

**WANESSA DE CÁSSIA MARTINS ANTUNES DE  
MELO**

**FOTOINATIVAÇÃO SELETIVA DOS  
MICRORGANISMOS: *Escherichia coli* e  
*Staphylococcus aureus***

Tese de doutorado 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 doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos  
2014

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

M528f Martins Antunes de Melo, Wanessa de Cássia  
Fotoinativação Seletiva dos Microrganismos:  
Escherichia coli e Staphylococcus aureus. / Wanessa de  
Cássia Martins Antunes de Melo; orientador Janice  
Rodrigues Perussi. São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação  
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em  
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de  
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,  
2014.

1. Biofilme. 2. Terapia fotodinâmica  
antimicrobiana. 3. Exopolissacarídeo. 4.  
Fotossensibilizadores. 5. Hipericina. 6. Ftalocianina.  
I. Título.



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

**Wanessa de Cássia Martins Antunes de Melo**

Título: "Fotoinativação Seletiva dos Microrganismos: Escherichia coli e Staphylococcus aureus".

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

Aprovado em: 19/03/2014

Profª. Drª. Janice Rodrigues Perussi (Orientadora)

Universidade de São Paulo - USP

Resultado: Aprovada

Assinatura: Janice

Profª. Drª. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho" - UNESP

Resultado: Aprovada

Assinatura: R. Adriana C. Marcantonio

Profª. Drª. Martha Simões Ribeiro

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
- IPEN

Resultado: Aprovada

Assinatura: Martha Ribeiro

Profª. Drª. Ana Maria Minarelli Gaspar

Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho" - UNESP

Resultado: APROVADA

Assinatura: Ag

Prof. Dr. Anderson Orzari Ribeiro

Universidade Federal do ABC - UFABC

Resultado: APROVADA

Assinatura: [Assinatura]

Homologado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

*Dedico este trabalho,*

*a todos que me apoiaram durante este percurso,*

*em especial*

*A Douglas pelo companheirismo, paciência,  
compreensão, conversas e pelo exemplo  
de pessoa e profissional*

*Aos meus pais e irmã pelo amor, carinho,  
incentivo, e força.*

*Meu muito obrigada a todos vocês que  
sei que posso contar por todo a minha vida*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço aos meus pais e minha irmã, pelo apoio e incentivo para enfrentar mais esta etapa da minha vida.*

*À Douglas, meu amor, que sempre esteve me apoiando, principalmente nas horas difíceis. Obrigado por tornar minha vida muito melhor.*

*À professora e orientadora Janice Rodrigues Perussi, pela sua dedicação, apoio e pelas oportunidades concedidas, que me proporcionaram um grande crescimento profissional.*

*Ao Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da Universidade Federal do ABC e ao Prof. Dr. Marcel Tabak do Instituto de Química da USP de São Carlos*

*Aos colegas do laboratório, Lucas, Yara, Milene, Alex, Roberta, Tânia, Joyce, Cláudia, Adriel, Marília, Maria Luísa, pela ajuda e companhia.*

*À professora Ana Maria Peplis pelo carinho e atenção nos momentos que precisei.*

*À seção de Pós-graduação, Janete e Nathália, pela atenção e colaboração sempre que precisei. E aos amigos da Bioengenharia.*

*À CAPES, FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro.*

*Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para este trabalho.*

## RESUMO

MELO, W.C.M.A. **Fotoinativação Seletiva dos Microrganismos: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***. 2014. 134f. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O aparecimento de uma grande variedade de microrganismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos tem resultado no aumento do índice de doenças e mortalidade provocadas por infecções que eram facilmente tratadas no passado. Muitas vezes essa resistência está relacionada à formação de biofilme pelos microrganismos, que produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS) dificultando a penetração de agentes antimicrobianos. A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês antimicrobial photodynamic therapy) é uma alternativa promissora para combater infecções microbianas, principalmente aquelas em que apresentam biofilmes. Basicamente esse mecanismo envolve a combinação sinérgica de um fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz visível de comprimento de onda adequado para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam oxidação dos componentes da célula levando-a à morte. Devido à natureza multifacetada e não-específica das EROs produzidos na aPDT, os microrganismos têm menos chance de desenvolver mecanismos de resistência. Apesar destas vantagens, a aPDT tem enfrentando o problema da hidrofobicidade que FSs como hipericina (Hy) e ftalocianina de zinco (FcZn) apresentam. Esta hidrofobicidade promove a agregação do FS em meio biológico, reduzindo a sua atividade fotodinâmica. Diante disso, este estudo teve o objetivo avaliar a ação fotodinâmica da Hy, FcZn e seus derivados hidrossolúveis (hipericina-glucamina - HyG, ftalocianina de zinco tetracarboxilada - FcZnTc e ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina - FcZnTcG), para inativar as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, tanto em cultura planctônica como em biofilme. Como a aPDT apresenta também a vantagem de seletividade, foi proposto que as condições para fotoinativação destas bactérias provocassem o mínimo de dano às células hospedeiras. Estudos físico-químicos dos novos FSs mostraram menor agregação dos FSs derivados em meio aquoso que seus compostos de origem, bem como um ligeiro aumento no coeficiente de atividade fotodinâmica. Além disso, a hidrofilicidade dos FSs aumentou a acumulação intracelular dos mesmos nas bactérias de estudo *S. aureus* e *E. coli*, tanto na forma de células planctônicas quanto em biofilme. Os ensaios de acumulação intracelular dos FSs determinaram os parâmetros de fotoinativação seletiva dos microrganismos, tanto em células planctônicas como em biofilme. Todos os FSs, com exceção de FcZn, foram capazes de promover a seletividade de *S. aureus* e *E. coli* na forma planctônica. Entretanto, devido a maior complexidade morfológica de *E. coli*, os parâmetros de fotoinativação utilizados para inibir esta bactéria foram cerca de duas vezes maiores que para inativar a mesma concentração celular de *S. aureus*. Dentre todos os FSs, a FcZnTcG apresentou as melhores condições de seletividade tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*, uma vez que inibiu aproximadamente 100% destes microrganismos e no máximo 15% de células epiteliais (Vero). A obtenção das condições de seletividade para os biofilmes bacterianos foi mais difícil, pois a acumulação dos FSs por *S. aureus* e *E. coli* foi menor, tornando-se assim necessário aumentar os parâmetros de fotoinativação, ou seja, concentração do FS, tempo de

incubação e dose de luz, que conseqüentemente inibiram mais as células epiteliais. Apesar disso, HyG e FcZnTcG foram capazes de promover a seletividade do biofilme de *S. aureus* em todas as etapas de formação. Entretanto, a seletividade do biofilme de *E. coli* foi alcançada apenas nas etapas de adesão reversível e irreversível e somente por FcZnTcG. Isso pode ser justificado pela maior concentração de EPS sintetizado por *E. coli* que por *S. aureus*, dificultando a acumulação dos FSs nas últimas etapas do biofilme de *E. coli* (biofilme maduro e dispersão). Portanto, os resultados desse estudo permitem sugerir que a hidrofiliçidade é uma característica importante para os FSs fotoativarem seletivamente os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*, mesmo na forma de biofilme. Além disso, foi observado que a ação de aPDT no EPS do biofilme bacteriano desempenha um papel fundamental para inibição tanto de *S. aureus* quanto de *E. coli*.

**Palavras-chave:** Biofilme, Terapia fotodinâmica antimicrobiana, Exopolissacarídeo, Fotossensibilizadores, Hipericina, Ftalocianina.

## ABSTRACT

MELO, W.C.M.A. **Selective photoinactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus***. 2014. 134f. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The appearance of a large variety of antimicrobial-resistant pathogenic microorganisms has led to increased rates of disease and mortality caused by infections that were easily treated in the past. It has become clear that the biofilm-grown cells increase the bacteria resistance to antibiotics. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a promising alternative way to fight microbial infections, especially the biofilm ones. This technique, basically, involves the synergistic combination of a photosensitizer, molecular oxygen and visible light of an appropriate wavelength to produce highly reactive oxygen species that lead to the oxidation of several cell components and to cell inactivation. The main advantage of the technique is that, given the existence of multiple targets, there is no development of resistance. The hydrophobicity of photosensitizers (PSs) like hypericin (Hy) and zinc phthalocyanine (ZnPc), reduces their photodynamic activity once they form aggregates in biological media. For this reason, was evaluated the effectiveness of Hy, ZnPc and its water-soluble derivatives (glucamine-hypericin-HyG, zinc tetracarboxylated phthalocyanine-ZnTcPc and zinc tetracarboxy-N-methylglucamine phthalocyanine-ZnTcGPc) to photoinactivate *S. aureus* and *E. coli* with minimal damage to a model of host cells. Physicochemical studies showed that hydrophilic PSs suffer less aggregation in aqueous media, as well as present a slight increase in photodynamic activity compared to Hy and ZnPC. Furthermore, the hydrophilicity of PSs increased the PS intracellular accumulation in bacteria, either in planktonic culture or biofilms. The accumulation study allowed to determine the parameters of selective photoinactivation of microorganisms. Due the morphologic complexity of *E. coli* the photodynamic parameters (incubation time, PS concentration and light dose) were twice that used against *S. aureus*. As a consequence, some more epithelial cells were affected by the process. Despite that, only the ZnPc could not promote the selective inactivation for planktonic cells. By the other hand, HyG and FcZnTcG were able to selectively photoinactivate the biofilm of *S. aureus* in all its formation stages. However, the selective inactivation of *E. coli* biofilm was achieved only in the reversible and irreversible adhesion and just for FcZnTcG. This fact can be explained by the higher concentration of exopolysaccharide ( $1,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) synthesized by *E. coli* compared with *S. aureus*, making difficult the accumulation of the PSs in the last stages of the *E. coli* biofilm formation (mature biofilm and dispersion). So, we can suggest that hydrophilicity is an important characteristic for the PSs, improving the selective photoinactivation of *S. aureus* and *E. coli*, even as biofilm. Moreover, the effectiveness of aPDT against EPS plays a key role for inhibition of bacterial biofilms

**Key words:** Biofilm, Antimicrobial photodynamic therapy, Exopolysaccharide, Photosensitizers, Hypericin, Phthalocyanine.

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cronologia do aparecimento das cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a diferentes antibióticos.....	20
<b>Figura 2:</b> Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.....	22
<b>Figura 3:</b> Etapas de formação do biofilme.....	27
<b>Figura 4:</b> Tempo de ação do antibiótico no biofilme bacteriano.....	28
<b>Figura 5:</b> Canais aquosos no biofilme.....	29
<b>Figura 6:</b> Atividade metabólica do biofilme conforme acesso das bactérias a nutrientes, oxigênio e água.....	30
<b>Figura 7:</b> Representação do diagrama de Jablonski.....	36
<b>Figura 8:</b> Estrutura química da ftalocianina.....	41
<b>Figura 9:</b> Estrutura química das metalo-ftalocianinas.....	41
<b>Figura 10:</b> Estrutura química da hipericina.....	42
<b>Figura 11:</b> Derivados mais hidrofílicos da <b>(a e b)</b> Ftalocianina de zinco e da <b>(c)</b> hipericina.....	43
<b>Figura 12:</b> Estrutura química da meglumina.....	44
<b>Figura 13:</b> Estrutura morfológica das bactérias: <b>(a)</b> Gram-positivas e <b>(b)</b> Gram-negativas.....	46
<b>Figura 14:</b> Espectro das fontes de luz empregadas: <b>(a)</b> LED vermelho e <b>(b)</b> LED amarelo.....	52
<b>Figura 15:</b> Curva de crescimento bacteriano.....	53
<b>Figura 16:</b> Curva analítica da absorvância em função da concentração da proteína BSA.....	55
<b>Figura 17:</b> Curva analítica da absorvância em função da concentração da goma de xantana.....	60

<b>Figura 18:</b> (a) Espectro de absorção e (b) fluorescência das ftalocianinas de zinco (5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS).....	63
<b>Figura 19:</b> (a) Espectro de absorção e (b) fluorescência das hipericinas (5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS).....	64
<b>Figura 20:</b> Espectro de absorção do ácido úrico na concentração de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em SDS 2% (m/v).....	65
<b>Figura 21:</b> Espectros de absorção do ácido úrico (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da (a) FcZn, (b) FcZnTc e (c) FcZnTcG, após diferentes tempos de irradiação com LED vermelho (630 nm).....	66
<b>Figura 22:</b> Espectros de absorção do ácido úrico (60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da (a) Hy e (b) HyG, após diferentes tempos de irradiação com LED amarelo (590 nm).....	67
<b>Figura 23:</b> Acumulação intracelular de FcZn, FcZnTc, FcZnTcG, Hy e HyG, nas diferentes etapas do biofilme de <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i> : (a) adesão reversível, (b) adesão irreversível, (c) biofilme maduro e (d) dispersão.....	75
<b>Figura 24:</b> Ilustração do ângulo de contato ( $\Theta$ ) entre a superfície do biofilme e a solução de FS: (a) representa uma interação hidrofílica ( $\Theta < 60^\circ$ ) e (b) representa uma interação hidrofóbica ( $\Theta > 60^\circ$ ).....	77
<b>Figura 25:</b> Fotografias dos ângulos de contato entre FcZnTcG e as diferentes etapas de formação do biofilme de <i>S. aureus</i> e <i>E.coli</i> , obtidas imediatamente (a) após a adição da gota e (b) depois de um determinado tempo de incubação.....	80
<b>Figura 26:</b> Índice de sobrevivência de <i>S. aureus</i> após 5 minutos de incubação com diferentes concentrações de Hy, HyG, FcZn, FcZnTc e FcZnTcG e irradiação nas doses de luz: (■) 0, (●) 3 e (▲) 6 $\text{J cm}^{-2}$ .....	82
<b>Figura 27:</b> Índice de sobrevivência de <i>S. aureus</i> e Vero após 5 minutos de incubação com diferentes concentrações dos FSs ((a) Hy e HyG, (b) FcZn, FcZnTc e FcZnTcG) e irradiação na dose de luz 6 $\text{J cm}^{-2}$ .....	84
<b>Figura 28:</b> Microscopia de fluorescência de (b) <i>S. aureus</i> e (d) Vero após 5 min de incubação com FcZnTcG na concentração de 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e dose de luz 6 $\text{J cm}^{-2}$ . Os controles de (a) <i>S. aureus</i> e (c) Vero estão também representados.....	85

**Figura 29:** Microscopia de fluorescência de *S. aureus* **(a)** antes e **(b)** após 5 min de incubação com FcZn na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $6 \text{ J cm}^{-2}$  .....86

**Figura 30:** Microscopia de fluorescência de *S. aureus* após 5 min de incubação com **(b)** Hy, **(c)** HyG e **(d)** FcZnTc na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $6 \text{ J cm}^{-2}$ . O controle de *S. aureus* **(a)** está também representado.....87

**Figura 31:** Índice de sobrevivência de células Vero e do biofilme de *S. aureus* nas diferentes etapas de formação do biofilme (**(a)** adesão reversível, **(b)** adesão irreversível, **(c)** biofilme maduro e **(d)** dispersão), após incubação com diferentes concentrações de Hy e HyG e irradiação com LED amarelo. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).....90

**Figura 32:** Índice de sobrevivência de células Vero e do biofilme de *S. aureus* nas diferentes etapas de formação do biofilme (**(a)** adesão reversível, **(b)** adesão irreversível, **(c)** biofilme maduro e **(d)** dispersão), após incubação com diferentes concentrações de FcZn, FcZnTc e FcZnTcG e irradiação com LED vermelho. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).....93

**Figura 33:** Concentração de EPS obtida nas diferentes etapas do biofilme de *S. aureus* (**(a)** adesão irreversível, **(b)** biofilme maduro e **(c)** dispersão) após incubação com diferentes concentrações dos FSs e irradiação. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).....96

**Figura 34:** **(b)** Biofilme de *S. aureus* (adesão reversível) e **(d)** as células epiteliais Vero após 30 minutos de incubação com FcZnTcG ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ . Os controles do biofilme de **(a)** *S. aureus* na etapa de adesão reversível e **(c)** Vero estão também ilustrados.....99

**Figura 35:** **(b)** Biofilme de *S. aureus* (adesão irreversível) e **(c)** as células epiteliais Vero após 35 minutos de incubação com FcZnTcG ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ . O controle do biofilme de *S. aureus* **(a)** na etapa de adesão irreversível está também ilustrado.....100

**Figura 36:** Biofilme de *S. aureus* nas etapas de **(b)** biofilme maduro e **(d)** dispersão após 45 minutos de incubação com HyG ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e dose de luz  $24 \text{ J cm}^{-2}$ . Seus respectivos controles estão representados pelas letras **(a)** e **(c)**. As células epiteliais Vero **(e)** nas mesmas condições de fotoinativação estão também representadas.....101

**Figura 37:** Índice de sobrevivência de *E. coli* após 10 minutos de incubação com diferentes concentrações de Hy, HyG FcZn, FcZnTc e FcZnTcG e irradiação nas doses de luz: (■) 0, (●) 3, (▲) 6 e (▼) 12 J cm<sup>-2</sup>.....103

**Figura 38:** Índice de sobrevivência de *E. coli* e Vero após 10 minutos de incubação com diferentes concentrações dos FSs ((a) Hy e HyG, (b) FcZn, FcZnTc e FcZnTcG) e irradiação na dose de luz 12 J cm<sup>-2</sup>.....105

**Figura 39:** Microscopia de fluorescência de (b) *E. coli* e (d) Vero após 10 min de incubação com FcZn na concentração de 10,0 µmol L<sup>-1</sup> e dose de luz 12 J cm<sup>-2</sup>. Os controles de (a) *E. coli* e (c) Vero estão também representados.....106

**Figura 40:** Microscopia de fluorescência de (b) *E. coli* e (d) Vero após 10 min de incubação com FcZnTcG na concentração de 10,0 µmol L<sup>-1</sup> e dose de luz 12 J cm<sup>-2</sup>. Os controles de (a) *E. coli* e (c) Vero estão também representados.....107

**Figura 41:** Microscopia de fluorescência de *E. coli* após 10 min de incubação com (b) Hy, (c) HyG e (d) FcZnTc na concentração de 10,0 µmol L<sup>-1</sup> e dose de luz 12 J cm<sup>-2</sup>. O controle de *E. coli* (a) está também representado.....108

**Figura: 42:** Índice de sobrevivência de células Vero e do biofilme de *E. coli* nas diferentes etapas de formação ((a) adesão reversível, (b) adesão irreversível, (c) biofilme maduro e (d) dispersão), após incubação com diferentes concentrações de Hy e HyG e irradiação com LED amarelo. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).....110

**Figura: 43:** Índice de sobrevivência de células Vero e do biofilme de *E. coli* nas diferentes etapas de formação ((a) adesão reversível, (b) adesão irreversível, (c) biofilme maduro e (d) dispersão), após incubação com diferentes concentrações de FcZn, FcZnTc e FcZnTcG, e irradiação com LED vermelho. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).....112

**Figura: 44:** Concentração de EPS obtida nas diferentes etapas do biofilme de *E. coli* ((a) adesão irreversível, (b) biofilme maduro e (c) dispersão) após incubação com diferentes concentrações dos FSs e irradiação. Tempo de incubação (TI) e Dose de luz (D).....114

**Figura 45:** Biofilme de *E. coli* nas etapas de (b) adesão reversível e (d) adesão irreversível após incubação com FcZnTcG e dose de luz 12 J cm<sup>-2</sup>. Seus respectivos controles estão representados pelas letras (a) e (c).....115

**Figura 46:** Biofilme de *E. coli* nas etapas de **(b)** biofilme maduro e **(d)** dispersão após 45 min de incubação com FcZnTcG ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e dose de luz  $24 \text{ J cm}^{-2}$ . Seus respectivos controles estão representados pelas letras **(a)** e **(c)**.....116

**Figura 47:** **(a)** Espectro de emissão da FcZn em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica da FcZn obtida a partir das intensidades de fluorescência em 680 nm.....132

**Figura 48:** **(a)** Espectro de emissão da FcZnTc em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica da FcZnTc obtida a partir das intensidades de fluorescência em 690 nm.....132

**Figura 49:** **(a)** Espectro de emissão da FcZnTcG em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica da FcZnTcG obtida a partir das intensidades de fluorescência em 690 nm.....133

**Figura 50:** **(a)** Espectro de emissão de Hy em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica de Hy obtida a partir das intensidades de fluorescência em 604 nm.....133

**Figura 51:** **(a)** Espectro de emissão de HyG em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica de HyG obtida a partir das intensidades de fluorescência em 604 nm.....134

## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Ocorrência mundial de MRSA adquiridas em meio hospitalar.....	23
<b>Tabela 2:</b> Efeito de diferentes métodos na inativação de biofilmes.....	31
<b>Tabela 3:</b> Estudos de fotoinativação microbiana.....	35
<b>Tabela 4:</b> Coeficientes de atividade fotodinâmica dos FSs.....	68
<b>Tabela 5:</b> Potencial zeta (mV) dos FSs em PBS.....	68
<b>Tabela 6:</b> Acumulação intracelular ( $\mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) de FcZn, FcZnTc e FcZnTcG nas bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> e nas células VERO, em função da concentração dos FSs e do tempo de incubação.....	71
<b>Tabela 7:</b> Acumulação intracelular ( $\mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) de Hy e HyG nas bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> e nas células VERO, em função da concentração dos FSs e do tempo de incubação.....	73
<b>Tabela 8:</b> Ângulo de contato obtido imediatamente após gotejamento das soluções de FSs sobre a superfície dos biofilmes bacterianos, nas diferentes etapas.....	78
<b>Tabela 9:</b> Ângulo de contato obtido após incubação das soluções de FSs com as superfícies dos biofilmes bacterianos, nas diferentes etapas.....	79

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1. Resistência microbiana.....	19
2.1.1. Biofilmes.....	25
<b>2.2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)</b> .....	34
2.2.1. Mecanismos da aPDT.....	36
2.2.2. Fotossensibilizadores.....	38
2.2.3. Problemas enfrentados pela aPDT.....	44
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	47
3.1. Objetivo geral.....	47
3.2. Objetivos específicos.....	47
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
4.1. Fotossensibilizadores.....	49
4.1.1. Medidas de absorção ótica (UV) e fluorescência.....	49
4.1.2. Foto-oxidação do ácido úrico.....	49
4.1.3. Potencial zeta.....	50
4.2. Fonte de luz.....	51
4.3. Microrganismos.....	52
4.3.1. Preparo da suspensão celular.....	52
4.3.2. Formação dos biofilmes bacterianos.....	53
4.4. Célula epitelial.....	54
4.4.1. Cultura celular.....	54
4.5. Ensaio de acumulação dos fotossensibilizadores.....	54
4.5.1. Microrganismos.....	55

4.5.2. Célula epitelial (VERO).....	56
4.6. Ângulo de contato.....	57
4.7. Ensaio de fotoinativação.....	58
4.7.1. Microrganismos.....	58
4.7.2. Célula epitelial (VERO).....	60
4.8. Determinação morfológica.....	61
4.8.1. Microscopia de fluorescência.....	61
4.8.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	62
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>63</b>
5.1. Fotossensibilizadores.....	63
5.1.1. Medidas de absorção ótica (UV-Vis) e fluorescência.....	63
5.1.2. Atividade Fotodinâmica dos fotossensibilizadores.....	64
5.1.3. Potencial zeta.....	68
5.2. Ensaio de acumulação dos fotossensibilizadores.....	69
5.2.1. Células planctônicas.....	69
5.2.2. Biofilmes.....	74
5.3. Ângulo de contato.....	77
5.4. Ensaio de Fotoinativação.....	80
5.4.1. Fotoinativação seletiva de <i>S. aureus</i> .....	80
5.4.1.1. Células planctônicas.....	80
5.4.1.2. Biofilme.....	89
5.4.2. Fotoinativação seletiva de <i>E. coli</i> .....	102
5.4.2.1. Células planctônicas.....	102
5.4.2.2. Biofilme.....	109
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>117</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>132</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento da resistência bacteriana é considerado um problema de saúde pública mundial que atinge principalmente os países de terceiro mundo. Dentre as espécies de bactérias resistentes se destacam os *Staphylococcus* e as *Enterobacteriaceae*, que apresentam cepas multi-resistentes como a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* [1].

O aumento do número de bactérias resistentes é impulsionado pelo uso indiscriminado e inadequado dos antibióticos, promovendo uma disseminação de infecções, principalmente nos hospitais, o que provocou o aumento do tempo de internação, o custo do tratamento, a redução do arsenal terapêutico e/ou, ainda, o aumento no número de óbitos dos pacientes. Diante disso, estratégias como o desenvolvimento de novas drogas têm sido propostas na tentativa de inibir a disseminação destes microrganismos. No entanto, há dois pontos importantes relacionados a essas estratégias: i) as novas drogas geralmente são prejudiciais às células do hospedeiro [2] e ii) as bactérias apresentam diferentes mecanismos de resistência contra estas estratégias, podendo-se destacar a formação de biofilme bacteriano [3].

O biofilme é uma comunidade microbiana envolta por uma matriz extracelular de polissacarídeos (EPS), aderidos entre si sobre um substrato (biótico ou abiótico). Atualmente, os biofilmes são responsáveis por aproximadamente 80% das infecções microbianas no corpo como: infecções do trato urinário, infecções do ouvido médio, gengivite, cárie, periodontite, algumas infecções gastrointestinais, infecções em cateteres e implantes ortopédicos, entre outras [4, 5].

Diante disso a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês antimicrobial photodynamic therapy) se apresenta como uma alternativa para reduzir o uso abusivo de antibióticos e, como consequência, diminuir o desenvolvimento da resistência microbiana. Essa técnica se baseia na combinação sinérgica de um fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz visível de comprimento de onda adequado que produz espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez causam oxidação dos componentes da célula levando-a à morte [6]. Duas são as vantagens que esta terapia apresenta em relação aos antibióticos: **i)** possibilidade do desenvolvimento de protocolos que conduzam a uma extensa redução dos microrganismos com dano muito limitado ao tecido hospedeiro e o **ii)** não

desenvolvimento de resistência microbiana ao tratamento devido ao grande número de alvos possíveis que as EROs podem atingir [7].

Os FSs são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz na região do visível [8]. Quando o FS é exposto à radiação em comprimento de onda apropriado, passa para o estado excitado levando a uma série de transferências moleculares de energia formando EROs [9]. No entanto, FSs hidrofóbicos sofrem agregação em meio aquoso diminuindo sua capacidade absorver energia luminosa e de produzir EROs, levando assim à redução da eficiência da aPDT [10-12]. Outro fato importante relacionado à hidrofobicidade dos FSs é o fato desta característica diminuir a acumulação destes compostos dentro das células microbianas, principalmente das bactérias Gram-negativas e dos biofilmes que apresentam uma complexa estrutura morfológica [4, 13].

A hipericina e a ftalocianina apesar de serem FSs hidrofóbicos apresentam uma alta atividade fotodinâmica. A hipericina (Hy) é um pigmento natural fotoativo presente em plantas do gênero *Hypericum*, que apresenta propriedades importantes enquanto um FS, podendo-se destacar o elevado rendimento quântico de geração de oxigênio singlete e uma baixa toxicidade no escuro [12]. A ftalocianina é um composto orgânico que apresenta alta seletividade, baixa fototoxicidade e que promove uma apreciável quantidade de EROs capazes de permanecer no estado excitado tripleto por um período de tempo mais longo [14].

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi encontrar parâmetros adequados para inativar seletivamente as bactérias *E. coli* e *S.aureus* em cultura planctônica e em biofilme utilizando novos FSs que foram sintetizados com o propósito de serem mais hidrossolúveis. Esses novos FSs são derivados da hipericina e da ftalocianina de zinco, que para se tornarem mais hidrofílicos foram inseridos grupo carboxílicos e a meglumina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Resistência microbiana

Os antibióticos têm sido usados no tratamento de doenças infecciosas desde 1940, quando um grupo de cientistas na Universidade de Oxford obteve sucesso com o primeiro teste clínico da penicilina. Entretanto, a utilização generalizada e, muitas vezes indiscriminada desses antibióticos, gerou o seu próprio conjunto de problemas como: **1)** aumento da morbidade e mortalidade, ou seja, ocorreu um elevado índice de mortalidade da população mundial (~ 45%) relacionado às infecções causadas por microrganismos multi-resistentes; **2)** alteração na composição dos antimicrobianos que se tornam mais tóxicos para inativar os microrganismos resistentes e acabam afetando as células dos hospedeiros; **3)** longos períodos de internação de pacientes com infecções e o aumento nos custos hospitalares e da saúde pública [15, 16].

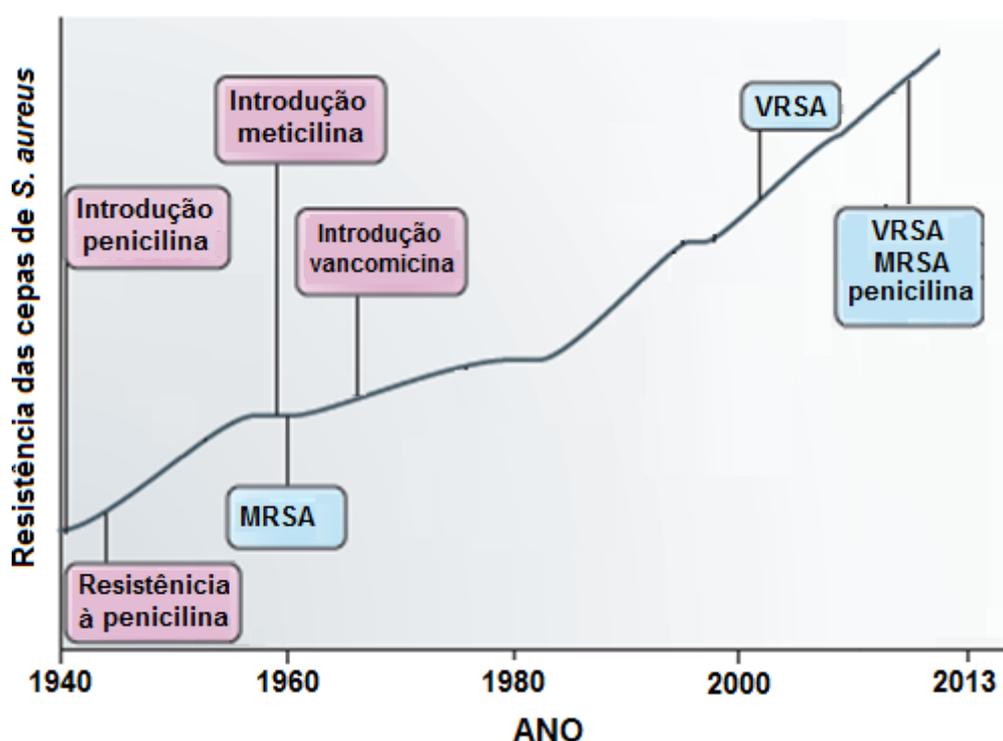
Esses problemas estão diretamente relacionados à resistência bacteriana aos antimicrobianos, a qual tem ocorrido devido a uma série de fatores: **(i)** prescrição inapropriada ou excessiva de antimicrobianos, adição generalizada de antibióticos às rações administradas aos animais, **(ii)** alta taxa de transmissão de microrganismos pelo aumento das viagens globalizadas, **(iii)** crescimento da pobreza nos países do terceiro mundo e **(iv)** ampla variedade de mecanismos de adaptação das células microbianas [3, 8, 17-20].

Basicamente, a resistência microbiana refere-se aos microrganismos resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos. Sob a perspectiva laboratorial, entende-se por resistência o crescimento de um microrganismo *in vitro* na presença de concentrações séricas de antimicrobianos, ou quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas que normalmente interfeririam em suas funções de crescimento e às quais seriam habitualmente sensíveis [21].

Uma das primeiras descrições do aparecimento da resistência microbiana ocorreu logo após o uso difundido da penicilina, antibiótico descoberto em 1929 por Alexander Fleming, que observou a inibição de estafilococos em uma placa de ágar contaminado pelo fungo *Penicillium*. Em meados dos anos de 1950, foram encontrados os primeiros registros de surtos por *S. aureus* resistentes à penicilina em ambiente hospitalar, fato consolidado quando na década de 1960 surgiu o primeiro caso de resistência às recém-descobertas penicilinas beta-lactâmicas, como a meticilina, reconhecendo-se, então, no final da década de 1970, as cepas de

*S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês methicillin-resistant *S. aureus*) como uma pandemia [20, 22]. Hoje, mais de 95% dos isolados de *S. aureus* de todo o mundo são resistentes a diversos antibióticos tais como a penicilina, ampicilina, meticilina e até mesmo a vancomicina (VRSA, do inglês vancomycin-resistant *S. aureus*) um antibiótico de última geração utilizado contra infecções causadas por bactérias Gram-positivas (Figura 1) [3, 23-25].

**Figura 1:** Cronologia do aparecimento das cepas de *S. aureus* resistentes a diferentes antibióticos (adaptado de Chambers e DeLeo, 2009) [26].

