindo sua eficiência. Além disso, a interação ATBs e FS pode comprometer a eficiência fotodinâmica. A aplicação prévia de IFD destacou-se como a melhor sequência temporal de combinação das terapias estudadas. Embora a interação entre terapias possa não levar a resultados triviais, o ajuste dos parâmetros potencializa a ação antimicrobiana que pode ser uma solução para falhas antibióticas.

5 AÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA NAS FALHAS DE ANTIMICROBIANOS

As bactérias multirresistentes (BMR) caracterizadas pela sobrevivência e crescimento na presença de ATBs, seja por alterações genéticas, seja por resposta ao ambiente, constituem uma das mais graves ameaças à saúde pública e devem ser combatidas com urgência. A IFD é uma alternativa para quebrar a resistência antimicrobiana que pode potencializar o efeito dos ATBs, cuja evidência dos efeitos sinérgicos de sua combinação foi demonstrada em estudo anterior.^{66,99} Este capítulo aborda o aumento da suscetibilidade bacteriana aos ATBs pela aplicação de IFD, que também pode auxiliar em outras falhas de ATBs, seja na persistência ou na virulência bacteriana. *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) isolado de um paciente e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) induzidos resistência à amoxicilina, eritromicina e à gentamicina foram avaliados quanto à MIC para diferentes intervalos de IFD usando 10 μ M de curcumina e 10 J/cm² em 450 nm. A fração de sobrevivência da população e a quantificação da biomassa do biofilme também foram avaliadas na presença e ausência de IFD. O estudo caracterizou a recuperação da suscetibilidade da amoxicilina, eritromicina e gentamicina após cinco ciclos de IFD. Os níveis de quebra de resistência para cada antibiótico a partir do efeito fotodinâmico, bem como a progressão em microrganismos descendentes, foram demonstrados em até 30 h após a aplicação da IFD. A formação de biofilme foi uma expressão de virulência bacteriana avaliada em cepas submetidas previamente a IFD. A ação fotodinâmica apresentou uma característica inovadora de modificar o grau de sensibilidade bacteriana aos ATBs de acordo com as dosagens, reduzindo assim a resistência e persistência de microrganismos de cepas padrão e clínicas, ou seja, aquelas que adquiriram resistência *in vitro* ou do histórico clínico do paciente. Para que a IFD seja um adjuvante aos ATBs, levantamos a hipótese de que a redução do grau de resistência antimicrobiana por meio da ação fotooxidativa é o caminho para combater as falhas dos ATBs.

5.1 Metodologia

5.1.1 Microrganismo

As linhagens estudadas foram a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) sem/com indução da resistência no laboratório e a cepa *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), esta isolada clinicamente de pacientes com infecção de garganta (Comitê de Ética Humana do hospital público Santa Casa, São Carlos-São Paulo, Brasil CAAE 83082018.4.0000.8148). Para o experimentos descritos em 5.1.3, 5.1.4 e 5.1.5. As bactérias foram cultivadas aerobiamente em meio líquido Brain Heart Infusion (BHI), overnight à 37 °C, 150 rpm. O inóculo foi centrifugado a 3000 rpm e o pellet suspenso em tampão fosfato salino (PBS), centrifugado novamente. O inóculo foi padronizado em 10⁷ a

10^8 UFC/ml pela densidade ótica em 600 nm. Para os experimentos 5.1.2 e 5.1.6, foi utilizado a suspensão de colônias descrito em 4.1.1.

5.1.2 Concentração inibitória mínima

Neste capítulo a determinação da MIC manteve a metodologia descrita em 4.1.3. Para a MIC de células descendentes após IFD, o inóculo foi cultivado em BHI por 18h, e transferido para novo meio completando 24h e 30h novamente. Para cada intervalo 18, 24 e 30h seguiu a padronização em 10^6 UFC/ml, como descrito.

5.1.3 Indução de resistência a antimicrobianos

Inicialmente o inóculo padronizado em 10^8 UFC/ml e foi transferido para tubo Falcon contendo 6 ml de meio MH com concentração de ATB variando de MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MIC. O cultivo foi mantido aerobiamente por 24 h, a 37 °C, 150 rpm. Posteriormente, o inóculo foi centrifugado a 3000 rpm e suspenso em MH para padronização 10^8 UFC/ml. O novo inóculo foi dividido em duas etapas: i) submetido a determinação da MIC (seção 4.1.3), ii) cultivo em 6 ml de meio MH com concentração de ATB variando de MIC, $\frac{1}{2}$ MIC, $\frac{1}{4}$ MICn sendo esse procedimento repetido por 3 ciclos. Na última etapa, as cepas cultivadas com $\frac{1}{4}$ MIC foram congeladas em criotubo contendo meio BHI e glicerol 20%, sendo denominadas de *S. aureus* AMO-induzida, ERI-induzida e GEN-induzida e utilizadas para os estudos deste capítulos .

5.1.4 Ciclo de inativação fotodinâmica parcial

O inóculo padronizado em 10^8 UFC/ml das cepas induzidas à resistência com $\frac{1}{4}$ MIC (seção 5.1.3) e a MRSA foram submetidas a protocolo de IFD descrito em 4.1.2. Dose de luz e concentração de FS foram usadas para reduzir menos de 3 log(UFC/ml) com base no resultado da Figura 13. As amostras foram submetidas a duas etapas: i) determinação da MIC descrito na seção 5.1.2 e ii) cultivo em meio BHI por intervalos de 6 e 24 h para repetir esse protocolo por 5 ciclos. Na última etapa, as cepas foram congeladas em criotubo contendo meio BHI e glicerol 20%. A partir desse estoque congelado, novo inóculo foi preparado (5.1.1) para a determinação da MIC como descrito em 5.1.2.

5.1.5 Ensaio de persistência

Após a padronização do inóculo (5.1.1), as bactérias foram transferidas para tubos Falcon com 25 ml de meio MH 10xMIC de AMO, ERI e GEN . Um grupo foi submetido previamente ao protocolo de IFD, ou seja, foi incubado com CUR 10 μ M e irradiado em 10 J/cm² com a Biotable® em 450 nm. As células sobreviventes foram então transferidas, do mesmo modo, para tubos Falcon com 25 ml de meio MH contendo 10xMIC dos três ATBs. A cada intervalo de hora amostras foram coletadas, diluídas e plaqueadas para determinação das UFC/ml. A taxa de sobrevivência foi definida como:

$$\text{Taxa de sobrevivência} = \frac{(UFC/ml)_{\text{tratamento}}}{(UFC/ml)_{\text{inicial}}} \quad (5.1)$$

5.1.6 Quantificação biomassa de biofilme

A partir de colônias de bactéria, inóculo foi ajustado em 10^8 UFC/ml e distribuído 200 μ L em placa de 96 poços, mantidos em incubação de 48 horas a 37 °C. Posteriormente, o meio foi removido e cada poço foi lavado duas vezes com 200 μ L de PBS. Em cada poço foram adicionados 100 μ L de solução do corante Cristal Violeta 0,1%, mantido em contato com o biofilme por 15 minutos, em seguida removido e cada poço foi lavado com 200 μ L de água destilada por quatro vezes. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos para a completa evaporação dos resíduos de água. Posteriormente, 200 μ L de álcool etílico absoluto foram adicionados em cada poço para a solubilização do corante aderido à matriz. A quantificação da biomassa total foi realizada através da leitura da densidade óptica a 570 e 600 nm, onde resultados maiores de absorbância indicam maior produção de biomassa no biofilme.

5.1.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica (N=9). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Os dados descritos por distribuição normal foram apresentados em média com desvio padrão e analisados por ANOVA One Way e Tukey. Para os dados não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis e da mediana foram aplicados, e os resultados foram plotados em mediana. Para todas as análises foi considerado o p-valor < 0,05 como significativo. O software utilizado para a análise estatística foi o TIBCO Software Inc version 14 e os gráficos plotados por Origin, Version 2022b.

5.2 Resultados

5.2.1 Indução da resistência bacteriana ao antimicrobiano

A exposição constante dos ATBs AMO ($MIC_0 = 0,25 \mu\text{g/ml}$), ERI ($MIC_0 = 16 \mu\text{g/ml}$) e GEN ($MIC_0 = 0,5 \mu\text{g/ml}$) nas respectivas concentrações de MIC_0 , $\frac{1}{2} MIC_0$ e $\frac{1}{4} MIC_0$ foram aplicadas em culturas de *S. aureus* (ATCC 25923), com lavagem e suspensão do meio fresco contendo as mesmas concentrações sub-inibitórias de ATBs em intervalos de 24 h.

