UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES
BIOENGENHARIA

ANA PAULA MAZINE CALABRESE

Estudos da inativação de *Propionibacterium acnes*
por fotodinamização de hipericina

São Carlos

2012

ANA PAULA MAZINE CALABRESE

Estudos da inativação de *Propionibacterium acnes*
por fotodinamização de hipericina

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Hidetake Imasato

São Carlos,

2012

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.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Atendimento ao Usuário do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Calabrese, Ana Paula Mazine

C141e Estudos da inativação de *Propionibacterium acnes* por fotodinamização de hipericina. / Ana Paula Mazine Calabrese ; orientador Hidetake Imasato. São Carlos, 2012.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

ANA PAULA MAZINE CALABRESE
MESTRADO EM CIÊNCIAS
ÁREA DE BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BICENGENHARIA
EESC - FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 6 / 9 / 2012

PROF. DR. HIDETAKE IMASATO
(ORIENTADOR)

Instituto de Química de São Carlos - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: Hidetake Imasato

PROF. DRA. JANICE RODRIGUES PERUSSI

Instituto de Química de São Carlos - USP

Resultado: aprovada

Assinatura: Janice

PROF. DRA. VITÓRIA HELENA MACIEL
COELHO

Centro Universitário Central Paulista - UNICEP

Resultado: Aprovada

Assinatura: Vitória Coelho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família querida.

Obrigada por acreditarem no meu potencial,
por todo apoio, amor incondicional e pelo
estímulo que me impulsionam a buscar uma
vida melhor a cada dia.

Amo todos vocês.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Hidetake Imasato pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo apoio a pesquisa, paciência e incentivo.

Agradeço imensamente ao grupo de fotossensibilizadores do IQSC-USP. A Profa. Dra Janice Rodrigues Perussi, pelo apoio e incentivo a pesquisa. Aos colegas de pesquisa Cintia, Joice, Adriel, Lucas, Roberta, Kelly e um agradecimento especial a Wanessa Melo, Dra. Claudia Bernal e Dra. Tania Tominaga, sem as quais este trabalho não teria sido realizado se não fosse sua constante ajuda.

Ao departamento de convênios IQSC que colaborou com a aquisição dos materiais para a realização do projeto, João Carlos Romano muito obrigada.

Ao programa de Interunidades em Bioengenharia pela ajuda na compra de matérias, e a secretaria Janete por toda paciência e ajudada prestada e aos professores e funcionários do departamento.

A todos os amigos sempre presentes, pelo simples ouvir e pelo ombro acolhedor de sempre. A todos os clientes-amigos que me incentivam a continuar e de certa forma contribuem para a minha formação profissional associada à pesquisa.

Agradeço ao meu noivo Melkzedekue por todo amor, paciência e incentivo nas horas mais difícil. Agradeço também a sua família que em breve será minha também. Francisco e Raquel, obrigada pelo incentivo.

Agradeço a minha família, Orivaldo, Virginia, Rosa, Elaine, Thiago, Vitor Hugo, Ana Carolina, Manzini e Henrique, muito obrigada por torcerem por mim, e pelo orgulho que sentem. Sou muito feliz por vocês existirem.

Enfim, agradeço a todos que torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada.

Resumo

Calabrese, A. P. M. **Estudos da inativação de *Propionibacterium acnes* por fotodinamização de hipericina**. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Um dos maiores desafios na área médica dermatológica tem sido o tratamento da acne. Esta dermatose afeta 80 a 90% dos adolescentes. A busca por tratamentos alternativos tornou-se importante devido à resistência bacteriana de *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) aos antibióticos comumente utilizados contra este agente etiológico e pelos efeitos colaterais produzidos por estas drogas. Visando minimizar estes efeitos colaterais e proporcionar a eliminação de *P. acnes*, uma nova modalidade de tratamento vem sendo pesquisada, a terapia fotodinâmica (TFD). TFD já está bem estabelecida no combate a muitos tipos de câncer e tem se mostrado promissora na área estética. Os protocolos de TFD para tratar a acne tem como base a síntese endógena de hematoporfirina e compostos relacionados induzida por ácido 5-aminolevulínico (ALA), um tratamento com tempo de incubação grande, dolorido e usando a luz azul. O objetivo deste estudo foi de um modo geral avaliar a eficácia da inativação fotodinâmica sobre o microorganismo *P. acnes* utilizando como FS a hipericina e irradiado com um LED amarelo (590 nm). A inativação do microorganismo foi conseguida mesmo com uma concentração baixa de hipericina (menos de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e foi caracterizada pelo curto tempo de bioacumulação estacionária (cerca de 2 min30s). A eficiência fotodinâmica de hipericina foi comprovada nos experimentos, e também pode-se observar que o uso do LED amarelo a partir de doses pequenas ($4,55 \pm 0,08 \text{ J cm}^{-2}$) sendo capaz de reduzir 63% das células viáveis utilizando $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hipericina.

Palavras- chave: acne, fotoinativação, hipericina.

Abstract

Calabrese, A. P. M. **Studies of the inactivation of *Propionibacterium acnes* by fotodinamização hypericin**. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012

One of the prominent challenges in medical dermatology has been the treatment of acne. The acne affects 80 to 90% of teenagers. The search for alternative treatment has become important due to bacterial resistance of *P. acnes* to usually applied antibiotics against this etiologic agent and the side effects produced by these drugs. In order to overcome these limitations to inactivated the *P. acnes*, the photodynamic based protocols has been studied. Already, well established named photodynamic therapy has been used against many cancers and the use of light has shown promise in the esthetic area, the photodynamic protocols has been used to treat acne based on endogenous synthesis of hematoporphyrin and related compounds induced by δ -aminolevulinic acid, a long term treatment and using the blue light. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of photodynamic inactivation of the *P. acnes* using hypericin, irradiated by a yellow LED (590 nm). The microorganism inactivation was achieved even at low concentration of hypericin (less than $1 \mu\text{g mL}^{-1}$), and was characterized by the short time bioaccumulation stationary state (around 2.5 minutes). In order to guarantee the reproducibility typically the incubation time was 10 minutes. The photodynamic efficiency was evaluated to be $4.55 \pm 0.08 \text{ J cm}^{-2}$ able to reduce 63% of the viable cells using $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of hypericin. These results allow concluding that the hypericin is an effective FS to inactivate *P. acnes*.

Keys Words: acne, fotoinactivation, hypericin.

Lista de Figuras

Figura 1 – Diagrama de Jablonski: ilustração gráfica dos mecanismos fotoquímicos em TFD.....	21
Figura 2 – Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração da luz de diferentes comprimentos de onda.....	23
Figura 3 – Fórmula estrutural da hipericina.....	25
Figura 4: Fonte de luz utilizada - Biotable: LED amarelo com emissão em 590 ± 11 nm.....	33
Figura 5 – Contagem manual das UFC de <i>P. acnes</i> cultivada em meio sólido de Agar em placas de petri. A) diluição de 10^{-6} grupo controle. B) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ hipericina, incubação 2 min30s, dose 12 J cm^{-2} , LED amarelo, sem diluição.....	37
Figura 6: Curva de crescimento de <i>P. acnes</i>	38
Figura 7: Curva de crescimento de <i>P. acnes</i> e representação da primeira derivada no tempo da curva de crescimento.....	39
Figura 8: A) Espectros de absorção óptica da hipericina diluída em meio de cultura em diferentes concentrações B) Absorção da hipericina em meio de cultura na banda em 590 nm em função da sua concentração.....	40
Figura 9: Efeito do tempo de incubação e diferentes concentrações hipericina na <i>P. acnes</i>	41
Figura 10: Espectro de absorção óptica da hipericina $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO.....	42
Figura 11: Efeito da irradiação sobre <i>P. acnes</i> com LED amarelo em função da dose de luz.....	43
Figura 12: Efeito do tempo de incubação (2 min30s, 5 e 10 minutos) e da concentração de HY (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) na <i>P. acnes</i> , com irradiação de luz 590 nm, com $D= 1 \text{ J cm}^{-2}$	45
Figura 13: <i>P. acnes</i> irradiada com LED amarelo, Dose 3 J cm^{-2} , com hipericina nas concentrações 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, nos tempos de incubação 2 min30s, 5 e 10 minutos.....	46

Figura 14: Efeito do tempo de incubação (2 min30s, 5 e 10 minutos) e de diferentes concentrações de HY (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7, 10, 12,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em <i>P. acnes</i> após irradiação com LED amarelo com $D= 6 \text{ J cm}^{-2}$	47
Figura 15: <i>P. acnes</i> irradiada com LED amarelo, Dose 12 J cm^{-2} , com hipericina nas concentrações 3, 5, 7 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nos tempos de incubação 2 min30s, 5 e 10 minutos.....	48
Figura 16: Variação da redução do log de UFC em função da dose de luz (J cm^{-2}).....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1: Discriminação da atividade fotodinâmica extra e intra celular (experimento 1) e da atividade intracelular (experimento 2), com irradiação na dose 6 J cm^{-2} 51

Tabela 2: Discriminação da atividade fotodinâmica extra e intracelular (experimento 1) e da atividade intracelular (experimento 2), com irradiação na dose 12 J cm^{-2} 52

Lista de Abreviaturas

TFD – Terapia fotodinâmica

FS – Fotossensibilizador

FSs – Fotossensibilizadores

LED – Light Emitting Diode (diodo emissores de luz)