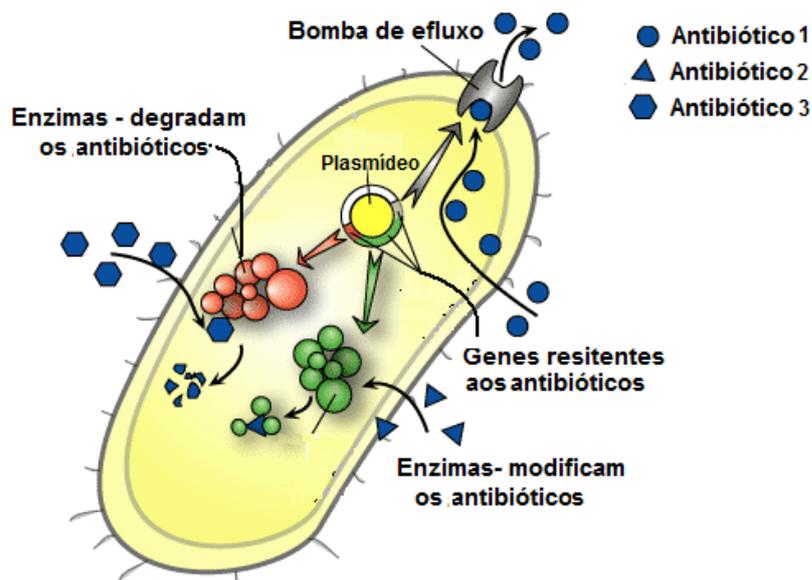


Com o passar do tempo o uso intensivo dos antimicrobianos provocou o aparecimento de outros microrganismos resistentes tais como: **(i)** bactérias Gram-positivas como os enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês vancomycin-resistant enterococos) e estirpes multi-resistentes de pneumococos; **(ii)** bactérias Gram-negativas como as produtoras de enzimas que promovem a transferência de agrupamentos químicos conhecidos como beta-lactamases que clivam anéis beta-lactâmicos de penicilinas e cefalosporinas e as multi-resistentes como os meningococos com susceptibilidade diminuída à penicilina; **(iii)** *C. albicans*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros [17, 27].

Esse surgimento se deve à capacidade dos microrganismos, em especial as bactérias, de transmitir genes entre populações de uma mesma espécie ou até de espécies diferentes [3, 28, 29]. A resistência hereditária às drogas é frequentemente carregada pelos plasmídeos (moléculas circulares duplas de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico), ou por pequenos segmentos de DNA denominados transposons que podem se transpor de uma região do DNA para outra. Portanto, alguns plasmídeos, incluindo aqueles denominados fatores de resistência (R), podem ser transferidos entre células microbianas em uma população e entre populações microbianas diferentes, mas estreitamente relacionadas. Os fatores R frequentemente contêm genes para a resistência a muitos antimicrobianos [2, 28].

Outros mecanismos vêm sendo propostos com relação à resistência microbiana, podendo-se destacar a inativação do antimicrobiano pela destruição ou modificação do mesmo; alteração do local de ação do antimicrobiano; diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano por impermeabilização da membrana celular ou devido às bombas de efluxo presentes nos microrganismos (Figura 2) [3, 19, 30].

**Figura 2:** Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos (adaptado de Todar, 2011) [31].



Nesse trabalho focamos os estudos com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, uma vez que apresentam maior índice de resistência aos antibióticos e alto fator de patogenicidade, em especial a *S. aureus*.

### ***Staphylococcus aureus***

Os estafilococos são bactérias cocos Gram-positivas encontradas com relativa frequência na microbiota normal do corpo humano. Apesar disso, esses microrganismos podem ser patogênicos causando uma variedade de síndromes. Dentre os estafilococos se destaca a *S. aureus*, pois atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade [32].

Uma propriedade biológica fundamental de *S. aureus* é a sua capacidade de colonizar assintomaticamente indivíduos saudáveis, por exemplo, cerca de 30% dos seres humanos são hospedeiros-nasais assintomáticos de *S. aureus* [33]. Esses portadores assintomáticos são presumivelmente uma fonte importante das estirpes de *S. aureus* que se espalham entre os indivíduos, o que torna essa bactéria um patógeno oportunista. O principal modo de transmissão de *S. aureus* é por contato direto, geralmente o contato pele-a-pele. Vários fatores do hospedeiro podem predispor indivíduos à infecção, incluindo a perda da normalidade da barreira

constituída pela pele, a presença de doenças de base tais como a diabetes ou AIDS e defeitos na função de neutrófilos [26].

A importância clínica dessa bactéria tem crescido ao longo dos anos, particularmente, devido ao aumento na ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por cepas multiresistentes [34]. As infecções hospitalares causadas por *S. aureus* incluem as que afetam a corrente sanguínea, o trato respiratório inferior, pele e tecidos moles, bem como podem estar associadas ao cateter venoso central levando a uma bacteremia. Esta situação tem sido agravada pelo aumento da incidência de estirpes que sejam menos susceptíveis a uma variedade de antibióticos, tornando o tratamento destas infecções mais difícil [35].

Infecções causadas por estirpes de *S. aureus* resistentes a antibiótico atingiram proporções epidêmicas globais. A carga global da doença estafilocócica, especialmente doenças causadas por MRSA, está aumentando em muitos países (Tabela 1). Dados do *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS), do *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos mostraram que, desde 1999, a proporção de MRSA ultrapassa 50% entre os pacientes em UTI. No Brasil, os índices de cepas MRSA são também bastante elevados (40% a 80%), principalmente em UTIs [36].

**Tabela 1:** Ocorrência mundial de MRSA adquiridas em meio hospitalar (adaptado de Xia e colaboradores, 2013) [36].

Incidência	Leste da Ásia	Sudeste da Ásia	Oeste da Europa	Norte da Europa	América do Norte	América do Sul	Austrália	África
>50%								
25-50%								
10-25%								
<10%								

Os mecanismos de resistência de *S. aureus* são classificados em duas categorias: **(i)** mutação de um gene bacteriano no cromossoma e **(ii)** aquisição de genes de resistência de outros organismos que podem ocorrer por conjugação, transdução ou transformação [32].

### ***Escherichia coli***

A *E. coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa geralmente encontrada no trato intestinal de indivíduos saudáveis, no entanto, em pacientes imunossuprimidos ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, essas bactérias podem causar doenças infecciosas como a gastroenterite, podendo ocorrer disseminação e colonização em outros nichos, incluindo sangue, sistema nervoso central e trato urinário, resultando em doenças graves [1, 37, 38]. Os primeiros estudos epidemiológicos relacionando esse microrganismo foram publicados na Alemanha nas décadas de 1920 e 1930 envolvendo surtos de diarreias [39].

Atualmente, *E. coli* é considerado o exemplo mais significativo de bactéria Gram-negativa relacionada com diversas doenças devido aos seus mecanismos de patogenicidade que são determinados pela habilidade de colonização do hospedeiro, potencial de penetração em superfícies mucosas, invasão e multiplicação nos tecidos além da capacidade de inibir os mecanismos de defesa locais ou sistêmicos do hospedeiro [40, 41]. *E. coli* é a segunda fonte mais comum de infecção cujos pacientes requerem hospitalização (17,3%), ficando atrás somente de *S. aureus* (18,8%) [42].

O aparecimento de cepas de *E. coli* multirresistentes tem emergido rapidamente devido a sua grande distribuição ambiental e propensão a albergar elementos genéticos móveis, em especial os plasmídeos [43]. Essa resistência tem ocorrido, principalmente, em relação a novos compostos como fluoroquinolonas e certas cefalosporinas. Surpreendentemente, a maioria dessas estirpes resistentes é adquirida em áreas hospitalares [44].

Portanto, é possível observar que embora a comunidade científica tenha bastante conhecimento a respeito dos microrganismos resistentes, a descoberta de novos antimicrobianos tem atingido sucesso limitado, pois desde 1970 não há o desenvolvimento de nenhuma nova classe de antimicrobianos para combater as doenças infecciosas. Atualmente o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano tem sido acompanhado pelo aparecimento da resistência de uma ou mais espécies microbianas [45, 46].

Estudos recentes apontam que a descoberta de novas drogas levará mais de uma década para alcançar a possibilidade de uso clínico [30, 46, 47]. Como resultado, hoje existe um grande número de pacientes com infecções para as quais não existe tratamento eficaz e quando existe, se restringe a um número restrito de

pessoas devido ao alto custo da droga [16, 47]. O desenvolvimento de novos antibióticos deve ser continuado, entretanto, a experiência das décadas passadas tem mostrado que novos antibióticos podem ser efetivos somente por um período de tempo restrito, ou seja, a resistência microbiana será desenvolvida cedo ou tarde para cada nova droga. Isso torna difícil o controle e tratamento das infecções e realça a necessidade de estratégias eficazes para o seu controle e prevenção.

### **2.1.1. Biofilmes**

Outro ponto importante relacionado à resistência microbiana aos antimicrobianos são os biofilmes, os quais necessitam urgentemente de novas estratégias para o seu controle e prevenção. Estima-se que o biofilme é responsável por cerca de 80% das infecções em diferentes partes do corpo como: infecções pulmonares de pacientes com fibrose cística, uretrite, conjuntivite, otite, infecções por cateteres, infecções do ouvido médio, gengivite, cárie, periodontite, implantes ortopédicos e assim por diante [5]. Pode-se destacar as infecções crônicas em feridas que geralmente têm sido associadas aos biofilmes uma vez que os microrganismos utilizam as condições da ferida para se aderir, colonizar e multiplicar. Acredita-se que de 65% a 80% dessas feridas devam a sua cronicidade e complicações infecciosas à formação de biofilmes [48]. Esse fato foi evidenciado por James e colaboradores, que após realizar biópsias de feridas crônicas e analisar por microscopia eletrônica de varredura puderam notar a presença de biofilmes [48].

As células de biofilmes microbianos têm propriedades e padrões de expressão gênica distintos das células planctônicas, que incluem variações fenotípicas da atividade enzimática, diferenças na composição da parede celular e da estrutura da superfície, dentre outras [4]. Estas características promovem o aumento da resistência dos biofilmes aos antimicrobianos, impedem o acesso das células do hospedeiro ao microrganismo bem como alteram o metabolismo do paciente [49, 50]. Dentre todos os microrganismos as bactérias se destacam como excelentes produtoras de biofilme, uma vez que apresentam características como tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante [51].

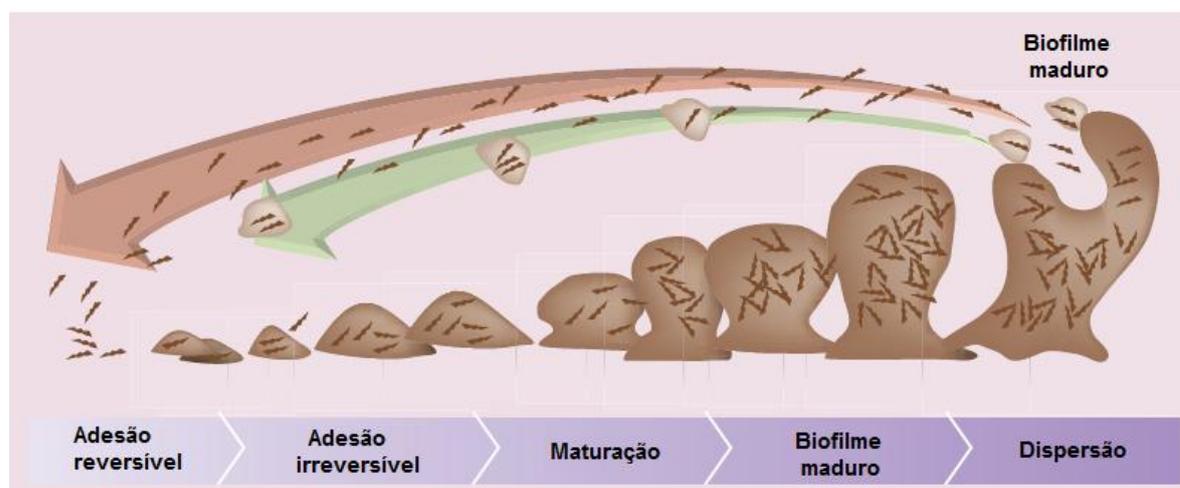
Basicamente o biofilme é definido como uma comunidade estruturada de microrganismos que produz uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) permitindo a

adesão e desenvolvimento dos mesmos sobre superfícies vivas ou inertes [4]. A formação do biofilme envolve a presença de um substrato favorável, a deposição celular, adsorção celular, dessorção de células ligadas reversivelmente, adsorção irreversível de outras células, sinalização célula-célula (quorum-sensing), a produção de exopolímeros, transporte de oxigênio e nutrientes para biofilme, efluxo de substâncias metabolizadas, crescimento celular e dispersão de partes do biofilme [52]. Todo esse processo de formação está diretamente relacionado com o mecanismo de resistência dos microrganismos.

### ***Correlação entre a formação e os mecanismos de resistência dos biofilmes***

Embora a estrutura e função dos biofilmes variem conforme o tipo de microrganismo, muitos passos de processo de formação são semelhantes. Geralmente o desenvolvimento do biofilme é devido em cinco etapas: **(i)** adesão reversível, **(ii)** adesão irreversível, **(iii)** maturação, **(iv)** biofilme maduro e **(v)** dispersão (Figura 3) [4].

**Figura 3:** Etapas de formação do biofilme (adaptado de Melo e colaboradores, 2013) [4].



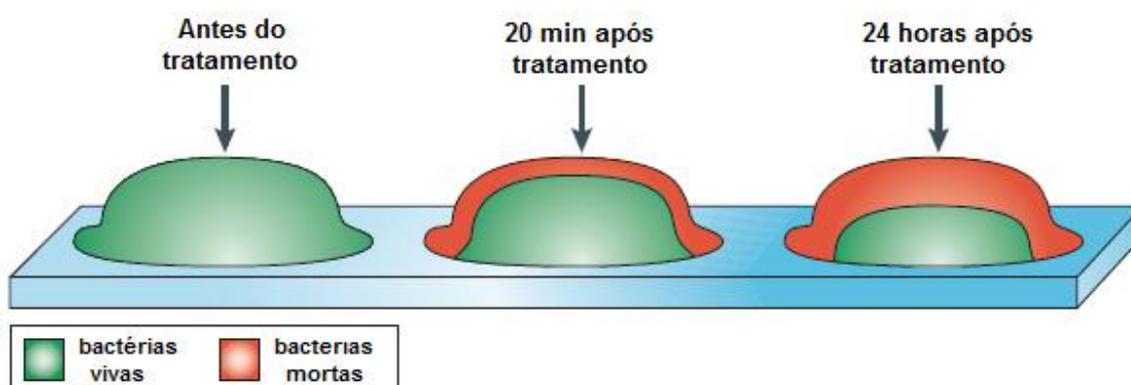
O conhecimento destes processos ajuda a compreender os mecanismos de resistência aos biofilmes de modo a criar estratégias para prevenir e/ou controlar o desenvolvimento dessa comunidade microbiana. A velocidade em que ocorre a formação inicial do biofilme depende da concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso que entre em contato com a superfície sólida, da afinidade das moléculas para com o suporte e das condições hidrodinâmicas do meio líquido, sendo de extrema importância para a adesão das moléculas orgânicas as características da superfície do suporte (carga superficial, energia livre de superfície, rugosidade da superfície) [53].

A primeira etapa de desenvolvimento do biofilme envolve a adesão reversível das células planctônicas sobre a superfície de um biomaterial ou de uma célula hospedeira [51, 54]. Neste estágio ocorre a interação de longo ou curto alcance entre a matriz extracelular (ECM) dos microrganismos e as superfícies bióticas ou abióticas [55]. Interações de longo alcance envolvem forças de van der Waals e forças eletrostáticas [49, 55] enquanto que as interações de curto alcance incluem ligações de hidrogênio e ligações covalentes. Nesta fase, as células são ainda susceptíveis a agentes antimicrobianos [56].

Subsequentemente ocorre a segunda etapa, na qual os microrganismos passam a se aderir irreversivelmente às superfícies bem como começam a secretar EPS [57]. Essa adesão geralmente ocorre através das capsulas e fimbrias que atuam como adesinas ligando o microrganismo à superfície por meio de interações

eletrostáticas e/ou ligante-receptor [58]. A produção de EPS nesta etapa promove o início da formação da matriz extracelular que além de ser composta por polissacarídeos, também compreende uma grande variedade de proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, lípidos, fibras amilóides, substâncias húmicas e, em alguns casos, quantidades surpreendentes de ADN extracelular (e-DNA) [5]. Alguns autores afirmam que o EPS representa o primeiro mecanismo de resistência dos biofilmes, pois atua como um fator de virulência promovendo maior resistência aos antimicrobianos e maior proteção contra a resposta imune do hospedeiro e, portanto, contribui para a vitalidade dos microrganismos [31, 56, 59, 60]. Isso ocorre devido ao EPS agir como um adsorvente ou reagente, reduzindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com o biofilme, bem como sua estrutura morfológica impede a penetração de 100% dos antibióticos conforme pode ser observado na figura 4 [59]. Outro ponto importante é o fato de que a agregação de microrganismos protegida pelo EPS torna-os menos susceptível à fagocitose e impede que os anticorpos do sistema imune possam efetivamente inativá-los [61].

**Figura 4:** Tempo de ação do antibiótico no biofilme bacteriano (adaptado de Davies, 2003) [59].

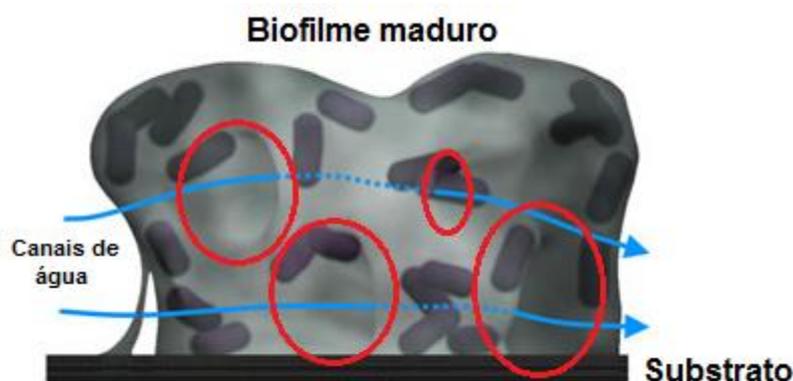


Após a adesão irreversível começa a etapa de maturação, na qual é possível se observar o aumento da ECM que circunda as microcolônias devido à continuada secreção de EPS [15, 62]. Esse estágio é controlado pelo quorum-sensing (QS), que caracteriza-se por um sistema de comunicação intra e interespecies de microrganismos, baseado na emissão de estímulos e respostas dependentes da densidade populacional. Este tipo de interação reflete o comportamento dos microrganismos, demonstrando a capacidade de habitar ambientes diversos, captar

as informações de seu meio, comunicar-se com diferentes espécies, monitorar sua densidade populacional e principalmente regular a sua expressão gênica, controlando a formação do biofilme [63-65]. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam sistemas de comunicação diferenciados para regular as diversas funções fisiológicas. Em geral, as bactérias Gram-positivas usam oligopeptídeos para se comunicar e as bactérias Gram-negativas usam como autoindutores as acil-homoserina lactonas (AHLs – um anel de homoserina lactona que, através de uma ligação amida, liga-se a um grupamento acil, que varia conforme a espécie bacteriana considerada) [66-68].

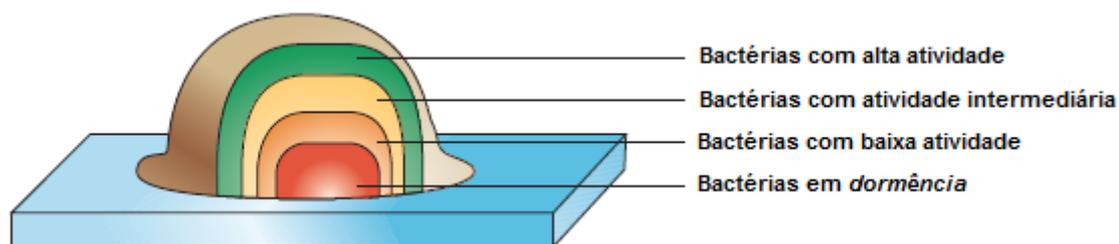
No quarto estágio o biofilme está totalmente formado, podendo-se observar canais aquosos (Figura 5) que permitem o transporte de água, nutrientes e metabólitos, a passagem de células planctônicas, bem como a remoção de metabólitos potencialmente tóxicos [54, 69, 70]. No entanto, devido à heterogeneidade do biofilme essas cavidades não atingem a camada mais profunda do mesmo, promovendo o estado de dormência nas células que se dividem infreqüentemente. Este estado de dormência é considerado outro mecanismo de resistência, uma vez que a maioria dos antibióticos reconhece e se liga às células com rápida divisão celular, como os microrganismos.

**Figura 5:** Canais aquosos no biofilme (adaptado de Costerton e colaboradores, 1995) [42, 69].



Os biofilmes são, de um modo geral, heterogêneos, contendo mais do que um microambiente distinto. Assim, em um mesmo biofilme podem ser encontrados microrganismos com diferentes atividades metabólicas que são influenciadas pelo acesso das células aos nutrientes, oxigênio e água (Figura 6).

**Figura 6:** Atividade metabólica do biofilme conforme acesso das bactérias a nutrientes, oxigênio e água (adaptado de Davies, 2003) [59].



A última etapa envolve o processo de dispersão/desprendimento de partes do biofilme que muitas vezes contribui para expandir a infecção, uma vez que células microbianas são liberadas e podem colonizar outras partes do corpo e/ou promover uma disseminação pela corrente sanguínea provocando uma sepse e até a morte no paciente. Apesar disso, geralmente os microrganismos liberados são similares às células planctônicas, o que favorece a ação de antimicrobianos. Essa etapa pode ocorrer de duas maneiras: por fenômenos de erosão superficial e ou por descolamento (“sloughing off”) [15]. A erosão consiste na perda contínua de porções de biofilme causada pelas alterações ambientais. A taxa de remoção do biofilme aumenta à medida que o biofilme vai se desenvolvendo. O “sloughing off” acontece quando há destacamento de grandes porções de biofilme como resultado da alteração de certas condições dentro do próprio biofilme [60, 61]. As próprias células englobadas no biofilme podem provocar o seu desprendimento pela segregação e excreção de enzimas que podem levar à quebra das ligações da matriz polimérica [71].

### ***Estratégias para inativar os biofilmes***

Diante da diversidade, flexibilidade e resistência dessas comunidades microbianas, várias estratégias vem sendo propostas. Geralmente estas estratégias visam prevenir a adesão bacteriana, romper a matriz extracelular e impedir o QS (Tabela 2).

**Tabela 2:** Efeito de diferentes métodos na inativação de biofilmes.

<i>Alvo do biofilme</i>	<i>Método</i>	<i>Microrganismo</i>	<i>Redução biofilme microbiano UFC (log<sub>10</sub>)</i>	<i>Referências</i>
<b>Adesão</b>	Plasma	<i>E. coli</i>	4.00	[72]
		<i>P. aeruginosa</i>	7.00	[72]
	Photo-grafting	<i>S. aureus</i>	6.00	[73]
		<i>C. albicans</i>	6.44	[74]
		<i>E. coli</i>	5.00	[75]
<b>Quorum sensing</b>	Furanonas	<i>S. epidermidis</i>	4.76	[76]
		<i>P. aeruginosa</i>	4.80	[77]
	RNA III	<i>S. aureus</i>	4.52	[78]
		<i>S. aureus</i>	4.50	[79]
		<i>S. epidermidis</i>	6.20	[80]
		<i>P. aeruginosa</i>	6.02	[81]
		<i>K. pneumonia</i>	3.9	[81]
		<i>E. coli</i>	4.27	[81]
		<i>E. coli</i>	5.78	[82]
		<i>A. baumannii</i>	5.29	[83]
<b>Matriz EPS</b>	<i>H. influenzae</i>	5.00	[83]	
	<i>K. pneumoniae</i>	5.21	[83]	
	<i>E. coli</i>	5.13	[83]	
	<i>P. aeruginosa</i>	5.10	[83]	
	<i>S. aureus</i>	4.92	[83]	
	<i>V. cholerae</i>	5.11	[84]	
	<i>S. aureus</i>	4.27	[84]	
	<i>P. aeruginosa</i>	4.34	[84]	

Como já mencionado a superfície dos biomateriais influencia diretamente na adesão microbiana, podendo-se destacar que características como rugosidade,

energia livre e a composição química dessa superfície determina o tipo de biofilme a ser formado. Assim, a modificação da superfície dos biomateriais é um dos principais métodos utilizados para reduzir a força de atração entre os microrganismos e os dispositivos médicos, e então impedir a adesão microbiana aos mesmos [61, 85].

Atualmente os principais meios de realizar essas modificações são por métodos físico-químicos para obter biomateriais anti-adesivos, e pela incorporação de agentes antimicrobianos aos dispositivos para impedir a colonização e proliferação microbiana sobre os biomateriais [86]. Os métodos físico-químicos promovem alterações de hidrofiliabilidade, tensão e energia na superfície do dispositivo, o que reduz a adsorção bacteriana bem como aumenta a atração e retenção dos antibióticos na superfície do material [87].

O tratamento por plasma é um método físico no qual a superfície do material é exposta à descarga luminescente sobre baixa pressão permitindo modificar o biomaterial sem alterar a composição e a estrutura do mesmo, com custo relativamente baixo [88]. Outra técnica importante é a implantação iônica que é caracterizada pela transferência de massa por meio do bombardeamento de um material com átomos ou moléculas ionizadas com energia suficiente para penetrar a camada mais profunda do material alvo. Resumidamente, é um processo em que os íons são acelerados em direção a uma superfície alvo na presença de vácuo. Esses íons formam um feixe energético de uma determinada espécie química que é incidida à superfície do material alvo. Esta técnica tem como vantagem o melhoramento das propriedades como corrosão, atrito, fricção e desgaste, e no caso da adesão microbiana é interessante, pois geralmente é realizada a deposição da prata a qual já é conhecida por ter um efeito bactericida [88]. Segundo Matsumura e colaboradores, os íons  $\text{Ag}^{+1}$  são capazes de interagir com os grupos tióis de proteínas resultando na inativação de enzimas regulatórias do metabolismo microbiano [89]. Além disso, esses íons impedem a replicação do DNA e afetam a estrutura e permeabilidade da membrana celular [90]. O “photo-grafting” é também um processo físico-químico que promove a incorporação covalente de aditivos na superfície de biomateriais poliméricos através de mecanismos de luz-induzida. Assim, elétrons de alta energia como raios gamma e luz UV são irradiados sobre os biomateriais afetando a adesão celular dos microrganismos bem como aumentando a hemocompatibilidade do material [91, 92].

Devido à alta participação do QS para a formação e regulação do biofilme, o controle deste mecanismo tornou-se um alvo atraente e promissor para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas [68]. Pesquisas visam o desenvolvimento de compostos análogos ou antagonistas ou até mesmo enzimas capazes de degradar moléculas sinalizadoras do sistema QS, levando à alteração significativa dos fenótipos regulados por este mecanismo, como por exemplo, o controle da multiplicação de microrganismos ou até mesmo a inibição dos mecanismos de virulência de bactérias presentes em diferentes ambientes [93].

Até o momento as furanonas e o RNA III são os principais candidatos relatados com inibidores de QS [50]. As furanonas são análogas de homoserina lactonas que atuam no sistema de QS, interferindo no crescimento de biofilmes e também aumentando a susceptibilidade a agentes antimicrobianos [94, 95]. O RNA III regula a produção de toxinas após a fase exponencial de crescimento bacteriano, reprimindo a virulência e formação de biofilme dos microrganismos [78, 80].

Conforme salientado anteriormente, o EPS se apresenta como um importante mecanismo de defesa dos biofilmes, impedindo ou dificultando a ação de antimicrobianos. Assim, algumas técnicas como campos bioelétricos [96] e ultrassom [97] têm sido utilizadas para romper o EPS e permitir a penetração dos antimicrobianos. O uso de enzimas como DNase I [83, 98] e alfa-amilase [99] também inativam o biofilme uma vez que degradam substâncias presentes no EPS [62].

Apesar da variedade de métodos disponíveis para inibir o biofilme, estes apresentam algum tipo de desvantagem como, o possível aparecimento de cepas resistentes devido à especificidade das técnicas e a falta de seletividade destes métodos que geralmente provocam dano às células do hospedeiro. Diante disso, novas técnicas têm sido necessárias para inibir seletivamente o biofilme microbiano e diminuir o uso abusivo de antimicrobianos. A terapia fotodinâmica antimicrobiana, é uma alternativa promissora, principalmente, para o tratamento de infecções localizadas, uma vez que apresenta como principal vantagem o não desenvolvimento de resistência ao tratamento pelos microrganismos, devido à multiplicidade de alvos possíveis.

## 2.2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

A Terapia Fotodinâmica é uma modalidade relativamente nova para o tratamento de câncer e vem se destacando em relação às terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), pois diferentemente dessas terapias não apresenta graves efeitos colaterais e nem possui eficiência limitada [10]. Essa terapia visa à destruição localizada do tecido vivo com crescimento anormal mediante sua necrose ou apoptose [100]. Portanto, outras moléstias tais como infecções bacterianas, fúngicas e virais, que têm como característica comum multiplicação desordenada de células, podem ser tratadas pela terapia fotodinâmica, chamada nesse caso de terapia fotodinâmica antimicrobiana [6, 101-103].

A aPDT se baseia na combinação de um FS com luz visível de comprimento de onda adequado, que na presença do oxigênio encontrado nas células é *ativado*, podendo promover uma resposta fototóxica, normalmente oxidativa, que é capaz de danificar biomoléculas e estruturas celulares e assim provocar a morte dos microrganismos [7]. Até o momento há dois tipos de mecanismos descritos na literatura que justifiquem o efeito fotodinâmico desta terapia, designados como Tipo I e Tipo II. No mecanismo Tipo I o FS ativado pode reagir com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais livres como hidroxila ( $\cdot OH$ ) e superóxido ( $\cdot O_2^-$ ); e no mecanismo Tipo II o FS ativado reage com moléculas vizinhas por transferência de energia ao oxigênio induzindo a produção do oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) [4].

A aPDT apresenta vantagens em relação aos antimicrobianos, podendo-se destacar: largo espectro de ação, visto que o FS pode agir sobre bactérias, fungos, vírus e protozoários; eficácia, independente das cepas microbianas serem resistentes a antibióticos; possibilidade do desenvolvimento de protocolos que conduzam a uma extensa redução dos microrganismos com dano muito limitado ao tecido hospedeiro; falta de seleção de cepas fotoresistentes após múltiplos tratamentos; baixa probabilidade de promover mutagenicidade; disponibilidade de formulações que permitam uma pronta e específica liberação do FS na área infectada e uso de uma fonte de luz de baixo custo para a ativação do agente FS [8, 101]. Essas vantagens podem ser observadas em resultados obtidos por alguns autores quando realizaram fotoinativação de microrganismos *in vitro* e *in vivo* (Tabela 3).

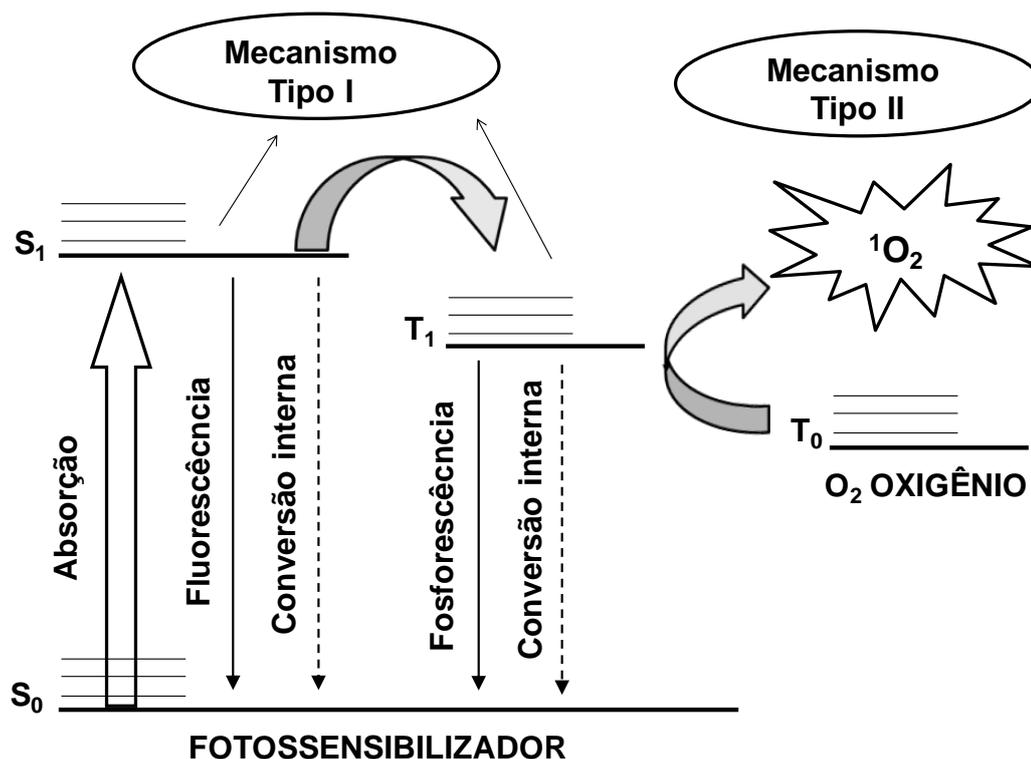
**Tabela 3:** Estudos de fotoinativação microbiana

<b><i>Microrganismo</i></b>	<b><i>FS</i></b>	<b><i>Redução microbiana UFC (log<sub>10</sub>)</i></b>	<b><i>Referências</i></b>
<i>S. aureus</i>	Azul de metileno ( <i>in vitro</i> )	3,29	[104]
	Azul de toluidina ( <i>in vitro</i> )	5,0	[105]
	Hipericina ( <i>in vitro</i> )	5,0	[106]
	Clorina e6 ( <i>in vivo</i> )	2,6	[107]
	Ftalocianina de zinco ( <i>in vitro</i> )	4,6	[108]
<i>E. coli</i>	Clorina pLe6 ( <i>in vivo</i> )	6,0	[109]
	Azul de metileno ( <i>in vitro</i> )	4,1	[110]
	Azul de toluidina ( <i>in vitro</i> )	3,5	[110]
<i>Pseudomonas areuginosa</i>	ALA ( <i>in vitro</i> )	9,0	[111]
	Clorina e6 ( <i>in vivo</i> )	6,0	[112]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Clorina pLe6 ( <i>in vivo</i> )	3,5	[113]
<i>Proteus mirabilis</i>	Clorina pLe6 ( <i>in vitro</i> )	6,0	[114]
<i>Candica albicans</i>	Porfirina ( <i>in vitro</i> )	1,0	[115]
	Azul de toluidina ( <i>in vivo</i> )	5,0	[116]
	Photogem ( <i>in vitro</i> )	1,41	[117]
	Azul de metileno ( <i>in vivo</i> )	0,6	[118]

### 2.2.1. Mecanismos da aPDT

Como já mencionado há dois tipos de fotoprocessos conhecidos como Tipo I e Tipo II, os quais são representados pelo diagrama de Jablonski (Figura 7).