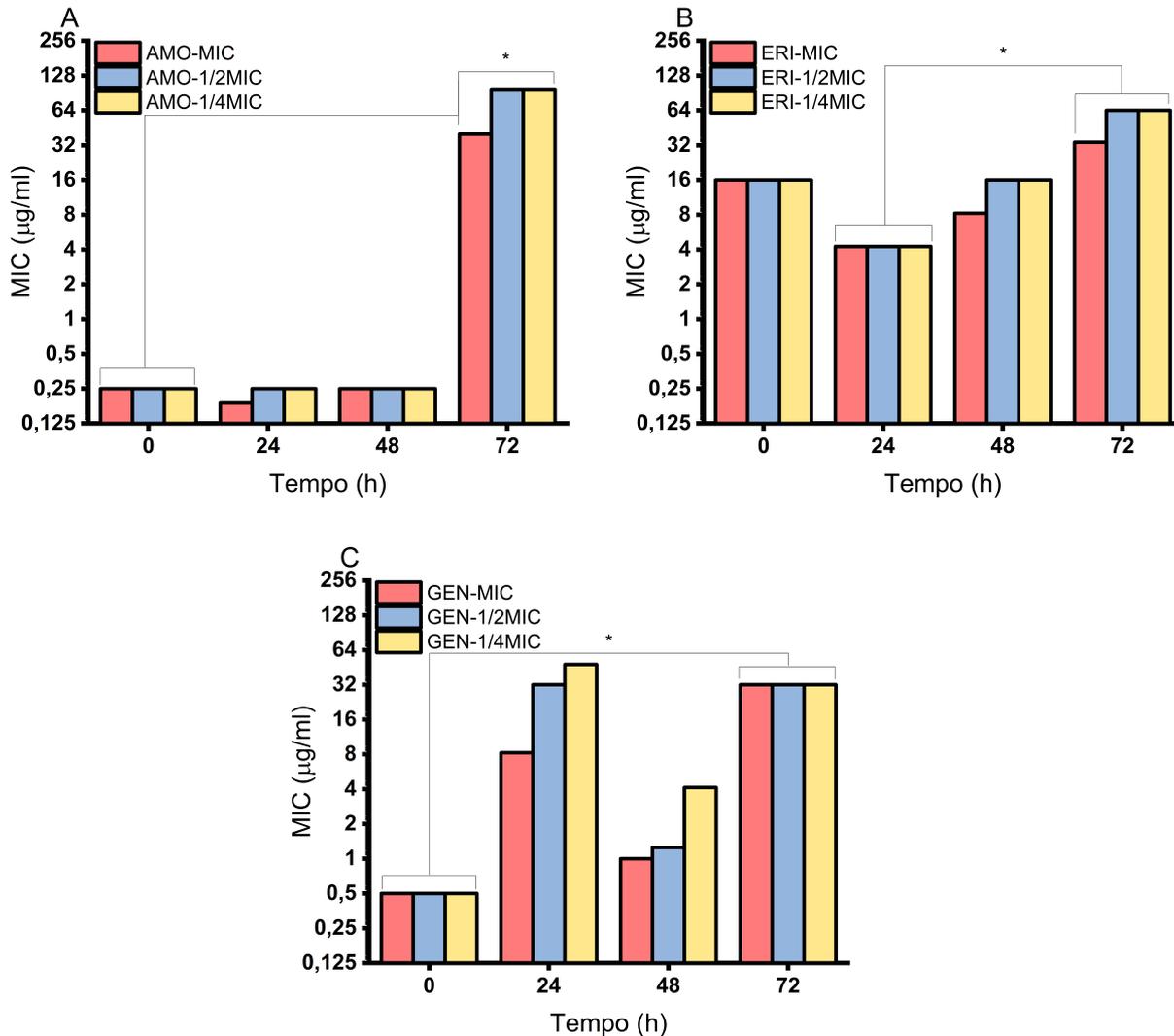


Figura 23 – Concentração inibitória mínima (MIC) após a indução de resistência aos ATBs com o cultivo em MIC_0 , $\frac{1}{2} MIC_0$ e $\frac{1}{4} MIC_0$ de *S. aureus* (ATCC 25923) para A) amoxicilina (AMO), no qual MIC_0 é $0,25 \mu\text{g/ml}$, B) eritromicina (ERI), no qual MIC_0 é $16 \mu\text{g/ml}$ e C) gentamicina (GEN), no qual MIC_0 é $0,5 \mu\text{g/ml}$. Os dados são a mediana das triplicatas experimentais. Gráficos usando a escala Log_2 do eixo y.
Fonte: Elaborada pela autora.

Nas primeiras horas de cultivo os valores de MIC mantiveram aproximadamente constante, mas após 72 h de cultivo, na Figura 23.A é possível observar o aumento da MIC de AMO entre 160 a 384 vezes. Para o cultivo em subconcentrações de ERI mostrados na Figura 23.B, inicialmente há uma diminuição do valor de MIC em 3,7 vezes, mas posteriormente segue crescente linearmente finalizando em 72 h com aumento de 2 a 4 vezes de MIC_0 . Para ambos os ATBs, AMO e ERI, o maior aumento é devido as concentrações de cultivo de $\frac{1}{2} MIC_0$ e $\frac{1}{4} MIC_0$, enquanto para a GEN (Figura 23.C) é possível observar que independente da concentração o aumento foi de 64 vezes no valor da

MIC₀. Foi constatado que após 72 h de cultivo os valores de MIC da cultura para os três ATBs é aumentado significativamente, de modo que a linhagem descendente se demonstra como resistentes a AMO, ERI e GEN. As amostras produzidas são as principais cepas resistentes aos ATBs usados nas próximas etapas, sendo estas denominadas de *S. aureus* AMO-induzida (Figura 23.A), ERI-induzida (Figura 23.B) e GEN-induzida (Figura 23.C).

5.2.2 Aumento da suscetibilidade bacteriana

A Figura 24 mostra o efeito de ciclos de IFD a cada 6h na MIC de cepas de *S. aureus* resistentes, seja de amostra coletada de pacientes (MRSA) ou da resistência induzida de *S. aureus* (ATCC25923) pelo cultivo de ¼ MIC de AMO (0,063 µg/ml), ERI (4 µg/ml) e GEN (0,125 µg/ml), cujo foi apresentado na Figura 23. O ciclo zero corresponde ao valor da MIC inicial das cepas a partir do inóculo de estoque congelado. A MRSA apresentou elevado valor de MIC para os três ATBs avaliados, sendo que a concentração de 1024 µg/ml era o valor máximo possível de detectar. Independente do ATB utilizado para induzir a resistência, as cepas descendentes apresentaram valores de MIC acima do ponto de corte para suscetibilidade de AMO, ERI e GEN.

A ação fotodinâmica para potencializar os ATBs foi mais efetiva para a cepa *S. aureus* GEN-induzida, de modo que após 5 ciclos de IFD as cepas apresentaram MIC abaixo do ponto de corte, classificando como sensível aos ATBs AMO, ERI e GEN. Na Figura 24.A, após 5 ciclos de IFD houve uma diminuição da MIC de AMO em 102; 128; 64 e 8533 vezes para MRSA, *S. aureus* AMO-induzida, ERI-induzida e GEN-induzida, respectivamente. Para ERI apresentado na Figura 24.B, os valores de MIC diminuíram em 77; 64; 128; 2048 vezes para MRSA, *S. aureus* AMO-induzida, ERI-induzida e GEN-induzida, respectivamente. A aplicação de IFD foi eficaz na ação da GEN, Figura 24.C, uma vez que 2 ciclos houve redução dos valores de MIC, sendo abaixo do ponto de corte para todas as cepas. Após 5 ciclos de IFD os novos valores de MIC de GEN foram de 0,1875 µg/ml para MRSA e 0,5 µg/ml para *S. aureus* AMO-induzida, ERI-induzida e GEN-induzida.

A Tabela 5 apresenta os valores da análise da taxa de quebra da resistência da ação fotooxidativa da IFD parcial em ciclos, definida como pela Equação 5.2. O parâmetro indica que a cepa de *S. aureus* induzida por GEN responde de forma mais eficaz à ação de ciclos parciais de IFD para aumentar a suscetibilidade a AMO>GEN>ERI. Como a GEN apresentou os maiores valores de η , sua recuperação de suscetibilidade foi mais efetiva para MRSA>GEN-induzido>ERI-induzido>AMO-induzido. Valores altos de η (Equação 5.2) representam maior eficiência na viabilidade da recuperação do ATB.

$$\eta = \frac{\text{Log}_2(\text{MIC}_i) - \text{Log}_2(\text{MIC}_{\text{ponto-de-corte}})}{\text{Número de ciclos}} \quad (5.2)$$