ALA – Ácido 5-aminolevulínico

MAL – Metil ALA

TFDA – Terapia fotodinâmica antimicrobiana

UFC – Unidade formadora de colônias

HY – Hipericina

PBS – Tampão fosfato salino

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

Sumário

1. Introdução	13
1.1 Anatomia e fisiologia da pele	13
1.2 Acne vulgaris	14
1.3 <i>Propionibacterium acnes</i>	15
1.4 Tratamentos convencionais para acne	16
1.5 Terapia fotodinâmica	19
1.5.1 Breve histórico	19
1.5.2 Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica	20
1.5.3 Processos fotoquímicos envolvidos na terapia fotodinâmica	21
1.5.4 Janela terapêutica	22
1.6 Fotossensibilizadores	23
1.6.1 Hipericina	24
1.7 Fontes de luz utilizadas na terapia fotodinâmica	25
1.8 Terapia fotodinâmica para acne	26
1.9 Fotoinativação de microrganismos	28
2. Objetivos	30
3. Materiais e métodos	31
3.1 Microrganismo	31
3.2 Fotossensibilizador	31
3.3 Fontes de luz	32
3.4 Procedimentos	33
3.4.1 Curva de Crescimento de <i>P. acnes</i>	33
3.4.2 Preparação da suspensão de microrganismos	34
3.4.3 Condições experimentais avaliadas	34
3.4.4 Contagem das unidades formadoras de colônias	36
3.5 Análise dos resultados	37
4. Resultados e discussões	38
4.1 Curva de crescimento de <i>P. acnes</i>	38
4.2 Solubilidade da hipericina	39

4.3	Efeito do tempo de incubação da hipericina em <i>P. acnes</i>	40
4.4	Efeito da irradiação sobre <i>P. acnes</i>	42
4.5	Fotoinativação dos microrganismos.....	44
4.5.1	Avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica em <i>P. acnes</i> utilizando LED amarelo dose 1 J cm ⁻²	44
4.5.2	Avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica em <i>P. acnes</i> , após irradiação, dose 3 J cm ⁻²	45
4.5.3	Avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica em <i>P. acnes</i> utilizando LED amarelo dose 6 J cm ⁻²	46
4.5.4	Avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica em <i>P. acnes</i> utilizando LED amarelo dose 12 J cm ⁻²	48
4.6	Discriminação da atividade fotodinâmica da hipericina intracelular e extracelular.....	50
5.	Conclusões	53
6.	Referências bibliográficas	54

1. Introdução

1.1 Anatomia e fisiologia da pele

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano em termos de área, essa corresponde em um adulto médio à cerca de 1,8 m² e uma espessura que varia entre 0,05 à 3,0 mm (Grice e Segre, 2011). Ela consiste de duas porções distintas, a epiderme e a derme firmemente unidas entre si.

A epiderme é a camada mais externa, organiza-se em cinco camadas (germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea), e serve como barreira contra a invasão de microrganismos e água, além de proteger os tecidos subjacentes dos efeitos nocivos da luz ultravioleta (Tortora, 2005).

Logo abaixo da epiderme, encontra-se a derme que é uma espessa camada de tecido conjuntivo. Na derme situam-se os vasos sanguíneos, terminações nervosas e os anexos da pele (glândula sudorípara, glândula sebácea, folículo piloso e pelos) (Pelczar, 1997).

Nestas estruturas existem muitos microrganismos que fazem parte da microbiota normal da pele que são bacilos pleomórficos gram-positivos denominados difteróides. Alguns difteróides, como *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) são tipicamente anaeróbicos e habitam os folículos pilosos. Seu crescimento ocorre nas glândulas sebáceas e é um fator de desenvolvimento da acne (Pelczar, 1997).

1.2 Acne vulgaris

Acne vulgar é uma dermatose crônica que, apesar de não apresentar risco de vida, causa temor entre os adolescentes. O termo acne se originou da palavra grega *acne*, cunhada por Aëtius Amidenus para descrever a erupção da pele. A forma mais comum de acne é denominada de “acne vulgar”, que significa “acne comum”. Esta afecção corresponde a aproximadamente 30% das queixas dermatológicas nos consultórios (Falcocchio, Ruiz *et al.*, 2006).

Acne atinge cerca de 80 a 90% dos adolescentes e 5 a 30% dos adultos (Sakamoto, Lopes *et al.*, 2010). Não se sabe ao certo o que leva o seu aparecimento, porém uma sucessão de fatores está envolvida na fisiopatologia da acne. Os fatores que favorecem o seu aparecimento são: hiperprodução sebácea, hiperqueratinização folicular, inflamação dérmica periglandular e aumento da colonização bacteriana por *P. acnes* (Costa, Alchorne *et al.*, 2008).

Esta dermatose ocorre em todas as raças, embora seja menos intensa em orientais e negros, afeta tanto o sexo masculino como o feminino, porém manifesta-se de forma mais grave no sexo masculino, o que se explica pela influência androgênica mais exacerbada nesse gênero (Dreno, 2005).

A localização preferencial da acne é a face, presente em 90% dos casos, mas pode ocorrer também na região dorsal, lombar e torácica anterior (Goodman, 2000).

A acne pode ser dividida em inflamatória ou não-inflamatória. A não-inflamatória ou comedoniana (acne grau I) é caracterizada por comedões que são obstruções do folículo pilossebáceo caracterizadas por apresentar uma hiperqueratinização folicular. Os comedões podem ser microcomedões (fase inicial, visto apenas com microscópio), comedões fechados (esbranquiçado, com forma esférica) e comedões abertos (coloração enegrecida na extremidade da lesão devido à presença de melanina). A acne inflamatória (acne grau II, III, IV e V) é caracterizada pela presença de lesões pápulo-pustulosas nos casos mais brandos, pode apresentar até nódulos císticos ou formação de abscessos e fístulas, nesse caso pode deixar sérias cicatrizes (Rinaldo Guirro, 2002).

A resposta inflamatória presente em qualquer grau citado acima desencadeia lesões visíveis que podem levar à formação de cicatrizes deformantes que tem um impacto psicossocial significativo sobre os pacientes afetados (Goodman, 2000).

Entretanto, vale destacar que além de *P. acnes* fazer parte da etiologia da acne vulgar, também pode estar associada a várias outras doenças mais preocupantes, como endocardites, endofitalmite, osteomielite, infecção de neurocirurgia cranial (Nakatsuji, Shi *et al.*, 2008), infecção na coluna espinhal (Haidar, Najjar *et al.*, 2010) e também pode estar associada à contaminação em concentrados de plaquetas de sangue utilizados na transfusão (Stormer, Kleesiek *et al.*, 2008).

Apesar de não ser um problema que apresente risco de vida à pessoa, é necessário atenção. O tratamento deve ser levado a sério e não apenas como tratamento estético. Estudos que avaliaram os efeitos psicossociais de pacientes com acne verificaram problemas nas áreas da auto-estima, imagem corporal, sociabilidade, dinâmica familiar, limitações no estilo de vida, depressão e até suicídio (Halvorsen, Stern *et al.*, 2011 *apud* Misery, 2011). Por isso, estudos relacionados à acne são de extrema importância, principalmente no que diz respeito a novas modalidades de tratamento.

1.3 *Propionibacterium acnes*

Dentre as bactérias residentes na pele que atuam na formação da acne, podem-se destacar: *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium granulosum*, *Staphylococcus epidermidis* e *Malassezia furfur* (Martin Dworkin 2006).

Seguramente a principal causadora da acne é a infecção bacteriana pela bactéria *P. acnes*. O nome “*Propionibacterium*” foi sugerido pelo pesquisador Orla Jensen em 1909, pois esses organismos foram caracterizados pela grande produção de ácido propiônico durante seu crescimento (Martin Dworkin 2006).

P. acnes, é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa e representa cerca de 50% das bactérias totais da face. É um patógeno oportunista, quando

existe um aumento da produção de sebo na unidade pilossebácea há uma proliferação maior da bactéria (Dessinioti e Katsambas, 2010). A bactéria coloniza o folículo sebáceo, causando um processo inflamatório, assim o folículo se rompe e *P. acnes* escapa do folículo danificado e em seguida entra na epiderme, caracterizando a acne vulgar (Liu, Nakatsuji *et al.*, 2011).

Não se sabe ao certo o que leva à colonização da bactéria nas glândulas sebáceas por *P. acnes*. Em uma revisão sistemática feita por Magin, 2005 foi verificado que a dieta alimentar, com aumento da ingestão de alimentos gordurosos como chocolate e outros lipídeos não estão relacionados ao aparecimento da bactéria. A questão da higiene da face também foi pesquisada e não se encontrou relatos que a má higiene contribuísse para o aparecimento da acne. Entretanto o fator genético, hormonal e psicológico (estresse) de cada indivíduo pode influenciar no aparecimento da doença (Magin, Pond *et al.*, 2005).

1.4 Tratamentos convencionais para acne

Os tratamentos para acne consistem de terapia medicamentosa com vitamina A (retinóicos), antibióticos, antiinflamatórios, terapia hormonal, administração tópica e oral de isotretinoína, além da aplicação de “peelings” químicos e físicos (Wang, Wang *et al.*, 2010).

Por se desenvolver sobre os lipídeos presentes na glândula de secreção, sua localização é relativamente profunda. Desta forma a lavagem e/ou o emprego de soluções anti-sépticas é praticamente ineficiente para o controle da proliferação dessas propionibactérias (Pelczar, 1997).

Tunca, 2010 tratou 86 pacientes divididos em três grupos (controle, nadifloxacina e eritromicina) com o uso tópico de nadifloxacina 1% creme e eritromicina 4% gel, mostrando que os dois medicamentos são igualmente efetivos para o tratamento de acne moderada (Tunca, Akar *et al.*, 2010).

Entretanto Dessinioti *et al.*, 2010 constataram que a administração de antibióticos como clindamicina e eritromicina apresentam resultados positivos na melhora da acne, porém depois de analisar cepas com *P. acnes*, observaram que a

bactéria adquire resistência ao antibiótico depois de determinado tempo de uso, reduzindo a eficácia do tratamento (Dessinioti e Katsambas, 2010).