**Figura 7:** Representação do diagrama de Jablonski. (Adaptado de Henderson e Dougherty, 1992). [119].

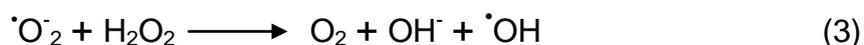


O diagrama de Jablonski apresenta os processos fotofísicos e fotoquímicos do FS após sofrer absorção de radiação. Após absorver um fóton de luz, a molécula do FS passa do estado fundamental ( $S_0$ ) para o estado excitado singlete ( $S_1$ ). Neste estado excitado o FS pode retornar ao seu estado fundamental emitindo um fóton de energia através do processo de relaxação física (conversão interna) e do processo radioativo de emissão de fluorescência; ou pode ainda inverter seu spin espontaneamente passando do estado  $S_1$  para o estado excitado tripleto ( $T_1$ ) [119-123].

A partir do estado tripleto, o FS pode retornar para o seu estado fundamental pelo processo de conversão interna ou através do processo radioativo de emissão de fosforescência. Sabe-se que o  $T_1$  na presença de oxigênio molecular induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  e  $\cdot O_2^-$  que

atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares levando a morte dos microrganismos [9, 119, 121, 123].

O mecanismo Tipo I, envolve a abstração de um átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o FS no seu estado excitado  $S_1$  ou  $T_1$  e o substrato, levando à formação de íons radicais que tendem a reagir instantaneamente com o oxigênio molecular produzindo  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  e  $\cdot O_2^-$  (Equações 1 - 3) [9, 122, 124].



Segundo Cassidy e colaboradores, a abstração do átomo de hidrogênio que ocorre no mecanismo Tipo I ocorre em moléculas insaturadas, como fosfolipídeos presentes na membrana celular. Assim, a peroxidação de lipídeos afeta a estrutura e o funcionamento da membrana celular, diminuindo a sua fluidez e aumentando sua permeabilidade aos íons. Tal fato pode também proporcionar a inativação de receptores celulares e de enzimas localizadas na membrana citoplasmática [125].

No mecanismo Tipo II ocorre a transferência de energia entre FS no estado  $T_1$  e o oxigênio molecular, promovendo a formação de  $^1O_2$  (Equação 4). Esta espécie reage rápida e indiscriminadamente com todos os tipos de biomoléculas, em especial proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, sendo apontado como o principal responsável pelo dano foto-oxidativo da célula microbiana. Este fato se justifica pelo mecanismo Tipo II apresentar uma maior constante de velocidade das reações de transferência de cargas, por volta de  $2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ , que o mecanismo Tipo I ( $> 10^7 M^{-1} s^{-1}$ ) [9, 123, 124, 126].



O oxigênio singlete possui uma natureza altamente reativa que restringe o seu tempo de vida nos sistemas biológicos para 0,01-0,04  $\mu\text{seg}$  e conseqüentemente o seu raio de ação para no máximo 0,02  $\mu\text{m}$ , portanto o dano fotodinâmico causado por essa ERO ocorre próximo à localização da molécula do

FS durante a irradiação. Sendo assim, a eficiência de aPDT depende da localização subcelular do FS que está relacionado à natureza química do FS, a sua concentração e ao tempo de incubação entre a administração do FS e a irradiação. Além disso, a dose de luz utilizada, o tipo de célula microbiana e o seu nível de oxigenação são parâmetros determinantes para a ação de aPDT [9, 120, 123, 124, 126].

### **2.2.2. Fotossensibilizadores**

A laranja de acridina foi o primeiro FS, descoberto por Raab em 1900. Este pesquisador observou a inativação do protozoário causador da malária, *Paramecium caudatum*, após exposição do mesmo ao corante e à luz. Raab postulou que este efeito era causado pela transferência de energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas na absorção da luz pela clorofila. Observou-se que a utilização da luz ou corante isoladamente não apresentava qualquer efeito aparente sobre os paramécios, mas juntos eles eram altamente citotóxicos [127]. Desde então um grande número de compostos com atividade fotodinâmica vêm sendo testados com o intuito de inativar microrganismos.

No entanto, sabe-se que para o FS ser devidamente utilizado na aPDT é necessário que o mesmo apresente algumas características ideais como as apresentadas no Quadro 1 [128].

**Quadro 1:** Principais características de um fotossensibilizador para aPDT.

<b>Toxicidade</b>	<b>Ausência de toxicidade no escuro.</b>
<b>Mutagenicidade</b>	<b>Não provocar distúrbios genéticos que possam se transformar em outra doença.</b>
<b>Seletividade</b>	<b>Inativar os microrganismos com o mínimo de dano as células do hospedeiro.</b>
<b>Eliminação</b>	<b>Acumular mais rapidamente nas células patogênicas, e ser eliminado mais rapidamente das células não-alvo.</b>
<b>Estabilidade</b>	<b>Cinética e termodinâmica</b>
<b>Solubilidade</b>	<b>Apresentar solubilidade em meios biológicos, para que não forme agregados</b>
<b>Acessibilidade</b>	<b>Síntese rápida, com alto rendimento e baixa custo, para acesso da população</b>

Os FSs são divididos em três categorias: fotossensibilizadores porfirínicos de 1<sup>o</sup> geração, fotossensibilizadores porfirínicos de 2<sup>o</sup> geração e os fotossensibilizadores não-porfirínicos (3<sup>o</sup> geração) [128].

A hematoporfirina (Hp) foi o primeiro composto produzido como FS de 1<sup>o</sup> geração. Inicialmente, esse composto foi utilizado no diagnóstico de câncer, no entanto eram necessárias altas dosagens deste FS para visualização do tumor, o que provocou a fotossensibilidade do paciente. Diante disso, foram realizadas diversas purificações da Hp promovendo assim o aparecimento do derivado de hematoporfirina (HpD) que era mais seletivo e se acumulava de modo mais eficaz no tumor com doses inferiores à Hp [129]. Atualmente, vários produtos contendo HpD são comercializados para o tratamento de câncer, podendo-se destacar o Photofrin<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup> e Photogem<sup>®</sup>.

Os FSs de 2<sup>o</sup> geração são moléculas puras que sofreram modificações químicas no anel tetrapirrólico das porfirinas. Assim a estrutura básica destes compostos é a porfirina podendo ser divididos em diferentes classes como: purpurinas, clorinas e bacterioclorinas, ftalocianinas e naftalocianinas [130]. Estes FSs apresentam altos coeficientes de absorção e geração de energia, bem como são capazes de penetrar a camada mais profunda dos tecidos. Além disso, apresentam pouca fotossensibilidade na pele do paciente, uma vez que seu acúmulo

é rápido e seletivo aos tecidos infectados e sua toxicidade é mínima na ausência de luz [120].

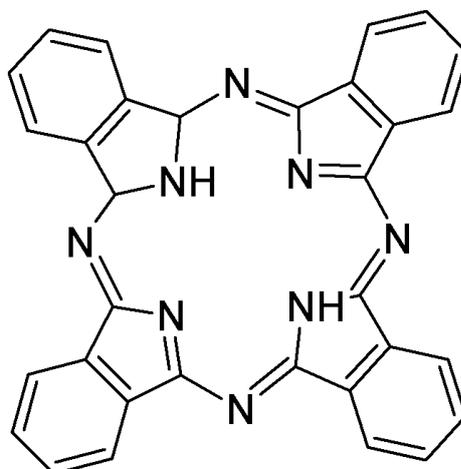
A terceira geração de FSs abrange os FSs de 2º geração modificados. Estas modificações ocorrem, principalmente, devido à hidrofobicidade que alguns FSs de 2º geração apresentam, pois sabe-se que esta característica pode levar o FSs, quando em meio aquoso, à auto-agregação e em muitos casos a uma subsequente precipitação, reduzindo drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete [10]. Os FSs de 3º geração podem ocorrer através da conjugação dos FSs a moléculas transportadoras (lipossomos, polímeros, anticorpos monoclonais, etc), ou a funcionalização dos FSs com grupamentos químicos que facilitam a incorporação e acumulação destes dentro das células microbianas [108, 131-134].

Neste trabalho foi comparada a ação dos FSs de 2º geração (ftalocianina e hipericina) em relação aos seus derivados mais hidrossólúveis (FSs de 3º geração), na inativação seletiva das bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

### ***Ftalocianina***

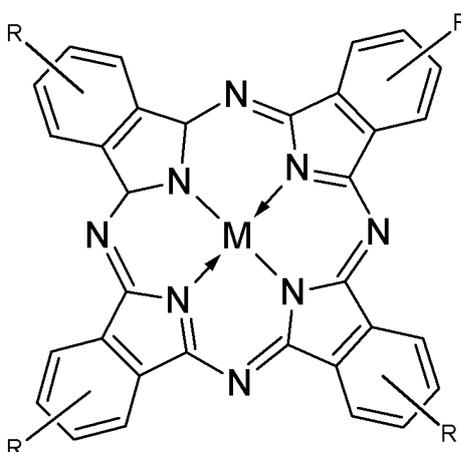
Ftalocianinas (Fc) são compostos orgânicos cuja estrutura inclui um anel constituído por oito átomos de nitrogênio e oito de carbono unidos mediante ligações duplas conjugadas (Figura 8) [14]. O espectro de absorção deste composto em solução consiste de duas bandas principais centradas em torno de 350 nm (banda Soret) e 670-690 nm (banda Q), sendo que a banda Q apresenta um coeficiente de extinção molar da ordem de  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Essa absorção é responsável pela cor azul intensa característica desses compostos. A banda Q intensa é acompanhada por bandas fracas próximas de 600 nm, atribuídas como sobretons vibracionais desta banda. A banda Q de mais baixa energia é particularmente sensível à substituição no macrociclo da ftalocianina [135, 136].

**Figura 8:** Estrutura química da ftalocianina.



Este fotossensibilizador tem sido alvo de estudo desde 1980, uma vez que apresentam alta seletividade, baixa fototoxicidade e são resistentes à degradação química ou fotoquímica [11]. As propriedades fotofísicas das Fcs são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central (Figura 9) refletindo diretamente no rendimento quântico e tempo de vida do estado excitado tripleto das metalo-ftalocianinas [137]. De acordo com Ryskova e colaboradores, a complexação com os íons metálicos diamagnéticos, como  $Zn^{+2}$ ,  $Al^{3+}$  e  $Ga^{3+}$ , promove uma apreciável quantidade de espécies de oxigênio singleto que são capazes de permanecer no estado excitado tripleto por um período de tempo mais longo [14].

**Figura 9:** Estrutura química das metalo-ftalocianinas



Apesar das importantes propriedades fotofísicas das Fcs, a sua hidrofobicidade promove a formação de agregados, o que reduz drasticamente o

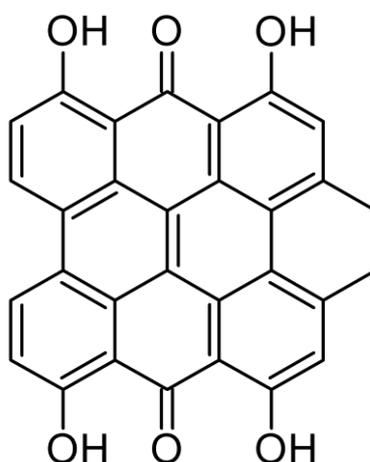
rendimento quântico de fluorescência, afetando a eficácia do processo fotodinâmico [138].

### **Hipericina**

A hipericina (Hy) é um pigmento fotoativo natural produzido por plantas do gênero *Hypericum* da família Guttiferae (Figura 10). Conhecida por suas propriedades antiinflamatórias, anti-sépticas, anti-infecciosas e antivirais a hipericina foi usada largamente em vários países da Europa durante muitos séculos [139].

Esse fotossensibilizador é uma quinona policíclica, que apresenta um alto rendimento quântico no estado tripleto e formação de oxigênio singlete, sendo mais fotoestável que a maioria dos fotossensibilizadores. Possui um intenso espectro de absorção com dois picos principais em 545 e 590 nm, sendo que no pico de 590 nm ocorre uma grande variação do coeficiente de extinção molar que fica entre 27.000 e 52.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> dependendo do tipo de solvente utilizado [12, 13, 140, 141].

**Figura 10:** Estrutura química da hipericina.

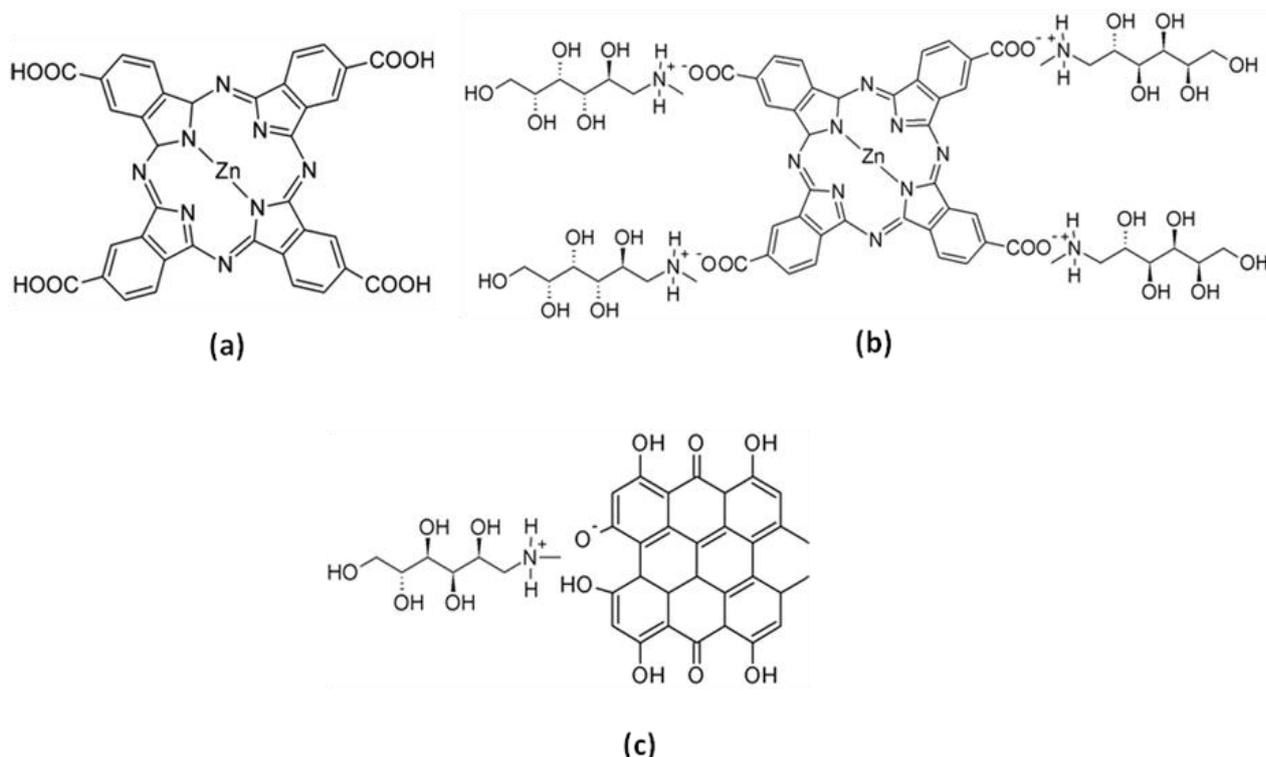


Assim como a Fc, a Hy é caracterizada pela sua hidrofobicidade e, portanto, perde a sua ação fotossensibilizadora quando em meio biológico, devido à formação de agregados e precipitados [142]. Diante disso, este trabalho teve o intuito de avaliar a atividade fotodinâmica da FcZn e Hy modificadas quanto a sua polaridade (mais hidrofílicas), na inativação seletiva das bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Uma das principais estratégias utilizadas para evitar a agregação destes FSS é a introdução de substituintes fortemente hidrofílicos nas posições periféricas dos compostos. Para tanto, neste estudo a FcZn foi funcionalizada com grupamentos

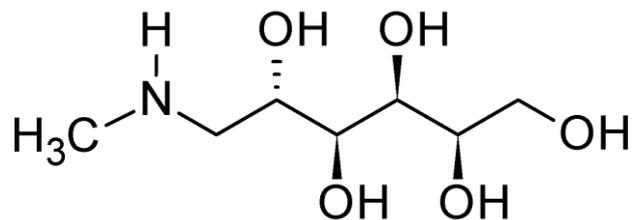
carboxílicos (Figura 11a) que proporcionam à molécula um caráter mais polar e, portanto, a torna menos hidrofóbica. Além disso, estes grupamentos viabilizaram a inserção da meglumina à FcZn (Figura 11b).

**Figura 11:** Derivados mais hidrofílicos da **(a e b)** Ftalocianina de zinco e da **(c)** hipericina.



A meglumina, conhecida também como N-metilglucamina (Figura 12) é um aminocarboidrato derivado da glicose capaz de formar espécies supramoleculares hidrofílicas com compostos que possuam em sua estrutura átomos de hidrogênio ácidos. A formação dos compostos de meglumina envolve como condição uma reação ácido-base em que o hidrogênio ácido é transferido ao grupo amina do aminocarboidrato. Os íons formados são então mantidos por uma interação eletrostática através do fragmento  $\text{NH}_2^+ \cdots \text{O}^-$  [143].

**Figura 12:** Estrutura química da meglumina.



Como já salientado, para viabilizar a formação de espécies supramoleculares entre a meglumina e a FcZn, esta foi primeiramente funcionalizada com grupos carboxílicos (ftalocianina de zinco tetracarboxilada - FcZnTc). Posteriormente à inserção dos grupos ácidos, a reação com o aminocarboidrato pode ser conduzida produzindo espécies mais solúveis em água. Esse procedimento permite a inserção de até quatro moléculas de meglumina como é observado na figura 11b para a ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina (FcZnTcG). A presença de vários grupos hidroxila na supramolécula fornece os sítios onde as ligações de hidrogênio são estabelecidas aumentando a hidrofiliabilidade da FcZn [143].

Um comportamento semelhante pode ser observado para hipericina, porém a reação ocorre a partir do grupo fenólico que cede o próton  $H^+$  formando a hipericina-glucamina (HyG - Figura 11c).

### 2.2.3. Problemas enfrentados pela aPDT

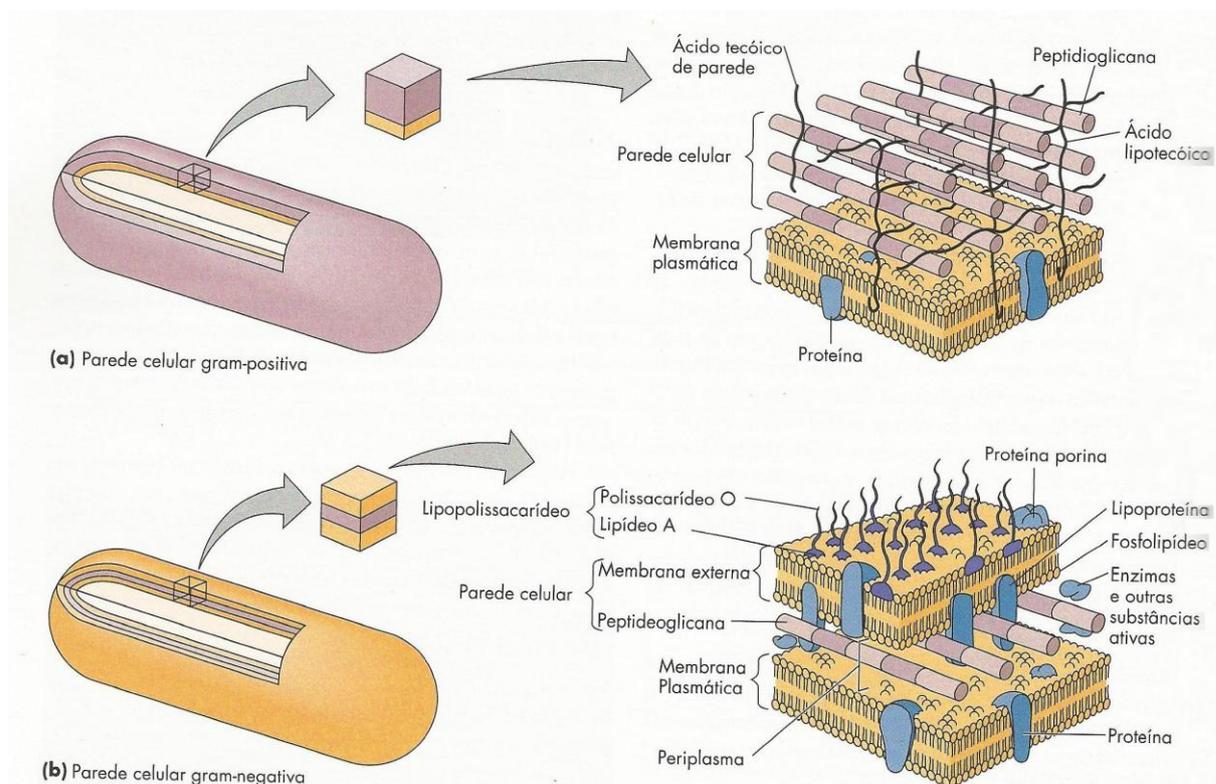
Conforme já comentado, a eficácia da aPDT para os diferentes microrganismos depende tanto do tipo quanto da concentração do FS, além do modo exato de ação deste composto que, por sua vez, é influenciado pelo sítio de ação. O sítio de ação depende das características físico-químicas da interação microrganismo-fotossensibilizador. Os parâmetros importantes do FS para interação incluem: solubilidade relativa em água e lipídeos, constante de ionização e outros fatores mais específicos como as características de absorção de luz e a eficiência da formação do estado excitado tripleto ou da produção de oxigênio singleto [4, 125, 144].

A morfologia da célula microbiana apresenta uma ampla variação tanto entre espécies quanto entre cepas, o que modula a interação dos FSs exógenos com os constituintes celulares, afetando os caminhos do processo de fotoinativação [8, 101]. A parede celular dos diferentes grupos de microrganismos apresenta uma grande

variabilidade na sua complexidade, arquitetura estrutural, permeabilidade e capacidade de associação com moléculas externas [144].

Portanto, a aPDT é mais eficaz na inativação das bactérias Gram-positivas, uma vez que, apresentam uma porção externa da parede celular (peptideoglicano e ácido lipoteicóico) relativamente mais porosa, permitindo aos FSs que alcancem a membrana citoplasmática (Figura 13a) [4]. Em contrapartida, as bactérias Gram-negativas, apresentam uma morfologia bem mais complexa que além de peptideoglicano possui uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos carregados negativamente, lipoproteínas e proteínas com função de porinas. Esta organização estrutural forma uma barreira física e funcional que dificulta a incorporação do FS (Figura 13b) [6]. Vale ainda destacar que quando estes microrganismos estão na forma de biofilme a atividade fotodinâmica do FS é reduzida, pois além das diferenças estruturais nas membranas celulares destes microrganismos a presença de outros componentes (EPS, QS, etc) dificultam ainda mais a interação do FS com os microrganismos.

**Figura 13:** Estrutura morfológica das bactérias: **(a)** Gram-positivas e **(b)** Gram-negativas (adaptado de Tortora, 2010) [2].



Portanto, a escolha do FS é fundamental para que a aPDT possa ser efetiva. Atualmente, os FSs de 2<sup>o</sup> geração vêm sendo modificados quanto a sua hidrofiliicidade o que facilita a incorporação dos mesmos nas células microbianas, em especial, quando as mesmas estão organizadas em biofilmes. Como já salientado, neste trabalho a Hy, a FcZn e seus derivados mais hidrofílicos foram utilizadas como FSs.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi encontrar condições ótimas para a fotoinativação seletiva de *S. aureus* e *E. coli*, tanto em cultura planctônica como em biofilme, causando o mínimo de dano às células hospedeiras (células epiteliais linhagem VERO). Para tanto foram utilizados os fotossensibilizadores hipericina e a ftalocianina de zinco bem como novos derivados hidrossolúveis sintetizados no Brasil.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliação da atividade fotodinâmica dos FSs através da metodologia de foto-oxidação do ácido úrico.
- Determinação do potencial zeta dos FSs em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para avaliar a carga e a agregação destes compostos em meio aquoso.
- Estudo da acumulação intracelular dos FSs nas células microbianas (cultura planctônica e biofilme) e células epiteliais da linhagem VERO, a fim de determinar os parâmetros (tempo de incubação e concentrações FSs) para fotoinativação seletiva.
- Determinação do ângulo de contato entre os FSs em solução aquosa (PBS) e as diferentes etapas de formação de biofilme de *S. aureus* e *E. coli*, com o intuito de investigar macroscopicamente a interação dos FSs com os biofilmes bacterianos.
- Avaliação da eficácia dos FSs mais hidrossolúveis em relação aos hidrofóbicos na fotoinativação seletiva de *S. aureus* e *E. coli*, tanto como células planctônicas quanto como biofilme. Para este objetivo foi avaliado o índice de sobrevivência dos microrganismos e das células epiteliais empregando os métodos de determinação da atividade metabólica com XTT e MTT, respectivamente.
- Determinação da concentração de EPS, através do alcian blue, nas diferentes etapas de formação dos biofilmes de *S. aureus* e *E. coli* após fotoinativação.
- Determinação morfológica através da microscopia de fluorescência de *S. aureus* e *E. coli* em culturas planctônicas antes e após fotoinativação seletiva.

- Determinação morfológica através da microscopia eletrônica de varredura de *S. aureus* e *E. coli* nas diferentes etapas dos biofilmes antes e após fotoinativação seletiva.
- Determinação morfológica através da microscopia eletrônica de varredura das células epiteliais VERO antes e após as melhores condições de fotoinativação seletiva.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Fotossensibilizadores

Os FSs utilizados nesse estudo foram a ftalocianina de zinco (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e seus derivados ftalocianina de zinco tetracarboxilada e ftalocianina de zinco tetracarboxi-N-metilglucamina bem como a hipericina e hipericina-N-metilglucamina, todos sintetizados pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da Universidade Federal do ABC. A solução estoque dos FSs ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi obtida em solvente aprótico polar, dimetil sulfóxido (DMSO), esterilizada por filtração em membrana  $0,22 \mu\text{m}$  e mantido ao abrigo da luz a  $4^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.1. Medidas de absorção ótica (UV-Vis) e fluorescência

As medidas de absorção ótica foram realizadas no espectrofotômetro HITACHI U-2800, sendo a cubeta de vidro com caminho ótico de  $1,0 \text{ cm}$ . As medidas de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro HITACHI F-4500, utilizando a cubeta de quartzo com caminho ótico de  $1,0 \text{ cm}$ .

Para realizar estas medidas, as soluções estoque dos FSs foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para a concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

#### 4.1.2. Foto-oxidação do ácido úrico

Alguns autores afirmam que o mecanismo Tipo II (formação de  $^1\text{O}_2$ ) é a principal via de inativação dos microrganismos na aPDT [124]. O ácido úrico é conhecido como captador de  $^1\text{O}_2$  podendo ser utilizado como dosímetro químico para avaliar a eficiência fotodinâmica dos FSs [145]. O coeficiente de atividade fotodinâmica é calculado, neste método, pelo decréscimo na intensidade da banda  $293 \text{ nm}$  do ácido úrico decorrente da foto-oxidação dessa molécula pelo  $^1\text{O}_2$  produzido pelo FS após irradiação (Equação 5) [145, 146].

$$AF = \frac{\Delta A_{AU} \times 10^5}{P \times t \times A (\lambda_{irra})} \quad (5)$$

Onde:

**AF** = atividade fotodinâmica ( $\text{m}^2 \text{W}^{-1} \text{s}^{-1} = \text{m}^2 \text{J}^{-1}$ )

**$\Delta A_{AU}$**  = variação da intensidade da absorção do ácido úrico em  $291 \text{ nm}$ , antes e após a irradiação

**P** = potencia da luz  $W m^{-2}$

**t** = tempo de irradiação (s)

**A** ( $\lambda_{irra}$ ) = absorvância do FS na solução de FS+AU no comprimento de onda da irradiação do LED.

Diante disso, foi avaliado de forma indireta o rendimento quântico da formação de oxigênio singlete ( $\Delta\Phi$ ) através da foto-oxidação do ácido úrico pelos FSs, utilizando a metodologia descrita por Fischer e colaboradores [145]. Soluções dos FSs na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram adicionadas a solução de ácido úrico ( $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% (m/v) e mantidas em agitação. Em seguida, as soluções contendo as hipericinas foram irradiadas por 1 hora, com LED amarelo ( $590 \pm 10 \text{ nm}$ ) e as soluções com as ftalocianinas foram irradiadas também por 1 hora pelo LED vermelho ( $630 \pm 10 \text{ nm}$ ). Periodicamente, foi retirada uma alíquota de cada amostra e realizadas medidas de absorção ótica no espectrofotômetro HITACHI U-2800, para avaliar o decréscimo da banda do ácido úrico em 293 nm.

#### 4.1.3. Potencial zeta

Alguns autores afirmam que além da hidrofiliidade dos FSs a presença de cargas também influencia diretamente na fotoinativação microbiana, sendo as bactérias Gram-positivas susceptíveis a qualquer tipo de FSs até mesmo os neutros e aniônicos, enquanto que as bactérias Gram-negativas, devido à presença de cargas negativas em sua membrana extracelular, se apresentam mais susceptíveis aos FS catiônicos [6, 8, 101, 147]. Diante disso foi avaliada a presença de cargas nos FSs em estudo, utilizando o método do potencial zeta.