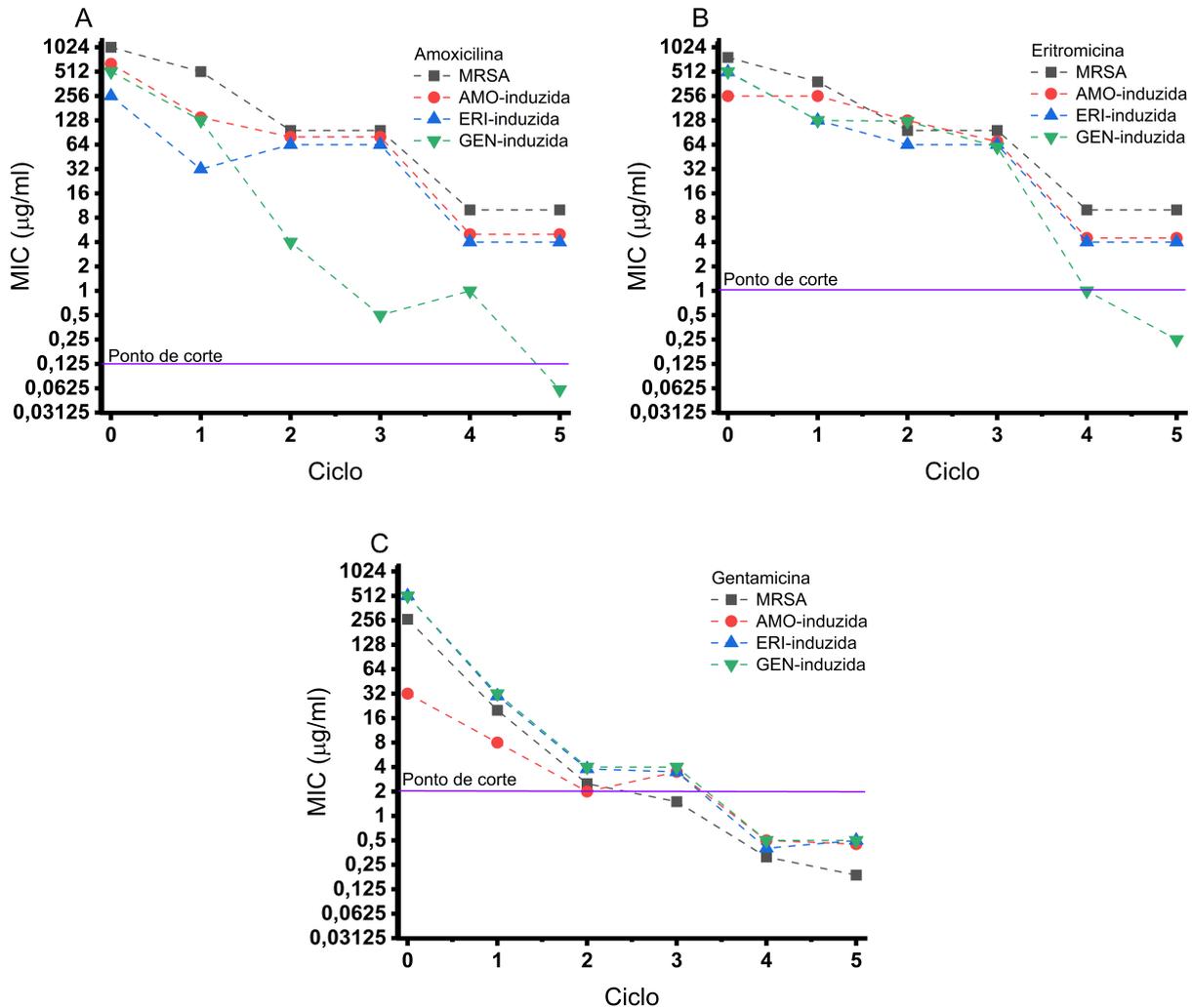


Figura 24 – Aumento da suscetibilidade aos ATBs com a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) a cada ciclos de inativação fotodinâmica (IFD) de $10 \mu\text{M}$ de CUR, $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ à 450 nm nas cepas coletada de pacientes (MRSA) ou de resistência induzida de *S. aureus* (ATCC25923) pelo cultivo de $\frac{1}{4}$ MIC de AMO ($0,063 \mu\text{g}/\text{ml}$), ERI ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$) e GEN ($0,125 \mu\text{g}/\text{ml}$). MIC de cada cepa referente aos ATBs A) amoxicilina, B) eritromicina e C) gentamicina. Os dados são a mediana das triplicatas experimentais. Gráficos usando a escala Log_2 do eixo y.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 – Valores de η indicativos de uma taxa de quebra de resistência pela ação de IFD parcial para cada cepa e amoxicilina (AMO), eritromicina (ERI) e gentamicina (GEN) avaliados. Em verde estão a combinação cepa-antimicrobiano que apresentaram as melhores taxas

Bactéria	AMO	ERI	GEN
MRSA	1.43	1.33	2.48
AMO-induzida	1.39	1.23	1.39
ERI-induzida	1.15	1.44	2.43
GEN-induzida	2.65	2.00	2.38

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.3 Concentração inibitória mínima em células descendentes após IFD

Na Figura 25, foi verificado se o aumento da suscetibilidade bacteriana obtida com o tratamento de IFD após 5 ciclos se manteve nas células descendentes, quando cultivadas diretamente da colônia em meio BHI sem nenhum tratamento. Como demonstrado na Figura 24, após 5 ciclos de IFD a MIC diminui drasticamente das cepas resistentes (clínica e induzidas). As barras em vermelho e azul na Figura 25 são as bactérias antes e após 5 ciclos de IFD, respectivamente. Para todas as cepas avaliadas, na cultura de 18h, foi constatado que a MIC obtida é menor que a MIC_0 (barra vermelha) das cepas MRSA, *S. aureus* AMO-induzida, ERI-induzida e GEN-induzida para AMO, ERI e GEN. Transferindo a cultura para meio fresco e cultivado até completar 24h e 30h, AMO e ERI apresentaram tendência em retornar à MIC_0 das cepas resistentes, ou seja, antes do tratamento de ciclos de IFD. Contudo, a GEN manteve MIC em valores drasticamente inferiores comparados com a MIC_0 das cepas resistentes.

Em números, após 30h de cultivo da cepa IFD-MRSA (Figura 25.A) apresentou MIC 2, 3 e 264 vezes menor que a MIC_0 para AMO, ERI e GEN respectivamente. Na Figura 25.B, a cepa IFD-AMO-induzida apresentou MIC 1,3 e 64 vezes menor para ERI e GEN, mas a MIC de AMO recuperou o valor inicial da cepa resistente. Para IFD-ERI-induzida (Figura 25.C) a MIC de AMO foi o dobro de MIC_0 , mas para os ERI e GEN foi menor em 2 e 683 vezes, respectivamente. No caso de IFD-GEN-induzida mostrado na Figura 25.D, após as 30 h de cultivo a MIC da população bacteriana foi de 2 e 683 vezes menor que MIC_0 de ERI e GEN respectivamente, mas recuperou o valor de MIC_0 para AMO.

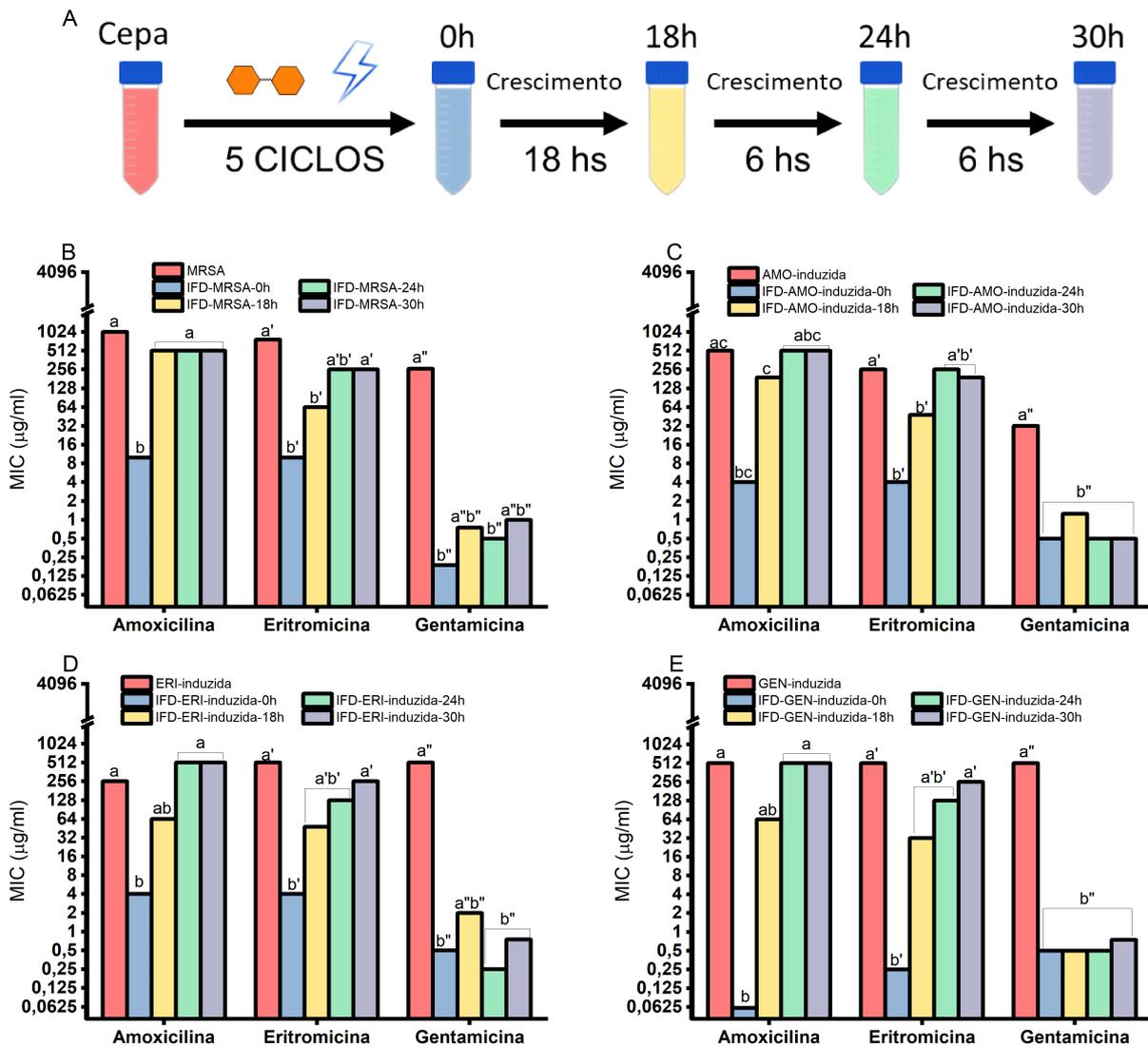


Figura 25 – Concentração inibitória mínima (MIC) de cepas de *S. aureus* resistentes e descendentes. A) Esquema da metodologia aplicada para determinar a MIC da cepa inicial (vermelho), após 5 ciclos de IFD parcial (azul) e do crescimento após tratamento em 18 (amarelo), 24 (verde) e 30 h (roxo). B) MRSA clinicamente isolado, C) induzido por amoxicilina (AMO), D) induzido por eritromicina (ERI), E) induzido por gentamicina (GEN). Os dados são a média de triplicados experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística para $p < 0,05$ e letras iguais indicam ausência de diferença estatística, a análise considera cada antimicrobiano individualmente. Gráficos usando uma escala Log_2 do eixo y.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.4 Efeito da IFD na persistência bacteriana

O índice de duração mínima para matar 99% da população (MDK_{99} , do inglês Minimal Duration for Killing 99%) é um parâmetro complementar para indicar as bactérias sensíveis, persistentes e resistentes. Valores moderados de MDK_{99} caracterizam uma linhagem persistente, ou seja, embora sejam bactérias sensíveis, o tempo para ação do ATB ser efetiva é maior. A Figura 26, apresenta a fração de sobrevivência das cepas *S. aureus* (ATCC 25923) e GEN-induzida com e sem aplicação prévia de IFD.