Portanto, o uso inapropriado de antibióticos pode causar resistência bacteriana, além disso, os antibióticos têm eficácia limitada e o uso combinado de antibióticos oral e tópico pode provocar irritação da pele (Nestor, 2007). Os tratamentos realizados com antibióticos sistêmicos não-específicos matam a maioria das bactérias da pele, o que resulta em um impacto na homeostase da microflora residente no organismo (Nakatsuji, Shi *et al.*, 2008).

Outra evidência encontrada por Smith, 2011 foi que o uso de retinóicos tópicos por dois a três meses pode causar irritação, eritema, queimação e secura da pele (Smith, Grindlay *et al.*, 2011).

A isotretinoína oral é um derivado de vitamina A que impede a formação do sebo, é um tratamento efetivo para acne e é bastante utilizado em um tipo muito grave de acne, chamada acne cística (Pelczar, 1997). Porém por inibir a formação do sebo, causa vários efeitos colaterais, pois não são seletivos apenas para as glândulas sebáceas na face e com isso afeta todas as glândulas sebáceas do corpo, e conseqüentemente causa ressecamento nos olhos, boca e graves incômodos estomacais. Esse tratamento tem muitas restrições, podendo causar até má formação congênita no caso de gravidez durante o uso.

Quanto ao uso de antibióticos para o tratamento da acne há relatos que a incidência de resistência bacteriana na abordagem de *P. acnes* aumentou de 20% em 1978, para 62% em 1996 (Gollnick, Cunliffe *et al.*, 2003).

Numa extensiva pesquisa feita por Simpson em 2001 foi constatado que mais de 40% de *P. acnes* é resistente aos antibióticos anti-acne comumente utilizados nos tratamentos, tanto na forma oral quanto na tópica.

No estudo realizado por Halvorsen, 2011 foi aplicado um questionário para pacientes com acne que eram alunos de uma escola em Oslo no ano de 2004, 90% dos participantes tinham depressão e sofriam de “bullying” entre os amigos. O sintoma de depressão aumentava quando o tratamento era feito em associação à isotretinoína oral (Halvorsen, Stern *et al.*, 2011).

McGrath, 2010 no seu estudo aplicou um questionário de qualidade de vida em pacientes que estavam em tratamento de acne com isotretinoína. O resultado do estudo constatou melhora da qualidade de vida dos pacientes após o tratamento,

entretanto ocorre mudança de humor dos mesmos durante o uso do medicamento (Mcgrath, Lovell *et al.*, 2010).

Outro tipo de tratamento são os “peelings” químicos (aplicação de ácidos) e os “peelings” mecânicos (microdermoabrasão). Nos “peelings” químicos são aplicados ácidos glicólicos, salicílicos e retinóicos. Já “peeling” mecânico é feito através de uma esfoliação manual da pele ou com aparelhos específicos com jato de cristal. Dependendo do grau em que a acne se apresente, os dois tipos de “peelings” demonstram um bom resultado na melhora da acne (Kempiak e Uebelhoer, 2008).

Entretanto, a individualidade de cada caso é um fator limitante para este tipo de tratamento, pois tanto o “peeling” químico quanto o mecânico não são capazes de eliminar as bactérias causadoras da acne, pois sua ação é mais superficial, no nível da epiderme, sendo assim não atinge a derme, sendo são mais utilizados nos casos de acne grau I e II.

Ademais, não podem ser aplicados em todos os tipos de pele, por exemplo, em peles morenas e negras, pois podem deixar manchas e severas cicatrizes, o que inviabiliza o uso destes recursos em muitos casos. Mais recentemente os “peelings” têm sido mais utilizados para tratar cicatrizes deixadas pela acne (Kempiak e Uebelhoer, 2008).

Como dito anteriormente, 5 a 30% dos adultos apresentam queixa de acne, geralmente nesta idade os indivíduos mais acometidos são as mulheres grávidas, isso se dá devido a grandes alterações hormonais geradas pela gestação e frente aos inconvenientes provenientes dos tratamentos convencionais, estas pacientes não podem se beneficiar de nenhum tratamento citado acima (Sakamoto, Lopes *et al.*, 2010).

Diante do exposto, para que a acne não deixe sequelas que podem durar a vida toda como cicatrizes e distúrbios psicológicos, surge à necessidade de novos tratamentos efetivos para a eliminação de *P. acnes*.

Com o intuito de diminuir os efeitos colaterais e melhorar a eficiência das terapias no combate à acne, podemos destacar como uma modalidade promissora para esta afecção a terapia fotodinâmica (TFD). A TFD já está bem estabelecida no tratamento de câncer e outras doenças (degeneração macular da retina, psoríase, micoses fungóides, infecções bacterianas, etc.) por ser mais efetiva e diminuir os efeitos colaterais causados pelas técnicas comuns para tratamento das mesmas.

1.5 Terapia fotodinâmica

1.5.1 Breve histórico

A fototerapia utiliza a luz visível ou visível próximo (infravermelho) como agente terapêutico. Esta técnica foi aplicada pela primeira vez há mais de 4000 anos no Egito, Índia e China para o tratamento de psoríases, vitiligo e raquitismo, por meio da combinação da administração oral de uma planta (*Amni majus*) e a exposição à luz solar (Choudhary, Nouri *et al.*, 2009).

O primeiro relato científico de uma reação fotodinâmica biológica surgiu no século XX, quando Oscar Raab, trabalhando no laboratório de Herman Von Tappeiner, na Alemanha, descobriu que a iluminação de culturas microbianas na presença do alaranjado de acridina resultava na morte celular (Raab, 1900). Esses achados provaram a existência de uma conexão entre a ativação de corantes pela luz com resultado terapêutico.

O trabalho de Jesionek em 1903 também foi destaque, sendo a primeira aplicação clínica da TFD com o uso tópico de eosina e luz no tratamento de carcinoma basocelular antes do período de irradiação (Von Tappeiner, 1903).

O uso da TFD na oncologia data dos anos 70, com os experimentos do Dr. Thomas J. Dougherty (Zeitouni, Oseroff *et al.*, 2003). Na área médica este método de tratamento tem se destacado, pois os vários tratamentos para o câncer (aplicação de quimioterapia, radioterapia e cirurgias para retirada do tumor) causam grande desconforto, muitos efeitos colaterais, além de causar queda de cabelos e no caso das cirurgias deixam serias cicatrizes e até mutilações.

Na década de 80 teve início as aplicações na área médica dermatológica e desde então a TFD vem se consolidando no tratamento de algumas doenças de pele, como câncer de pele não melanoma, lesões pré-malignas e queratoses actínicas.

Mais recentemente na década de 90 até os nossos dias foi introduzida a TFD para uso estético e tem sido empregada na prevenção do envelhecimento e até mesmo para acne.

1.5.2 Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica.

A TFD utiliza três componentes fundamentais: fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular existente nas células. O tratamento consiste na administração tópica ou sistêmica do FS ao paciente, posteriormente este FS se acumula preferencialmente nos tecidos tumorais e após a irradiação com luz de comprimento de onda adequado ocorrem vários processos físicos, químicos e biológicos onde ocorre a inviabilização das células (Simplicio, Maionchi *et al.*, 2002).

No caso do tratamento de câncer a droga é injetada na corrente sanguínea e percorre todo o corpo, sendo absorvida por todas as células, no entanto, as células saudáveis eliminam essa droga em um período de tempo que varia de 24 a 36 h, enquanto as células cancerosas, que apresentam um metabolismo diferente, retêm esta droga por um tempo mais prolongado, em torno de 72 h. Esperando-se 24 h após a administração da droga, a substância fotossensível estará mais concentrada nas células cancerosas, estabelecendo uma diferenciação entre estas células e as demais. Essa substância fotossensível, quando iluminada por uma luz de comprimento de onda específico, é então excitada e, uma vez neste estado energético, provoca uma reação fotoquímica com o oxigênio molecular, produzindo espécies reativas de oxigênio: $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}\text{OH}$, H_2O_2 , que são altamente reativas com os constituintes celulares e, portanto, bastante citotóxicas. Como consequência disso, a célula cancerosa e o tecido tumoral como um todo é levado à morte por apoptose ou necrose, eliminando a lesão cancerosa e, posteriormente, permitindo a completa restauração do tecido (Dougherty, Gomer *et al.*, 1998).

Este mesmo processo ocorre no tratamento de outras patologias, o que difere é o tipo do FS utilizado, o modo de aplicação do FS (que pode ser tópica no caso de câncer de pele e micose fungóide por exemplo), dose e comprimento de onda da luz utilizada.

1.5.3 Processos fotoquímicos envolvidos na terapia fotodinâmica

Durante a TFD, o FS presente na célula é ativado com a presença da luz. Essa ativação leva o FS do estado fundamental ao estado excitado chamado triplete. Na etapa posterior, as moléculas do FS podem retornar ao estado fundamental emitindo energia, através da liberação de fótons ou progredir na cadeia de reações químicas. A Figura 1 representa o Diagrama de Jablonski que esquematiza os mecanismos fotoquímicos que ocorrem na TFD.

Figura 1 – Diagrama de Jablonski: ilustração gráfica dos mecanismos fotoquímicos em TFD.

Existem dois mecanismos de ação dos FSs sobre as biomoléculas: mecanismo do Tipo I e mecanismo do Tipo II.

A) Mecanismo tipo I

Ocorre por transferência de elétron entre o FS no estado triplete excitado e componentes do sistema, gerando íons-radicais que tendem a reagir com

o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados (Machado, 2000). Em geral esse processo de transferência de elétrons tende a ser muito rápido, pois a sobreposição dos orbitais durante a formação do complexo excitado é máxima.

B) Mecanismo tipo II

O FS no estado triplete transfere energia ao oxigênio molecular no estado fundamental (tripleto) produzindo oxigênio singleto. O oxigênio singleto é uma forma reativa de oxigênio e é considerado o principal mediador do dano fotoquímico causado à célula por muitos FSs (Machado, 2000).