O potencial zeta é a medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas. Sua medição permite analisar a estabilidade e interações entre partículas, que é refletida pelo potencial de superfície das partículas e pelo solvente utilizado. Alguns fatores influenciam esta medida como a concentração da solução e o pH do meio. Valores de potencial zeta maiores que 30 mV, negativo ou positivo, são capazes de evitar agregação devido à repulsão eletrostática entre as partículas, portanto há uma maior estabilidade entre as partículas [148]. Para a aPDT é recomendado que os FSs apresentem potenciais

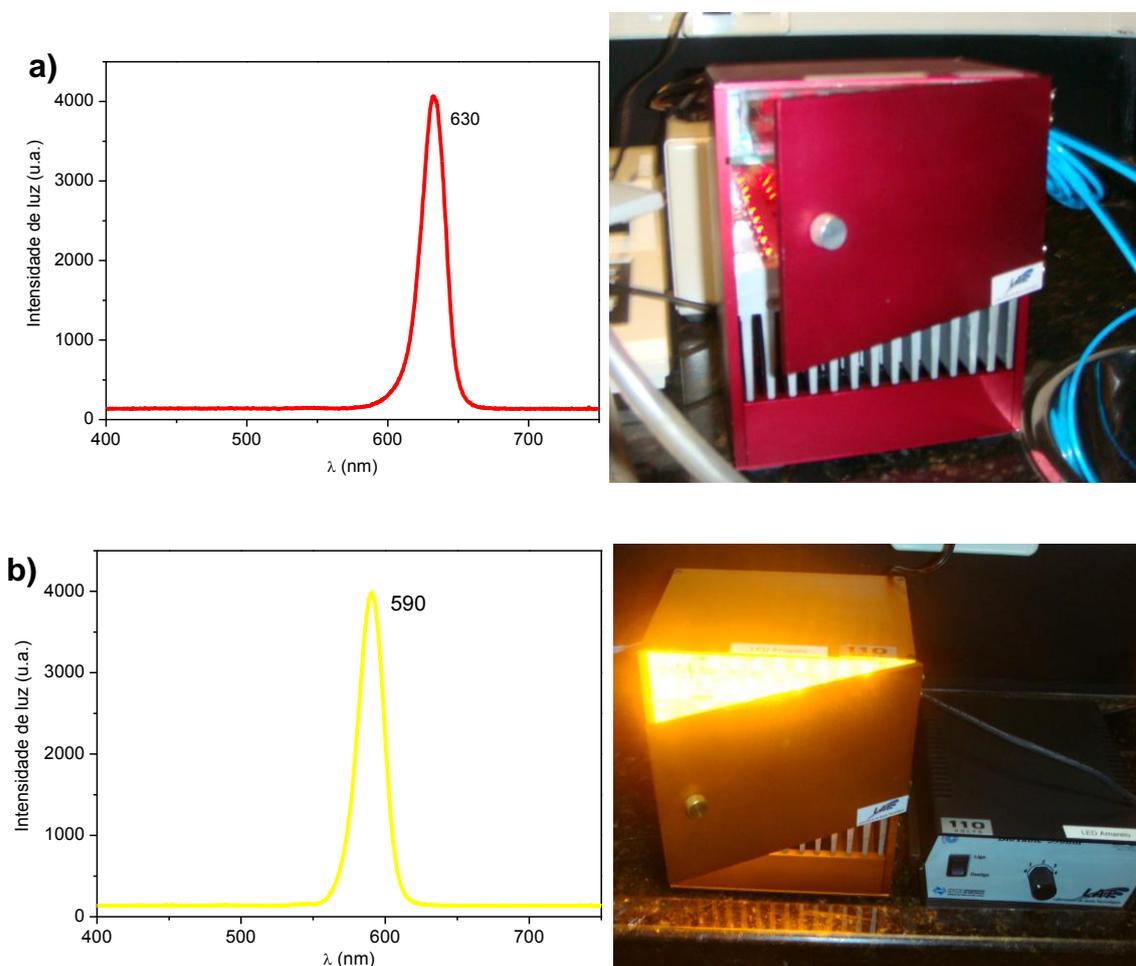
zeta maiores que 30 mV, uma vez que a agregação diminui a atividade fotodinâmica destes compostos, ou seja, diminui a produção de EROs.

Para realizar as medidas de potencial zeta os FSs na concentração de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram solubilizados em PBS a partir da solução estoque de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em DMSO. Alíquotas de 1,0 mL destas soluções foram colocadas em cubetas de poliestireno com eletrodos de cobre laterais e assim realizadas as medidas no equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS (disponibilizado pelo Prof. Dr. Marcel Tabak, Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos-USP, Brasil).

#### **4.2. Fonte de luz**

Para fotossensibilização das ftalocianinas e hipericinas foram utilizadas mesas de iluminação compostas de LEDs vermelhos (630nm  $\pm$  10 nm) com potência de 18 mW ou amarelos (590 nm  $\pm$  10 nm) com potência de 10 mW, respectivamente (Figura 14). Estas mesas são chamadas de BioTables e foram desenvolvidas no CEPOF do Instituto de Física de São Carlos-USP. O comprimento de onda da fonte de luz utilizada para cada experimento depende absorção de cada fotossensibilizador.

**Figura 14:** Espectro das fontes de luz empregadas: **(a)** LED vermelho e **(b)** LED amarelo.



### 4.3. Microrganismos

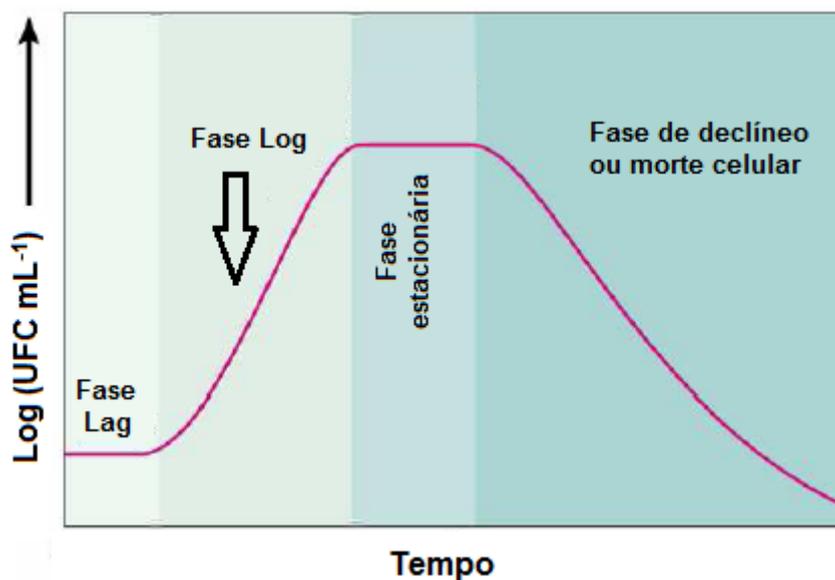
Os microrganismos utilizados nesse estudo foram as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

#### 4.3.1. Preparo da suspensão celular [13]

Primeiramente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* foram cultivadas em meio Infusão cérebro-coração (BHI) e mantidas *overnight* a 37°C na incubadora MA 410 Marcon com agitação de 100 rpm. Em seguida, 1,0 mL do meio crescido foi inoculado no caldo BHI fresco e mantido em agitação a 100rpm a 37°C até as bactérias alcançarem a fase logarítma (Figura 15). As células foram centrifugadas (Centrífuga - Excelsa II) a 1300 rpm por 10 minutos e suspensas em PBS estéril. A

suspensão celular foi diluída em PBS até obter uma concentração celular de  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

**Figura 15:** Curva de crescimento bacteriano (adaptado de Tortora, 2010) [2].



#### 4.3.2. Formação dos biofilmes bacterianos (adaptado de Chandra e colaboradores, 2008) [149]

A formação dos biofilmes foi feita em lâminas de poliestireno estéreis para os experimentos de determinação morfológica dos microrganismos, ou em placas de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) para ensaios de citotoxicidade. Independente do suporte utilizado, o método de formação do biofilme de *S. aureus* e *E. coli* foi o mesmo.

Inicialmente, foi preparada uma suspensão celular contendo  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , conforme descrito no item 4.3.1. Esta suspensão foi inoculada nos suportes que foram mantidos na incubadora a  $37^\circ\text{C}$  por 4 h, para a adesão celular. Após esse período, os suportes foram lavados com PBS, a fim de retirar as células não aderidas e adicionou-se caldo BHI fresco para o desenvolvimento do biofilme. Os suportes, então, foram mantidos na incubadora a  $37^\circ\text{C}$  por no máximo 4 dias (96 horas), sendo que após 2 dias o meio de cultura foi trocado pelo caldo de BHI fresco.

O efeito da aPDT contra os biofilmes de *E. coli* e *S. aureus*, foi avaliado nas diferentes etapas de formação do biofilme: adesão reversível (4 horas), adesão irreversível (24 horas), biofilme maduro (72 horas) e dispersão (96 horas).

#### **4.4. Célula epitelial**

Neste estudo foram utilizadas células epiteliais de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*, linhagem VERO (ATCC-CCL-81), provinda do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

##### **4.4.1. Cultura celular [150]**

Devido a morfologia da linhagem VERO estas células foram cultivadas aderidas a um substrato sólido (garrafas de poliestireno 25 cm<sup>3</sup>) utilizando como meio de cultura o Dulbecco modificado por Iscove's suplementado com soro fetal bovino 10% (m/v) e antibióticos penicilina 10000 U.I. mL<sup>-1</sup> e estreptomicina 10 mg mL<sup>-1</sup>. As células foram mantidas em estufa (Forma Scientific – modelo 3164) a 37 °C, 95 % de ar e 5 % de CO<sub>2</sub> gasoso. O subcultivo das células foi feito a cada três dias removendo-se o meio de cultura e adicionando PBS para remoção das células não aderidas. Após lavagem com PBS foi adicionado a enzima proteolítica tripsina contendo EDTA 0,03% (m/v) para digerir as proteínas da matriz extracelular e assim descolar as células do substrato sólido. As células desagregadas foram suspensas em meio de cultura, transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 1000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 1,0 mL de meio de cultura fresco para determinar a concentração e viabilidade celular pelo método de contagem na câmara de Neubauer utilizando como marcador de células mortas o corante Trypan blue.

#### **4.5. Ensaio de acumulação dos fotossensibilizadores**

Previamente aos ensaios citotóxicos de fotoinativação seletiva, foi determinada a concentração de FS que era acumulado intracelularmente nas células bacterianas e nas células epiteliais em função do tempo de incubação. Este método contribuiu para a escolha do tempo de incubação em que a acumulação FS-microrganismo fosse maior que acumulação FS-células epiteliais.

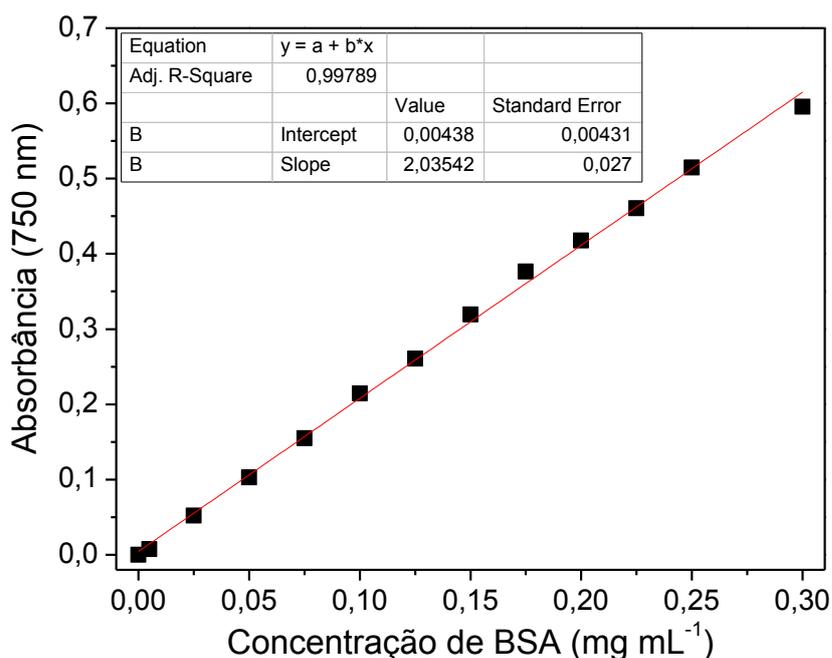
#### 4.5.1. Microrganismos

##### *Células planctônicas*

As suspensões celulares de *S. aureus* e *E. coli* contendo  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , foram incubadas no escuro a  $37^\circ\text{C}$  com os FSs em estudo nas concentrações de 0 -  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  por 20 minutos. Periodicamente, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas e centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm. Logo, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 1,0 mL de SDS a 2% (m/v). Após 18 h de incubação em temperatura ambiente as amostras tratadas com SDS foram divididas em duas partes: 0,4 mL foram utilizadas para determinação de proteínas pelo método de Lowry [151] e 0,6 mL foram utilizados na determinação da concentração do FSs por fluorescência [108].

As concentrações intracelulares de cada FS foram normalizadas pela concentração de proteína na amostra que é diretamente proporcional ao número de células. Para isso foi obtida previamente uma curva analítica de proteína utilizando a albumina de soro bovino (BSA) que mimetiza as proteínas bacterianas e celulares (Figura 16) e uma curva analítica de fluorescência dos FSs em SDS 2% (m/v), (Anexo 1) [108].

**Figura 16:** Curva analítica da absorbância em função da concentração da proteína BSA.  $n=3$



## **Biofilmes**

Em cada etapa do biofilme foi determinada a concentração máxima intracelular de FS. Para tanto, após a formação de cada etapa do biofilme (item 4.3.2), o suporte (lâmina poliestireno 1,0 cm x 1,0 cm) foi incubado no escuro a 37°C com os FSs em estudo nas concentrações de 0 - 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , por 45 minutos. Periodicamente, as amostras foram retiradas do meio com FS e lavadas com PBS (2x) para retirar o FS não acumulado. Logo, o suporte foi colocado em um tubo cônico contendo 1,0 mL de PBS e agitado no Vortex por 2 min para retirar as células aderidas na lâmina de poliestireno. A fim de se obter o *pellet* o tubo cônico contendo apenas os microrganismos em PBS foi centrifugado por 5 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 1,0 mL de SDS 2%. Após 18 h de incubação em temperatura ambiente as amostras tratadas com SDS foram divididas em duas partes: 0,4 mL foram utilizadas para determinação de proteínas pelo método de Lowry [151] e 0,6 mL foram utilizados na determinação da concentração dos FSs por fluorescência [108].

### **4.5.2. Célula epitelial (VERO)**

Em placas de Petri de 60 mm de diâmetro incubou-se 5,0 mL de uma suspensão contendo  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Após 24 horas o meio foi retirado e adicionou-se de 0-50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de FS, solubilizado em meio de cultura, e incubou-se no escuro a 37°C por no máximo 45 minutos. Em cada tempo de incubação retirou-se o meio com FS, lavou-se a monocamada celular com PBS (2X), adicionou-se 1,0 mL de tripsina/EDTA para *descolar* as células da placa de petri e transferiu-se a suspensão para um tubo cônico que foi centrifugado por 1 minuto a 1000rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao *pellet* 1,0 mL de SDS 2% (m/v). Após 1 hora de agitação em temperatura ambiente as amostras tratadas com SDS foram divididas em duas partes: 0,2 mL foram utilizadas para determinação de proteínas pelo método de Lowry [151] e 0,8 mL foram utilizados na determinação da concentração do FSs por fluorescência [108].

#### 4.6. Ângulo de contato

A medição de ângulo de contato é uma técnica utilizada para determinar a hidrofobicidade de materiais [152, 153]. Para se aplicar esta técnica os materiais têm que ser planos, lisos e homogêneos, o que dificulta sua aplicação aos microrganismos, uma vez que a porosidade do filme microbiano provoca uma rápida absorção das soluções dificultando a medida do ângulo [154]. No entanto, apesar desta dificuldade, este é um dos métodos mais importantes no estudo dos biofilmes, pois permite obter uma estimativa da hidrofobicidade global das células [152, 154]. Para ângulos de contato superiores a  $60^\circ$ , a superfície é considerada hidrofóbica, enquanto que para ângulos inferiores a  $60^\circ$  a superfície é considerada hidrofílica [155].

O ângulo de contato representa o valor em graus que uma determinada substância líquida forma com uma superfície. Neste estudo a superfície foi representada pelas lâminas de poliestireno (3,0 cm x 3,0 cm) contendo os biofilmes bacterianos nas diferentes etapas de formação (item 4.3.2).

Os ângulos de contato foram determinados pelo método da gota séssil [156, 157] através do goniômetro acoplado a uma câmera digital, operado em ar e a temperatura ambiente, disponibilizado pelo Grupo de polímeros “Prof. Bernhard Gross” do Instituto de Física da USP, São Carlos, SP. As amostras contendo os biofilmes nas diferentes etapas de formação foram colocadas sobre um suporte no interior da câmara do goniômetro e gotas ( $\sim 100 \mu\text{L}$ ) contendo soluções dos FSs em PBS foram adicionadas à superfície do biofilme bacteriano. As concentrações dos FSs utilizadas foram determinadas pelo ensaio de acumulação intracelular (item 4.5.1). A determinação do ângulo formado sobre superfície foi efetuada imediatamente à colocação da gota e após o tempo de incubação também definido pelo ensaio de acumulação intracelular (item 4.5.1). Estas medidas foram feitas em triplicata em quatro áreas diferentes da lâmina contendo biofilme. Os ângulos de contato foram calculados automaticamente por meio do *software* RHI 2001 Imaging Software instalado em um computador acoplado ao goniômetro.

## 4.7. Ensaio de fotoinativação

### 4.7.1. Microrganismos

#### ***Células planctônicas***

A fim de avaliar a ação dos diferentes FSs na fotoinativação de *E. coli* e *S. aureus*, 500 µL de suspensão celular de cada cepa microbiana ( $1 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>) foram adicionados às placas de microtitulação de 48 poços contendo 500 µL de FS em diferentes concentrações. As placas contendo as amostras foram incubadas no escuro a 37 °C por um tempo incubação pré-determinado no item 4.5.1. A seguir as amostras foram irradiadas com LED nos comprimentos de onda adequados a cada FS em diferentes doses de luz (J cm<sup>-2</sup>). O grupo controle foi submetido às mesmas condições experimentais citadas acima, entretanto, na ausência do FS.

O índice de sobrevivência dos microrganismos foi determinado pela atividade metabólica bacteriana através do ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil) -5 - [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT) [149]. Para isso as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga e centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi suspenso em 1,0 mL de PBS. Logo, 100 µL das amostras foram colocadas em microplacas de 96 poços e adicionou-se 50 µL de solução de sal de XTT (1,0 mg mL<sup>-1</sup> em PBS, Invitrogen) e 4 µL de solução de menadiona (1,0 mmol L<sup>-1</sup> em etanol, Sigma). As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C por 3 horas. A atividade da desidrogenase do metabolismo bacteriano reduz o sal de tetrazólio XTT a sais de formazana, resultando em alteração colorimétrica que se correlaciona com a viabilidade celular. A mudança colorimétrica foi medida utilizando um leitor de microtitulação (Versa Max – Molecular devices) a 490 nm.

#### ***Biofilmes***

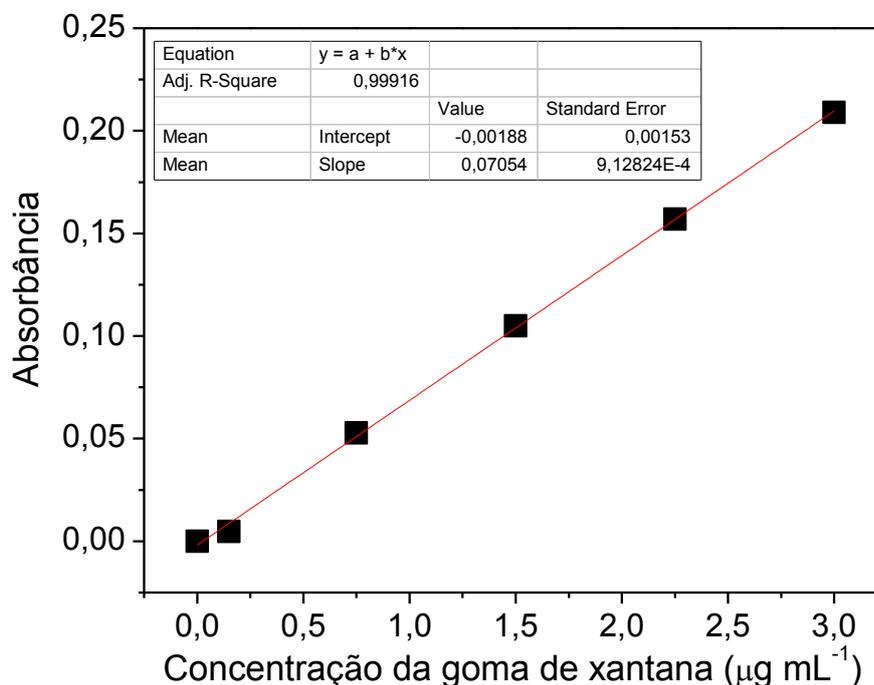
Após crescimento de cada etapa do biofilme (item 4.3.2) nas placas de microtitulação de 96 poços, foram adicionadas soluções dos FSs em PBS, nas diferentes concentrações de estudo. As placas foram mantidas no escuro a 37°C por um tempo de incubação pré-determinado pelo ensaio do item 4.5.1. Em seguida, removeu-se as soluções de FSs e lavou-se os poços com PBS (2x) para retirar os FSs não incorporados ao biofilme. Adicionou-se 100 µL de PBS e as amostras foram irradiadas com LED nos comprimentos de onda adequados a cada FS em diferentes

doses de luz. O grupo controle foi submetido às mesmas condições experimentais citadas acima, entretanto, na ausência do FS.

Assim como no ensaio de fotoinativação das células planctônicas, o método utilizado para determinar a sobrevivência das bactérias foi o XTT [149], que discrimina células microbianas vivas e mortas baseada na atividade metabólica de células vivas. Para tanto, retirou-se o PBS dos poços e adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de solução de sal de XTT ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  em PBS) e 4  $\mu\text{L}$  de solução de menadiona ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em etanol). As placas de microtitulação foram incubadas a  $37^\circ \text{C}$  por 3 h-e a mudança colorimétrica foi medida utilizando um leitor de microtitulação a 490 nm.

Conforme comentado na revisão bibliográfica, o EPS é um importante fator de resistência do biofilme, por isso foi determinado a ação de aPDT neste polissacarídeo. Para isso foi utilizado o método descrito por Bober e colaboradores [158]. Este método promove a ligação do marcador *Alcian blue* ao grupamento éster e carboxila do EPS, promovendo uma mudança colorimétrica em função da concentração de EPS presente no meio. Portanto, após o ensaio de fotoinativação retirou-se o PBS dos poços e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido acético 7% e incubou-se a temperatura ambiente por 30 min, para extrair o EPS das bactérias em biofilme. A seguir adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de Alcian blue ( $0,015 \text{ mg mL}^{-1}$  em ácido acético 7%, Sigma) e incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos. A mudança colorimétrica foi medida utilizando um leitor de microtitulação a 600 nm. Os valores de absorvância foram convertidos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando a curva analítica da goma de xantana que mimetiza o EPS bacteriano (Figura 17) [158].

**Figura 17:** Curva analítica da absorvância em função da concentração da goma de xantana. n=3



#### 4.7.2. Célula epitelial (VERO)

Os parâmetros obtidos na inativação bacteriana (células planctônicas e biofilme) foram aplicados às células epiteliais com o intuito de se obter uma fotoinativação seletiva. Para isso,  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram plaqueadas nas placas de microtitulação de 96 poços e incubadas a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24 h, o meio foi removido e a monocamada de células foi lavada com PBS (1x). As células foram, então, incubadas com diferentes concentrações de cada FS por até 45 minutos. Após esse período o meio contendo o FS foi retirado, as células foram novamente lavadas com PBS (1x) e adicionou-se o meio de cultura fresco (Dulbecco modificado por Iscove's, Sigma). As placas foram irradiadas com LED nos comprimentos de onda adequados de cada FS em diferentes doses de luz ( $\text{J cm}^{-2}$ ). Após irradiação para recuperação celular as placas de microtitulação foram mantidas na incubadora por 48 h a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . O grupo controle foi submetido às mesmas condições experimentais citadas acima, entretanto, na ausência do FS.

O índice de sobrevivência celular foi determinado pela atividade metabólica celular através do ensaio de redução 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT). Esse método baseia-se na atividade da desidrogenase mitocondrial

que reduz o sal de tetrazólio MTT a sais de formazana, resultando em alteração colorimétrica que se correlaciona com a viabilidade. Assim, após irradiação retirou-se o meio de cultura dos poços, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de MTT ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  em meio de cultura) e incubou-se a placa de microtitulação por 3 h a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . O meio com MTT foi removido e 50  $\mu\text{L}$  de álcool etílico foi adicionado para solubilizar os cristais de formazana. Logo, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de uma solução (1:1) de PBS com álcool isopropílico e a mudança colorimétrica foi medida utilizando um leitor de microtitulação a 550 nm.

#### **4.8. Determinação morfológica**

Os estudos morfológicos das bactérias (células planctônicas e biofilme) e das células VERO foram realizados apenas para as condições de seletividade, previamente determinadas no item 4.6. Para isso, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência (MF) utilizando o marcador de ácido nucleico, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma).

##### **4.8.1. Microscopia de fluorescência**

###### ***Células planctônicas***

Após ensaios de fotoinativação as células bacterianas foram transferidas para tubos de microcentrifugação e centrifugadas por 5 min a 5000 rpm, para obtenção do *pellet*. O *pellet* foi lavado com PBS (2x) e as células foram fixadas com paraformaldeído (2% m/v em PBS) por 20 min a temperatura ambiente. Após fixação, as células foram novamente centrifugadas por 5 min a 1000 rpm, lavadas com PBS (2x), incubadas no escuro com 100  $\mu\text{L}$  de DAPI ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em PBS) por 10 min, a temperatura ambiente. A seguir, foi obtida a imagem pelo microscópio de fluorescência (Olympus, modelo DP72) com excitação em 358 nm e emissão em 461 nm.

###### ***Células epiteliais (VERO)***

Para se obter imagens de microscopia de fluorescência, as células epiteliais foram plaqueadas em lamínulas de vidro (1,0 cm x 1,0 cm) nas mesmas condições do item 4.6.1. Após ensaios de fotoinativação as células VERO foram fixadas com paraformaldeído na temperatura ambiente (2% (m/v) em PBS) por 20 minutos e

depois lavadas com PBS (2x). A seguir, as amostras foram incubadas no escuro com 100  $\mu\text{L}$  de DAPI ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em PBS) por 10 min a temperatura ambiente. A seguir, foram obtidas as imagens pelo microscópio de fluorescência com excitação em 358 nm e emissão em 461 nm.

#### **4.8.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

##### ***Biofilmes***

Para realização deste experimento os biofilmes, nas diferentes etapas de formação, foram obtidos em lâminas de poliestireno 1,0 cm x 1,0 cm. Depois de aplicados a estes biofilmes os parâmetros de fotoinativação seletiva, os mesmos foram transferidos para placas de 24 poços e fixados em 1,0 mL de glutaraldeído 2,5% (m/v) por 1 hora. Posteriormente, as lâminas contendo os biofilmes foram submersas por 20 min em soluções de álcool etílico nas seguintes concentrações (% v/v): 10, 25, 50, 75 e 90 e finalmente por 1 h em álcool etílico a 100% (v/v). Após a secagem, as lâminas foram transferidas para *stubs* metálicos e submetidas ao processo de metalização por *sputtering* (Denton Vacuum Desk II, Denton Vacuum, USA) com  $10^{-9}$  m de espessura de fio de ouro. A seguir, os biofilmes foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura JSM-5310, JEOL (Instituto de Química de São Carlos, USP) operando em 20 kV com diferentes ampliações.

##### ***Células epiteliais (VERO)***

Previamente à realização deste experimento, as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro (1,0 cm x 1,0 cm) nas mesmas condições do item 4.6.1. Após ensaios de fotoinativação as células VERO passaram pelo mesmo tratamento descrito anteriormente para os biofilmes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

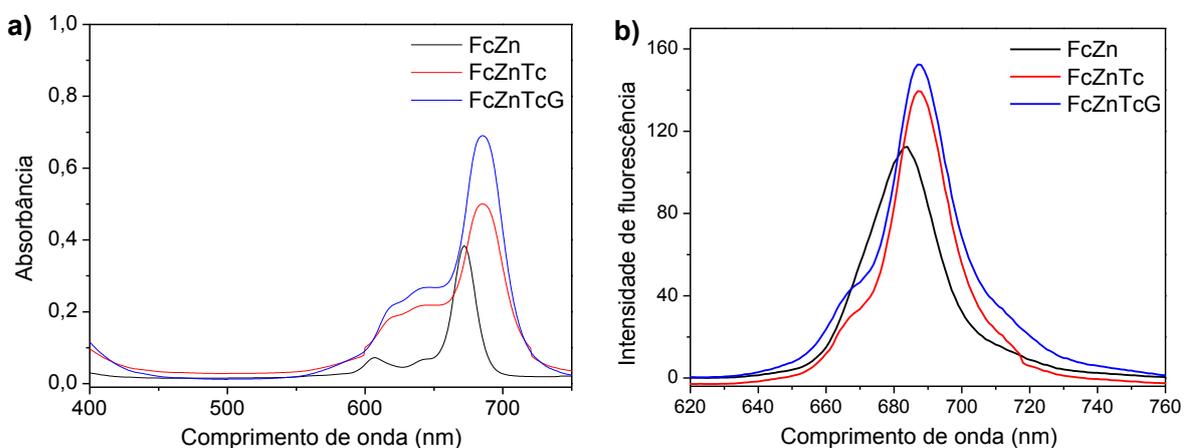
### 5.1. Fotossensibilizadores

#### 5.1.1. Medidas de absorção ótica (UV-Vis) e fluorescência

A figura 18a mostra o espectro de absorção da FcZn e seus derivados em PBS. A FcZn apresentou forte absorção no visível entre 607-672 nm com pico mais intenso em 672 nm. A inserção do grupamento tetracarboxi (FcZnTc e FcZnTcG) promoveu uma alteração no espectro de FcZn podendo-se observar um ligeiro deslocamento das bandas de 607 para 617 nm e 672 para 684 nm. A presença da meglumina tornou a FcZn mais hidrofílica diminuindo a formação de agregados em meio aquoso, o que ocasionou um aumento na absorção de FcZnTcG, em relação as outras Fcs do estudo. Este fato também promoveu uma maior intensidade de fluorescência emitida pela FcZnTcG, pois havia maior numero de monômeros em solução que agregados e de acordo com Hamblin e Mróz somente os monômeros fluorescem (Figura 18b) [159].

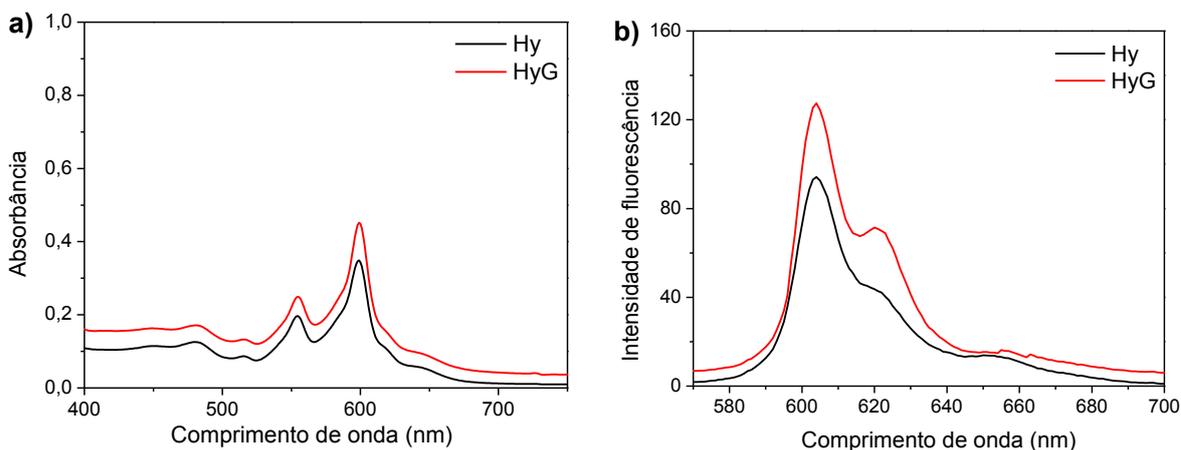
Os espectros de fluorescência das Fcs foram, também, obtidos em solução de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS, com excitação em 620 nm e emissão entre 630-800 nm. Foi possível observar que o espectro de emissão de fluorescência máxima para a FcZn foi em 680 nm e dos seus derivados em 690 nm. Este ligeiro deslocamento pode ser justificado pela diferença nos espectro de absorção, apesar disso a atividade fotodinâmica dos derivados não foi comprometida.

**Figura 18:** (a) Espectro de absorção e (b) fluorescência das ftalocianinas de zinco –  $\lambda$  excitação 620 nm ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS – 1% DMSO).



Com relação aos espectros de absorção da hipericina e seu derivado, foi possível observar quatro bandas no espectro do visível (481, 515, 554 e 600 nm) apresentando maior intensidade nas duas últimas. Assim como para a FcZn, a inserção da meglumina promoveu um aumento na intensidade dos picos (Figura 19a). A modificação estrutural da hipericina (HyG) não alterou as propriedades fotoquímicas do Fs que manteve seu o espectro de emissão de fluorescência máxima em 600 nm, podendo-se observar também um outro pico em 620 nm com maior definição no espectro da HyG. O espectro de fluorescência foi também realizado em PBS, com excitação em 545 nm e emissão entre 602 nm (Figura 19b).