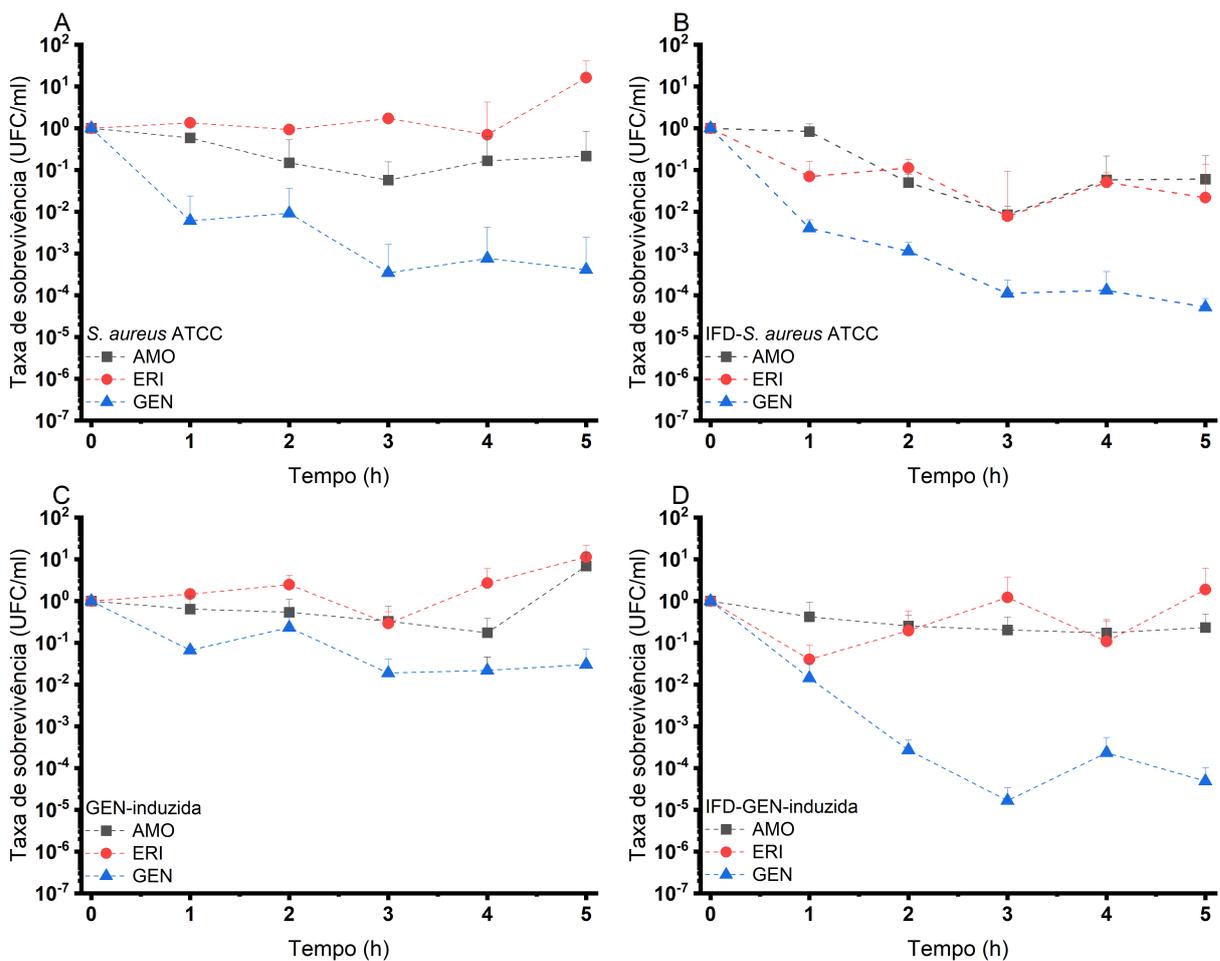


Figura 26 – Taxa de sobrevivência bacteriana com o cultivo de 10 MIC_0 de amoxicilina (AMO), eritromicina (ERI) e gentamicina (GEN) das cepas A) *S. aureus* ATCC 25923, B) aplicação de inativação fotodinâmica (IFD, 10 μM de curcumina, 10 J/cm^2 à 450 nm) previamente na cultura de *S. aureus* ATCC 25923. C) *S. aureus* GEN-induzida e D) aplicação de IFD (10 μM de curcumina, 10 J/cm^2 à 450 nm) previamente na cultura de *S. aureus* GEN-induzida. Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 26.A, apesar da linhagem ser sensível a AMO, não foi possível obter o MDK_{99} dentro do período de dados experimentais de 5 h, assim como para ERI, mas para

GEN o valor identificado foi de 2,4 h. Contudo, a aplicação prévia de IFD em *S. aureus* mostrado na Figura 26.B, diminui o MDK₉₉ para a GEN e ERI, sendo de 1,9 h e 4,8 h respectivamente, enquanto que para AMO o MDK₉₉ é de 5,5 h matematicamente. A taxa de diminuição da taxa de sobrevivência foi mais acelerada para aplicação prévia de IFD de 0,3 a 0,8 vezes. Para a cepa de *S. aureus* GEN-induzida, por ser resistente a todos os ATBs, o comportamento obtido ao longo do tempo foi de uma fração sobrevivente cujo o MDK₉₉ é maior do que o tempo do experimento de 5 h. Todavia, a aplicação prévia de IFD em cepas GEN-induzida (Figura 26.D) demonstrou que o comportamento da fração de sobrevivência é mais decrescente em 0,1 a 1,3 vezes para todos os ATBs avaliados, sendo possível determinar experimentalmente o MDK₉₉ para GEN em 1,8 h.

5.2.5 Quantificação biomassa de biofilme

A formação de biofilme é uma das expressões de virulência das bactérias, sendo essa uma das estratégia que protegem os microrganismo da ação de ATB. Na Figura 27 mostra a biomassa de biofilmes da cepas estudadas neste capítulo.

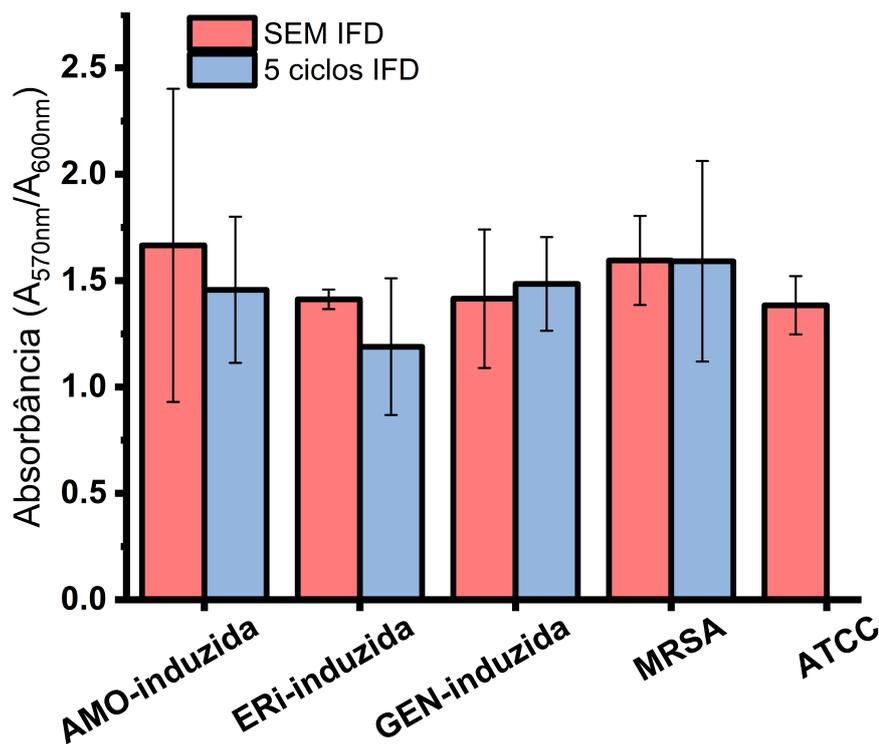


Figura 27 – Quantificação da biomassa aderida de biofilme por meio da absorção do cristal violeta em 570 nm normalizado pela densidade ótica da célula bacteriana em 600nm, para diferentes cepas bacterianas de *S. aureus* (Amoxicilina(AMO)-induzida, Eritromicina (ERI)-induzida, Gentamicina (GEN)-induzida, *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) e ATCC 25923) com/sem aplicação de 5 ciclos de inativação fotodinâmica (IFD, 10 μ M de curcumina, 10 J/cm² à 450 nm) previamente a indução do biofilme.

Fonte: Elaborada pela autora.

A biomassa aderida a uma superfície é mensurada pela quantidade de matriz extracelular por absorção do cristal violeta (570 nm) e pela presença de células bacterianas por densidade ótica (600 nm). O biofilme cultivado totalizou 48 horas de crescimento.