Ambas as reações fotoquímicas geram espécies reativas de oxigênio que são altamente tóxicas para as células. Em condições aeróbicas, o oxigênio singleto é considerado o maior mediador de danos fotoquímicos nas células para muitos tipos de FS (Machado, 2000 *apud* Simplicio, Maionchi *et al.*, 2002).

1.5.4 Janela terapêutica

A interação da luz com o tecido é uma função complexa das propriedades ópticas do tecido, uma vez que a absorção e o espalhamento da luz são dependentes do comprimento de onda. Os tecidos normais contêm muitas substâncias que absorvem ou refletem radiação eletromagnética. A penetração da luz através dos tecidos é facilitada na região compreendida entre 600-800 nm na qual os tecidos são relativamente transparentes. Esta faixa de comprimento de onda é conhecida como “janela terapêutica” e pode ser utilizada em terapia fotodinâmica. A Figura 2 representa o decréscimo na intensidade da luz (fluência) no tecido exposto a um feixe de luz plano de diferentes comprimentos de onda em função da penetração.

Figura 2 – Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração da luz de diferentes comprimentos de onda.

Muitos estudos são realizados para aprimorar e descobrir novos FSs que tenham o espectro de absorção dentro da janela terapêutica. Cada fotossensibilizador absorve em um comprimento de onda diferente por exemplo: Clorinas (640-700 nm) e ftalocianinas (675-700 nm).

1.6 Fotossensibilizadores

Um FS é definido como uma substância que induz sensibilidade luminosa a processos químicos e/ou físicos, normalmente insensíveis à luz. A maioria dos FSs aprovados para uso clínico apresenta em sua estrutura um anel heterocíclico semelhante à clorofila e ao grupamento heme da hemoglobina. Os fótons são absorvidos na banda do espectro eletromagnético de absorção característica dos FSs, podendo transferir essa energia a outras moléculas, especialmente ao oxigênio molecular que resultará na liberação de espécies energéticas de meia-vida curta, levando ao dano do sistema biológico envolvido (Sibata, Colussi *et al.*, 2000).

Um FS ideal deve possuir os seguintes requisitos:

- Ser quimicamente puro e de composição conhecida;
- Ser biologicamente estável;
- Ter toxicidade mínima no escuro sendo citotóxico somente na presença de luz;
- Ser preferencialmente retido pelo tecido alvo;
- Ser rapidamente excretado pelo corpo para prover baixa toxicidade sistêmica;
- Possuir alto rendimento quântico (facilidade para absorver ou emitir fótons) nos estados triplete ou singlete;
- Ter uma alta eficiência quântica para o evento fotoquímico, onde a penetração da luz no tecido é máxima e onde o comprimento de onda da luz permanece energético o suficiente para produzir oxigênio singlete (Vorozhtsov, Karmakova *et al.*).

1.6.1 Hipericina

A hipericina (figura 3), um pigmento fotoativo natural produzido por plantas do gênero *Hypericum* da família Guttiferae, devido a suas propriedades medicinais tem sido utilizada pela humanidade desde a antiguidade, é uma planta herbácea perene com folhas amarelas douradas, popularmente conhecida como erva de são João (Zanoli, 2004).

Figura 3 – Fórmula estrutural da hipericina.

Dentre as propriedades medicinais da hipericina podemos destacar sua ação antiviral, antiretroviral, antibactericida, antipsoriática e antidepressiva (Guedes e Eriksson, 2005)

Para a aplicação na técnica de TFD a hipericina tem sido utilizada como composto fotossensibilizador devido sua ação bactericida e agente antitumoral, pois apresenta alto rendimento quântico do estado triplete e formação de oxigênio singlete. Além de não ser tóxica no escuro, sua ação pode ser aumentada cerca de 100 vezes na presença da luz (Hadjur, Richard *et al.*, 1996).

Embora não seja claro o mecanismo pelo qual a hipericina exerce sua atividade biológica, sabe-se que via oxigênio singlete ela inibe a atividade da proteína quinase e outras enzimas de defesa celular, como a oxidase monoamina e a succinoxidase mitocondrial (Berlanda, Kiesslich *et al.*, 2010).

1.7 Fontes de luz utilizadas na terapia fotodinâmica

Uma ampla variedade de fontes de luz são encontradas para utilização em terapia fotodinâmica, podem ser coerentes ou não coerentes, dentre elas podemos citar os LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (de diversos tipos), os Diodos Emissores de Luz (LED – Light Emitting Diode), lâmpadas

incandescentes e lâmpadas fluorescentes (Brancaleon e Moseley, 2002). A melhor fonte de radiação tem sido descrita como sendo a que por um baixo custo forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do FS, sem efeitos térmicos significativos (Machado, 2000).

Os lasers foram as primeiras fontes de luz utilizadas na terapia fotodinâmica. Para alguns tipos de tumores (tumores internos) esta é a melhor opção de utilização da luz, pois pode-se acoplar uma fibra óptica e direcionar a luz no local desejado, sem danos aos tecidos vizinhos, porém esta técnica gera um alto custo o que levou a novas pesquisas na área para desenvolver novas fontes de luz.

As fontes de luz mais utilizadas na inativação de microrganismos são o lasers de baixa intensidade e o LED, que apresentam como vantagens a versatilidade (podem ser arrançados de várias formas e em grande quantidade para a irradiação de grandes áreas) e o custo mais baixo em comparação a uma fonte laser (Zeitouni, Oseroff *et al.*, 2003).

A região do espectro eletromagnético de emissão da fonte de luz para a terapia deverá ser escolhida levando em consideração as bandas de absorção dos FSs e a profundidade desejável de penetração da luz nos tecidos biológicos.

1.8 Terapia fotodinâmica para acne

A TDF tem sido considerada um tratamento promissor para a acne devido à diminuição dos efeitos colaterais gerados por outros tratamentos convencionais além de ser considerado um método rápido e eficaz e apresenta poucas contra-indicações (pacientes albinos, fotossensíveis, porfiria, etc.). Dentre os mecanismos envolvidos nesta técnica inclui-se a fotodestruição de *P. acnes*, a redução do tamanho das glândulas sebáceas e a diminuição da produção de sebo (Almeida Issa e Manela-Azulay, 2010).

Os estudos realizados com TFD para acne geralmente são realizados *in vivo* e a maioria utiliza luz azul ou vermelha associada ao ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seu derivado metil-ALA (MAL). Segundo Nestor, 2007 o uso de ALA TFD para

tratamento de acne e outras condições dermatológicas não estão totalmente seguras e as condições clínicas não foram totalmente estabelecidas.

Um estudo realizado com 78 pacientes chineses com acne severa submetidos ao tratamento com ALA creme a 10%, incubado por 3 horas e irradiado por 30 minutos com LED 633 nm, dose 50-70 J cm⁻² e 66 mW cm⁻², apresentou excelente resultado para 22% dos pacientes e para o restante observou-se uma melhora significativa, o que mostra a eficácia do tratamento (Wang, Wang *et al.*, 2010).

O estudo de Yin e colaboradores, 2010 envolveu 108 pacientes tratados com ALA tópico na forma de emulsão óleo-água aplicada sobre a lesão da pele mantida oclusiva com filme plástico por 5 horas e exposto a 126 J cm⁻² de luz vermelha por 20 minutos. Dentre as concentrações analisadas, 5, 10, 15 e 20%, as concentrações de 10 e 15% foram as mais eficazes (Yin, Hao *et al.*, 2010).

Pollock, 2004 utilizou ALA tópico em creme (20 %) com luz vermelha (635 nm, 25 mW cm⁻² e 15 J cm⁻²) em 10 pacientes durante 3 semanas. Como resultado obtido pode-se observar (por meio de espectroscopia de fluorescência) uma grande produção de porfirinas, que consequentemente eliminou *P. acnes* mostrando a efetividade do estudo (Pollock, Turner *et al.*, 2004).

Em 2006 o estudo de Wiegell e Wulf comparou ALA e MAL (2 gramas) em creme, aplicado em 15 pacientes e iluminado com luz vermelha 37 J cm⁻² e taxa de fluência 34mW cm⁻². ALA e MAL foram igualmente efetivos no tratamento de acne, foi encontrado em média 59% de redução na inflamação da lesão de acne em 12 semanas pós-tratamento (Wiegell e Wulf, 2006).

Além disso, outro trabalho com a participação de 22 pacientes foi realizado com o intuito de comparar ALA-TFD irradiado com luz vermelha (550-700 nm), apenas ALA, somente a luz vermelha e grupo controle. ALA foi utilizado de forma tópica a 20% e incubado por 3 horas com filme plástico. Os pacientes foram tratados uma vez por semana durante quatro semanas. Todos os pacientes tratados com TFD ALA tiveram melhor resultado comparado com os outros grupos (Hongcharu, Taylor *et al.*, 2000).

No estudo realizado por Akaraphanth que tratou 28 pacientes com ALA-TFD com luz azul (415 nm) de um lado da face e apenas luz azul do outro lado. O ALA foi administrado de forma tópica e incubado por 1 hora, com tempo de irradiação de luz azul de 20 minutos. Com esse resultado chegaram à conclusão que ALA-TFD com

luz azul foi muito superior do que a aplicação utilizando apenas luz azul (Akaraphanth, Kanjanawanitchkul *et al.*, 2007).

Mostrando que este tratamento pode ser utilizado em qualquer fototipo de pele, o trabalho realizado por Lee e seus colaboradores em 2007, contou com a participação de 24 pacientes com peles morenas e negras que apresentando acne moderada. Foram tratados com a combinação de LED azul (415 nm) e laser vermelho (633 nm). A aplicação foi feita por 4 vezes (1 vez por semana) e foi irradiada luz durante 20 minutos, apresentaram resultados positivos em até 8 semanas após o tratamento (Lee, You *et al.*, 2007).