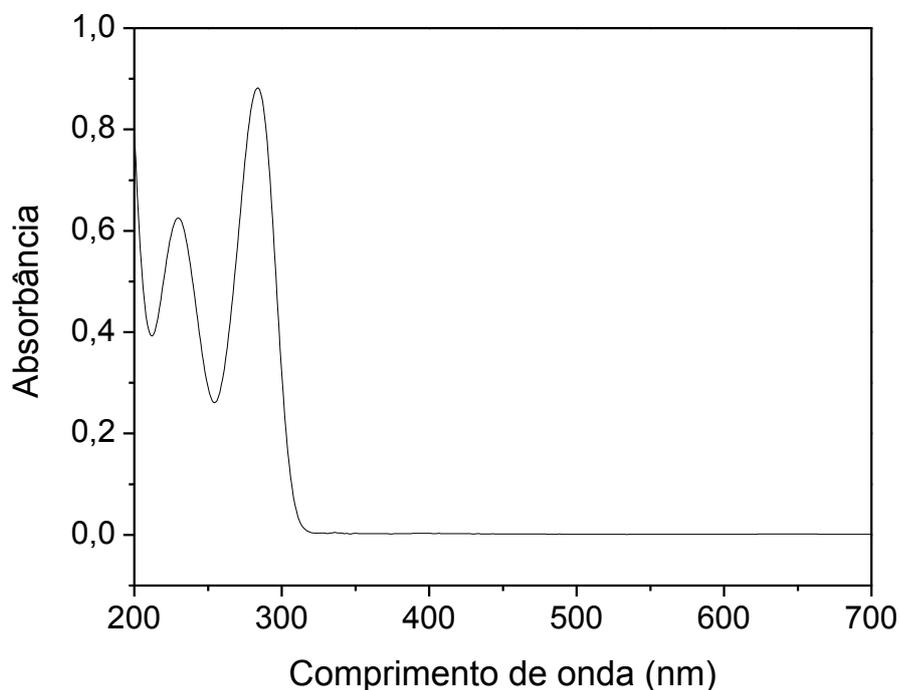
**Figura 19: (a)** Espectro de absorção e **(b)** fluorescência das hipericinas -  $\lambda$  excitação 545 nm ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em PBS – 1% DMSO).



### 5.1.2. Atividade Fotodinâmica dos fotossensibilizadores

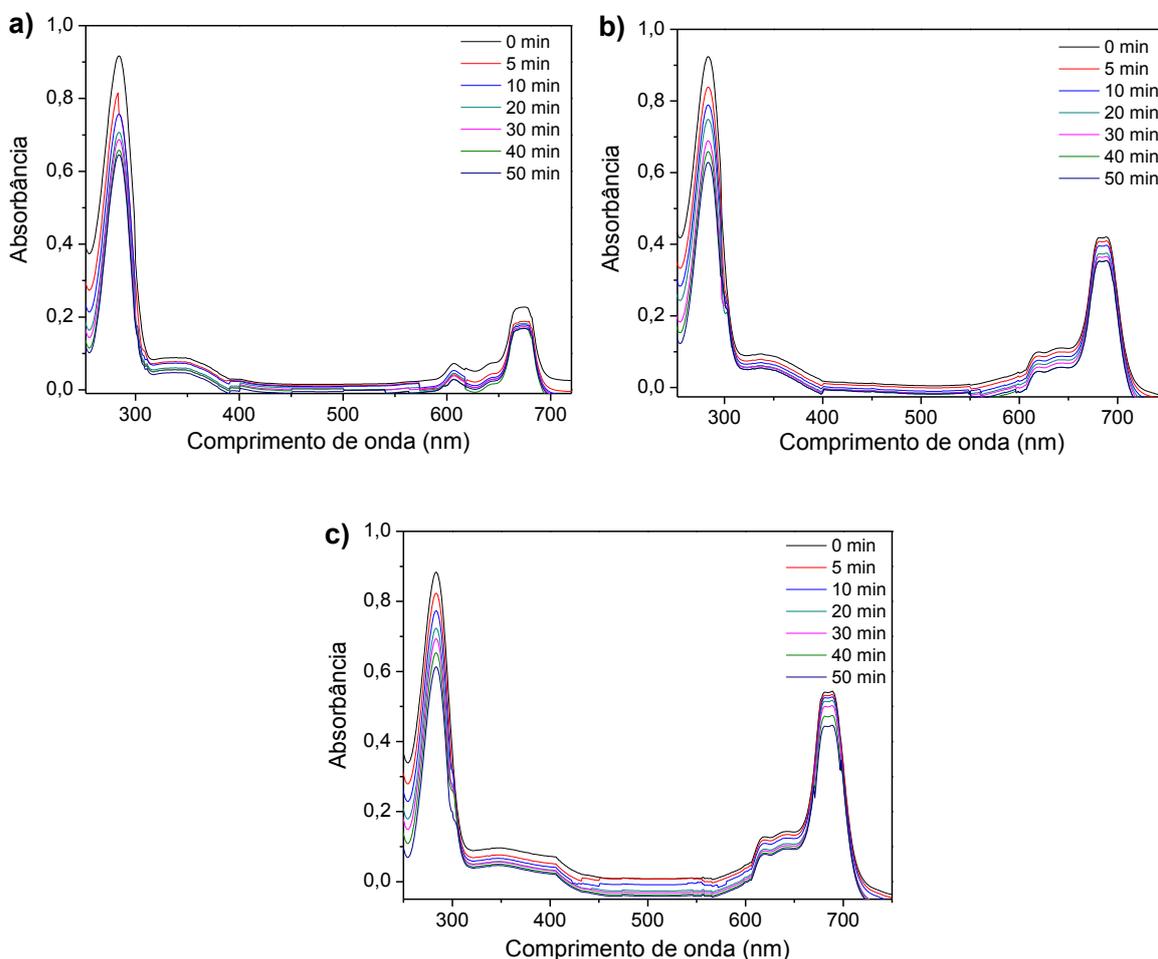
A figura 20 representa o espectro de absorção do ácido úrico, podendo-se observar a presença de duas bandas (235 e 293 nm). A banda de maior intensidade (293 nm) foi utilizada para avaliar a ação foto-oxidante dos FSs sobre o ácido úrico em função do tempo de irradiação.

**Figura 20:** Espectro de absorção do ácido úrico na concentração de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  em SDS 2% (m/v).



Somente a irradiação com os LEDs (vermelho e amarelo), na ausência dos FSs, não causou nenhum efeito de oxidação no ácido úrico, uma vez que esta substância não absorve em nenhum dos comprimentos de onda de irradiação das fontes de luz que correspondem a 630 nm e 590 nm, respectivamente. Portanto, os resultados apresentados nas figuras 22 e 23 mostram a ação das ftalocianinas de zinco e das hipericinas, respectivamente, em oxidar o ácido úrico após diferentes tempos de irradiação, permitindo a determinação do coeficiente de atividade fotodinâmica destes FSs (tabela 4).

**Figura 21:** Espectros de absorção do ácido úrico ( $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  da **(a)** FcZn, **(b)** FcZnTc e **(c)** FcZnTcG, após diferentes tempos de irradiação com LED vermelho (630 nm).



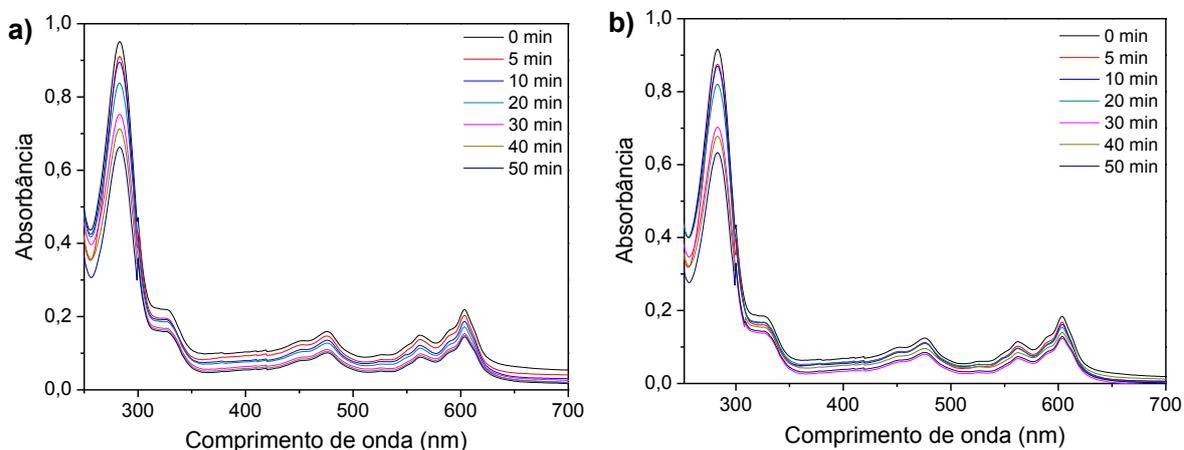
Após irradiação com o LED vermelho pode-se observar um decréscimo na banda de 293 nm do ácido úrico decorrente de sua oxidação pelo oxigênio singlete (Figura 21). Essa molécula é formada devido à transferência de energia entre os FSs no estado excitado triplete e o oxigênio molecular. A magnitude do decréscimo da banda 293 nm foi proporcional ao tempo de irradiação, sendo que após 50 min de irradiação essa banda diminuiu em 30% na presença de FcZn e FcZnTcG e em 32% na presença de FcZnTc. Esse fato mostra que a capacidade da FcZn de produzir oxigênio singlete não foi afetada pela presença do grupamento tetracarboxi e da meglumina.

Com esses experimentos pode-se também fazer uma estimativa da porcentagem de fotodegradação dos FSs que foi medida a partir da diferença entre

a intensidade da banda de maior absorção da FcZn (672 nm) e seus derivados (684 nm), antes e após irradiação (50 min). A FcZn apresentou maior porcentagem de fotodegradação (70%) o que corresponde a aproximadamente 4 vezes mais que o observado para FcZnTc (18%) e FcZnTcG (16%) (Figura 21). Pode-se sugerir que a inserção de grupamentos hidrossolúveis à FcZn aumentou sua fotoestabilidade, uma vez que diminuiu sua fotodegradação em relação a FcZn na ausência desses grupamentos.

A Hy e a HyG, assim como as Fcs, foram capazes de oxidar o ácido úrico pela produção de  $^1\text{O}_2$  após irradiação com o LED amarelo. O aumento do tempo de irradiação promoveu uma diminuição na intensidade da banda do ácido úrico de até 30% na presença da Hy e 31% na presença da HyG, após 50 min de irradiação (Figura 22). Estes FSs se mostraram mais fotoestáveis que a FcZn e menos que as FcZnTc e FcZnTcG, uma vez que a Hy apresentou 34% de fotodegradação e a HyG 31% (Figura 23). O fato da FcZnTcG ter fotodegradado menos que a HyG pode ser explicado pela diferença estrutural entre os compostos, pois enquanto a HyG é funcionalizada com apenas uma molécula de meglumina a FcZnTcG apresenta quatro moléculas de meglumina e quatro grupos carboxilatos. Portanto, com os resultados obtidos neste trabalho sugere-se que quanto mais hidrofílico o FSs menos susceptível a fotodegradação ele se apresenta.

**Figura 22:** Espectros de absorção do ácido úrico ( $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  da **(a)** Hy e **(b)** HyG, após diferentes tempos de irradiação com LED amarelo (590 nm).



Com os resultados obtidos foi possível determinar o coeficiente de atividade fotodinâmica dos FSs (Tabela 4). As hipericinas apresentaram uma atividade fotodinâmica cerca de 10 vezes maior que as ftalocianinas. Se compararmos a Hy e FcZn com os seus derivados é possível notar que o aumento da solubilidade não está diretamente relacionado com o efeito fotodinâmico do FS, uma vez que o coeficiente de atividade fotodinâmica entre eles foi praticamente o mesmo

**Tabela 4:** Coeficientes de atividade fotodinâmica dos FSs. n = 4

<b>FS (5,0 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Atividade fotodinâmica (<math>\text{m}^2 \text{J}^{-1}</math>)</b>
Hy	20,0 $\pm$ 2,1
HyG	21,0 $\pm$ 1,9
FcZn	2,2 $\pm$ 1,4
FcZnTc	2,4 $\pm$ 1,2
FcZnTcG	2,7 $\pm$ 1,6

### 5.1.3. Potencial zeta

A Tabela 5 mostra os valores de potencial zeta dos FSs em meio aquoso. A força iônica do meio foi mantida constante pela presença do tampão que também foi utilizado para mimetizar as condições fisiológicas

**Tabela 5:** Potencial zeta (mV) dos FSs em PBS. n=4

<b>FS (2,5 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
Hy	- 27,13 $\pm$ 2,06
HyG	-32,85 $\pm$ 1,59
FcZn	-24,08 $\pm$ 1,60
FcZnTc	-29,06 $\pm$ 3,03
FcZnTcG	- 34,80 $\pm$ 2,41

O valor negativo do potencial indica que na presença do PBS a dupla camada elétrica das partículas consiste de íons positivos encontrados principalmente

adsorvidos na camada de adsorção primária enquanto que os íons negativos distribuem-se na camada do contra-íon [160]

Foi possível observar um aumento em módulo do potencial para valores próximos ou superiores a 30 mV para as espécies mais hidrofílicas indicando que esta propriedade proporciona às partículas dispersas no meio tamponado elevada resistência à agregação [161].

## **5.2. Ensaio de acumulação dos fotossensibilizadores**

Para melhor compreensão dos resultados este item foi dividido em duas partes: células planctônicas e biofilme. Em ambas as partes, os resultados de acumulação intracelular dos FSs foram comparados entre as bactérias e a VERO, para determinar os parâmetros de fotoinativação (tempo de incubação e concentração do FS) de modo a inibir os microrganismos, sem provocar danos às células epiteliais.

### **5.2.1. Células planctônicas**

As tabelas 6 e 7 mostram os resultados de acumulação intracelular das ftalocianinas e hipericinas, respectivamente, em função do tempo de incubação e da concentração dos FSs.

Em todas as condições de estudo o aumento da concentração dos FSs promoveu maior acumulação intracelular, principalmente em *S. aureus*. Esta bactéria apresentou, em menores tempos de incubação, maiores concentrações dos FSs incorporados intracelularmente comparando com *E. coli*. Assim, de uma maneira geral, a partir de 5 min quase 100% da concentração total dos FSs já estava acumulado intracelularmente em *S. aureus*, enquanto que neste mesmo tempo *E. coli* havia incorporado no máximo cerca de 50%. A porcentagem de acumulação em *E. coli* diminuiu conforme aumentou a hidrofobicidade dos FSs. Esta diferença de acumulação pode ser justificada pela presença de LPS na parede celular de *E. coli*, dificultando a penetração intracelular dos FSs [101].

A hidrofiliabilidade dos FSs favoreceu sua acumulação intracelular, podendo-se notar maiores concentrações de FcZnTcG nas células bacterianas, independente do tempo de incubação (Tabela 6). Por outro lado, a FcZn se mostrou menos eficaz para se acumular nas células microbianas, apresentando baixas relações de

concentração em função da concentração de proteína (Tabela 6). Assim, quando comparamos estas Fc é possível observar que no estudo com a *S. aureus*, a acumulação de FcZn ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) após 10 minutos de incubação é de  $0,235 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$  enquanto que a de FcZnTcG ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) é de  $0,749 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$  após um tempo de incubação quase 5 vezes menor (2:30 min).

**Tabela 6:** Acumulação intracelular ( $\mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) de FcZn, FcZnTc e FcZnTcG nas bactérias *S. aureus* e *E. coli* e nas células VERO, em função da concentração dos FSs e do tempo de incubação. n= 3

FS	Tempo de incubação (minutos)	Concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	VERO
FcZn	2:30	1,125	0,002 $\pm$ 0,004	0,001 $\pm$ 0,001	0,0001 $\pm$ 0,0023
		2,5	0,018 $\pm$ 0,007	0,008 $\pm$ 0,003	0,0002 $\pm$ 0,0031
		5,0	0,089 $\pm$ 0,016	0,026 $\pm$ 0,008	0,0005 $\pm$ 0,0003
		10,0	0,168 $\pm$ 0,044	0,079 $\pm$ 0,008	0,0007 $\pm$ 0,0005
	5	1,125	0,053 $\pm$ 0,005	0,034 $\pm$ 0,005	0,0003 $\pm$ 0,0004
		2,5	0,076 $\pm$ 0,013	0,037 $\pm$ 0,004	0,0007 $\pm$ 0,0002
		5,0	0,157 $\pm$ 0,070	0,088 $\pm$ 0,032	0,0012 $\pm$ 0,0012
		10,0	0,208 $\pm$ 0,035	0,164 $\pm$ 0,015	0,0019 $\pm$ 0,0015
	10	1,125	0,067 $\pm$ 0,002	0,042 $\pm$ 0,003	0,0005 $\pm$ 0,0009
		2,5	0,097 $\pm$ 0,013	0,076 $\pm$ 0,021	0,0012 $\pm$ 0,0005
		5,0	0,191 $\pm$ 0,036	0,102 $\pm$ 0,017	0,0023 $\pm$ 0,0011
		10,0	0,235 $\pm$ 0,011	0,154 $\pm$ 0,037	0,0030 $\pm$ 0,0021
FcZnTc	2:30	1,125	0,070 $\pm$ 0,019	0,038 $\pm$ 0,003	0,0001 $\pm$ 0,0003
		2,5	0,149 $\pm$ 0,017	0,089 $\pm$ 0,007	0,0004 $\pm$ 0,0010
		5,0	0,360 $\pm$ 0,073	0,182 $\pm$ 0,034	0,0007 $\pm$ 0,0016
		10,0	0,501 $\pm$ 0,010	0,246 $\pm$ 0,014	0,0010 $\pm$ 0,0025
	5	1,125	0,092 $\pm$ 0,006	0,074 $\pm$ 0,007	0,0004 $\pm$ 0,0012
		2,5	0,204 $\pm$ 0,021	0,144 $\pm$ 0,025	0,0009 $\pm$ 0,0006
		5,0	0,395 $\pm$ 0,060	0,266 $\pm$ 0,013	0,0016 $\pm$ 0,0007
		10,0	0,655 $\pm$ 0,032	0,347 $\pm$ 0,035	0,0023 $\pm$ 0,0005
	10	1,125	0,093 $\pm$ 0,004	0,111 $\pm$ 0,010	0,0008 $\pm$ 0,0006
		2,5	0,208 $\pm$ 0,025	0,183 $\pm$ 0,008	0,0017 $\pm$ 0,0009
		5,0	0,403 $\pm$ 0,058	0,320 $\pm$ 0,008	0,0029 $\pm$ 0,0001
		10,0	0,698 $\pm$ 0,015	0,405 $\pm$ 0,043	0,0036 $\pm$ 0,0008
FcZnTcG	2:30	1,125	0,100 $\pm$ 0,004	0,097 $\pm$ 0,005	0,0003 $\pm$ 0,0007
		2,5	0,200 $\pm$ 0,014	0,184 $\pm$ 0,009	0,0005 $\pm$ 0,0009
		5,0	0,450 $\pm$ 0,042	0,301 $\pm$ 0,036	0,0011 $\pm$ 0,0002
		10,0	0,749 $\pm$ 0,107	0,350 $\pm$ 0,017	0,0013 $\pm$ 0,0006
	5	1,125	0,150 $\pm$ 0,010	0,115 $\pm$ 0,013	0,0006 $\pm$ 0,0002
		2,5	0,287 $\pm$ 0,012	0,193 $\pm$ 0,022	0,0014 $\pm$ 0,0009
		5,0	0,498 $\pm$ 0,045	0,330 $\pm$ 0,018	0,0019 $\pm$ 0,0003
		10,0	0,895 $\pm$ 0,221	0,454 $\pm$ 0,047	0,0029 $\pm$ 0,0004
	10	1,125	0,194 $\pm$ 0,010	0,133 $\pm$ 0,017	0,0010 $\pm$ 0,0016
		2,5	0,298 $\pm$ 0,320	0,221 $\pm$ 0,022	0,0019 $\pm$ 0,0005
		5,0	0,500 $\pm$ 0,038	0,370 $\pm$ 0,003	0,0032 $\pm$ 0,0007
		10,0	0,898 $\pm$ 0,153	0,541 $\pm$ 0,053	0,0039 $\pm$ 0,0003

Com relação à acumulação das hipericinas apresentada na Tabela 7, foi possível observar que as bactérias acumularam intracelularmente maiores concentrações de Hy que FcZn, comparáveis as concentrações recuperadas de FcZnTc. Isso pode ser explicado devido ao grande caráter lipofílico da Hy que, segundo Bernal [162] facilita a penetração deste FS nas células. Apesar disto, foi possível observar que o caráter polar dos FSs é mais significativo para acumulação destes nas células microbianas que o caráter apolar. Este fato pode ser confirmado com a o aumento da acumulação intracelular de Hy após ser funcionalizada com a molécula de meglumina.

Além disso, foi possível observar que aqueles FSs (FcZnTcG e HyG) que apresentaram maior resistência à agregação nos ensaios com o potencial zeta, apresentaram maior acumulação intracelular nas células bacterianas, podendo sugerir que a diminuição da agregação do FSs em meio aquoso também influencia diretamente na acumulação intracelular.

**Tabela 7:** Acumulação intracelular ( $\mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) de Hy e HyG nas bactérias *S. aureus* e *E. coli* e nas células VERO, em função da concentração dos FSs e do tempo de incubação. n=3

FS	Tempo de incubação (minutos)	Concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	VERO
Hy	2:30	1,125	0,016 $\pm$ 0,004	0,014 $\pm$ 0,005	0,0001 $\pm$ 0,0004
		2,5	0,051 $\pm$ 0,008	0,043 $\pm$ 0,008	0,0003 $\pm$ 0,0001
		5,0	0,147 $\pm$ 0,014	0,130 $\pm$ 0,020	0,0006 $\pm$ 0,0010
		10,0	0,341 $\pm$ 0,041	0,226 $\pm$ 0,032	0,0008 $\pm$ 0,0003
	5	1,125	0,072 $\pm$ 0,002	0,037 $\pm$ 0,006	0,0003 $\pm$ 0,0003
		2,5	0,189 $\pm$ 0,010	0,122 $\pm$ 0,017	0,0007 $\pm$ 0,0007
		5,0	0,389 $\pm$ 0,015	0,268 $\pm$ 0,028	0,0014 $\pm$ 0,0004
		10,0	0,631 $\pm$ 0,011	0,318 $\pm$ 0,045	0,0020 $\pm$ 0,0010
	10	1,125	0,073 $\pm$ 0,006	0,052 $\pm$ 0,006	0,0006 $\pm$ 0,0002
		2,5	0,187 $\pm$ 0,012	0,158 $\pm$ 0,015	0,0015 $\pm$ 0,0013
		5,0	0,398 $\pm$ 0,051	0,286 $\pm$ 0,010	0,0026 $\pm$ 0,0010
		10,0	0,670 $\pm$ 0,026	0,362 $\pm$ 0,041	0,0032 $\pm$ 0,0001
HyG	2:30	1,125	0,082 $\pm$ 0,006	0,081 $\pm$ 0,018	0,0002 $\pm$ 0,0001
		2,5	0,173 $\pm$ 0,007	0,119 $\pm$ 0,021	0,0004 $\pm$ 0,0011
		5,0	0,388 $\pm$ 0,028	0,200 $\pm$ 0,013	0,0009 $\pm$ 0,0002
		10,0	0,719 $\pm$ 0,065	0,276 $\pm$ 0,023	0,0011 $\pm$ 0,0008
	5	1,125	0,121 $\pm$ 0,005	0,094 $\pm$ 0,008	0,0005 $\pm$ 0,0008
		2,5	0,213 $\pm$ 0,013	0,171 $\pm$ 0,07	0,0012 $\pm$ 0,0012
		5,0	0,400 $\pm$ 0,029	0,293 $\pm$ 0,012	0,0017 $\pm$ 0,0004
		10,0	0,716 $\pm$ 0,017	0,411 $\pm$ 0,045	0,0026 $\pm$ 0,0008
	10	1,125	0,123 $\pm$ 0,009	0,110 $\pm$ 0,012	0,0009 $\pm$ 0,0002
		2,5	0,226 $\pm$ 0,013	0,188 $\pm$ 0,027	0,0017 $\pm$ 0,0010
		5,0	0,417 $\pm$ 0,009	0,324 $\pm$ 0,036	0,0030 $\pm$ 0,0006
		10,0	0,858 $\pm$ 0,062	0,452 $\pm$ 0,039	0,0037 $\pm$ 0,0008

A acumulação seletiva dos FSs foi possível, uma vez que foram recuperadas baixas concentrações destes compostos pelas células epiteliais. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao tamanho das células epiteliais VERO ser cerca de 10 vezes maior que das bactérias e pela presença de organelas revestidas por membranas, o que dificultou a incorporação dos FSs. Portanto, para aumentar a acumulação intracelular dos FSs à esta célula são necessários maiores tempos de incubação e altas concentrações de FS.

Diante dos resultados de acumulação foi possível determinar as condições para fotoinativação seletiva das bactérias na forma de células planctônicas.

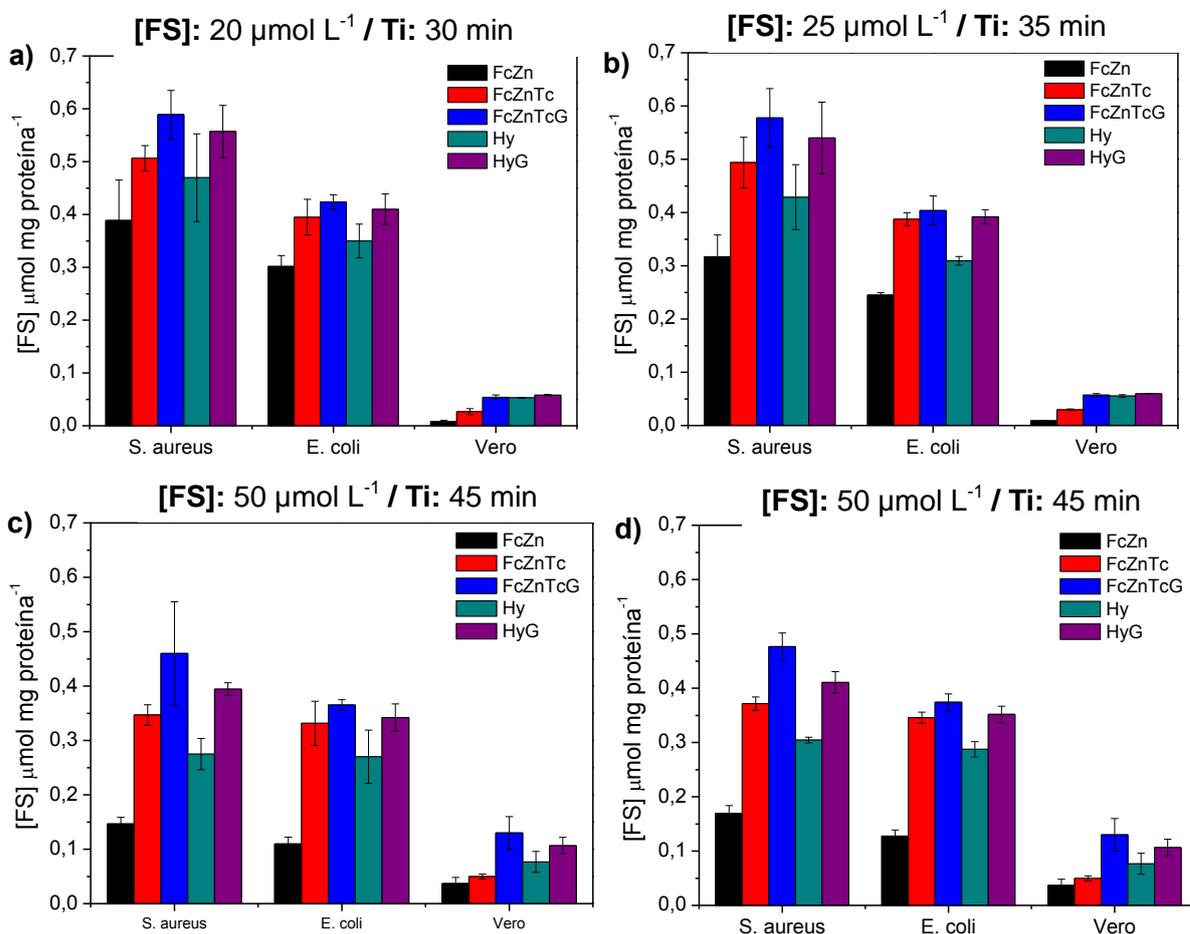
### 5.2.2. Biofilmes

A figura 23 apresenta as melhores condições de acumulação dos FSs nas diferentes etapas do biofilme de *S. aureus* e *E. coli*. Para obter estes resultados foi realizado um estudo de acumulação dos FSs em diferentes concentrações e com vários tempos de incubação (dados não mostrados).

No primeiro estágio de formação do biofilme (Figura 23a), foi necessária uma concentração de 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de FS e um tempo de incubação de 30 min, para obter uma acumulação intracelular de FS aproximada às células bacterianas na forma planctônica. Apesar do aumento dos parâmetros de acumulação, a concentração de FSs recuperado intracelularmente foi menor nas células aderidas que nas células planctônicas, provavelmente devido à interação da ECM das células microbianas com o substrato (placas de poliestireno) reduzir a área livre da bactéria para aproximação [51] e assim acumulação dos FSs. Nesta etapa os FSs funcionalizados com a meglumina foram mais acumulados tanto por *S. aureus* quanto por *E. coli*, podendo-se observar maior acumulação por *S. aureus*. A diferença de acumulação entre as células bacterianas, como já salientado, é devido as suas diferenças morfológicas [101]. No entanto, no estágio que apresenta um biofilme maduro (Figura 23c) estas diferenças não parecem ser tão significativas, uma vez que acumulação intracelular dos FSs nas células bacterianas é aproximadamente a mesma. Isso pode ser explicado pelo aparecimento de outro fator de resistência, o EPS, que se torna a principal barreira de defesa dos biofilmes bacterianos [60].

Este polissacarídeo começa a ser secretado no estágio de adesão irreversível [88], o que provocou uma diminuição na acumulação intracelular dos FSs pelas bactérias, mesmo com o aumento do tempo de incubação (35 min) e da concentração dos FSs para 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 23b).

**Figura 23:** Acumulação intracelular de FcZn, FcZnTc, FcZnTcG, Hy e HyG, nas diferentes etapas do biofilme de *S.aureus* e *E.coli*: **(a)** adesão reversível, **(b)** adesão irreversível, **(c)** biofilme maduro e **(d)** dispersão.



Ainda em relação à figura 23b foi possível observar maior acumulação intracelular dos FSs mais hidrofílicos (FcZnTc, FcZnTcG e HyG) e que devido ao aumento dos parâmetros de acumulação a incorporação intracelular dos FSs em VERO foi ligeiramente maior, com exceção da FcZn. A FcZn, de acordo com os valores de potencial zeta (tabela 5) apresentou menor resistência de agregação em meio aquoso, influenciando na baixa acumulação intracelular deste FS em todas as células de estudo.

No terceiro estágio (biofilme maduro) o biofilme bacteriano está completamente formado e envolvido pela ECM que possui alta concentração de EPS. Portanto, foi necessário aumentar o tempo de incubação para 45 min e a concentração dos FSs para  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 23c). Estas condições permitiram que

os FSs fossem acumulados no biofilme, em especial os FSs mais hidrofílicos. Sugere-se que a incorporação dos FSs possa ter ocorrido devido à presença de canais aquosos nesta etapa do biofilme [70], permitindo principalmente a entrada dos FSs mais hidrofílicos. Apesar disso a concentração de FSs acumulado foi menor que para os estágios anteriores, provavelmente devido a essas cavidades aquosas não atingirem a camada mais profunda do biofilme e algumas vezes causar a remoção de metabólitos potencialmente tóxicos. [56].

A figura 23d mostra a acumulação intracelular dos FSs no último estágio de biofilme (dispersão). Nesta etapa foram utilizados os mesmos parâmetros de acumulação que no estágio anterior (Figura 23c). Pode-se observar que houve um ligeiro aumento na concentração dos FSs acumulados neste estágio do que no estágio anterior. Esse fato pode ser justificado pelo desprendimento de pedaços de biofilme, semelhantes às células planctônicas, que ocorre nesta etapa facilitando a incorporação dos FSs [61].

Portanto, de uma maneira geral a hidrofiliabilidade dos FSs promoveu maior acumulação em todos os estágios dos biofilmes bacterianos, podendo-se destacar a recuperação de maiores concentrações de FcZnTcG e de menores concentrações de FcZn. Se compararmos a acumulação intracelular dos biofilmes e das células epiteliais é possível dizer que houve uma acumulação seletiva, uma vez que mesmo em altas concentrações de FS ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e grandes tempos de incubação (45 min) a acumulação intracelular dos FSs em VERO foi cerca de três vezes menor que nos biofilmes bacterianos (Figura 23c).

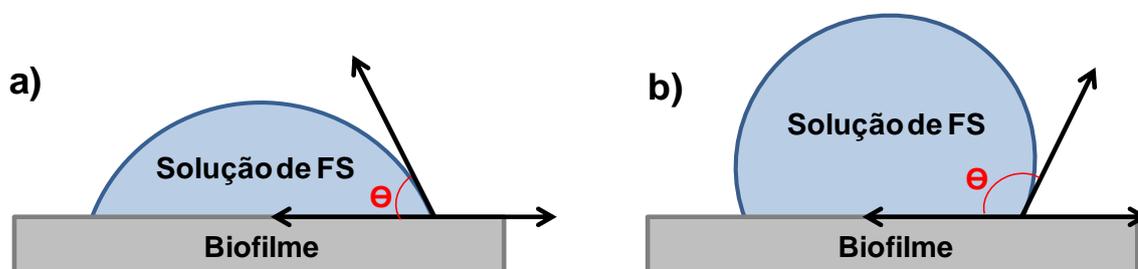
Este estudo foi de grande importância para definir os melhores parâmetros de fotoinativação tanto para as células planctônicas quanto para os biofilmes, uma vez que a eficiência da aPDT é dependente da localização do FS e portanto da acumulação intracelular deste composto [123]. Esta dependência com relação à localização do FS se deve ao curto raio de ação das EROs, principalmente do  $^1\text{O}_2$ , durante a irradiação [120]. Portanto, torna-se necessário que o FS se acumule intracelularmente, para que ocorra um aumento na eficiência de aPDT.