Comparativamente, as cepas que tiveram a indução da resistência pelo cultivo em $\frac{1}{4}$ MIC₀ de AMO, ERI, GEN (Figura 23) apresentaram um aumento da biomassa de biofilme em relação a cepa ancestral (ATCC) em 20,4%, 2% e 2,2% respectivamente. A linhagem de paciente MRSA também apresentou uma biomassa de biofilme em 15,3% maior que a cepa ATCC.

A aplicação prévia da IFD nas bactérias resistentes resultou em diminuição da biomassa de biofilme aderida na superfície da placa em 12,6%, 1,8%, and 0.% para AMO-induzida, ERI-induzida, e MRSA, em comparação com a não aplicação prévia de IFD, respectivamente. O resultado na figura ilustra possíveis diferenças na expressão de fatores de virulência entre bactérias resistentes e sensíveis. Além disso, o impacto dos ciclos de PDI não se limita à modificação dos perfis de suscetibilidade; ele também sugere possíveis efeitos antivirulência.

5.3 Discussão

A resistência bacteriana é uma das principais preocupações de saúde mundial, mas não a única causa da falha dos ATBs, sendo também devido as bactérias persistentes e biofilmes.¹⁰⁰ A razão pela qual a resistência é o principal foco dos estudos quando se analisa a efetividade do ATB dá-se pela sua crescente taxa e disseminação em decorrência dos processos de seleção artificial, cuja a exposição inadequada do fármaco aos microrganismos elimina as células suscetíveis e seleciona as células bacterianas resistentes,²⁰ como mostrado na Figura 23. Além disso, elas mostraram que a indução por uma determinada classe de ATB desencadeia também a de outras classes. Uma estratégia para potencializar os efeitos dos ATBs é pela associação de técnicas, por exemplo, a IFD que pode diminuir significativamente os valores de MIC mostrado na Figura 24.

Além disso, em trabalhos anteriores, mostramos que a ação da IFD potencializa o efeito do ATB utilizando os FS azul de metileno⁶⁶ e a CUR (Cap. 4,⁹⁹) com diferentes ATBs. Nossos estudos corroboram com outros presentes na literatura, no qual a ordem de aplicação entre as terapias, escolha do FS e classe de ATBs podem ser determinantes nas respostas sinérgicas.^{62, 69–71, 95}

Com base no resultado apresentado na Figura 24, o aumento da suscetibilidade das três classes de ATBs se mostrou efetiva na população bacteriana resistente sendo isolado clínico ou resistência induzida em laboratório. Embora diminuições expressivas nas MIC tenham sido constatadas, melhorias no protocolo podem promover melhores resultados, como modificação do intervalo e da duração de aplicação da IFD, com o

objetivo de obter a quebra da resistência pela ação fotodinâmica em todos os grupos, que foi apenas obtido para o ATB GEN (Figura 24.C) e para a cepa *S. aureus* GEN-induzida nos demais ATBs, obtendo MIC abaixo do ponto de corte. A GEN atravessa a membrana bacteriana e se liga ao rRNA em um transporte ativo dependente de oxigênio, impedindo a síntese de proteínas.¹⁰¹ Quando esse limiar não é alcançado, a população sobrevivente predominante permanece sendo as células não suscetíveis aos ATBs, de modo que as próximas gerações da população a MIC final é maior ou igual à MIC₀ de quando não houve ação fotodinâmica aplicada (Figura 25). No caso em que o ponto de corte é ultrapassado, aumenta a probabilidade do predomínio das células suscetíveis aos ATBs na população, conseqüentemente as próximas gerações não tendem a ter aumento expressivo na MIC, como o caso do uso da GEN (Figura 25).

Para as diferentes cepas estudadas a GEN se destaca quanto a quebra da resistência e a manutenção da suscetibilidade após a recuperação. Por ser um aminoglicosídeo, a GEN atua no ribossomo subunidade 30S e a ERI, um macrolídeo, atua na subunidade ribossomal 50S.¹⁶ Quando há a combinação da IFD com a GEN e ERI implica em maior probabilidade de bactérias remanescentes com danos no ribossomo, cuja é uma organela essencial para manutenção das atividades celulares. Um dano no ribossomo precisa de um tempo de recuperação maior do que danos na parede celular, que é o dano mais acumulado quando a AMO, β -lactâmico, é utilizada.⁵⁸ Como o intervalo entre as aplicações da IFD foi de 6h, um tempo significativamente maior do que o tempo para que haja novas gerações de células filhas, os dados demonstraram que houve permanência do efeito de diminuição da MIC. Isso sugere que o dano fotooxidativo acumulado em combinação com o antibiótico é mais difícil de ser reparado. Além disso, analisando o parâmetro η , (Tabela 5) quando este é grande significa que a taxa de danos supera a regeneração, neste caso a quebra da resistência é mais permanente. O oposto ocorre quando o parâmetro η é pequeno.

A resposta distinta entre as cepas de *S. aureus* e as diferentes classes de ATBs demonstram que a resposta da combinação de IFD e ATB não é universal para cada trio bactéria, FS e ATB. Além disso, os resultados obtidos também são influenciados pela fase de crescimento da bactéria, como na Figura 25 em que após ter o aumento da suscetibilidade aos ATBs e as culturas voltarem ao cultivo sem tratamento, as bactérias na fase estacionária (18h) majoritariamente não recuperaram o mesmo nível de resistência inicial diferentemente das culturas em fase logarítmica (24h e 30h).

O termo "ponto de interrupção de resistência" para efeitos antibacterianos usado para cepas de bactérias de tipo selvagem e derivadas clinicamente, ambos com mecanismos de resistência adquiridos ou selecionados, também foi analisado aqui em termos de manutenção desse ponto de interrupção. Observamos uma queda na resistência com IFD em linhagens ATCC que foram induzidas à resistência pelo método de indução antibiótica (pelo método de resistência adquirida, Figura 23), apresentaram retorno aos seus limiares

de resistência. Isso nos mostrou a necessidade de adequar as modificações da dosagem de IFD para manter a quebra de resistência ao uso de AMO após 24 horas de tratamento.

Neste capítulo, o foco está em demonstrar que a ação fotodinâmica além de ser um adjuvante à ATBT, também é capaz de atuar nos diferentes casos quando há a falha do ATB. Aumentar ou recuperar totalmente a suscetibilidade aos ATBs, como demonstrado na Figura 24, permite o aumento do tempo de uso útil da classe de ATB. As chances de novos ATBs serem aprovados pelo FDA para estudo de fase clínica III é de 6 em 10.131, sendo que dos que são aprovados, a probabilidade de ser de uma classe de ATB nova é de apenas 25%.⁴ Isso implica uma baixa probabilidade de resolver o problema da resistência bacteriana, uma vez que a maioria dos novos ATBs tende a ser de classes existentes. Portanto, a busca por técnicas que combatam os mecanismos de resistência aos ATBs é essencial.

Usualmente a estratégia que tem sido adotada clinicamente é a associação de diferentes classes de ATBs visando a diminuição das dosagens de tratamento e respostas sinérgicas. Contudo, em alguns casos, além de uma resposta antagônica há a exposição a mais de uma classe de ATB, limitando ainda mais as opções de tratamentos, diminuindo o tempo de uso útil dessa classe.^{102–104} A combinação de 2 ou mais ATBs pode induzir a tolerância das cepas bacterianas aos medicamentos, ou seja, a sobrevivência por um tempo limitado extenso da bactéria em condições letais.¹⁰⁵ Essa é uma das causas nas quais uma infecção é dificilmente erradicada, pois há as reinfecções e cerca de 80% são infecções por biofilmes.^{106,107}

Diferentemente, a IFD além de aumentar a suscetibilidade do ATB também diminui o MDK₉₉ (Figura 26) que é essencial para a ação desses fármacos, os quais majoritariamente agem durante o tempo de crescimento, sendo que as células persistentes tendem a ter uma taxa de crescimento menor.¹⁰⁸ Desse modo a diminuição do MDK₉₉ promovida pela IFD combate outra vertente da falha dos ATBs. Na persistência aqui demonstrada, avaliou-se a patogênese microbiana de bactérias induzidas por resistência e suscetíveis devido à necessidade de prolongar o tratamento, considerando a possibilidade de recidiva após a terapia. Nesses casos recorrentes em pacientes, alternativas são usadas para alcançar a eficácia do tratamento, o que também pode aumentar os efeitos colaterais. Algumas características fenotípicas em uma subpopulação, incluindo bactérias persistentes que sobrevivem em altas concentrações de ATBs reinfectando pacientes, podem afetar a resistência antimicrobiana e, portanto, a ineficácia dos ATBs.^{9,100} Além disso, os sintomas graves de uma infecção devem-se a fatores de virulência como toxinas e formação de biofilme, cuja expressão pode ser estimulada em função da dosagem do ATB.^{10,11}