No seu trabalho em 2007, Nestor diz que a TFD para acne tem eficácia limitada principalmente nos casos de acne moderada a severa em decorrência do comprimento de onda escolhido (fontes de luz), além da forma de aplicação da irradiação e naturalmente, o tempo de irradiação (Nestor, 2007).

1.9 Fotoinativação de microrganismos

Assim como a TFD, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), também utiliza FSs e luz visível para promover uma resposta fototóxica, normalmente oxidativa, que é capaz de danificar todos os tipos de biomoléculas e estruturas celulares, provocando a morte dos microrganismos (Wainwright, 1998).

A inativação de microrganismos teve início em 1972, quando Kerr e colaboradores observaram a primeira apoptose celular, mas apenas em 1991, Agarwal relatou a ocorrência de resposta apoptótica com a TFD, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, estabelecendo assim a noção da natureza da destruição (morte) fotoinduzida (Kerr, Wyllie *et al.*, 1972 *apud* Agarwal e Goedde, 1991).

Os danos fotodinâmicos nas células estão bem estabelecidos em alguns sistemas biológicos, particularmente em bactérias e leveduras e, de maneira geral, não diferem muito dos danos observados nas células de eucariotos superiores (Wainwright, 1998).

Com relação à eficiência da inativação bacteriana, é conhecido que bactérias Gram-positivas são geralmente mais susceptíveis à TFDA. Em geral os estudos mostram que bactérias Gram-positivas são fotoinativadas por uma grande variedade de fotossensibilizadores, enquanto as Gram-negativas são mais resistentes sendo que isso ocorre devido à diferença nas estruturas celulares (Wainwright, 1998).

Além disso, até o presente momento não se tem notícia de desenvolvimento de resistência microbiana à TFDA. Uma vez que os FSs utilizados na TFDA agem via produção de oxigênio singlete, não existe resistência microbiana natural, assim, não importa se a cepa é resistente a uma ou muitas classes de agentes bacterianos (por ex. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) dado que o cromóforo (FS) é capturado pelo microrganismo. As principais vantagens da TFDA são que a bactéria pode ser erradicada por um tempo muito curto e é improvável o desenvolvimento de resistência dos alvos da bactéria (Hamblin e Hasan, 2004).

Ainda pouco explorado, é cada vez mais evidente o potencial da TFDA para a inativação de microrganismos na área médica dermatológica. Como citado no item 1.8, muitos autores utilizam a terapia fotodinâmica para acne em pacientes, utilizando diferentes parâmetros na aplicação da técnica. Destacou-se que essa terapia ainda apresenta limitações devido à ausência de parâmetros definidos para que a terapia seja efetiva na eliminação dos microrganismos, apontando a necessidade de estudos laboratoriais mais precisos antes que essa terapia possa ser utilizada em humanos. Portanto é necessário definir a combinação dos parâmetros relevantes para se estabelecer o protocolo clínico para a eliminação da bactéria, utilizando a fotoinativação de *P. acnes* (Sakamoto, Lopes *et al.*, 2010).

2. Objetivos

Esse estudo teve como objetivo geral avaliar a eficácia da TFDA sobre o microrganismo *P. acnes* utilizando hipericina, irradiado por um sistema emissor de luz (LED).

Os objetivos específicos são:

- Avaliar o efeito tóxico de hipericina sobre o crescimento de *P. acnes*;
- Avaliar o efeito tóxico da luz (LED amarelo) sobre o microrganismo;
- Definição do comprimento de onda e dose de luz apropriada para a irradiação do microrganismo;
- Verificar qual o tempo de incubação e a concentração adequados do fotossensibilizador na inativação de *P. acnes*.

3. Materiais e métodos

3.1 Microrganismo

Foi utilizada neste trabalho uma cepa de *P. acnes* (ATCC 6919) pertencente à coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) cedida para esta pesquisa.

Para a execução dos ensaios foram utilizados o meio de cultura Reinforced Clostridium Médium e Reinforced Clostridium Agar (Himedia), preparados e utilizados segundo as recomendações do fabricante.

3.2 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado neste trabalho foi hipericina, que foi sintetizada pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da Universidade Federal do ABC e caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear. A solução estoque de concentração 1mg mL^{-1} foi obtida em dimetil sulfóxido (DMSO), esterilizada por filtração em membrana com poro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ e mantida ao abrigo da luz a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. As concentrações intermediárias foram preparadas pela diluição da solução estoque em meio de cultura (Reinforced Clostridium Médium).

3.3 Fontes de luz

Foi utilizada neste projeto a fonte de luz chamada de Biotable que foi desenvolvida no Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão de Óptica e Fotônica (CEPOF), Instituto de Física de São Carlos, USP, SP, Brasil. Para os experimentos foi empregado o LED amarelo com emissão em 590 ± 11 nm e intensidade média de 10 mW cm^{-2} . Este aparelho é refrigerado a água e foi desenvolvido especialmente para uso em laboratório (Figura 4).

A variação das fluências (doses de luz) foi obtida por meio de diferentes tempos de iluminação, obtidos através da equação 1.

$$I = \frac{D}{t} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

I = intensidade de luz em mW cm^{-2}

D = dose de luz em J cm^{-2}

t = tempo de irradiação em segundos

Sendo que $1 \text{ J} = 1 \text{ W} \times \text{segundo}$

Figura 4: Fonte de luz utilizada - Biotable: LED amarelo com emissão em 590 ± 11 nm.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Curva de Crescimento de *P. acnes*

Para iniciar os experimentos foi realizada a curva de crescimento de *P. acnes*. Este experimento foi necessário para verificar qual o tempo ótimo para cultivo da mesma.

Foi colocado 1 mL da suspensão celular em 10 mL de meio de cultura e mantido em jarra de anaerobiose na estufa de cultura bacteriológica sem agitação (Modelo 002 CB) a 37 °C, por 24 horas. A partir desta amostra foi coletado 2 mL de suspensão celular e acrescentado 50 mL de meio de cultura, mantidos nas mesmas condições citadas acima. Este ensaio teve duração de 24 horas, sendo que a cada

hora, uma alíquota era coletada e feita a leitura da densidade óptica em 660nm realizada em espectrofotômetro Hitachi.

3.4.2 Preparação da suspensão de microrganismos

A partir da cepa microbiana, foi preparada suspensão padronizada de *P. acnes* contendo 1×10^9 células mL^{-1} . Para o preparo dessa suspensão a bactéria foi cultivada em Reinforced Clostridium Medium e mantida em jarra de anaerobiose em estufa de cultura bacteriológica por 12 horas a 37 °C. Após o período de incubação do microrganismo em caldo nutritivo, o sedimento foi obtido por centrifugação (Centrífuga Excelsa II) a 1300 rpm por 10 minutos e suspenso em 10 mL de tampão fosfato salino (PBS). Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes.

3.4.3 Condições experimentais avaliadas

A seguir estão descritas as etapas realizadas para a avaliação da efetividade da TFD na inativação de *P. acnes*. Todos os ensaios descritos a seguir foram realizados em quadruplicata.

A) Grupo controle

Alíquotas de 100 μL da suspensão celular de *P. acnes* foram transferidas para um dos poços de uma placa de titulação de 12 poços (Costar Corning). A seguir o mesmo volume de meio de cultura estéril foi transferido para o poço e permaneceram em repouso durante cinco minutos (média do tempo de incubação). Nesse grupo não foi aplicado nenhum tratamento. Os resultados obtidos com as culturas dessas amostras foram utilizados como

parâmetro para comparação com aqueles obtidos com as culturas das amostras submetidas ao processo fotodinâmico.

B) Grupo fotossensibilizador

Para que fosse avaliada a existência de toxicidade da hipericina sobre a suspensão celular, foram incluídas neste estudo amostras inoculadas com esse FS e que foram mantidas no escuro. Alíquotas de 100 μL da suspensão celular de *P. acnes* foram transferidas para um dos poços de uma placa de titulação de 12 poços. Em seguida acrescentaram-se alíquotas de 100 μL de hipericina com as concentrações de 0,5; 1; 1,5; 3; 5; 7; 10; 15; 20 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para se avaliar a cinética de bioacumulação do FS o sistema de ensaio foi pré-incubado por 2 min30s, 5, 10, 15 e 30 minutos sob o abrigo da luz.

C) Grupo luz

Foi avaliado se a aplicação da luz (LED), na ausência do FS, poderia apresentar efeitos tóxicos para *P. acnes*. Assim, alíquotas de 100 μL da suspensão celular foram transferidas para um dos poços de uma placa de titulação de 12 poços. A seguir 100 μL de Reinforced Clostridium Medium foram transferidos para o poço. O sistema de ensaio foi mantido por 5 minutos no escuro e em seguida foi realizado a irradiação de LED amarelo, nas doses 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 J cm^{-2} .

D) Grupo inativação do microrganismo

A fim de avaliar a ação da hipericina na fotoinativação de *P. acnes*, 100 μL de suspensão celular padronizada (1×10^9 células mL^{-1}) foi inoculada em placas de titulação de 12 poços. Em seguida acrescentaram-se alíquotas de 100 μL de hipericina em diferentes concentrações (0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 5; 7; 10; 12,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras foram mantidas no escuro por 2 min30s, 5 e 10 minutos e em seguida foi realizada a irradiação com LED amarelo, nas doses 1, 3, 6 e 12 J cm^{-2} .

E) Discriminação da atividade fotodinâmica da hipericina extracelular e intracelular

Para distinguirmos se a atividade fotodinâmica ocorre pela hipericina internalizada ou fora das células foi realizado um ensaio de fotossensibilização separando-se o FS.