### 5.3. Ângulo de contato

O ângulo de contato foi importante para complementar os resultados de acumulação, uma vez que foi possível avaliar macroscopicamente a interação dos FSs com os biofilmes bacterianos, nas suas diferentes etapas de formação. Os resultados de ângulo de contato foram obtidos imediatamente após o gotejamento das soluções dos FSs (tabela 8) e após um determinado tempo de incubação (tabela 9), definido pelo ensaio de acumulação intracelular (item 5.2.2).

Esta técnica permite medir o ângulo  $\Theta$  formado entre a superfície do sólido (biofilmes) e o líquido (FSs), conforme pode ser observado na figura 24. Para determinar qual tipo de interação ocorreu entre a superfície dos biofilmes e as soluções de FSs, assumiu-se que ângulos  $\Theta > 60^\circ$  representam interações hidrofóbicas e ângulos  $\Theta < 60^\circ$  representam interações hidrofílicas [155].

**Figura 24:** Ilustração do ângulo de contato ( $\Theta$ ) entre a superfície do biofilme e a solução de FS: **(a)** representa uma interação hidrofílica ( $\Theta < 60^\circ$ ) e **(b)** representa uma interação hidrofóbica ( $\Theta > 60^\circ$ ).



Na tabela 8 é possível observar que a interação imediata dos biofilmes bacterianos com os FSs foi hidrofóbica, uma vez que todos os ângulos obtidos foram maiores que  $60^\circ$ . Apesar disso, é notável que os ângulos obtidos na presença dos FSs mais hidrossolúveis (FcZnTc, FcZnTcG e HyG) foram menores que dos FSs mais lipossolúveis (FcZn e Hy), principalmente na interação com o biofilme de *S. aureus*.

Os altos valores de  $\Theta > 60$  e, portanto, a baixa interação biofilme-FS, confirmaram a necessidade de aumentar o tempo de contato entre as soluções de

FSs e os biofilmes, para maior incorporação destes compostos pelos biofilmes bacterianos. Assim, foram feitas medidas dos ângulos de contato após incubação dos biofilmes com os FSs (tabela 9).

**Tabela 8:** Ângulo de contato obtido imediatamente após gotejamento das soluções de FSs sobre a superfície dos biofilmes bacterianos, nas diferentes etapas. n=3

Bactéria	Estágio do biofilme	Ângulo de contato ( $\Theta$ )				
		FcZn	FcZnTc	FcZnTcG	Hy	HyG
<i>S. aureus</i>	Adesão reversível	72,6 ± 1,2	66,2 ± 2,1	64,2 ± 1,2	70,3 ± 1,6	65,3 ± 2,3
	Adesão irreversível	74,5 ± 1,9	68,2 ± 1,3	66,3 ± 1,6	73,2 ± 1,8	68,1 ± 1,5
	Biofilme maduro	90,8 ± 2,4	80,1 ± 2,1	75,6 ± 1,6	84,1 ± 1,6	78,2 ± 1,4
	Dispersão	89,4 ± 3,1	80,8 ± 2,3	75,0 ± 2,0	83,5 ± 1,9	76,5 ± 2,5
<i>E. coli</i>	Adesão reversível	78,2 ± 1,9	70,3 ± 1,6	67,0 ± 1,7	75,2 ± 1,6	69,3 ± 1,4
	Adesão irreversível	81,5 ± 1,5	73,3 ± 1,4	69,5 ± 1,4	78,3 ± 1,7	70,6 ± 1,6
	Biofilme maduro	95,0 ± 1,3	86,1 ± 1,5	78,3 ± 1,5	87,2 ± 1,6	80,4 ± 1,8
	Dispersão	93,1 ± 1,6	85,2 ± 1,9	77,9 ± 1,6	89,1 ± 2,6	81,4 ± 2,7

A incubação com os FSs promoveu maior interação destes com os biofilmes bacterianos, em todas as etapas de formação dos biofilmes, havendo uma diminuição dos ângulos de contato em relação aos obtidos imediatamente após o gotejamento das soluções de FS. Esse efeito foi mais intensificado no biofilme de *S. aureus*, em especial quando na presença da FcZnTcG (Tabela 9).

**Tabela 9:** Ângulo de contato obtido após incubação das soluções de FSs com as superfícies dos biofilmes bacterianos, nas diferentes etapas. n=3

Bactéria	Estágio do biofilme	Ângulo de contato ( $\Theta$ )				
		FcZn	FcZnTc	FcZnTcG	Hy	HyG
<i>S. aureus</i>	Adesão reversível	56,2 ± 1,1	28,3 ± 1,1	15,7 ± 2,2	41,4 ± 1,0	13,1 ± 1,6
	Adesão irreversível	58,5 ± 1,4	34,7 ± 1,7	27,2 ± 1,9	45,2 ± 1,5	30,6 ± 2,2
	Biofilme maduro	73,4 ± 1,6	55,0 ± 2,0	42,2 ± 1,4	64,0 ± 1,0	49,2 ± 2,4
	Dispersão	76,5 ± 1,7	57,8 ± 1,5	40,4 ± 1,7	63,9 ± 2,8	46,0 ± 1,3
<i>E. coli</i>	Adesão reversível	59,8 ± 1,1	31,2 ± 1,6	19,0 ± 1,7	55,0 ± 1,3	27,0 ± 1,2
	Adesão irreversível	62,7 ± 1,8	40,9 ± 1,0	26,5 ± 1,9	58,1 ± 1,4	33,9 ± 1,0
	Biofilme maduro	77,3 ± 1,8	59,0 ± 1,2	49,3 ± 1,5	67,0 ± 1,2	54,0 ± 1,5
	Dispersão	77,6 ± 1,4	58,2 ± 1,6	47,7 ± 1,9	66,8 ± 1,8	51,9 ± 2,0

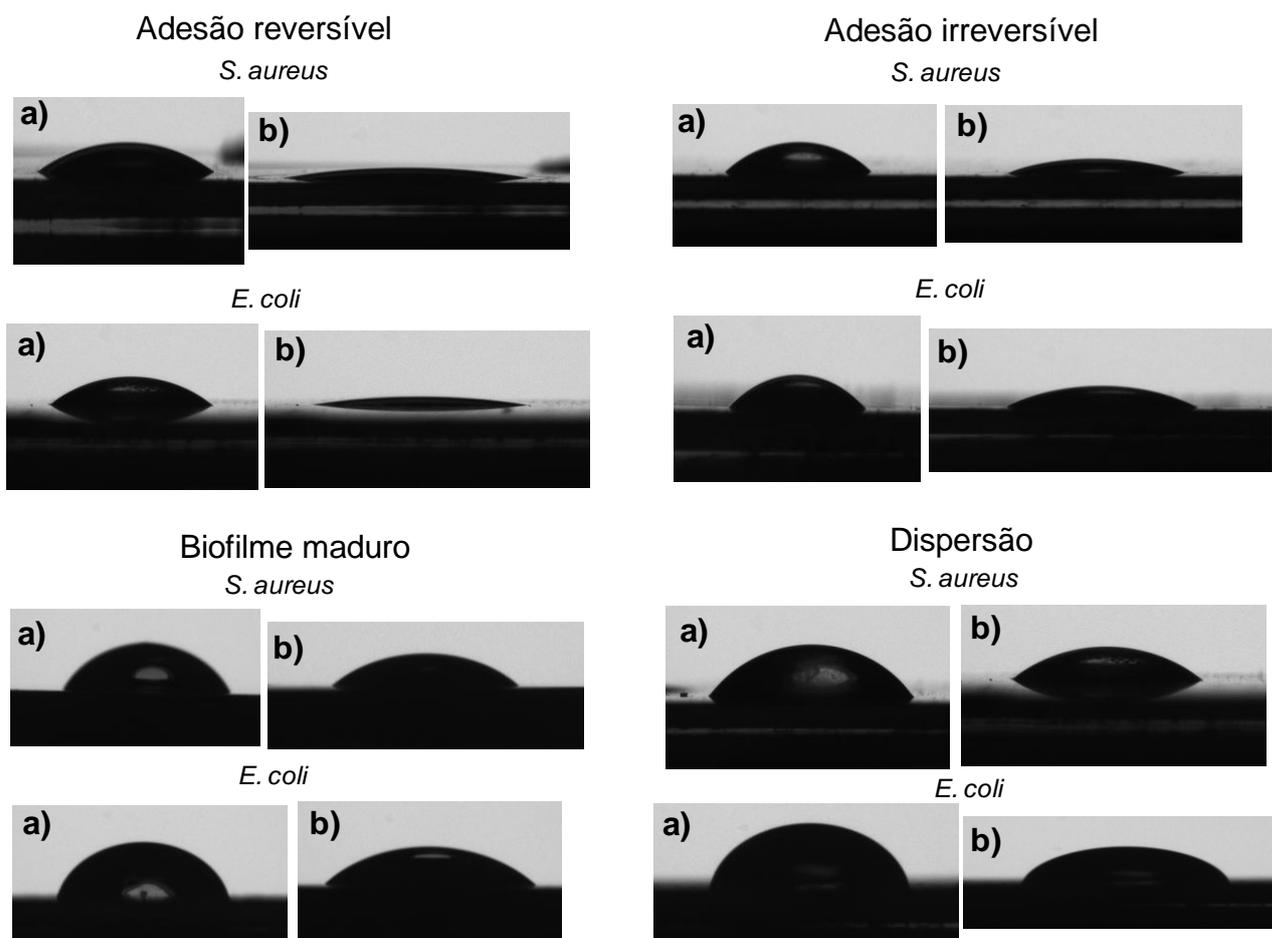
Na etapa de adesão reversível, a diferença dos resultados de ângulo de contato entre as células bacterianas pode ser explicada pela alta taxa de peptidoglicano presente na parede celular de *S. aureus* que permite aos FSs serem incorporados mais facilmente que em *E. coli*, que por sua vez possui maiores quantidades de lipídeos em sua parede celular do que de peptidoglicano [163].

Assim como observado na tabela 8, a evolução dos biofilmes bacterianos provocou um aumento nos ângulos  $\Theta$ , provavelmente devido ao aparecimento e aumento da concentração de EPS a partir da etapa de adesão irreversível. Esse aumento não foi evidente na etapa de dispersão onde ocorreu uma estabilização ou diminuição no valor de  $\Theta$ , que pode ser justificado pelo desprendimento de partes do biofilme e pela diminuição da produção de EPS, tornando as bactérias mais susceptíveis a interação com os FSs.

Os resultados de ângulo de contato corroboram com os de acumulação, pois os FSs mais hidrossolúveis apresentaram os menores valores de  $\Theta$  e, portanto, são mais facilmente incorporados pelos biofilmes bacterianos.

Devido à similaridade entre as fotografias dos ângulos, as figuras abaixo estão apresentando somente os resultados mais promissores obtidos na presença de FcZnTcG, antes e após incubação com os biofilmes bacterianos (Figura 25).

**Figura 25:** Fotografias dos ângulos de contato entre FcZnTcG e as diferentes etapas de formação do biofilme de *S. aureus* e *E. coli*, obtidas imediatamente **(a)** após a adição da gota e **(b)** depois de um determinado tempo de incubação.



## 5.4. Ensaio de Fotoinativação

### 5.4.1. Fotoinativação seletiva de *S. aureus*

#### 5.4.1.1. Células planctônicas

Os resultados obtidos nos ensaios de acumulação intracelular (item 5.2.1) contribuíram para determinar o parâmetro - tempo de incubação, para realização dos ensaios de fotoinativação. Portanto, previamente à irradiação, *S. aureus* foi incubada

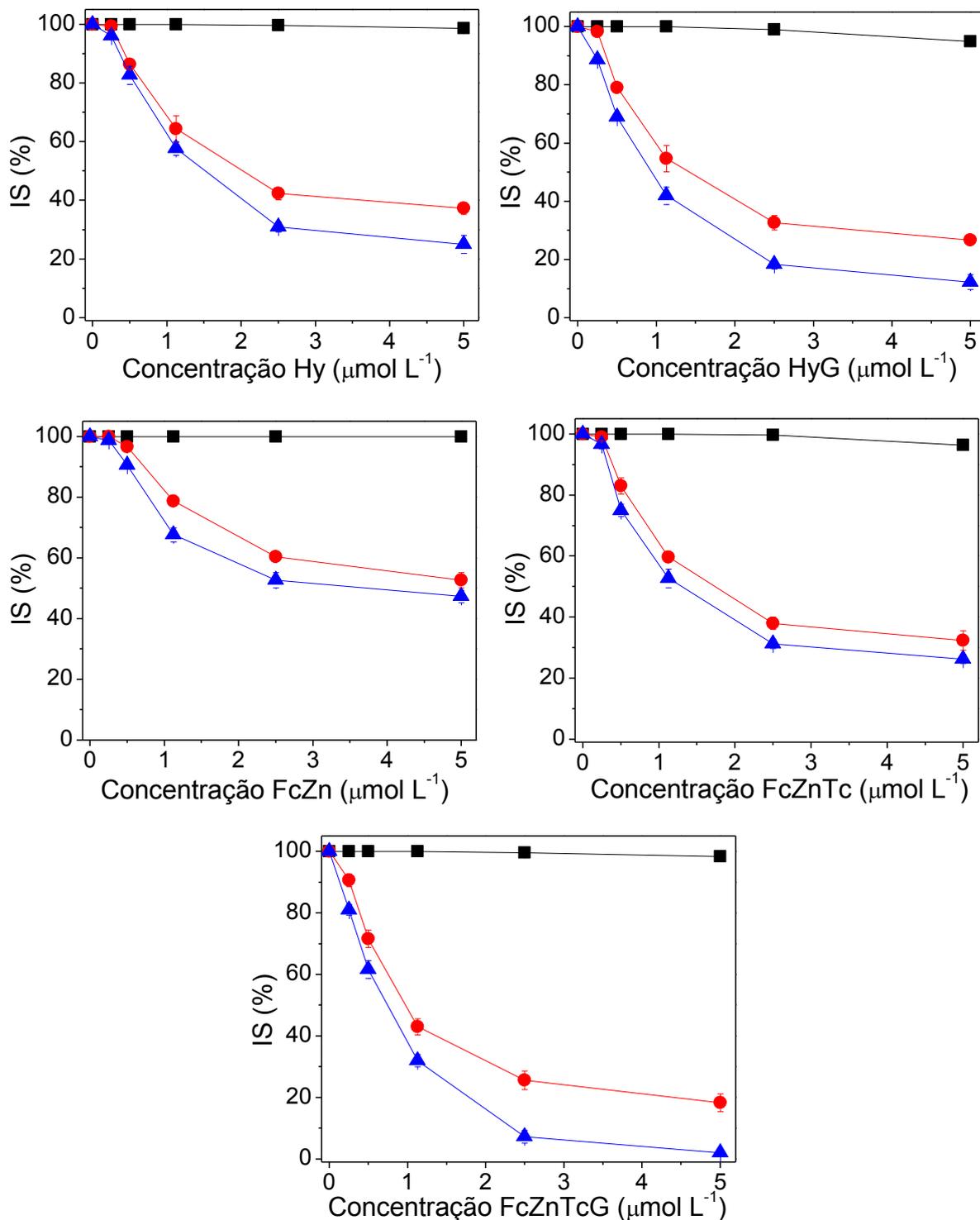
no escuro por 5 min com os FSs, uma vez que acima deste tempo a acumulação intracelular dos FSs por *S. aureus* não aumentou significativamente (Tabela 6 e 7).

As células bacterianas que não foram irradiadas (escuro) após incubação com diferentes concentrações dos FSs (0,0 – 5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) apresentaram um índice de sobrevivência (IS) de aproximadamente 100% para todos os FSs (Figura 26). Após determinada as concentrações dos FSs e o tempo de incubação, foi avaliada a dose de luz adequada para inativação de *S. aureus*. A figura 26 mostra o IS de *S. aureus* após irradiação com LED amarelo ou LED vermelho, em diferentes doses de luz (3 e 6  $\text{J cm}^{-2}$ ).

Somente a irradiação com o LED amarelo ou LED vermelho não foi capaz de inibir *S. aureus*. Entretanto, a associação dos FSs com irradiação em seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção dentro da janela terapêutica inibiu o crescimento de *S. aureus*. Essa inibição foi intensificada com o aumento da dose de luz e da concentração dos FSs. No caso das hipericinas quando dobrou-se a dose de luz ocorreu uma diminuição de ~10% no IS de *S. aureus*. Tal fato não foi tão evidente para a FcZn e FcZnTc, uma vez que o aumento da dose de luz promoveu apenas um acréscimo na inibição de ~3% no crescimento *S. aureus*. A FcZnTcG por sua vez foi o FS que demonstrou maior eficácia com o aumento da dose de luz, pois o IS de *S. aureus* diminuiu cerca de 20%.

Conforme salientado o aumento da concentração dos FSs provocou uma diminuição do IS de *S. aureus*, no entanto a cinética da inibição bacteriana em relação à concentração dos FSs diminuiu a partir de 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Figura 26:** Índice de sobrevivência de *S. aureus* após 5 minutos de incubação com diferentes concentrações de Hy, HyG, FcZn, FcZnTc e FcZnTcG e irradiação nas doses de luz: (■) 0, (●) 3 e (▲) 6 J cm<sup>-2</sup>.



De uma maneira geral é possível observar que os FSs mais hidrossolúveis promoveram maior inativação de *S. aureus*, podendo-se destacar a FcZnTcG que na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  após 5 min de incubação e dose de luz de  $6 \text{ J cm}^{-2}$  foi capaz de inativar quase 100% deste microrganismos (Figura 26).

A FcZn na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $6 \text{ J cm}^{-2}$ , inibiu somente 50% de *S. aureus* (Figura 26). Isso pode ser explicado pela baixa acumulação intracelular deste FS por *S. aureus* (Tabela 6). A FcZnTc, entretanto, nas mesmas condições de estudo foi capaz de inibir cerca de 28% a mais de *S.aureus* que a FcZn, provavelmente, devido ao maior acúmulo intracelular de FcZnTc por *S. aureus* que chegou ser cerca de duas vezes maior que de FcZn (Tabela 6).

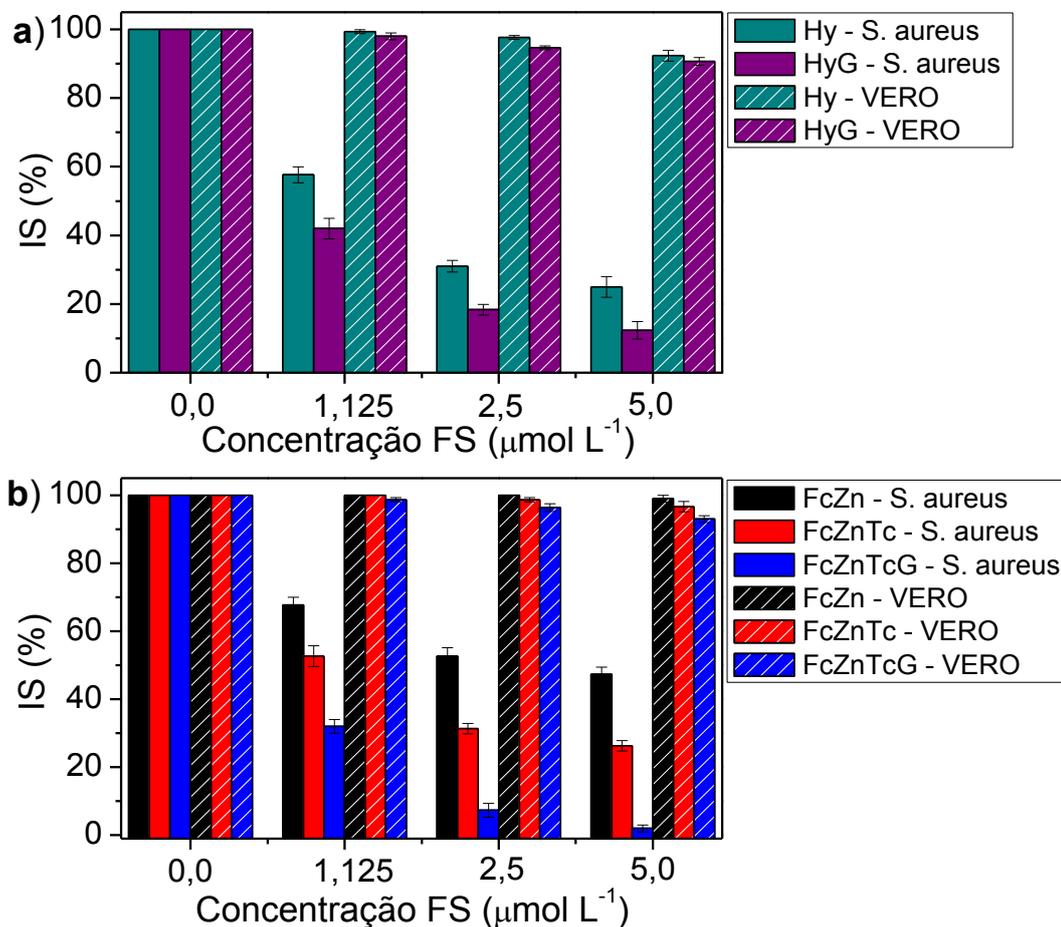
Os ensaios de fotoinativação na presença das hipericinas confirmaram os resultados obtidos com as ftalocianinas, uma vez que o aumento da hidrofiliçidade do FS promoveu maior inativação de *S. aureus*. Esse fato pôde ser observado principalmente nas condições máximas de estudo (concentração do FS de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , tempo de incubação de 5 min e dose de luz de  $6 \text{ J cm}^{-2}$ ), pois a inibição de *S. aureus* na presença de HyG foi cerca de 13% maior que na presença de Hy.

Diante dos resultados, sugere-se que a fotoinativação de *S. aureus* é mais dependente da concentração de FS acumulada intracelularmente que da atividade fotodinâmica deste composto para produzir oxigênio singlete, uma vez que FcZnTcG mesmo apresentando um coeficiente de atividade fotodinâmica 10 vezes menor que das hipericinas (Tabela 4) foi capaz que inativar 100% de *S. aureus* enquanto que Hy e HyG, nas condições de estudos, inibiram no máximo 77% e 90% destes microrganismos, respectivamente (Figura 26).

Os ensaios de fotoinativação de *S. aureus* contribuíram para determinar os parâmetros para fotoinativação seletiva deste microrganismo na forma de células planctônicas. A figura 27 mostra o índice de sobrevivência de *S. aureus* e Vero após 5 min de incubação com os FSs nas concentrações de 0 –  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz de  $6 \text{ J cm}^{-2}$ .

A irradiação com os LEDs amarelo ou vermelho na dose de luz de  $6 \text{ J cm}^{-2}$ , não provocaram nenhum dano às células epiteliais que permaneceram com o IS em 100% (Figura 27). Os FSs ( $1,125$ ;  $2,5$  e  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) após 5 min de incubação com a Vero também não promoveram inibição desta célula epitelial (dados não mostrados).

**Figura 27:** Índice de sobrevivência de *S. aureus* e Vero após 5 minutos de incubação com diferentes concentrações dos FSs ((a) Hy e HyG, (b) FcZn, FcZnTc e FcZnTcG) e irradiação na dose de luz  $6 \text{ J cm}^{-2}$ .

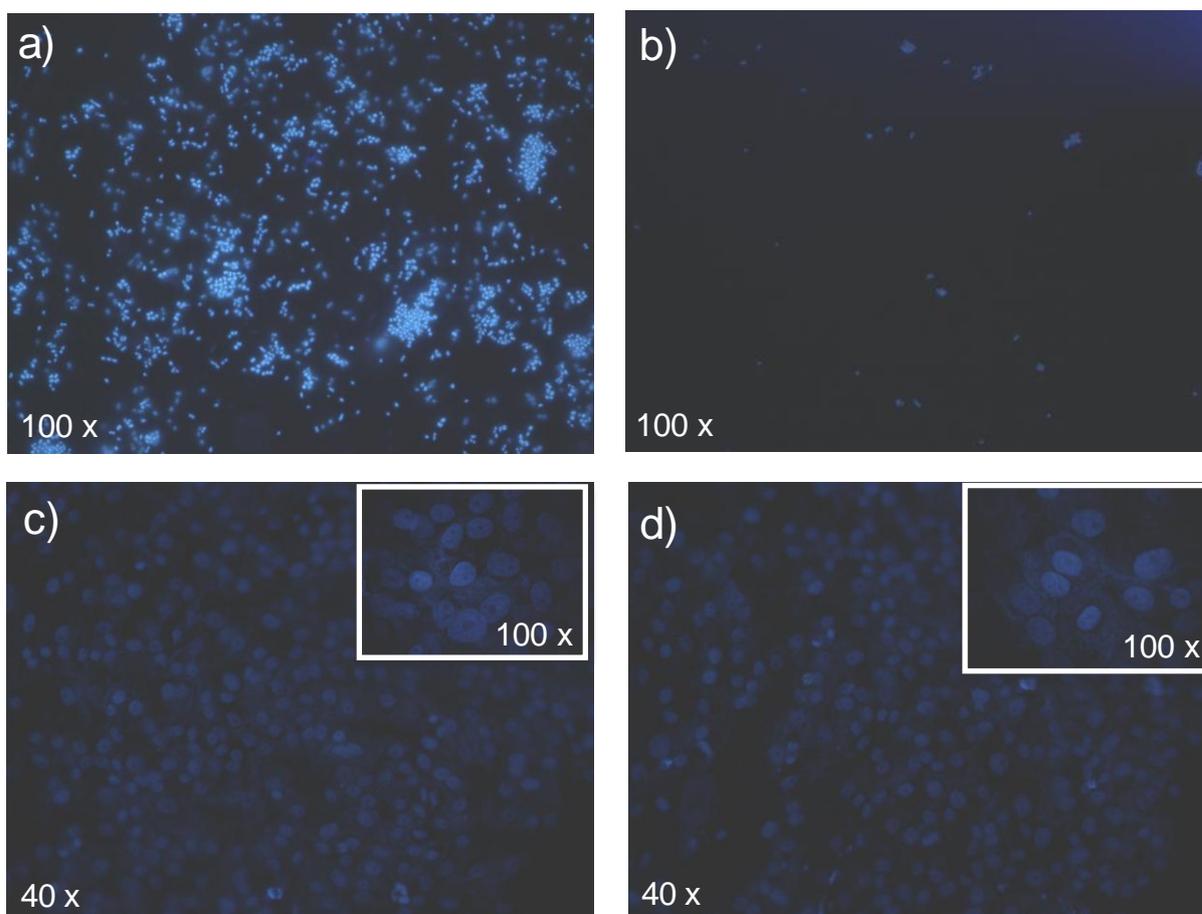


Conforme observado no ensaio de acumulação (item 5.2.1) as células epiteliais Vero acumularam intracelularmente baixas concentrações dos FSs, sendo que mesmo após 5 min de incubação com os FSs ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi obtido no máximo uma acumulação de  $0,0019 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ , enquanto que *S. aureus* foi capaz de acumular  $0,498 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$  (Tabela 6). Isso contribuiu para houvesse uma baixa inibição das células epiteliais Vero após irradiação e, portanto tornando possível a fotoinativação seletiva de *S. aureus*.

Os FSs mais hidrossolúveis foram capazes de atingir maior seletividade que os FS hidrofóbicos, uma vez que provocaram maior inibição no crescimento de *S. aureus* com o mínimo de dano as células epiteliais Vero. Esse fato foi mais evidente para a FcZnTcG, uma vez que promoveu a fotoinativação seletiva de *S. aureus* em

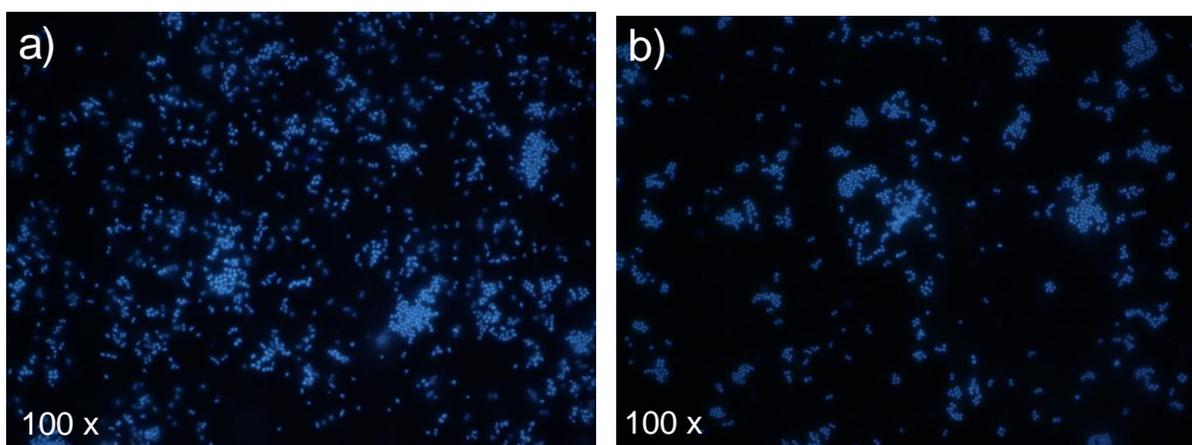
todas as condições de estudo. Vale destacar que a FcZnTcG na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  apresentou os melhores resultados de seletividade, pois após irradiação com LED vermelho ( $6 \text{ J cm}^{-2}$ ) foi capaz de inibir  $\sim 100\%$  de *S. aureus* e apenas 7% das células Vero (Figura 27b). Este resultado pôde ser visualizado pela microscopia de fluorescência com DAPI, onde observou-se uma diminuição significativa na quantidade de *S. aureus* após a fotoinativação (Figura 28b) em relação ao controle (Figura 28a). Foi observado também que o número de células epiteliais permaneceu praticamente o mesmo antes e após fotoinativação (Figuras 28c e 28d). Vale destacar que devido à similaridade entre as fotos obtidas de Vero antes e após a PDT, independente do FS utilizado, a mesma foi representada somente pela figura 28.

**Figura 28:** Microscopia de fluorescência de **(b)** *S. aureus* e **(d)** Vero após 5 min de incubação com FcZnTcG na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $6 \text{ J cm}^{-2}$ . Os controles de **(a)** *S. aureus* e **(c)** Vero estão também representados.



A FcZn foi o FS que demonstrou ser menos eficaz para alcançar a seletividade de *S. aureus*, pois apesar de não ter provocado dano às células epiteliais (IS 99%), foi capaz de inativar somente 50% das células bacterianas (Figura 27b). Isso pode ser justificado pela baixa acumulação intracelular de *S. aureus* causada pela hidrofobicidade de FcZn. Isto pôde ser observado na microscopia de fluorescência de *S. aureus* onde houve uma diminuição do número de células desta bactéria em relação ao controle (Figura 29), que não foi tão significativa quanto na presença dos outros FSs (Figura 28 e 30).

**Figura 29:** Microscopia de fluorescência de *S. aureus* (a) antes e (b) após 5 min de incubação com FcZn na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $6 \text{ J cm}^{-2}$ .