No Capítulo 4 foi demonstrado que a aplicação de tratamentos seja monoterapias de ATB, IFD ou o tratamento combinado alteram o fenótipo bacteriano.⁹⁹ Através das adesinas, as bactérias ligam-se a superfícies alvo como células teciduais, promovendo

o desenvolvimento de uma infecção e o direcionamento bacteriano para uma superfície específica sendo o primeiro passo para a formação de uma estrutura tridimensional complexa, ou seja, um biofilme, característico de infecções persistentes, crônicas e infecções bacterianas recorrentes.¹⁰⁹ Na Figura 27, mostramos que o biofilme, um importante fator de virulência, tem maior formação quando a cepas são resistentes comparada com células sensíveis a ATBs. Entretanto, as cepas descendentes após 5 ciclo de IFD diminuem a expressão dessa virulência, corroborando novamente que a ação fotoxidativa age nas células modificando estruturas e metabolismo celular quando estas não são eliminadas. Além da IFD, é relatado que CUR tem ação anti-infecciosa ao inibir biofilme de *P. aeruginosa* entre outros patógenos.¹¹⁰⁻¹¹² A redução da formação de biofilme é relevante para tratamento de infecções bacterianas, uma vez que além da deterioração do paciente, os biofilmes tendem a ter um aumento da resistência aos ATBs em até 1000 vezes.¹¹³ Porém alguns estudos indicam que não necessariamente os biofilmes são resistentes aos ATBs, mas o ambiente favorece a persistência da célula bacteriana aos ATBs.¹¹⁴

Assim, a ação fotodinâmica se demonstra não apenas como um adjuvante sinérgico ao ATB,⁶² mas com capacidade de modificar o grau de suscetibilidade bacteriana aos ATBs pela diminuição abaixo dos pontos de corte de resistências e a pela diminuição do MDK₉₉, além de controlar a formação de biofilme de cepas resistentes, um importante fator de virulência bacteriano. Nesses três principais pontos que tange a falha da ATB, a IFD associada ao tratamento convencional se demonstra o tratamento adequado e benéfico para futuras aplicações em casos de infecção bacterianas, sendo uma resposta à demanda da organização mundial da saúde (OMS) em buscar alternativas para as falhas de ATBs. Embora os resultados demonstrem a competência da combinação da IFD com ATBs, existem diversos pontos a serem melhor elucidados na resposta de longo prazo deste tratamento combinado.

Finalmente, deve-se ressaltar que os principais mecanismos fotodinâmicos para reduzir a resistência das bactérias aos ATBs ainda precisam ser determinados. No entanto, as observações aqui apresentadas permitem o estabelecimento de hipóteses. Quando as bactérias adquirem resistência a um determinado ATB, ocorrem modificações em seu metabolismo, bem como na permeabilidade da membrana. As reações enzimáticas podem destruir a molécula do ATB ou a bomba de efluxo pode expelir tais moléculas. A oxidação introduzida pela ação fotodinâmica pode interferir nesses mecanismos diminuindo sua atividade. Como resultado, ocorre a quebra das barreiras à ação do antibiótico, potencializando seu efeito antibacteriano pela ação fotodinâmica.

5.4 Conclusão

Nesse capítulo foram mostradas as evidências de que a proposta de aplicação da IFD para auxiliar o aumento da suscetibilidade bacteriana aos ATBs é possível. Prolongar e recuperar o uso de diferentes classes de ATBs são demandas urgentes dada as perspectivas futuras no que tange a saúde global. Desse modo, o problema de infecções resistentes no qual há a possibilidade de irradiação como faringotonsilites, pneumonia, úlceras não cicatrizantes entre outros, a IFD se demonstra como uma abordagem apropriada, mas que ainda necessita avaliação mais ampla dentro da temática resistência a ATBs. Mais do que isso, os resultados indicaram a possibilidade de conjugar ATB com IFD de forma que as gerações existentes de ATBs possam voltar a ser viáveis no combate às infecções. Com o tempo espera-se que a reversão da resistência ao ATB possa ser permanente e nesse caso o ATB sozinho possa voltar a ser uma boa solução. A combinação da oxidação fotodinâmica com ATBs pode ser uma nova modalidade de combate às infecções em muitas situações. Isso certamente deverá ajudar a reverter um cenário difícil de resistência antimicrobiana.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme descrito em 1.2, o objetivo da pesquisa desenvolvida nesta tese foi analisar a combinação entre ATBT e IFD. Com base nos resultados obtidos e análises realizadas os principais pontos discutidos foram:

- Encontrar concentrações adequadas de ATBs e IFD é essencial para obter um efeito sinérgico e maximizar a eficácia da terapia combinada, evitando concentrações excessivas que possam causar efeitos adversos.
- A resposta sinérgica da combinação de IFD e ATBs pode variar dependendo da cepa bacteriana, dos tipos de ATBs, das doses utilizadas e das condições experimentais.
- A IFD afeta a permeabilidade celular e aumenta a suscetibilidade das bactérias aos ATBs, o que pode reverter a resistência bacteriana.
- Diferentes protocolos de combinação podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos, sendo a aplicação prévia de IFD considerada a melhor sequência temporal.
- A interação entre ATBs e FSs pode comprometer a eficiência fotodinâmica, e o ajuste dos parâmetros é importante para potencializar a ação antimicrobiana.
- A IFD pode auxiliar no aumento da susceptibilidade bacteriana aos ATBs, oferecendo uma abordagem apropriada para tratar infecções resistentes.
- A combinação de IFD com ATBs pode permitir que gerações existentes de ATBs sejam viáveis novamente no combate às infecções, revertendo a resistência antimicrobiana.
- A ação fotodinâmica em conjunto com ATBs pode ser uma nova modalidade de combate às infecções e ajudar a reverter o cenário desafiador da resistência antimicrobiana.

Esses resultados indicam a IFD como uma estratégia adjuvante eficaz para potencializar a ação dos ATBs e combater infecções resistentes. No entanto, mais pesquisas são necessárias para uma avaliação mais ampla, como por exemplo avaliar outros ATBs, microrganismos e FSs, para a compreensão completa dos mecanismos de ação e interação entre IFD e ATBs.

REFERÊNCIAS

- 1 ASLAM, B. *et al.* Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, Informa UK Limited, v. 11, p. 1645–1658, Oct. 2018. DOI: 10.2147/idr.s173867.
- 2 ABAT, C. *et al.* Evaluating the clinical burden and mortality attributable to antibiotic resistance: the disparity of empirical data and simple model estimations. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford University Press (OUP), v. 65, n. suppl_1, p. S58–S63, Aug. 2017. DOI: 10.1093/cid/cix346.
- 3 KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, American Society for Microbiology, v. 44, n. 12, p. 3249–3256, Dec. 2000. DOI: 10.1128/aac.44.12.3249-3256.2000.
- 4 CHAHINE, E. B. *et al.* Antibiotic approvals in the last decade: are we keeping up with resistance? **Annals of Pharmacotherapy**, SAGE Publications, v. 56, n. 4, p. 441–462, July 2021. DOI: 10.1177/10600280211031390.
- 5 YADAV, S. *et al.* Making of water soluble curcumin to potentiate conventional antimicrobials by inducing apoptosis-like phenomena among drug-resistant bacteria. **Scientific Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 10, n. 1, Aug. 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70921-2.
- 6 HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, Elsevier BV, v. 51, p. 72–80, Oct. 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- 7 BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 13, n. 1, p. 42–51, Dec. 2014. DOI: 10.1038/nrmicro3380.
- 8 LIU, Y. *et al.* Bacterial metabolism-inspired molecules to modulate antibiotic efficacy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press (OUP), v. 74, n. 12, p. 3409–3417, June 2019. DOI: 10.1093/jac/dkz230.
- 9 BAND, V. I.; WEISS, D. S. Heteroresistance: a cause of unexplained antibiotic treatment failure? **PLOS Pathogens**, Public Library of Science (PLoS), v. 15, n. 6, p. e1007726, June 2019. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007726.
- 10 EL-ALEAM, R. H. A. *et al.* Bacterial virulence factors: a target for heterocyclic compounds to combat bacterial resistance. **RSC Advances**, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 11, n. 58, p. 36459–36482, 2021. DOI: 10.1039/d1ra06238g.
- 11 MACEDO, G. H. R. V. de *et al.* Interplay between ESKAPE pathogens and immunity in skin infections: an overview of the major determinants of virulence and antibiotic resistance. **Pathogens**, MDPI AG, v. 10, n. 2, p. 148, Feb. 2021. DOI: 10.3390/pathogens10020148.

12 RAGHEB, M. N. *et al.* Inhibiting the evolution of antibiotic resistance. **Molecular Cell**, Elsevier BV, v. 73, n. 1, p. 157–165, Jan. 2019. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.10.015.

13 HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, Springer Science and Business Media LLC, v. 3, n. 5, p. 436–450, May 2004. DOI: 10.1039/b311900a.

14 MAISCH, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Bentham Science Publishers Ltd., v. 9, n. 8, p. 974–983, July 2009. DOI: 10.2174/138955709788681582.

15 BRYNILDSEN, M. P. *et al.* Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. **Nature Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 31, n. 2, p. 160–165, Jan. 2013. DOI: 10.1038/nbt.2458.

16 KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 8, n. 6, p. 423–435, May 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2333.

17 LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, Springer Science and Business Media LLC, v. 12, n. 5, p. 371–387, Apr. 2013. DOI: 10.1038/nrd3975.

18 GAYNES, R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), v. 23, n. 5, p. 849–853, May 2017. DOI: 10.3201/eid2305.161556.

19 CABRAL, D.; WURSTER, J.; BELENKY, P. Antibiotic persistence as a metabolic adaptation: stress, metabolism, the host, and new directions. **Pharmaceuticals**, MDPI AG, v. 11, n. 1, p. 14, Feb. 2018. DOI: 10.3390/ph11010014.

20 PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media SA, v. 9, p. 2928, Nov. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02928.

21 SARTELLI, M. *et al.* Antibiotic use in low and middle-income countries and the challenges of antimicrobial resistance in surgery. **Antibiotics**, MDPI AG, v. 9, n. 8, p. 497, Aug. 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9080497.

22 COSTA, A. L. P. D.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Universidade Federal do Amapá, v. 7, n. 2, p. 45, Aug. 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57.