Para tanto, 100 μL de suspensão celular foi inoculada nos poços de placas de titulação de 12 poços. Em seguida acrescentaram-se alíquotas de 100 μL de hipericina nas concentrações, 7 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram mantidas no escuro por 2 min30s, 5 e 10 minutos. Após estes tempos de incubação a amostra foi centrifugada (mini centrífuga de eppendorf - Spin), o sobrenadante foi descartado, acrescentou-se 100 μL de meio de cultura e a amostra foi irradiada utilizando o LED amarelo, nas doses 6 e 12 J cm^{-2} .

3.4.4 Contagem das unidades formadoras de colônias

Após o procedimento de cada um dos cinco grupos foram realizadas diluições seriadas das amostras, 100 μL de suspensão celular foi adicionada a 900 μL PBS. Após cada diluição a amostra foi agitada com o auxílio de um agitador de tubos (Vortex) durante 30 segundos. Essas diluições foram semeadas em placas de Petri de vidro de 90 x 15 mm, 60 μL da amostra foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski sobre a superfície da placa contendo Reinforced Clostridium Agar. As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose e mantidas por 36 h em estufa bacteriológica a 37 °C. Após período de incubação foi realizada a contagem do número de colônias para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL^{-1}), conforme representado na Figura 5.

Figura 5 – Contagem manual das UFC de *P. acnes* cultivada em meio sólido de Agar em placas de petri. A) diluição de 10^{-6} grupo controle. B) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ hipericina, incubação 2 min30s, dose 12 J cm^{-2} , LED amarelo, sem diluição.

3.5 Análise dos resultados

Após a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) foram obtidas as médias e os desvios padrões dos resultados, convertidos para log. Utilizando-se o programa OriginPro 8 foram feitos gráficos de UFC em função da concentração do FS.

4. Resultados e discussões

4.1 Curva de crescimento de *P. acnes*

O estudo do crescimento de *P. acnes* teve como objetivo o conhecimento detalhado da duração das várias fases de crescimento do microrganismo através da elaboração da curva de crescimento (Figura 6). De acordo com esta curva podemos observar que de 0 a 6 horas o microrganismo estudado se encontra na fase lag, nesta fase o microrganismo está em fase de adaptação metabólica ao novo ambiente. De 6 a 16 horas está na fase log, neste momento o microrganismo está com divisão máxima sendo que o número de células da população dobra a cada geração. Após 20 horas de crescimento os microrganismos se encontram na fase estacionária, onde há escassez de nutrientes e/ou acúmulo de metabólitos e o número de células vivas é igual ao número de células mortas (Tortora, 2005).

Figura 6: Curva de crescimento de *P. acnes*.

Utilizando-se a derivada primeira, podemos observar que o pico máximo de crescimento de *P. acnes* se dá no tempo de 12 horas, no qual temos certeza que a mesma se encontra em plena atividade, não havendo falta de nutrientes e nem morte celular, sendo assim, este tempo foi considerado ótimo para cultivo da bactéria e assim utilizado nos experimentos realizados neste estudo. Esta curva está representada na figura 7.

Figura 7: Curva de crescimento de *P. acnes* e representação da primeira derivada no tempo da curva de crescimento.

4.2 Solubilidade da hipericina

A hipericina é moderadamente solúvel em vários solventes. Neste experimento avaliou-se a solubilidade de hipericina com o meio de cultura utilizado para cultivar *P. acnes* (Reinforced Clostridium Medium) (Figura 8). De acordo com o espectro de absorção apresentado na figura 8A, quanto maior a concentração do

FS, maior á banda de absorção em 606 nm, mostrando assim que o meio de cultura solubilizou a hipericina (figura 8B). O mais relevante é que o ajuste linear dos valores das absorbâncias em função da concentração segue a lei de Lambert-Beer.

Assim para os experimentos de inativação do microrganismo, as soluções intermediárias de hipericina foram solubilizadas com meio de cultura.

Figura 8: A) Espectros de absorção óptica da hipericina diluída em meio de cultura em diferentes concentrações B) Absorção da hipericina em meio de cultura na banda em 590 nm em função da sua concentração.

4.3 Efeito do tempo de incubação da hipericina em *P. acnes*

A fim de estudar o potencial tóxico de hipericina foram feitos ensaios citotóxicos na ausência de irradiação com diferentes concentrações de hipericina e diferentes tempos de incubação, com o intuito de verificar a toxicidade intrínseca do FS na bactéria, ou seja, citotoxicidade no escuro, bem como determinar a influência do tempo de incubação na morte celular.

O gráfico abaixo apresenta os valores de log UFC mL⁻¹ em função da concentração de HY em diferentes tempos de incubação (Figura 9).

Figura 9: Efeito do tempo de incubação e diferentes concentrações hipericina na *P. acnes*.

Nos testes realizados foram utilizadas as seguintes concentrações de HY 0, 0,5, 1, 1,5, 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 25 μg mL⁻¹, incubadas por 2 min30s, 5, 15 e 30 minutos. Com os resultados obtidos observou-se que a hipericina tem um efeito tóxico sobre *P. acnes*, pois houve uma redução do log UFC mL⁻¹ de $9,7 \pm 0,9$ para $7,7 \pm 0,2$ já com 2 min30s minutos de incubação, e $7,6 \pm 0,4$ com 30 minutos de incubação, indicando que com o aumento do tempo de incubação não há uma correspondência direta na morte celular, ou seja, não observou-se diminuição no número de UFC. Esta observação é importante, pois indica que a cinética de incorporação da HY é rápida.

Este ensaio foi útil para demonstrar que o tempo necessário para garantir a máxima incorporação do FS, ou seja, o tempo de saturação da concentração no interior das células, é inferior a 2 min30s mesmo para baixas concentrações de incubação de hipericina.

4.4 Efeito da irradiação sobre *P. acnes*

A fonte de luz utilizada (LED amarelo) foi determinada de acordo com a absorção do FS utilizado (Figura 10). Este experimento foi utilizado como um controle, pois em TFD, somente a luz, na ausência do FS, não deve apresentar efeito tóxico às bactérias.

Figura 10: Espectro de absorção óptica da hipericina $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO.

Foi obtido o espectro de absorção óptica de hipericina na concentração de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ solubilizada em DMSO. Pode-se observar que esse composto apresenta picos máximos de absorção em 419, 480, 515, 554 e 598 nm. Uma vez que esse último representa a absorção mais proeminente na região do visível, pode-se justificar a escolha da irradiação em 590 nm no sentido de se maximizar a eficiência quântica do FS em produzir o seu estado tripleto.

A intensidade de luz pode ser definida como a quantidade de energia transmitida ao alvo por unidade de tempo e é expressa em mW cm^{-2} . A quantidade de energia absorvida durante todo o intervalo de tempo é definida como dose de luz, que por sua vez é expressa em J cm^{-2} .

Nos ensaios a intensidade do LED amarelo foi fixada em 10 mW cm^{-2} e variou-se o tempo de irradiação.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 11 e mostram que apenas a exposição de *P. acnes* à luz, em doses de até 24 J cm^{-2} , não tem efeito tóxico sobre o crescimento da bactéria.

Figura 11: Efeito da irradiação sobre *P. acnes* com LED amarelo em função da dose de luz.

Alguns trabalhos relatam que algumas espécies de bactérias Gram-negativas requerem tempos maiores de exposição à irradiação para serem inativadas quando comparadas com espécies Gram-positivas. Isso se deve à diferença que apresentam na parede celular, as Gram-negativas tem uma bicamada lipídica, enquanto as Gram-positivas apresentam uma única camada de peptidoglicanos (Huang e Hamblin, 2011).

Macleane et al. irradiaram cepas de *Sataphilococcus aureus* resistente à ampicilina (MRSA), *Acinetobacter baumannii*, entre outras, na ausência de fotossensibilizador. Os autores observaram uma redução de até 4,2 log de UFC após 180 min de irradiação com LED de 405 nm e de potência 10 mW cm^{-2} , um tempo maior que o utilizado no presente trabalho que foi de 40 minutos. (Macleane, Macgregor et al., 2009).

A inativação de *P. acnes* encontrada somente com irradiação pode ser devida à presença de porfirinas que se encontram dentro da célula bacteriana, como foi relatado pelo estudo de Lee, et al. Muitos derivados de porfirina são considerados FSs de primeira geração, que após irradiação produzem espécies reativas e oxigênio singlete (Bernal, 2011). Lee et al., acompanharam 24 pacientes com acne severa durante algumas semanas após sessões de irradiação com LED 415 e 633 nm e dose de 48 e 96 J cm⁻². Foi observada redução significativa do número de lesões (Lee, You *et al.*, 2007).

4.5 Fotoinativação dos microrganismos

Para verificar qual a melhor condição para se aplicar a TFD, foram testados alguns parâmetros como dose de luz, concentração de hipericina e tempo de incubação. Os ensaios foram realizados de acordo com o item 3.4.3.

4.5.1 Avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica em *P. acnes* utilizando LED amarelo dose 1 J cm⁻²

Nos ensaios de inativação fotodinâmica manteve-se fixa a dose de 1 J cm⁻² (tempo de irradiação de 1 min40s) e variou-se a concentração de hipericina e o tempo de incubação. Podemos observar algumas alterações no log UFC mL⁻¹, representados na figura 12.

Figura 12: Efeito do tempo de incubação (2 min30s, 5 e 10 minutos) e da concentração de HY (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) na *P. acnes*, com irradiação de luz 590 nm, com $D=1 \text{ J cm}^{-2}$.

No menor tempo de incubação (2 min30 s) e na menor concentração de HY ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi obtido uma redução de 2,06 log de UFC mL^{-1} . Aumentando-se 40 vezes a concentração de HY e quadruplicando o tempo de incubação, a redução observada foi de 3 log de UFC mL^{-1} . Esses resultados evidenciam que a dose utilizada foi insuficiente para atingir a máxima ativação da hipericina.