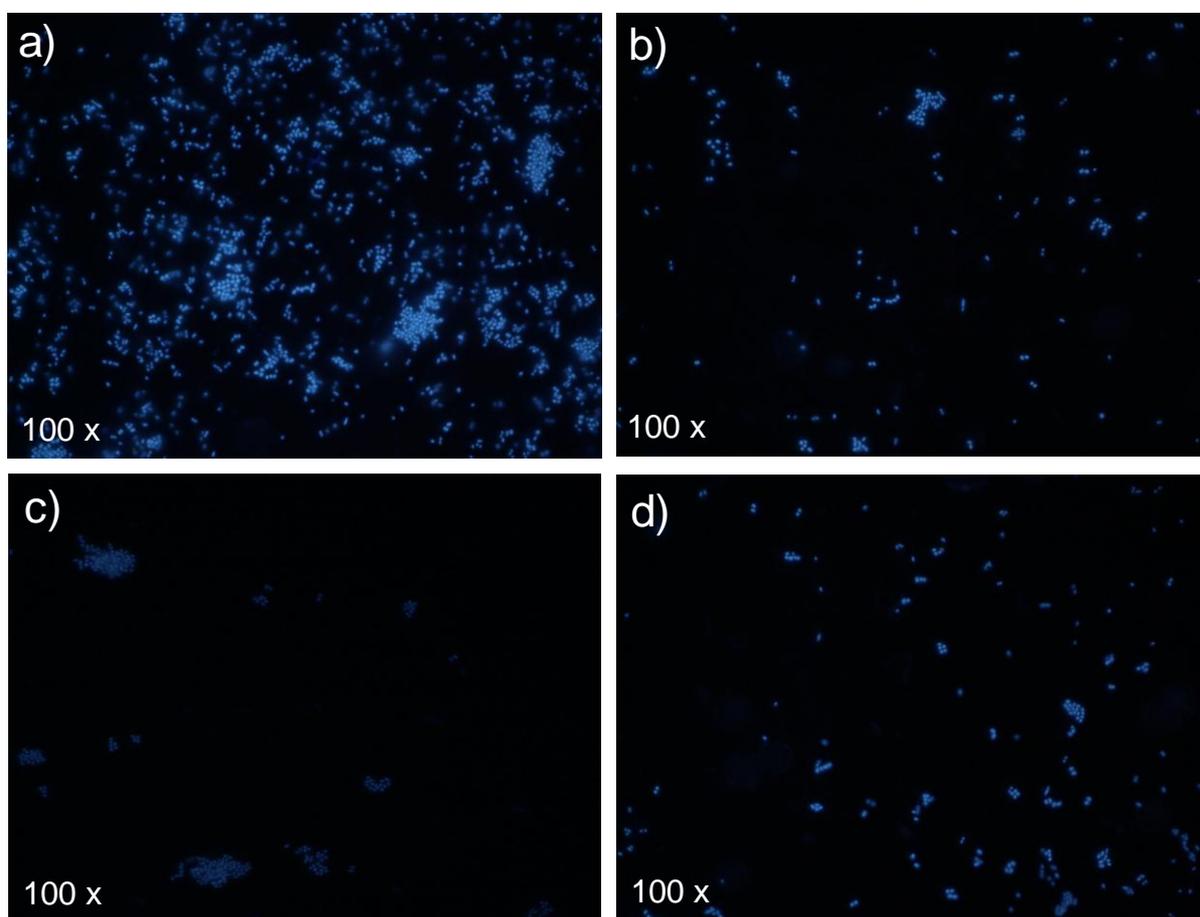


Em relação ao outro FS hidrofóbico (Hy), foi possível notar a fotoinativação seletiva de *S. aureus* nas concentrações de  $2,5$  e  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , uma vez que este FS inibiu cerca de 70% e 77% das células bacterianas e somente 3% e 7% das células epiteliais, respectivamente. Os ensaios na presença de HyG e FcZnTc se comportaram de maneira similar aos ensaios na presença de Hy, pois a fotoinativação seletiva de *S. aureus* foi possível somente nas concentrações de  $2,5$  e  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . No entanto, enquanto HyG ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) inativou 10% de Vero e 90% de *S. aureus*, a FcZnTc ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) inibiu 3% das células epiteliais e 78% de *S. aureus*. Diante disso, é possível afirmar que os FSs mais hidrossolúveis (HyG, FcZnTc e FcZnTcG) na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , após 5 min de incubação com às células Vero e *S.aureus* e irradiação na dose de luz  $6 \text{ J cm}^{-2}$  são mais eficazes

para promover a fotoinativação seletiva de *S. aureus* que seus compostos de origem (Hy e FcZn).

A figura 30 mostra as fotos obtidas por microscopia de fluorescência com o marcador DAPI das melhores condições de seletividade para *S. aureus* na presença dos FSs Hy, HyG e FcZnTc. Conforme pôde ser observado há um número menor de células bacterianas na presença de HyG que na presença de Hy e FcZnTc, devido à maior inibição de *S. aureus* por HyG.

**Figura 30:** Microscopia de fluorescência de *S. aureus* após 5 min de incubação com **(b)** Hy, **(c)** HyG e **(d)** FcZnTc na concentração de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $6 \text{ J cm}^{-2}$ . O controle de *S. aureus* **(a)** está também representado.



Sendo *S. aureus* uma das bactérias que mais desenvolve resistência aos antibióticos, há na literatura vários estudos que mostram a aplicação e eficiência de aPDT na inibição desta bactéria. No entanto, os estudos de fotoinativação, em sua maioria, utilizam altas doses de luz e de concentração de FSs, dificultando a

obtenção da fotoinativação seletiva de *S. aureus*, o que valoriza ainda mais o presente trabalho. Recentemente, Hanakova e colaboradores investigaram a ação de duas porfirinas (TMPyP e ZnTPPS<sub>4</sub>) na inibição de *S. aureus*. Ambas foram capazes de inativar 100% de *S. aureus*, entretanto, para isso foi necessário utilizar uma alta concentração dos FSs (25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e uma dose de luz 25 vezes maior que a utilizada neste trabalho (150  $\text{J cm}^{-2}$ ) [164]. Ashkenazi e colaboradores também avaliaram a ação fotodinâmica de duas porfirinas para inibição de *S. aureus* e, mesmo após 30 min de incubação com as porfirinas (50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e irradiação na dose de luz 75  $\text{J cm}^{-2}$  o máximo de inativação de *S. aureus* obtida foi cerca de 60% [165].

Atualmente os fulerenos vêm sendo utilizados como FSs para fotoinativação microbiana e tem demonstrado resultados promissores quando grupamentos catiônicos são inseridos. Tegos e colaboradores avaliaram a eficiência dos fulerenos catiônicos na fotoinativação seletiva de *S. aureus* e puderam observar que este FS na concentração de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  associado dose de luz de 8  $\text{J cm}^{-2}$  foi capaz de inativar quase 100% de *S. aureus*. Entretanto, não foi possível obter a seletividade uma vez que o fulereno apresentou toxicidade no escuro às células de hospedeiras (fibroblastos) que foi reduzida em cerca de 40% [166]. A FcZn contendo grupamentos catiônicos também foi avaliada na literatura quanto a sua capacidade de obter a fotoinativação seletiva de *S. aureus*. Para tanto, a *S. aureus* e as células hospedeiras (fibroblastos) foram incubadas por 5 min com as FcZn catiônicas (0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e irradiadas com dose de luz 15  $\text{J cm}^{-2}$ . Os autores observaram que o aumento da quantidade de grupamento catiônico inserida à FcZn aumentou a inativação de *S. aureus* (62%), entretanto provocou a morte que 80% das células fibroblastos [108].

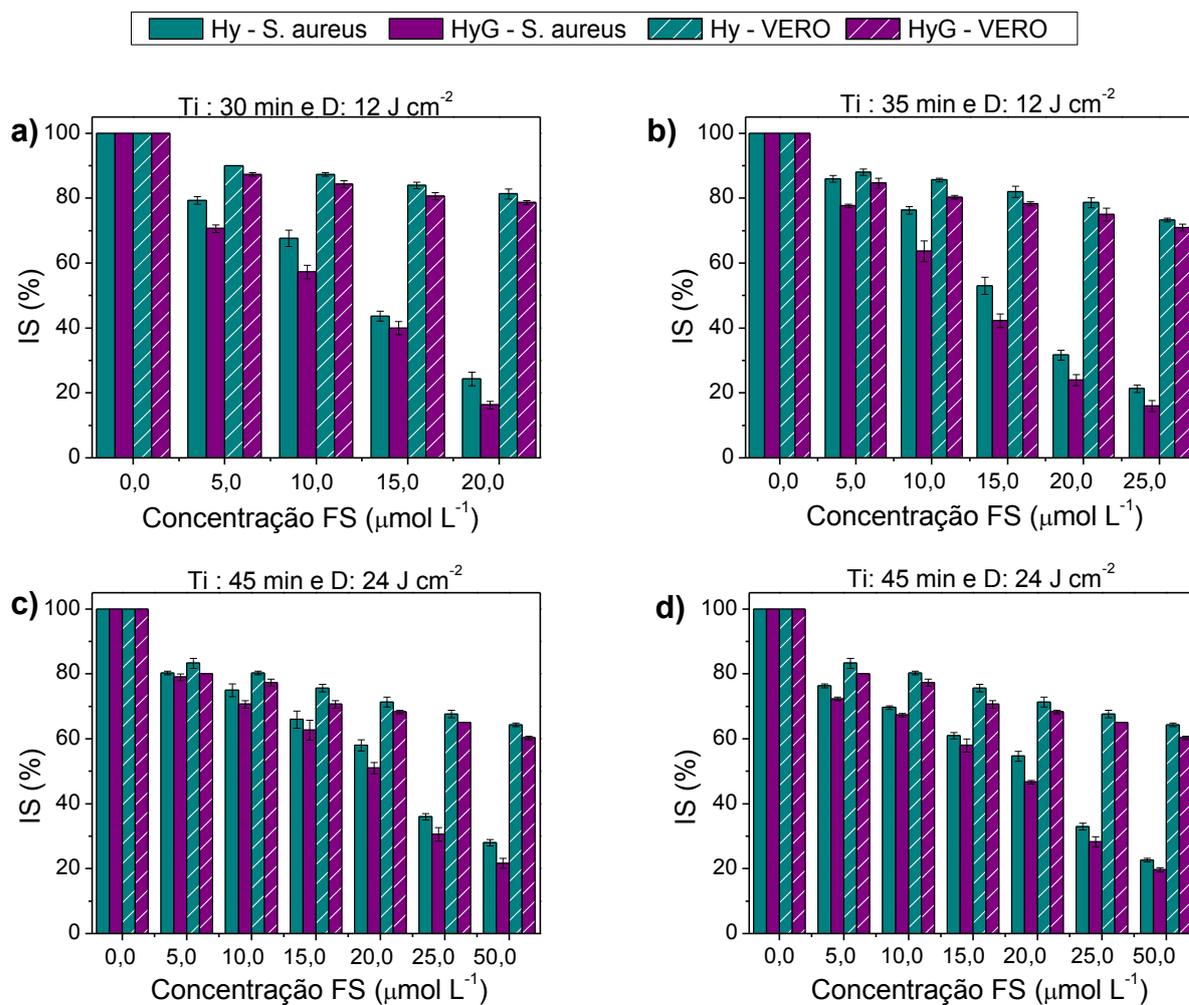
Portanto, se compararmos os resultados de fotoinativação seletiva de *S. aureus* obtidos neste trabalho com os descritos na literatura, é possível sugerir que os FSs hidrofílicos (HyG, FcZnTc e FcZnTcG) são mais eficazes que os FSs utilizados na literatura até o momento. Além disso, os parâmetros de fotoinativação empregados neste estudo contribuíram para a inibição de 100% das células bacterianas sem provocar dano às células empregadas como modelo de hospedeiro. Isso significa que a concentração do FS bem como o tempo de incubação devem ser baixos para facilitar a acumulação seletiva nos microrganismos que, como

demonstrado, é mais rápida nas bactérias do que nas células epiteliais, de forma que a irradiação com dose baixa leve ao dano somente aos microrganismos.

#### **5.4.1.2. Biofilme**

A figura 31 representa a fotoinativação seletiva do biofilme de *S. aureus*, nas diferentes etapas de formação, após incubação com as hipericinas e irradiação com o LED amarelo. Os parâmetros de fotoinativação definidos previamente pelo ensaio de acumulação (item 5.2.2) foram distintos para cada etapa do biofilme. Entretanto, independente da etapa do biofilme e da dose de luz, foi possível observar que apenas a irradiação com o LED amarelo não causa inibição da *S. aureus* ou das células Vero.

**Figura 31:** Índice de sobrevivência de células Vero e do biofilme de *S. aureus* nas diferentes etapas de formação do biofilme ((a) adesão reversível, (b) adesão irreversível, (c) biofilme maduro e (d) dispersão), após incubação com diferentes concentrações de Hy e HyG e irradiação com LED amarelo. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).



De uma maneira geral, o aumento da concentração das hipericinas reduziu o número de células de *S. aureus*. Isso foi mais evidente para os ensaios na presença de HyG, uma vez que, independente da etapa do biofilme, aumentou a inativação de *S. aureus* em 10% se comparado a Hy (Figura 31). Os resultados desse estudo permitem sugerir que este fato esteja relacionado ao biofilme de *S. aureus* acumular intracelularmente maiores concentrações de HyG que de Hy (Figura 23).

Na primeira etapa de formação do biofilme (adesão reversível) utilizou-se um tempo de incubação do FS de 30 min, dose de luz 12 J cm<sup>-2</sup> e concentrações dos

FSs de 0 – 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Estes parâmetros foram mais que o dobro do utilizado para a fotoinativação de *S. aureus* em cultura planctônica. Isso se deve à adesão da ECM bacteriana ao poliestireno reduzir a área livre do microrganismo para acumulação intracelular do FS [51] e, portanto reduz a morte das células, tornando assim necessário maiores tempos de incubação e dose de luz para alcançar a mesma inibição de *S. aureus* na forma planctônica. Apesar disso, foi possível obter condições de seletividade nesta etapa do biofilme bacteriano, pois na presença de 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Hy e HyG, após irradiação, foi possível inativar 76 e 84% de *S. aureus* enquanto somente 18 e 21% de células Vero foram inibidas, respectivamente (Figura 31a). Dessa forma, atingiu-se uma inativação seletiva considerável nessas condições.

Com o desenvolvimento do biofilme (etapa adesão irreversível) foi necessário aumentar o tempo de incubação para 35 min e a concentração para 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 31b), para alcançar a mesma inativação bacteriana que obtida na primeira etapa do biofilme (Figura 31a). Isso porque nesta etapa começa a ser secretado o EPS, que cria uma barreira entre as células e os FSs [57, 167]. O aumento do tempo de incubação e da concentração dos FSs necessários para a fotoinativação promoveu inibição ligeiramente maior de Vero por Hy (~26%) e HyG (~29%), dificultando a seletividade na inativação do biofilme de *S. aureus* a partir desta etapa.

O biofilme maduro secreta maiores concentrações de EPS (Figura 33b) além de apresentar outros meios de resistência contra agentes externos como os FSs. Deste modo, para obter uma inibição de aproximadamente 75% de *S. aureus* nesta etapa do biofilme foi necessário o tempo de incubação de 45 min, dose de luz de 24  $\text{J cm}^{-2}$  e concentração de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Hy e HyG (Figura 31c). Estes parâmetros de fotoinativação foram maiores que os utilizados nas etapas anteriores de formação do biofilme (Figuras 31a e 31b). Isso provocou maior acumulação intracelular de Hy e HyG pelas células epiteliais (Figura 23c), ocasionando uma diminuição de aproximadamente 10% a mais no IS de Vero que o obtido nas condições anteriores (Figura 31).

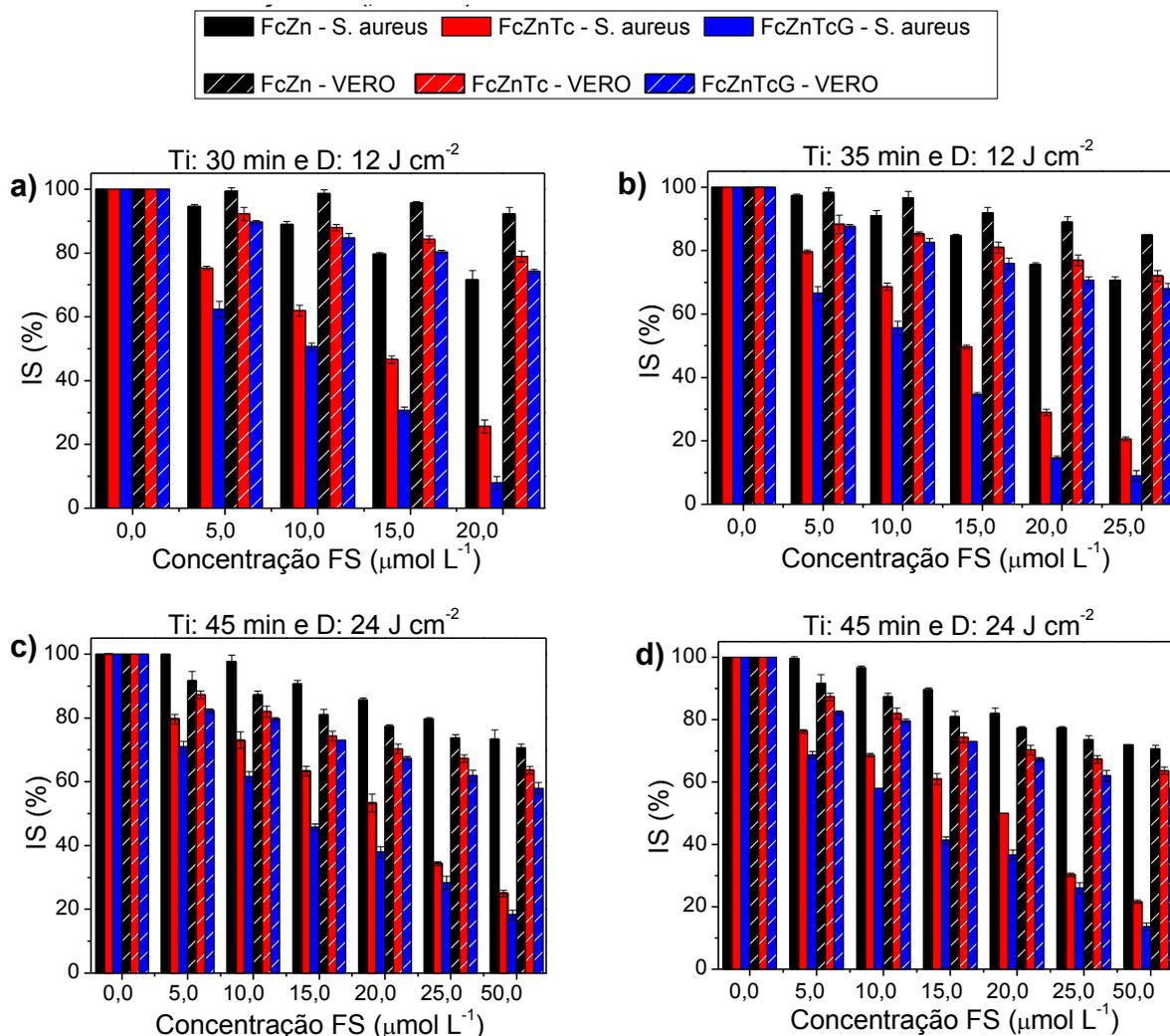
Como já discutido anteriormente na quarta etapa de formação do biofilme (dispersão), devido à diminuição de nutrientes no meio, ocorre o desprendimento de pedaços de biofilme que apresentam características semelhantes às células planctônicas. Deste modo, foi possível obter uma maior concentração de Hy e HyG

acumulada às células de *S. aureus* que na terceira etapa do biofilme (Figura 23c e 23d), o que proporcionou, nas condições de estudo, uma inibição bacteriana adicional de aproximadamente 7% (Figura 31c). Portanto, nesta etapa foi possível obter melhores condições de seletividade que na etapa anterior (biofilme maduro).

A figura 32 mostra os resultados de fotoinativação seletiva das diferentes etapas do biofilme de *S. aureus* na presença das ftalocianinas. Para facilitar a comparação, os parâmetros de fotoinativação deste estudo foram os mesmos utilizados nos ensaios anteriores na presença das hipericinas (Figura 31). Experimentos controle mostraram que somente a luz vermelha não promoveu nem inibição bacteriana nem das células epiteliais, independente da dose de luz utilizada neste trabalho (12 e 24 J cm<sup>-2</sup>). O aumento da concentração das ftalocianinas, entretanto, provocou maior inibição de ambas as células, sendo esta morte celular mais significativa em *S. aureus* (Figura 32). Isso se justifica pela maior acumulação intracelular das ftalocianinas por *S. aureus* que por células Vero (Figura 23).

O aumento da solubilidade de FcZn em meio aquoso com a inserção do grupamento tetracarboxila (FcZnTc) e da meglumina (FcZnTcG) promoveu o aumento da inibição de *S. aureus* em todas as etapas do biofilme bacteriano (Figura 32). Essa diferença de inativação celular entre o FS e seus derivados foi significativamente maior para as ftalocianinas que para as hipericinas, provavelmente, devido a FcZn apresentar maior agregação em meio aquoso (Tabela 5) e possuir um menor coeficiente de atividade fotodinâmica em relação a Hy (Tabela 4). Estas características fazem com que a FcZn se acumule menos às células e produza menos EROs durante a irradiação que a Hy [9].

**Figura 32:** Índice de sobrevivência de células Vero e do biofilme de *S. aureus* nas diferentes etapas de formação do biofilme ((a) adesão reversível, (b) adesão irreversível, (c) biofilme maduro e (d) dispersão), após incubação com diferentes concentrações de FcZn, FcZnTc e FcZnTcG e irradiação com LED vermelho. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).



O FS FcZn não foi capaz de promover a fotoinativação seletiva do biofilme de *S. aureus*, em nenhuma das as etapas de formação (Figura 32). No primeiro e segundo estágios de formação do biofilme foi possível observar a morte de no máximo 30% de *S. aureus*, o que correspondeu a apenas cerca de 10% a mais de inibição provocada em células Vero nas mesmas condições de estudo (Figuras 32a e 32b). Com o desenvolvimento do biofilme (3º e 4º etapas) a eficácia de FcZn para

inativar *S. aureus* foi ainda menor, o que provocou uma igualdade na morte celular desta célula bacteriana com as células Vero que alcançou ~ 20%.

A FcZnTc, por outro lado, foi capaz de proporcionar uma grande inibição de *S. aureus* em todas as etapas de formação do biofilme com pouco dano às células epiteliais (Figura 32). Pode-se destacar que os resultados de seletividade obtidos na presença de FcZnTc foram similares aos obtidos na presença de Hy em todas as etapas do biofilme. Portanto, como a acumulação intracelular de FcZnTc pelo biofilme de *S. aureus* foi maior que de Hy e o coeficiente de atividade fotodinâmica de Hy foi maior que de FcZnTc, os resultados similares de fotoinativação na presença deste composto sugere que ambas as características dos FSs são determinantes para a fotoinativação do biofilme de *S. aureus*.

Assim como ocorreu no ensaio de fotoinativação das células planctônicas de *S. aureus* (Figuras 26 e 27), a FcZnTcG apresentou maior eficiência de inativação do biofilme desta bactéria que os outros FSs estudados (Figura 32). Nas etapas de adesão reversível e irreversível a inibição de *S. aureus* por FcZnTc alcançou aproximadamente 90%. Na primeira etapa do biofilme este resultado foi obtido após incubação de *S. aureus* com FcZnTc ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por 30 min e irradiação com dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$  (Figura 32a). Entretanto, na segunda etapa do biofilme, devido ao aparecimento do EPS, foi necessário maior tempo de incubação (35 min) e concentração do FS ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Figura 32b). Estes parâmetros de fotoinativação proporcionaram uma diminuição no IS de Vero de 26% e 32%, respectivamente.

A FcZnTcG também foi capaz de fotoinativar o biofilme de *S. aureus* nos estágios de biofilme maduro e disperso, promovendo uma inibição de 82% e 87% de *S. aureus*, respectivamente (Figuras 32c e 32d). Para obter estes resultados os biofilmes de *S. aureus* foram incubados por 45 min com FcZnTcG na concentração de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e irradiados por 23 min LED vermelho (dose de luz  $24 \text{ J cm}^{-2}$ ). Estes parâmetros de fotoinativação dificultaram a obtenção da seletividade por FcZnTcG, uma vez que por ser mais hidrossolúvel que os outros FSs foi mais acumulada nas células Vero (Figura 23) e, portanto, provocou uma inibição de ~42% nas células epiteliais (Figura 32).

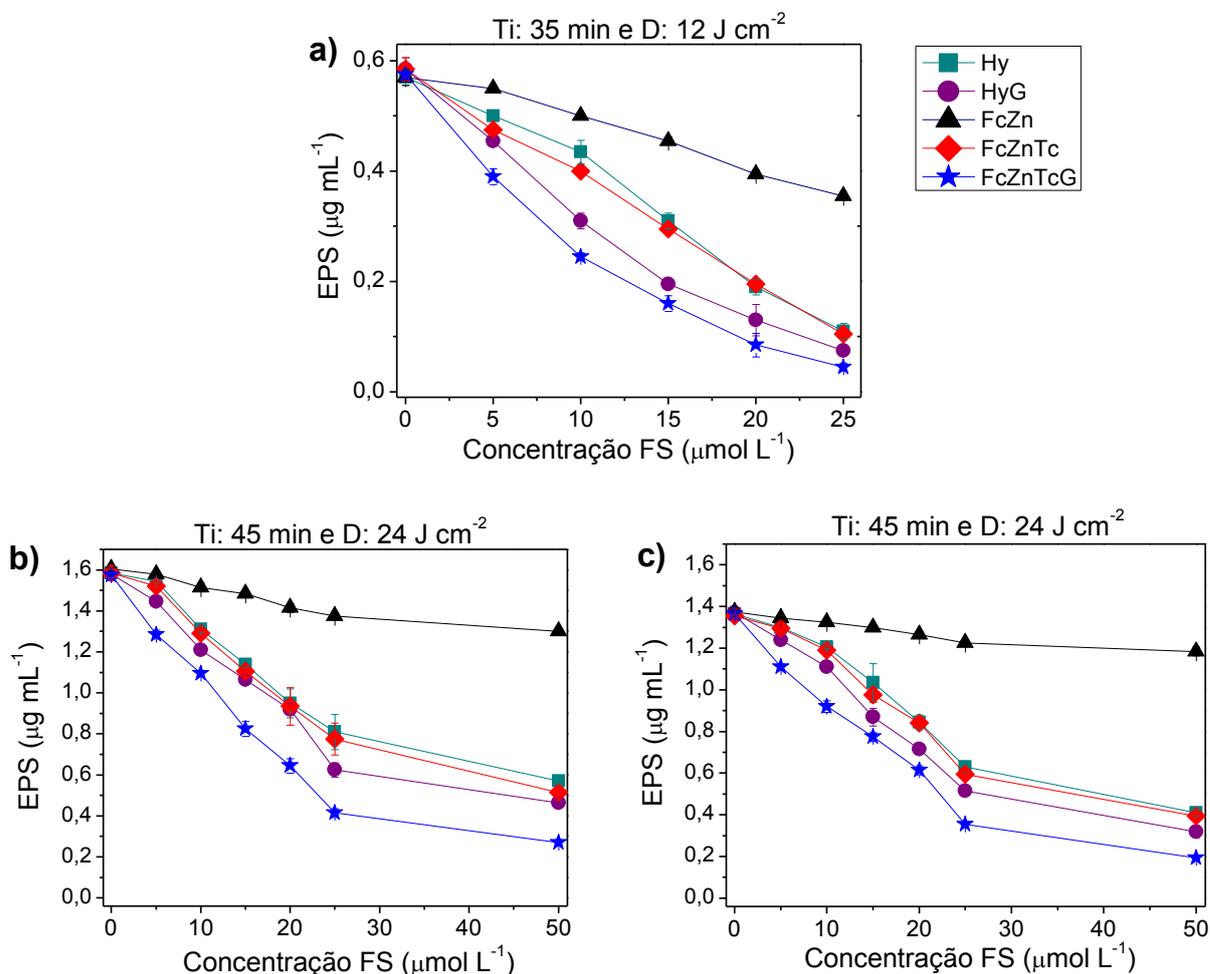
Diante dos resultados expostos, pode-se sugerir que para o biofilme de *S. aureus* nas etapas de adesão reversível e irreversível o FS que demonstrou maior eficácia para promover a seletividade bacteriana foi a FcZnTcG. Já nos dois últimos

estágios de formação do biofilme de *S. aureus*, a HyG apresentou melhor seletividade, pois reduziu um grande número de células bacterianas com um dano menor às células Vero que o proporcionado por FcZnTcG. Isso comprova que a solubilidade dos FSs em meio aquoso é uma importante característica para promover a fotoinativação do biofilme de *S. aureus*.

A fotoinativação do biofilme de *S. aureus* também tem sido avaliada na literatura, entretanto, estes estudos geralmente investigam a aPDT somente na etapa do biofilme maduro e por outro lado não tem se preocupado em conseguir esse efeito de forma seletiva, ou seja, sem afetar as células hospedeiras. Apesar disso, se compararmos os resultados de inativação de *S. aureus* na etapa do biofilme maduro obtidos neste trabalho em relação aos resultados da literatura, é possível observar que obtivemos maior redução bacteriana nas condições empregadas. Por exemplo, Sharma e colaboradores investigaram a ação do FS azul de toluidina na inibição do biofilme de *S. aureus* (5 dias). Para isso o biofilme bacteriano foi incubado por 30 min com o FS ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e depois irradiaram com uma dose de luz de  $100 \text{ J cm}^{-2}$ , obtendo uma redução de *S. aureus* de aproximadamente 50% [105]. Di Poto e colaboradores associaram a aPDT com antibiótico vancomicina para inibir o biofilme de *S. aureus*. Na aPDT utilizaram o FS Meso-tetra (N-metil-pyridyl )porfirina (MTP) na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , 15 min de incubação de dose de luz  $150 \text{ J cm}^{-2}$ . Estas condições reduziram apenas ~40% de *S. aureus*, entretanto quando aPDT foi associada à vancomicina a redução aumentou em ~ 60% [168]. Apesar disso, a possibilidade de *S. aureus* adquirir resistência contra a vancomicina compromete o estudo, sendo ideal que somente a aPDT fosse capaz de promover cerca de 100% de inibição bacteriana. Novamente, nossos resultados mostraram que para ocorrer a fotoinativação seletiva bacteriana é necessário que a acumulação intracelular dos FSs seja maior pelos microrganismos que pelas células hospedeiras, promovendo após a irradiação maior inibição microbiana.

Conforme descrito anteriormente, o EPS é considerado um componente importante para manter a integridade funcional do biofilme microbiano, uma vez que age como barreira defensiva protegendo as células bacterianas de fatores externos. Deste modo foi avaliada, de forma inédita, a ação de aPDT sobre este polissacarídeo, conforme pode ser observado na figura 33.

**Figura 33:** Concentração de EPS obtida nas diferentes etapas do biofilme de *S. aureus* ((a) adesão irreversível, (b) biofilme maduro e (c) dispersão) após incubação com diferentes concentrações dos FSs e irradiação. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).



Como o EPS começa a ser sintetizado a partir da segunda etapa de formação do biofilme [57], a concentração deste polissacarídeo não foi determinada na etapa de adesão reversível. De uma maneira geral, a incubação do biofilme de *S. aureus* com os FSs associados à irradiação com LED vermelho ou amarelo, proporcionou uma redução da concentração de EPS, que foi proporcional ao aumento da concentração dos FSs.

Na etapa de adesão irreversível a concentração inicial de EPS foi de 0,6 µg mL<sup>-1</sup>. Essa concentração diminuiu após incubação por 35 min com os FSs (5 – 25 µmol L<sup>-1</sup>) e irradiação com dose de luz de 12 J cm<sup>-2</sup> (Figura 33a). Esta redução foi mais evidente na presença da FcZnTcG (25 µmol L<sup>-1</sup>) que reduziu 90% do EPS, enquanto que a Hy, HyG e FcZnTc, nas mesmas condições, reduziram cerca de 81%

e FcZn ~ 58%. Estes resultados corroboram com o IS de *S. aureus* obtidos após fotoinativação (Figuras 31b e 32b).

Com o desenvolvimento do biofilme ocorre a maturação das microcolônias bacterianas que aumentam a produção de EPS para maior proteção desta comunidade contra fatores externos [69]. Por isso na terceira etapa de formação do biofilme foi obtida uma concentração inicial de EPS quase três vezes maior ( $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que na etapa de adesão irreversível (Figura 33b). Isso diminuiu a ação de aPDT neste polissacarídeo, pois mesmo utilizando parâmetros de fotoinativação maiores que os usados para a etapa de adesão irreversível (Ti 45 min, concentração dos FSs de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e D  $24 \text{ J cm}^{-2}$ ) a redução de EPS foi menor, principalmente, na presença de FcZn que reduziu somente ~19% (Figura 33b). Por outro lado seus derivados mais hidrossolúveis, FcZnTc e FcZnTcG, foram capazes de reduzir 69% e 83%, respectivamente (Figura 33b). Portanto, sugere-se que o aumento da concentração de EPS possa ter contribuído para menor acumulação dos FSs pelas células bacterianas (Figura 23) o que provocou uma menor inibição microbiana após os ensaios de fotoinativação em relação às etapas anteriores (Figuras 31 e 32).

No estágio de dispersão do biofilme foi possível observar uma redução de  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  na concentração inicial de EPS (Figura 33c), em relação ao estágio anterior (biofilme maduro). Isso pode ser justificado pela fragmentação do biofilme que ocorre nesta etapa, onde porções do EPS associados aos microrganismos são liberadas para o meio [60]. Diante disso, os mesmos parâmetros de fotoinativação utilizados para o biofilme no terceiro estágio, provocaram maior redução na concentração de EPS que alcançou cerca de 73% na presença das hipericinas e FcZnTc, 85% na presença de FcZnTcG e de apenas 21% na presença de FcZn.