23 KONG, K.-F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, Wiley, v. 118, n. 1, p. 1–36, Jan. 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x.

-
- 24 ZENG, D. *et al.* Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 6, n. 12, p. a026989, Sept. 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a026989.
- 25 TRIMBLE, M. J. *et al.* Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 6, n. 10, p. a025288, Aug. 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a025288.
- 26 KIRKHAM, S. *et al.* Self-assembly of the cyclic lipopeptide daptomycin: spherical micelle formation does not depend on the presence of calcium chloride. **ChemPhysChem**, Wiley, v. 17, n. 14, p. 2118–2122, Apr. 2016. DOI: 10.1002/cphc.201600308.
- 27 NGUYEN, F. *et al.* Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biological Chemistry**, Walter de Gruyter GmbH, v. 395, n. 5, p. 559–575, Feb. 2014. DOI: 10.1515/hsz-2013-0292.
- 28 KRICKER, J. A. *et al.* Nonantimicrobial actions of macrolides: overview and perspectives for future development. **Pharmacological Reviews**, American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET), v. 73, n. 4, p. 1404–1433, Oct. 2021. DOI: 10.1124/pharmrev.121.000300.
- 29 CHENG, G. *et al.* Antibacterial action of quinolones: from target to network. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Elsevier BV, v. 66, p. 555–562, Aug. 2013. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.01.057.
- 30 MOSAEI, H.; ZENKIN, N. Inhibition of RNA polymerase by rifampicin and rifamycin-like molecules. **EcoSal Plus**, American Society for Microbiology, v. 9, n. 1, Mar. 2020. DOI: 10.1128/ecosalplus.esp-0017-2019.
- 31 SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, Elsevier BV, v. 3, n. 3, p. 155–160, June 2000. DOI: 10.1054/drup.2000.0146.
- 32 O’NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. 2016. Disponível em: <https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf>. Acesso em: 06 jun.23.
- 33 TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, Elsevier BV, v. 18, n. 3, p. 318–327, Mar. 2018. DOI: 10.1016/s1473-3099(17)30753-3.
- 34 SOMMER, M. O. A. *et al.* Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? **Nature Reviews Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 15, n. 11, p. 689–696, July 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.75.
- 35 PULINGAM, T. *et al.* Antimicrobial resistance: prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Elsevier BV, v. 170, p. 106103, Mar. 2022. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106103.
- 36 KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, Elsevier BV, v. 31, p. 31–42, Mar. 2017. DOI: 10.1016/j.drup.2017.07.003.

- 37 WAINWRIGHT, M. *et al.* Photoantimicrobials—are we afraid of the light? **The Lancet Infectious Diseases**, Elsevier BV, v. 17, n. 2, p. e49–e55, Feb. 2017. DOI: 10.1016/s1473-3099(16)30268-7.
- 38 ACKROYD, R. *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, American Society for Photobiology, v. 74, n. 5, p. 656–669, May 2007. DOI: 10.1562/0031-8655(2001)0740656thopap2.0.co2.
- 39 CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, Informa UK Limited, v. 44, n. 5, p. 571–589, May 2018. DOI: 10.1080/1040841x.2018.1467876.
- 40 LEE, C.-N. *et al.* Daylight photodynamic therapy: an update. **Molecules**, MDPI AG, v. 25, n. 21, p. 5195, Nov. 2020. DOI: 10.3390/molecules25215195.
- 41 KESSEL, D. Photodynamic therapy: a brief history. **Journal of Clinical Medicine**, MDPI AG, v. 8, n. 10, p. 1581, Oct. 2019. DOI: 10.3390/jcm8101581.
- 42 AMIN, R. M. *et al.* Antimicrobial blue light inactivation of pseudomonas aeruginosa by photo-excitation of endogenous porphyrins: in vitro and in vivo studies. **Lasers in Surgery and Medicine**, Wiley, v. 48, n. 5, p. 562–568, Feb. 2016. DOI: 10.1002/lsm.22474.
- 43 LIU, Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, v. 1, n. 3, p. 140–167, Dec. 2015. DOI: 10.18053/jctres.201503.002.
- 44 VATANSEVER, F. *et al.* Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford University Press (OUP), v. 37, n. 6, p. 955–989, Nov. 2013. DOI: 10.1111/1574-6976.12026.
- 45 BACELLAR, I. *et al.* Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, Aug. 2015. DOI: 10.3390/ijms160920523.
- 46 IMLAY, J. A. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. **Current Opinion in Microbiology**, Elsevier BV, v. 24, p. 124–131, Apr. 2015. DOI: 10.1016/j.mib.2015.01.004.
- 47 REZENDE, L. G. *et al.* Assessing photosensitized membrane damage: available tools and comprehensive mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, Wiley, v. 98, n. 3, p. 572–590, Dec. 2021. DOI: 10.1111/php.13582.
- 48 FENG, T.; WANG, J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. **Gut Microbes**, Informa UK Limited, v. 12, n. 1, p. 1801944, Aug. 2020. DOI: 10.1080/19490976.2020.1801944.
- 49 GLAESER, J. *et al.* Singlet oxygen stress in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, Elsevier, v. 58, p. 141–173, 2011. DOI: 10.1016/b978-0-12-381043-4.00004-0.

- 50 MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochemical and Photobiological Sciences**, Springer Science and Business Media LLC, v. 14, n. 8, p. 1518–1526, Aug. 2015. DOI: 10.1039/c5pp00037h.
- 51 SOARES, J. M. *et al.* Evolution of surviving streptococcus pyogenes from pharyngotonsillitis patients submit to multiple cycles of antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Elsevier BV, v. 210, p. 111985, Sept. 2020. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111985.
- 52 TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, American Society for Microbiology, v. 50, n. 1, p. 196–203, Jan. 2006. DOI: 10.1128/aac.50.1.196-203.2006.
- 53 TYERS, M.; WRIGHT, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 17, n. 3, p. 141–155, Jan. 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0141-x.
- 54 MULANI, M. S. *et al.* Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media SA, v. 10, p. 539, Apr. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00539.
- 55 TANG, J.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T. What is synergy? the saariselkä agreement revisited. **Frontiers in Pharmacology**, Frontiers Media SA, v. 6, p. 181, Sept. 2015. DOI: 10.3389/fphar.2015.00181.
- 56 DOERN, C. D. When does 2 plus 2 equal 5? a review of antimicrobial synergy testing. **Journal of Clinical Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 52, n. 12, p. 4124–4128, Dec. 2014. DOI: 10.1128/jcm.01121-14.
- 57 YEH, P. J. *et al.* Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 7, n. 6, p. 460–466, June 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2133.
- 58 HEGRENESS, M. *et al.* Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 37, p. 13977–13981, Sept. 2008. DOI: 10.1073/pnas.0805965105.
- 59 VAKIL, V.; TRAPPE, W. Drug combinations: mathematical modeling and networking methods. **Pharmaceutics**, MDPI AG, v. 11, n. 5, p. 208, May 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11050208.
- 60 FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmacology Research and Perspectives**, Wiley, v. 3, n. 3, p. e00149, May 2015. DOI: 10.1002/prp2.149.
- 61 BAEDER, D. Y. *et al.* Antimicrobial combinations: Bliss independence and loewe additivity derived from mechanistic multi-hit models. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: biological sciences**, The Royal Society, v. 371, n. 1695, p. 20150294, May 2016. DOI: 10.1098/rstb.2015.0294.

- 62 FENG, Y. *et al.* Photodynamic and antibiotic therapy in combination against bacterial infections: efficacy, determinants, mechanisms, and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Elsevier BV, v. 177, p. 113941, Oct. 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113941.
- 63 WOZNIAK, A.; GRINHOLC, M. Combined antimicrobial activity of photodynamic inactivation and antimicrobials—state of the art. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media SA, v. 9, n. 930, May 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00930.
- 64 DASTGHEYB, S. S. *et al.* Photo-activated porphyrin in combination with antibiotics: therapies against staphylococci. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Elsevier BV, v. 129, p. 27–35, Dec. 2013. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.09.006.
- 65 WOŹNIAK, A. *et al.* Antimicrobial photodynamic inactivation affects the antibiotic susceptibility of enterococcus spp. clinical isolates in biofilm and planktonic cultures. **Biomolecules**, MDPI AG, v. 11, n. 5, p. 693, May 2021. DOI: 10.3390/biom11050693.
- 66 WILLIS, J. A. *et al.* Breaking down antibiotic resistance in methicillin-resistant staphylococcus aureus : combining antimicrobial photodynamic and antibiotic treatments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 119, n. 36, Aug. 2022. DOI: 10.1073/pnas.2208378119.
- 67 AROSO, R. T. *et al.* Synergic dual phototherapy: cationic imidazolyl photosensitizers and ciprofloxacin for eradication of in vitro and in vivo e. coli infections. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Elsevier BV, v. 233, p. 112499, Aug. 2022. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112499.
- 68 RONQUI, M. R. *et al.* Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Elsevier BV, v. 158, p. 122–129, May 2016. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.036.
- 69 PÉREZ-LAGUNA, V. *et al.* Photodynamic therapy using methylene blue, combined or not with gentamicin, against staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Elsevier BV, v. 31, p. 101810, Sept. 2020. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101810.
- 70 FENG, Y.; TONON, C. C.; HASAN, T. Dramatic destruction of methicillin-resistant staphylococcus aureus infections with a simple combination of amoxicillin and light-activated methylene blue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Elsevier BV, v. 235, p. 112563, Oct. 2022. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112563.
- 71 ILUZ, N. *et al.* The synergistic effect of PDT and oxacillin on clinical isolates of staphylococcus aureus. **Lasers in Surgery and Medicine**, Wiley, v. 50, n. 5, p. 535–551, Jan. 2018. DOI: 10.1002/lsm.22785.
- 72 NCCLS. **Testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: 6th ed. Pennsylvania: Wayne, 2003.
- 73 COURTNEY, C. M. *et al.* Potentiating antibiotics in drug-resistant clinical isolates via stimuli-activated superoxide generation. **Science Advances**, American Association for the Advancement of Science (AAAS), v. 3, n. 10, Oct. 2017. DOI: 10.1126/sciadv.1701776.