4.5.2 Avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica em *P. acnes*, após irradiação, dose 3 J cm^{-2}

Com a dose de luz 3 J cm^{-2} , que corresponde ao tempo de irradiação no LED amarelo de 3 min20s, considerando as mesmas condições anteriores, houve uma redução de 4,58 ordem de grandeza, os resultados estão apresentados na Figura 13.

Figura 13: *P. acnes* irradiada com LED amarelo, Dose 3 J cm⁻², com hipericina nas concentrações 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 e 10 μg mL⁻¹, nos tempos de incubação 2 min30s, 5 e 10 minutos.

Nesses ensaios foram utilizadas as mesmas condições de HY e tempos de incubação realizados nos experimentos do item 4.5.1, porém o tempo de irradiação foi cerca de duas vezes superior. Nessas condições a inativação foi de 4,47 até 4,58 ordem de grandeza para os três tempos de incubação testados e considerando a concentração de 10 μg mL⁻¹, evidenciando o aumento da potencialização da hipericina pela luz.

4.5.3 Avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica em *P. acnes* utilizando LED amarelo dose 6 J cm⁻²

Nesse experimento o tempo de irradiação foi aumentado para 10 minutos correspondendo a uma dose de 6 J cm⁻², além disso, duas novas concentrações de HY também foram testadas (12,5 e 15 μg mL⁻¹). Os resultados desses experimentos estão apresentados na Figura 14.

Figura 14: Efeito do tempo de incubação (2 min30s, 5 e 10 minutos) e de diferentes concentrações de HY (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7, 10, 12,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em *P. acnes* após irradiação com LED amarelo com $D=6\text{ J cm}^{-2}$.

Neste experimento podemos ressaltar os valores obtidos na inativação da bactéria com a concentração de hipericina 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e tempo de incubação 2 min30s, o log UFC mL^{-1} reduziu de $9,7 \pm 0,9$ para $5,6 \pm 0,7$, totalizando uma redução de 4,1 ordem de grandeza. Nos tempos de 5 e 10 minutos de incubação, a redução foi de 5,2 e 5,9, percebe-se que dobrando-se os tempos de incubação a morte celular não aumentou na mesma ordem de grandeza.

Os resultados encontrados nos ensaios realizados com as concentrações de 12,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, considerando o tempo de 2 min30s, não evidenciaram inativação celular superior a 4 ordens de grandeza. Com os tempos de incubação de 5 e 10 minutos de incubação a redução nas UFC mL^{-1} foi de 5,4 e 6,0 ordens de grandeza, resultados muito semelhantes aos encontrados com 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.5.4 Avaliação da efetividade da inativação fotodinâmica em *P. acnes* utilizando LED amarelo dose 12 J cm^{-2}

Após 20 minutos de irradiação da bactéria (dose 12 J cm^{-2}) e as concentrações 3, 5, 7 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de HY e tempos de incubação realizados nos experimentos do item 4.5.1, obteve-se a maior inativação de *P. acnes* (Figura 15).

Figura 15: *P. acnes* irradiada com LED amarelo, dose 12 J cm^{-2} , com hipericina nas concentrações 3, 5, 7 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, nos tempos de incubação 2 min30s, 5 e 10 minutos.

Comparando-se os tempos de incubação de 2 min30s e 10 minutos, e a concentração de hipericina $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ observou-se que com 2 min30s o log UFC mL^{-1} reduziu de $9,7 \pm 0,9$ para $3,1 \pm 0,8$, totalizando uma redução de 6,6 ordens de grandeza. E com tempo de incubação de 10 minutos a redução foi de $9,7 \pm 0,9$ para $2,3 \pm 0,4$, diminuindo assim 7,4 ordens de grandeza. Esses ensaios foram os mais efetivos para inativar a *P. acnes*.

Observou-se que a dose de luz foi um fator importante na inativação da bactéria, uma vez que aumentando os tempos de incubação e as concentrações do

fotossensibilizador não foi obtido um aumento da inativação celular semelhante ao encontrado quando dobrou-se o tempo de irradiação.

De acordo com a figura 16, podemos observar que com a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hipericina e com o aumento da dose há um aumento na morte celular, evidenciando que esta concentração foi suficiente para eliminar *P. acnes*.

Figura 16: Variação da redução do log de UFC em função da dose de luz (J cm^{-2}).

De acordo com a equação 2, onde UFC_0 é a concentração total de células viáveis, UFC após a ação fotodinâmica, Y é o logaritmo da variação de UFC , Y_0 é o Y devido à toxicidade intrínseca e $Dose_{0,63}$ é a dose de radiação necessária para inativar 63% das células. Assumindo-se a concentração fixa de FS igual a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. O logaritmo da inativação máxima atingível corresponde a $7,4 \pm 0,3$ e a dose para inativar 63% das células viáveis correspondeu a $4,55 \pm 0,08 \text{ J cm}^{-2}$. A citotoxicidade intrínseca (Y_0) da hipericina correspondeu a 1,7.

$$\log \frac{UFC_0}{UFC} = Y = Y_0 + (Y_{max} - Y_0) \left\{ 1 - \exp - \frac{Dose}{Dose_{0,63}} \right\} \quad (\text{Equação 2})$$

Ashkenazi *et al*, 2002, realizaram experimentos de fotoinativação de *P. acnes*, utilizando $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido δ -aminolevulínico como reagente precursor para induzir a biossíntese da protoporfirina e demais intermediários que apresentam atividade fotodinâmica. Mesmo considerando a irradiação na região de alta absorvidade (banda de Soret) foi necessário irradiar-se com LED azul com doses de 75 J cm^{-2} para se observar a inativação de 5 a 6 ordens de grandezas. Devido ao mecanismo biossintético dos derivados de porfirinas, a técnica requer tempos longos de incubação (de 24 a 72) horas como relatados pelo autor.

4.6 Discriminação da atividade fotodinâmica da hipericina intracelular e extracelular

Com os ensaios realizados de acordo com o item 3.4.3 e utilizando irradiação na dose de 6 J cm^{-2} , para verificar se a atividade fotodinâmica ocorre pela hipericina internalizada, ou fora das células, observou-se como resultados dos experimentos que em ambos os ensaios apresentam o mesmo efeito fotodinâmico, os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Discriminação da atividade fotodinâmica extra e intracelular (experimento 1) e da atividade intracelular (experimento 2), com irradiação na dose 6 J cm^{-2} .

HY ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tempo de incubação (min)	log (UFC/UFC ₀)	log (UFC/UFC ₀)
		Experimento 1	Experimento 2
7	5	$5,0 \pm 1,4$	$5,0 \pm 1,4$
7	10	$5,8 \pm 1,3$	$5,8 \pm 1,3$
10	5	$5,2 \pm 1,3$	$5,2 \pm 1,3$
10	10	$6,0 \pm 1,7$	$6,3 \pm 1,6$

Observa-se que em todas as concentrações de HY e tempos de incubação testados, o log da relação entre UFC após tratamento fotodinâmico e antes do tratamento fotodinâmico, não apresentou alterações entre os experimentos 1 e 2, ou seja, a presença do fotossensibilizador fora da célula bacteriana não altera a atividade fotodinâmica da hipericina internalizada.

Os mesmos experimentos, seguindo o item 3.4.3 E, foram realizados com irradiação com dose de 12 J cm^{-2} e 7 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hipericina. Os resultados dos experimentos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Discriminação da atividade fotodinâmica extra e intracelular (experimento 1) e da atividade intracelular (experimento 2), com irradiação na dose 12 J cm^{-2} .

HY ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Tempo de incubação (min)	log (UFC/UFC ₀)	log (UFC/UFC ₀)
		Experimento 1	Experimento 2
7	5	$5,4 \pm 1,4$	$5,4 \pm 1,4$
7	10	$5,6 \pm 1,7$	$5,7 \pm 1,7$
10	5	$6,9 \pm 1,4$	$6,9 \pm 1,4$
10	10	$7,4 \pm 1,3$	$7,4 \pm 1,3$

Os resultados apresentados na tabela 2 evidenciam que em todas as concentrações de HY e tempos de incubação testados, o log da relação entre UFC após tratamento fotodinâmico e antes do tratamento fotodinâmico foram idênticos para os experimentos, corroborando com as discussões feitas para os experimentos obtidos com irradiação de 6 J cm^{-2} .

5. Conclusões

Devido à resistência bacteriana de *P. acnes* aos antibióticos comumente utilizados no tratamento anti-acne, surge a necessidade de novos tratamentos para esta patologia. Neste trabalho foi verificado o uso de hipericina para inativar *P. acnes*.

Utilizando uma série de parâmetros o presente estudo verificou qual as melhores condições para eliminar a bactéria. Os resultados apresentados demonstram que o emprego da hipericina poderá ser promissor: a) o tempo necessário de sua incorporação não é superior a 2 min30s; b) a radiação a ser empregada é a amarela, comprimento de onda mais longo que o azul, portanto menos susceptível à absorção pelos pigmentos naturais; c) a inativação com doses máximas de 12 J cm^{-2} seria suficiente para atingir a inativação de 7,4 ordens de grandeza de *P. acnes*. Doses de $4,5 \text{ J cm}^{-2}$ são suficientes para inativar 63% de *P. acnes*.

A fim de garantir a reprodutibilidade, o melhor parâmetro utilizado foi $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do FS incubado por 10 minutos e irradiado com LED amarelo com dose 12 J cm^{-2} .

Uma limitação da hipericina é a sua solubilidade em água que pode ser aumentada em meio de cultura. Os resultados do presente trabalho demonstram que a hipericina pode ser incorporada rapidamente, resultando em uma citotoxicidade que pode ser aumentada em 3,8 vezes pela irradiação com a luz amarela.

Conclui-se que hipericina é um FS eficiente quando utilizado para inativar *P. acnes*. Por ser mais barato e não apresentar dor na aplicação quando comparado aos fotossensibilizadores e os reagentes comumente utilizados para o tratamento de acne, poderá ser utilizado como uma nova modalidade de tratamento anti-acne.

6. Referências bibliográficas¹

AGARWAL, D. P.; GOEDDE, H. W. HUMAN VARIABILITY IN ALCOHOL AND ALDEHYDE METABOLISM - VULNERABILITY TO TOXIC EFFECTS. **Ecogenetics: Genetic Predisposition to the Toxic Effects of Chemicals**, p. 141-158, 1991 1991. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991BU23G00009 >.

AKARAPHANTH, R.; KANJANAWANITCHKUL, W.; GRITIYARANGSAN, P. Efficacy of ALA-PDT vs blue light in the treatment of acne. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 23, n. 5, p. 186-190, 2007. ISSN 0905-4383. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249196800005 >.

ALMEIDA ISSA, M. C.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-511, Jul-Aug 2010. ISSN 0365-0596. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282877200014 >.

ASHKENAZI, H. et al. Eradication of Propionibacterium acnes by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 17-24, 2003. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181221500003 >.

BERLANDA, J. et al. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 100, n. 3, p. 173-180, Sep 2 2010. ISSN 1011-1344. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280929100009 >.

BERNAL, C. **Hipericina, Photodithazine e Photogem: um estudo comparativo da atividade fotodinâmica**. . 2011. Instituto de Química de São Carlos, , Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 3, p. 173-186, 2002 2002. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177689900005 >.

CHOUDHARY, S.; NOURI, K.; ELSAIE, M. L. Photodynamic therapy in dermatology: a review. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 6, p. 971-980, 2009. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270894900017 >.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

COSTA, A.; ALCHORNE, M. M. D.; GOLDSCHMIDT, M. C. B. Etiopathogenic features of acne vulgaris. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 83, n. 5, p. 451-459, 2008. ISSN 0365-0596. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261448000010 >.

DESSINIOTI, C.; KATSAMBAS, A. D. The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 2-7, 2010. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279425300002 >.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, Jun 17 1998. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074327000007 >.

DRENO, B. Pathophysiology of acne. **Presse Medicale**, v. 34, n. 7, p. 537-539, 2005. ISSN 0755-4982. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228586700015 >.

FALCOCCHIO, S. et al. Propionibacterium acnes GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 40, n. 3-4, p. 132-137, Jun 1 2006. ISSN 1381-1177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238484400010 >.

GOLLNICK, H. et al. Management of acne - A report from a global alliance to improve outcomes in acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1, p. S1-S37, Jul 2003. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <Go to ISI>://000184187600001 >.

GOODMAN, G. J. Postacne scarring: A review of its pathophysiology and treatment. **Dermatologic Surgery**, v. 26, n. 9, p. 857-871, 2000. ISSN 1076-0512. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089245600012 >.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244-253, 2011. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288436600011 >.

GUEDES, R. C.; ERIKSSON, L. A. Theoretical study of hypericin. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, v. 172, n. 3, p. 293-299, Jun 5 2005. ISSN 1010-6030. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229524200011 >.

HADJUR, C. et al. Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n. 2, p. 375-381, Aug 1996. ISSN 0031-8655. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VC58800026 >.

HAIDAR, R. et al. Propionibacterium acnes causing delayed postoperative spine infection: Review. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 42, n. 6-7, p. 405-411, 2010. ISSN 0036-5548. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279896500001 >.

HALVORSEN, J. A. et al. Suicidal Ideation, Mental Health Problems, and Social Impairment Are Increased in Adolescents with Acne: A Population-Based Study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 363-370, 2011. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286177500016 >.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, May 2004. ISSN 1474-905X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222008500007 >.

HONGCHARU, W. et al. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 183-192, 2000. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088805800007 >.

HUANG, L.; HAMBLIN, M. MECHANISMS OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY: AN IN VITRO STUDY ON GRAM-NEGATIVE AND GRAM-POSITIVE BACTERIA. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p. 957-957, Feb 2011. ISSN 0196-8092. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288396000151 >.

KEMPIAK, S. J.; UEBELHOER, N. Superficial Chemical Peels and Microdermabrasion for Acne Vulgaris. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, n. 3, p. 212-220, 2008. ISSN 1085-5629. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260199800008 >.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. APOPTOSIS - BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-&, 1972 1972. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1972N215800001 >.

LEE, S. Y.; YOU, C. E.; PARK, M. Y. Blue and red light combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype IV. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 2, p. 180-188, 2007. ISSN 0196-8092. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244609500015 >.

LIU, P. F. et al. Passive immunoprotection targeting a secreted CAMP factor of Propionibacterium acnes as a novel immunotherapeutic for acne vulgaris. **Vaccine**, v. 29, n. 17, p. 3230-3238, Apr 2011. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <Go to ISI>://000290603100022 >.

MACHADO, A. E. D. Photodynamic therapy: Principles, potential of application and perspectives. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, Mar-Apr 2000. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086362400015 >.

MACLEAN, M. et al. Inactivation of Bacterial Pathogens following Exposure to Light from a 405-Nanometer Light-Emitting Diode Array. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1932-1937, Apr 1 2009. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264549400017 >.

MAGIN, P. et al. A systematic review of the evidence for 'myths and misconceptions' in acne management: diet face-washing and sunlight. **Family Practice**, v. 22, n. 1, p. 62-70, Feb 2005. ISSN 0263-2136. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227278600011 >.

MARTIN DWORKIN , S. F., EUGENE ROSENBERG ,KARL-HEINZ SCHLEIFER, ERKO STACKEBRANDT. **The Prokaryotes – A Handbook on the Biology of Bactéria**. 3º edição. 2006.

MCGRATH, E. J. et al. A prospective trial of the effects of isotretinoin on quality of life and depressive symptoms. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 6, p. 1323-1329, 2010. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284368600027 >.

MISERY, L. Consequences of Psychological Distress in Adolescents with Acne. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 290-292, 2011. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286177500006 >.

NAKATSUJI, T. et al. Bioengineering a humanized acne microenvironment model: Proteomics analysis of host responses to Propionibacterium acnes infection in vivo. **Proteomics**, v. 8, n. 16, p. 3406-3415, 2008. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258649800022 >.

NESTOR, M. S. The use of photodynamic therapy for treatment of acne vulgaris. **Dermatologic Clinics**, v. 25, n. 1, p. 47-+, Jan 2007. ISSN 0733-8635. Disponível em: < <Go to ISI>://000243315800007 >.

PELCZAR, M. J. **Microbiologia conceitos e Aplicações**. 2º. São Paulo: 1997.

POLLOCK, B. et al. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy and mechanism of action. **British Journal of Dermatology**, v. 151, n. 3, p. 616-622, Sep 2004. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <Go to ISI>://000223953200013 >.

RAAB, O. Effect of fluorescent substances on Infusoria. **Zeitschrift Fur Biologie**, v. 39, p. 524-546, 1900 1900. ISSN 0372-8366. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000202421400019 >.

RINALDO GUIRRO, E. G. **Fisioterapia Dermato Funcional**. 2002.

SAKAMOTO, F. H.; LOPES, J. D.; ANDERSON, R. R. Photodynamic therapy for acne vulgaris: A critical review from basics to clinical practice Part I. Acne vulgaris: When and why consider photodynamic therapy? **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 183-193, 2010. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280252100001 >.

SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, Aug 2000. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088942700002 >.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Photodynamic therapy: Pharmacological aspects, applications and news from medications development. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, Sep-Oct 2002. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178067900016 >.

SIMPSON, N. Antibiotics in acne: time for a rethink. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 2, p. 225-227, Feb 2001. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167236600001 >.

SMITH, E. V.; GRINDLAY, D. J. C.; WILLIAMS, H. C. What's new in acne? An analysis of systematic reviews published in 2009-2010. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 36, n. 2, p. 119-123, 2011. ISSN 0307-6938. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287400400002 >.

STORMER, M.; KLEESIEK, K.; DREIER, J. Propionibacterium acnes lacks the capability to proliferate in platelet concentrates. **Vox Sanguinis**, v. 94, n. 3, p. 193-201, 2008. ISSN 0042-9007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253981500005 >.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 8°. Porto Alegre: 2005.

TUNCA, M. et al. Topical nadifloxacin 1% cream vs. topical erythromycin 4% gel in the treatment of mild to moderate acne. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 12, p. 1440-1444, 2010. ISSN 0011-9059. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284543800020 >.

VON TAPPEINER, H. the effect of fluoresceine substances on the fermentation and toxine. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 36, p. 3035-3038, Jul-Oct 1903. ISSN 0365-9496. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000201156200068 >.

VOROZHTSOV, G. N. et al. **Photosensitizing agents for use in photodynamic therapy**: Org Intermediates Dyestuffs Res Inst; Mosc Oncology Res Inst.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13-28, Jul 1998. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075013800003 >.

WANG, X. L. et al. Topical ALA PDT for the treatment of severe acne vulgaris. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 1, p. 33-38, Mar 2010. ISSN 1572-1000. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276559900007 >.

WIEGELL, S. R.; WULF, H. C. Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 4, p. 647-651, Apr 2006. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <Go to ISI>://000236404800011 >.

YIN, R. et al. Investigation of optimal aminolaevulinic acid concentration applied in topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for treatment of moderate to severe acne: a pilot study in Chinese subjects. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 5, p. 1064-1071, 2010. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283597500024 >.

ZANOLI, P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. **Cns Drug Reviews**, v. 10, n. 3, p. 203-218, Fal 2004. ISSN 1080-563X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224665400001 >.

ZEITOUNI, N. C.; OSEROFF, A. R.; SHIEH, S. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers - Current review and update. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 17-18, p. 1133-1136, Jul 2003. ISSN 0161-5890. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184067800017 >.