- 74 BRCAST. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. 2023. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/Tabela-pontos-de-corte-BrCAST-15-03-2023.pdf>. Acesso em: 04 jul. 23.
- 75 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Reference strains: how many passages are too many?** 2022. Disponível em: <https://delivery-files.atcc.org/api/public/content/256197-Reference-Strains-How-many-passages-are-too-many>. Acesso em: 17 aug. 23.
- 76 MORENO, M. G.; TRAMPUZ, A.; LUCA, M. D. Synergistic antibiotic activity against planktonic and biofilm-embedded streptococcus agalactiae, streptococcus pyogenes and streptococcus oralis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press (OUP), v. 72, n. 11, p. 3085–3092, Aug. 2017. DOI: 10.1093/jac/dkx265.
- 77 GOULD, I. In-vitro pharmacodynamic studies of piperacillin/tazobactam with gentamicin and ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press (OUP), v. 39, n. 1, p. 53–61, Jan. 1997. DOI: 10.1093/jac/39.1.53.
- 78 ARSLAN, U. *et al.* Distribution of emm genotypes and antibiotic susceptibility of streptococcus pyogenes strains: analogy with the vaccine in development. **Mikrobiyoloji Bulteni**, Bilimsel Tip Publishing House, v. 47, n. 2, p. 318–323, Apr. 2013. DOI: 10.5578/mb.4480.
- 79 LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, American Society for Microbiology, v. 31, n. 4, p. e00020-18, Oct. 2018. DOI: 10.1128/cmr.00020-18.
- 80 NELSON, K. M. *et al.* The essential medicinal chemistry of curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 60, n. 5, p. 1620–1637, Jan. 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975.
- 81 N.822, . G. N. **Curcumin from turmeric (Curcuma longa) gras notice**. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/132575/download>. Acesso em: 04 jul. 23.
- 82 DIAS, L. D. *et al.* Curcumin as a photosensitizer: from molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: photochemistry reviews**, Elsevier BV, v. 45, p. 100384, Dec. 2020. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2020.100384.
- 83 BAYM, M.; STONE, L. K.; KISHONY, R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science**, American Association for the Advancement of Science (AAAS), v. 351, n. 6268, p. aad3292, Jan. 2016. DOI: 10.1126/science.aad3292.
- 84 TYAGI, P. *et al.* Bactericidal activity of curcumin is associated with damaging of bacterial membrane. **PLOS ONE**, Public Library of Science (PLoS), v. 10, n. 3, p. e0121313, Mar. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0121313.
- 85 MELO, N. J. de *et al.* Natural versus synthetic curcuminoids as photosensitizers: photobleaching and antimicrobial photodynamic therapy evaluation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Elsevier BV, v. 42, p. 103495, June 2023. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2023.103495.

- 86 JARVI, M. T.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 102, n. 3, p. 661–671, Feb. 2012. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.043.
- 87 SIRIWONG, S. *et al.* The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant staphylococcus epidermidis. **BMC Pharmacology and Toxicology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 17, n. 1, p. 39, Aug. 2016. DOI: 10.1186/s40360-016-0083-8.
- 88 LASCH, P.; NAUMANN, D. **Infrared spectroscopy in microbiology**. New York: John Wiley & Sons, 2015. p. 1–32. DOI: 10.1002/9780470027318.a0117.pub2.
- 89 PONTES, M. H.; GROISMAN, E. A. Slow growth determines nonheritable antibiotic resistance salmonella enterica. **Science Signaling**, American Association for the Advancement of Science (AAAS), v. 12, n. 592, p. eaax3938, July 2019. DOI: 10.1126/scisignal.aax3938.
- 90 ZOU, L. *et al.* Synergistic antibacterial activity of silver with antibiotics correlating with the upregulation of the ROS production. **Scientific Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 8, n. 1, p. 11131, July 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-29313-w.
- 91 TAKAHASHI, N. *et al.* Lethality of MalE-LacZ hybrid protein shares mechanistic attributes with oxidative component of antibiotic lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 114, n. 34, p. 9164–9169, Aug. 2017. DOI: 10.1073/pnas.1707466114.
- 92 INGOLFSSON, H. I.; KOEPPE, R. E.; ANDERSEN, O. S. Curcumin is a modulator of bilayer material properties. **Biochemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 46, n. 36, p. 10384–10391, Aug. 2007. DOI: 10.1021/bi701013n.
- 93 SONG, M. *et al.* A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant gram-negative pathogens. **Nature Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 5, n. 8, p. 1040–1050, May 2020. DOI: 10.1038/s41564-020-0723-z.
- 94 WAINWRIGHT, M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Elsevier BV, v. 21, n. 6, p. 510–520, June 2003. DOI: 10.1016/s0924-8579(03)00035-9.
- 95 BARRA, F. *et al.* Photodynamic and antibiotic therapy in combination to fight biofilms and resistant surface bacterial infections. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, v. 16, n. 9, p. 20417–20430, Aug. 2015. DOI: 10.3390/ijms160920417.
- 96 WANG, J.; ZHUAN, R. Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: an overview. **Science of The Total Environment**, Elsevier BV, v. 701, p. 135023, Jan. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135023.
- 97 GE, L. *et al.* The importance of reactive oxygen species on the aqueous phototransformation of sulfonamide antibiotics: kinetics, pathways, and comparisons with direct photolysis. **Water Research**, Elsevier BV, v. 149, p. 243–250, Feb. 2019. DOI: 10.1016/j.watres.2018.11.009.

-
- 98 JEONG, J. *et al.* Degradation of tetracycline antibiotics: mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction processes. **Chemosphere**, Elsevier BV, v. 78, n. 5, p. 533–540, Jan. 2010. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.11.024.
- 99 SOARES, J. M. *et al.* Physicochemical mechanisms of bacterial response in the photodynamic potentiation of antibiotic effects. **Scientific Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 12, n. 1, p. 21146, Dec. 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-25546-y.
- 100 FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 15, n. 8, p. 453–464, May 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.42.
- 101 KRAUSE, K. M. *et al.* Aminoglycosides: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 6, n. 6, p. a027029, June 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a027029.
- 102 DOMALAON, R. *et al.* Synergistic combinations of anthelmintic salicylanilides oxyclozanide, rafoxanide, and closantel with colistin eradicates multidrug-resistant colistin-resistant gram-negative bacilli. **The Journal of Antibiotics**, Springer Science and Business Media LLC, v. 72, n. 8, p. 605–616, Apr. 2019. DOI: 10.1038/s41429-019-0186-8.
- 103 NGUYEN, C. *et al.* Pairwise antibiotic interactions in escherichia coli: triclosan, rifampicin and aztreonam with nine other classes of antibiotics. **The Journal of Antibiotics**, Springer Science and Business Media LLC, v. 69, n. 11, p. 791–797, Mar. 2016. DOI: 10.1038/ja.2016.26.
- 104 XU, X. *et al.* Synergistic combination of two antimicrobial agents closing each other's mutant selection windows to prevent antimicrobial resistance. **Scientific Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 8, n. 1, p.7237, May 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-25714-z.
- 105 LIU, X. *et al.* Sublethal levels of antibiotics promote bacterial persistence in epithelial cells. **Advanced Science**, Wiley, v. 7, n. 18, p. 1900840, July 2020. DOI: 10.1002/advs.201900840.
- 106 BALABAN, N. Q. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 17, n. 7, p. 441–448, Apr. 2019. DOI: 10.1038/s41579-019-0196-3.
- 107 MAH, T.-F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, Future Medicine Ltd, v. 7, n. 9, p. 1061–1072, Sept. 2012. DOI: 10.2217/fmb.12.76.
- 108 BRAUNER, A. *et al.* An experimental framework for quantifying bacterial tolerance. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 112, n. 12, p. 2664–2671, June 2017. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.05.014.
- 109 DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), v. 8, n. 9, p. 881–890, Sept. 2002. DOI: 10.3201/eid0809.020063.

- 110 RUDRAPPA, T.; BAIS, H. P. Curcumin, a known phenolic from curcuma longa, attenuates the virulence of pseudomonas aeruginosa PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 56, n. 6, p. 1955–1962, Feb. 2008. DOI: 10.1021/jf072591j.
- 111 ARAÚJO, T. S. D. *et al.* Reduced methicillin-resistant staphylococcus aureus biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Elsevier BV, v. 21, p. 219–223, Mar. 2018. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.011.
- 112 ALALWAN, H. *et al.* The anti-adhesive effect of curcumin on candida albicans biofilms on denture materials. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media SA, v. 8, p. 659, Apr. 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00659.
- 113 PENESYAN, A. *et al.* Rapid microevolution of biofilm cells in response to antibiotics. **npj Biofilms and Microbiomes**, Springer Science and Business Media LLC, v. 5, n. 1, Nov. 2019. DOI: 10.1038/s41522-019-0108-3.
- 114 KEREN, I. *et al.* Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford University Press (OUP), v. 230, n. 1, p. 13–18, Jan. 2004. DOI: 10.1016/s0378-1097(03)00856-5.