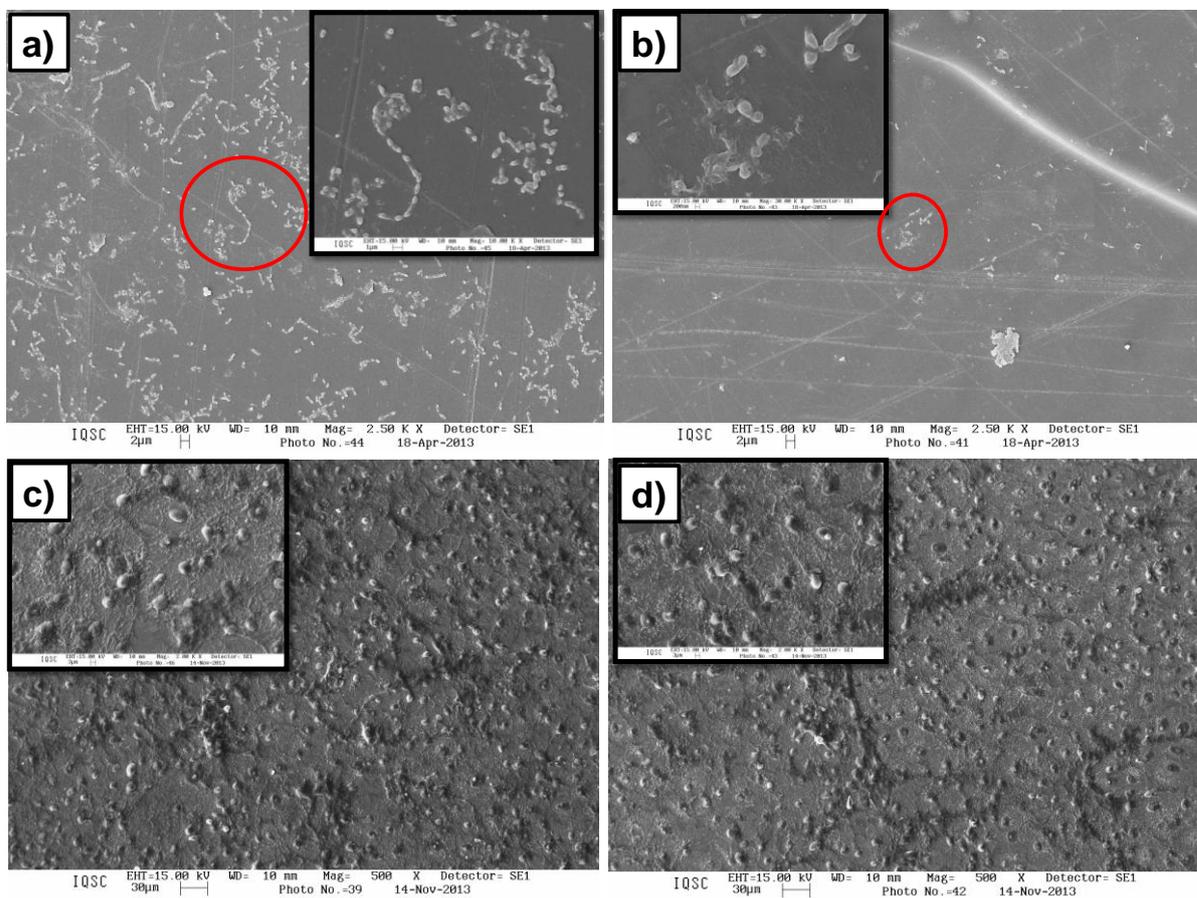
A concentração de EPS obtida após fotoinativação em todas as etapas do biofilme corrobora com os resultados de acumulação intracelular dos FSs por *S. aureus*, uma vez que os FSs (FcZnTcG e HyG) que promoveram maior dano ao polissacarídeo foram mais acumulados pelas células bacterianas e, portanto inibiram maior concentração destes microrganismos.

Para ilustrar os melhores resultados de fotoinativação seletiva do biofilme de *S. aureus* nas diferentes etapas de formação, foram obtidas micrografias utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Figuras 34,35 e 36). De maneira geral foi possível observar que após os ensaios de fotoinativação houve uma redução

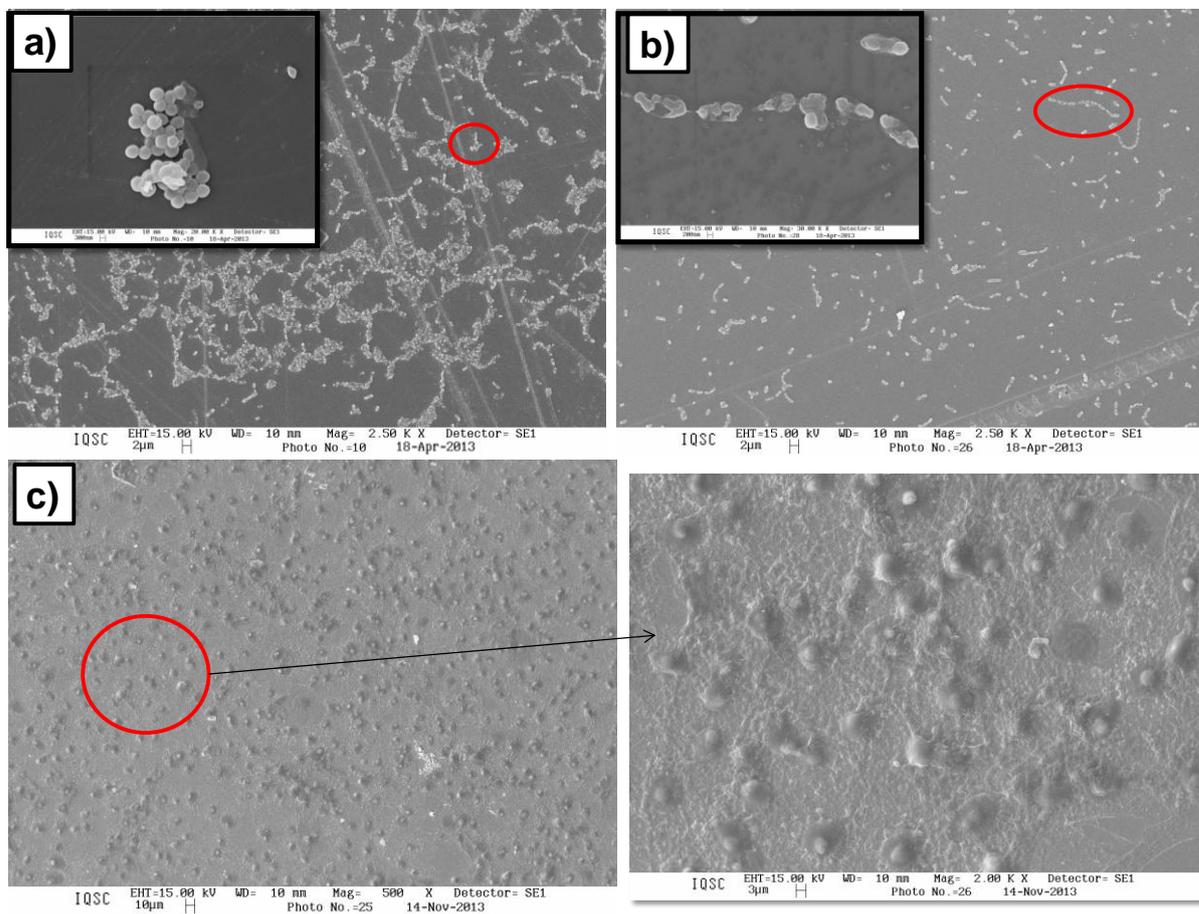
significativa do número de células de *S. aureus* em relação ao controle, independente da etapa do biofilme deste microrganismo. Além disso, a aPDT promoveu uma modificação morfológica nas células bacterianas que não se mostravam mais na forma de cocos.

Com relação às micrografias das células epiteliais foi possível observar uma redução do número destas células em relação ao seu controle (Figura 34c), não tão significativa quanto a obtida para as células bacterianas, confirmando assim, a fotoinativação seletiva do biofilme de *S. aureus*, principalmente na etapa de adesão reversível.

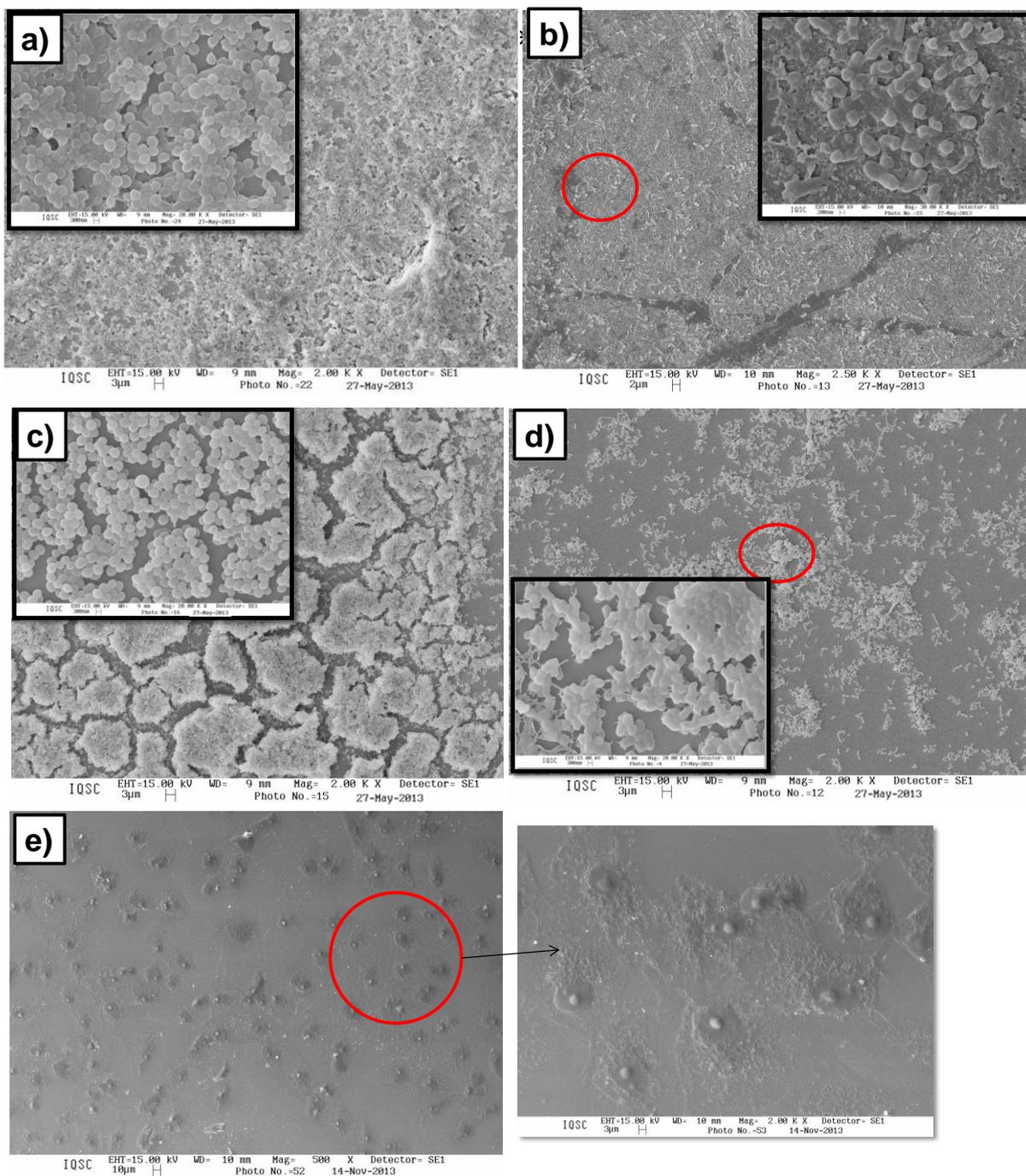
**Figura 34:** (b) Biofilme de *S. aureus* (adesão reversível) e (d) as células epiteliais Vero após 30 minutos de incubação com FcZnTcG ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ . Os controles do biofilme de (a) *S. aureus* na etapa de adesão reversível e (c) Vero estão também ilustrados.



**Figura 35:** (b) Biofilme de *S. aureus* (adesão irreversível) e (c) as células epiteliais Vero após 35 minutos de incubação com FcZnTcG ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e dose de luz  $12\text{J cm}^{-2}$ . O controle do biofilme de *S. aureus* (a) na etapa de adesão irreversível está também ilustrado.



**Figura 36:** Biofilme de *S. aureus* nas etapas de **(b)** biofilme maduro e **(d)** dispersão após 45 minutos de incubação com HyG ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e dose de luz  $24 \text{ J cm}^{-2}$ . Seus respectivos controles estão representados pelas letras **(a)** e **(c)**. As células epiteliais Vero **(e)** nas mesmas condições de fotoinativação estão também representadas.



## 5.4.2. Fotoinativação seletiva de *E. coli*

### 5.4.2.1. Células planctônicas

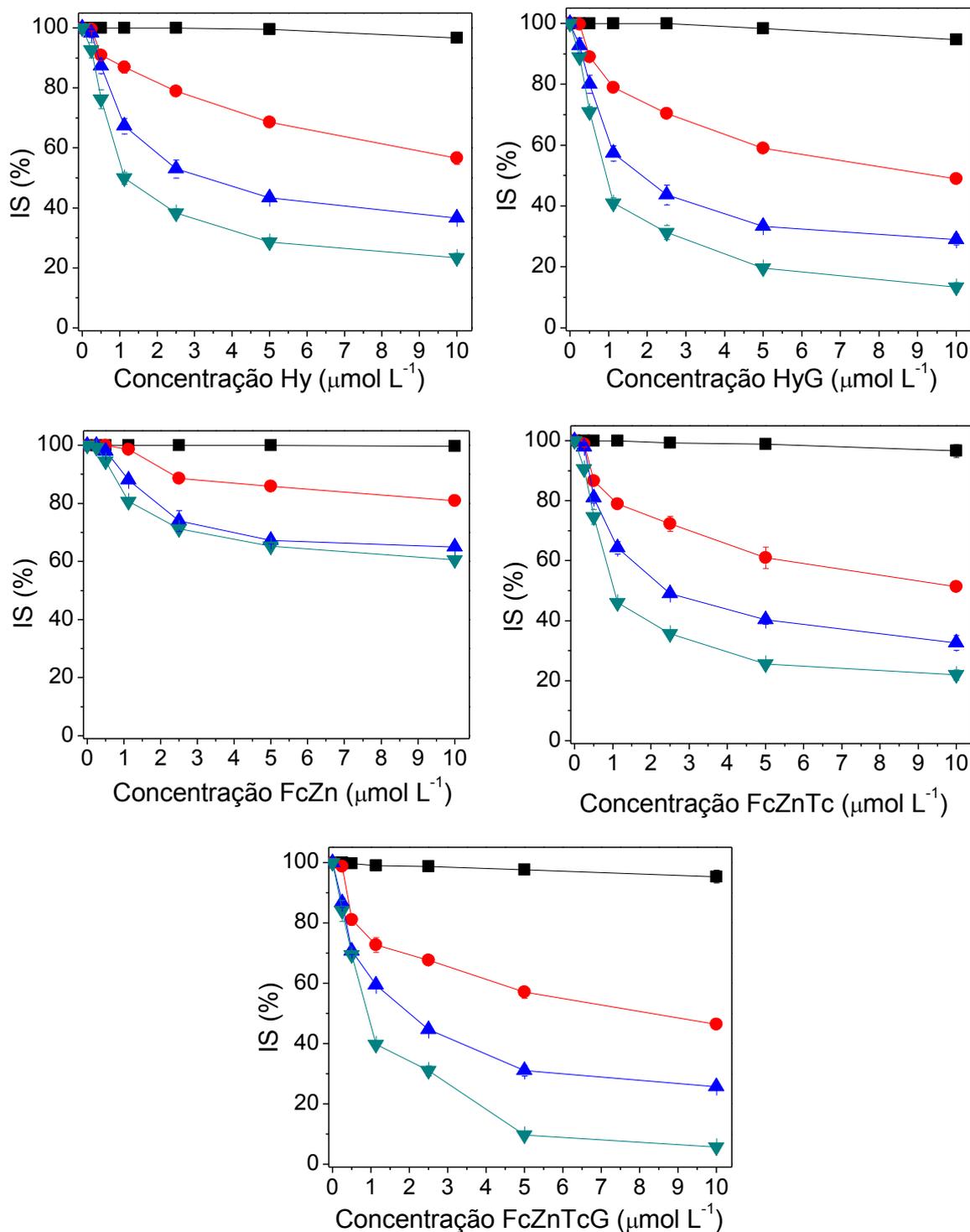
Os resultados de acumulação intracelular (item 5.2.1) contribuíram para a escolha do tempo de incubação e da concentração dos FSs para a fotoinativação de *E. coli*. Conforme pôde ser observado nas tabelas 6 e 7, a acumulação dos FSs por *E. coli* foi significativamente menor que a acumulação obtida por *S. aureus*, sendo necessário o dobro de tempo de incubação para *E. coli* acumular a mesma concentração de FS que *S. aureus*. Como já comentado, isso ocorre devido à diferença morfológica entre as células bacterianas, uma vez que *E. coli* apresenta uma membrana celular muito mais complexa que *S. aureus*. Os parâmetros para a fotoinativação de *E. coli*, foram duas vezes maiores que os utilizados para a fotoinativação de *S. aureus*, ou seja, o tempo de incubação foi de 10 min e a concentração dos FSs variou de 0 – 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

A figura 37 representa os valores de IS de *E. coli* após incubação com os FSs em diferentes concentrações e doses de luz entre 0 – 12  $\text{J cm}^{-2}$ . Pôde-se observar que somente a irradiação com LED vermelho ou com LED amarelo, independente da dose de luz, não afetou as células bacterianas, pois o IS permaneceu em 100%. Isso também foi observado na condição escuro, na qual somente os FSs sem irradiação não foram capazes de promover a inativação de *E. coli*.

O aumento da dose de luz teve maior efeito sobre as células de *E. coli* do que em *S. aureus*, sendo possível observar uma diminuição de 20% no IS de *E. coli* com o aumento da dose de 3 para 6  $\text{J cm}^{-2}$  (Figura 37) enquanto que esse aumento reduziu 10% de *S. aureus* (Figura 26). No entanto, foi necessário dobrar os parâmetros de fotoinativação (tempo de incubação, concentração do FSs e dose de luz) de *E. coli* em relação a *S. aureus*, para alcançar praticamente a mesma porcentagem de células inativadas.

Assim como a dose de luz, o aumento da concentração dos FSs provocou maior inibição no crescimento de *E. coli*, essa inativação foi mais acentuada para concentrações até-5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 37).

**Figura 37:** Índice de sobrevivência de *E. coli* após 10 minutos de incubação com diferentes concentrações de Hy, HyG FcZn, FcZnTc e FcZnTcG e irradiação nas doses de luz: (■) 0, (●) 3, (▲) 6 e (▼) 12 J cm<sup>-2</sup>.



Se compararmos os FSs Hy e FcZn com os seus derivados mais hidrossolúveis foi possível observar, uma maior inibição de *E. coli* pelos derivados. Essa diferença foi mais evidente no ensaio de fotoinativação na presença das ftalocianinas, uma vez que após 10 min de incubação e dose de luz de  $12 \text{ J cm}^{-2}$  tanto a FcZnTc quanto a FcZnTcG nas concentrações de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , promoveram uma inibição máxima desta bactéria de  $\sim 74\%$  e  $\sim 100\%$ , respectivamente. Enquanto que a FcZn nas mesmas condições inibiu somente 40% das células de *E. coli* (Figura 37). Esse resultado pode ser justificado pela maior agregação de FcZn em meio aquoso em relação aos outros FSs, o que diminui a concentração deste composto no meio e, portanto, diminui a sua acumulação intracelular por *E. coli* bem como a produção de EROs [9].

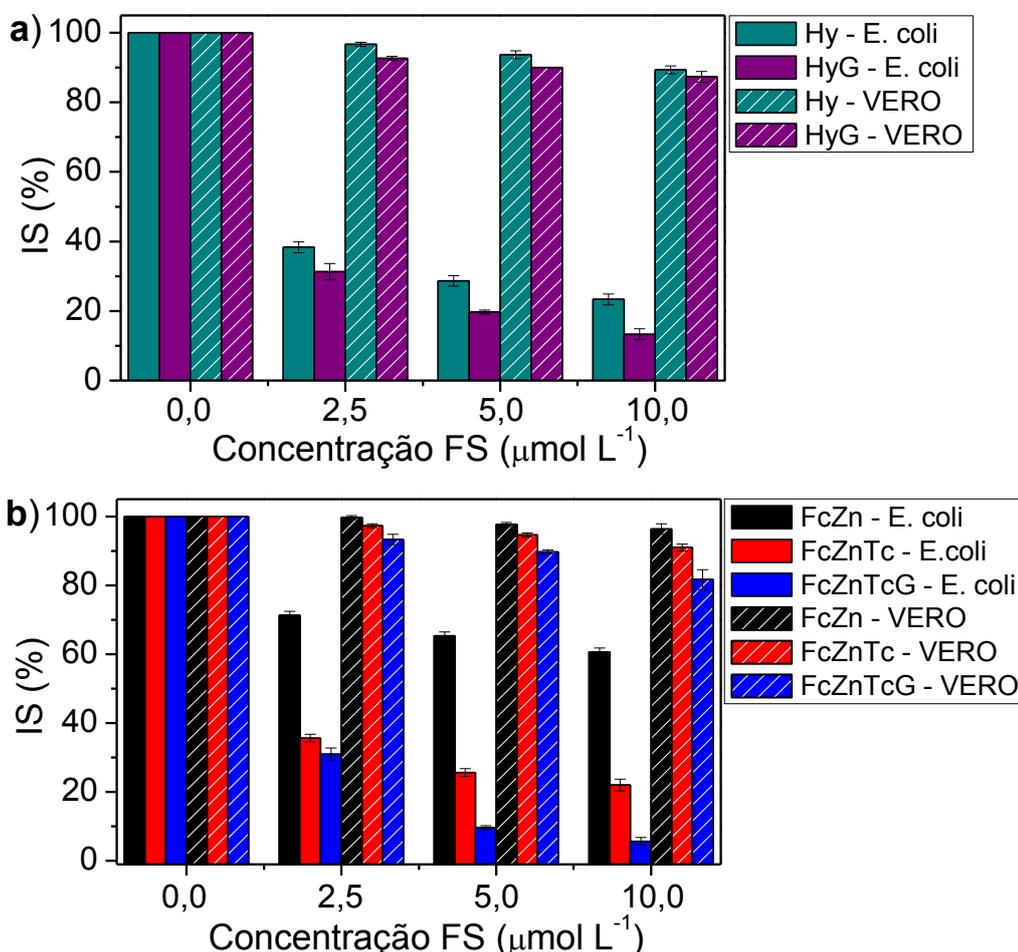
No que diz respeito a Hy, pôde-se notar que sua hidrofobicidade não afetou de maneira significativa a fotoinativação de *E. coli* como ocorreu com a FcZn, provavelmente, devido ao caráter lipofílico deste composto facilitar sua penetração nas células [162]. Outro ponto importante para justificar a maior eficiência na fotoinativação de *E. coli* por Hy em relação a FcZn, é o fato de Hy apresentar um coeficiente de atividade fotodinâmica cerca de 10 vezes maior que o de FcZn (Tabela 4).

Apesar de Hy ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) nas condições de 10 min de incubação e dose de luz de  $12 \text{ J cm}^{-2}$  promover uma grande inibição em *E. coli* ( $\sim 75\%$ ), foi possível observar que a inserção da meglumina a esse FS permitiu maior acumulação intracelular deste FSs pelo microrganismo (Tabela 7), o que aumentou em 12% a inibição de *E. coli* em relação a Hy.

Portanto, os resultados de fotoinativação de *E. coli* determinaram os parâmetros para os ensaios de fotoinativação seletiva deste microrganismo. A figura 38 mostra o índice de sobrevivência de *E. coli* em relação à Vero após incubação por 10 minutos com os FSs (0,0; 2,5; 5,0 e  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e irradiação na dose de luz de  $12 \text{ J cm}^{-2}$ .

Assim como ocorreu para os ensaios de seletividade de *S. aureus*, somente a irradiação com os LEDs vermelho e amarelo (Figura 26) ou os FSs sem irradiação (escuro – dados não mostrados), não foram capazes de provocar inibição das células epiteliais.

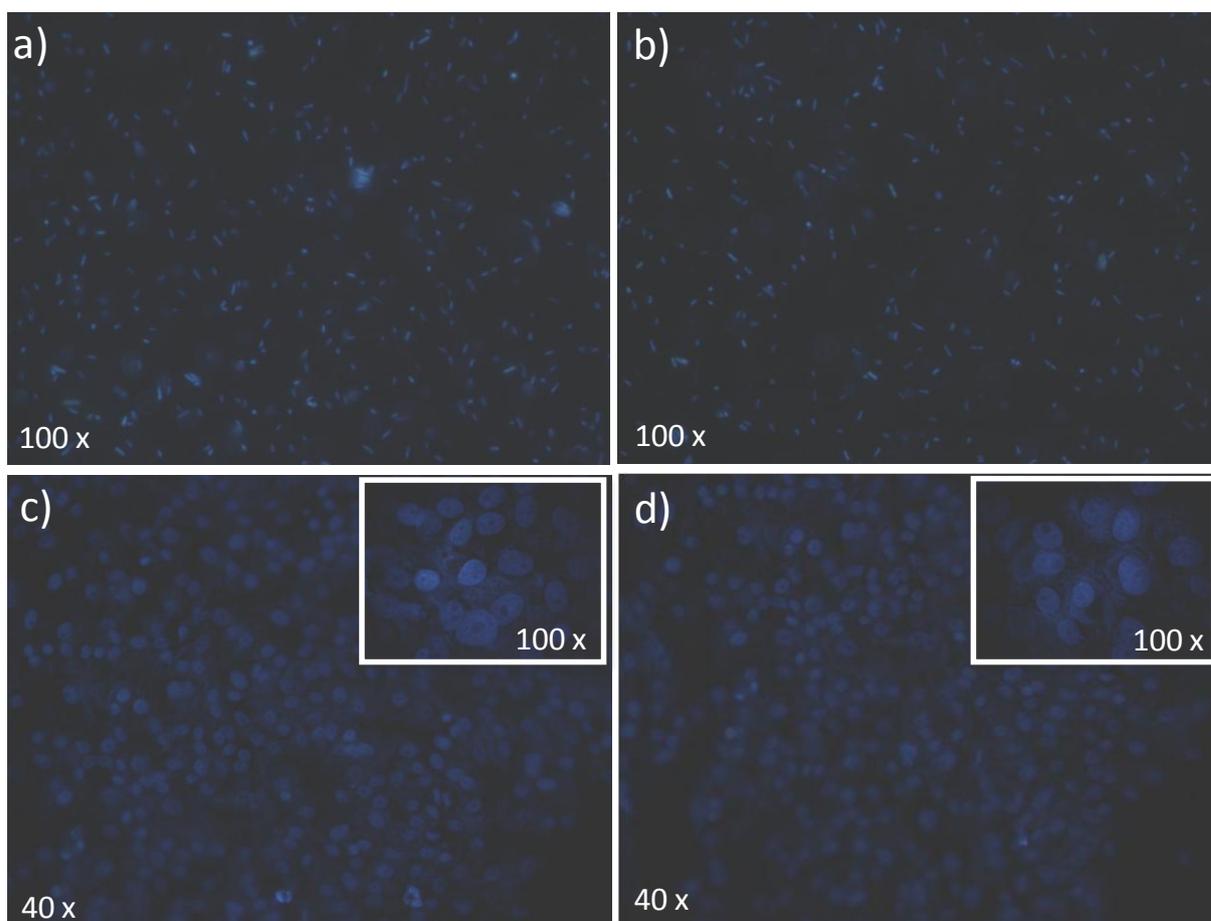
**Figura 38:** Índice de sobrevivência de *E. coli* e Vero após 10 minutos de incubação com diferentes concentrações dos FSs ((a) Hy e HyG, (b) FcZn, FcZnTc e FcZnTcG) e irradiação na dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ .



De uma maneira geral foi possível notar claramente que todos os FSs nas concentrações de  $5,0$  e  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com exceção de FcZn, foram capazes de inativar seletivamente *E. coli* após 10 min de incubação e dose  $12 \text{ J cm}^{-2}$  (Figura 38). A seletividade de *E. coli* por FcZn, nas condições de estudo, não foi possível devido à baixa eficiência deste FS para inibir de *E. coli*, em relação aos outros FS. Conforme comentado acima, mesmo após 10 min de incubação e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ , a FcZn ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi capaz de inibir somente 40% de *E. coli* (Figura 38) Esse resultado pôde ser observado pela microscopia de fluorescência com DAPI, o qual mostrou que o número de células de *E. coli* na presença de FcZn após fotoinativação (Figura 37a) é praticamente o mesmo que no controle (Figura 37b). Apesar do pequeno efeito sobre as células microbianas, a FcZn não promoveu danos às células epiteliais, que

apresentaram um IS 96% após 10 min de incubação com este FS e dose de luz equivalente a  $12 \text{ J cm}^{-2}$  (Figura 38). Na figura 39, é possível confirmar este resultado, uma vez que as células epiteliais após tratamento com FcZn se mantiveram iguais ao controle.

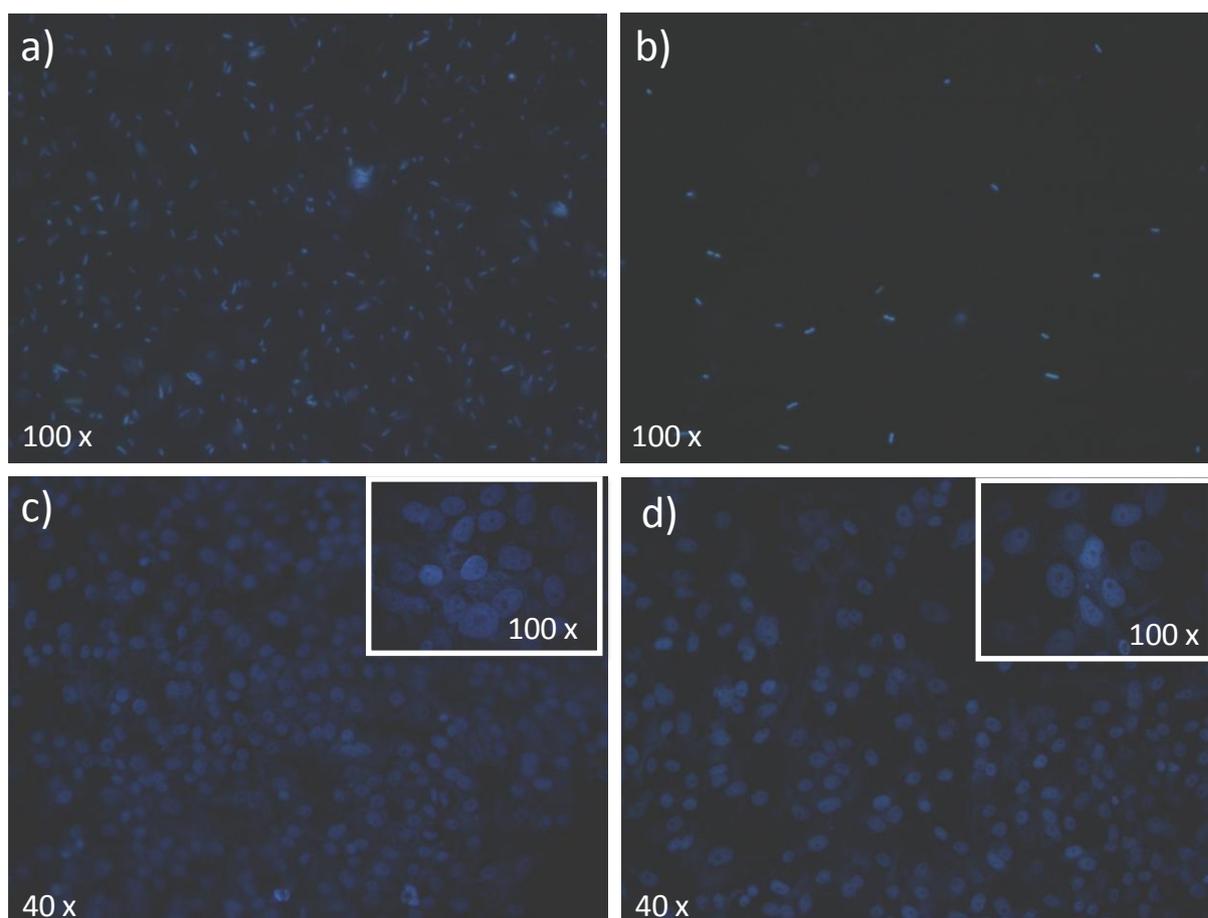
**Figura 39:** Microscopia de fluorescência de **(b)** *E. coli* e **(d)** Vero após 10 min de incubação com FcZn na concentração de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ . Os controles de **(a)** *E. coli* e **(c)** Vero estão também representados.



A FcZnTcG ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi o único FS que provocou aproximadamente 100% de inibição em *E. coli*, após 10 min de incubação e dose  $12 \text{ J cm}^{-2}$ . No entanto, estas condições de fotoinativação promoveram maior dano às células epiteliais em relação aos outros FSs, inibindo 19% das células Vero. A microscopia de fluorescência ilustrou estes resultados, podendo-se observar que o número de células de *E. coli* após fotoinativação diminuiu significativamente em relação ao

controle e os espaços entre as células epiteliais após aPDT aumentaram em relação ao controle devido à morte celular de Vero (Figura 40).

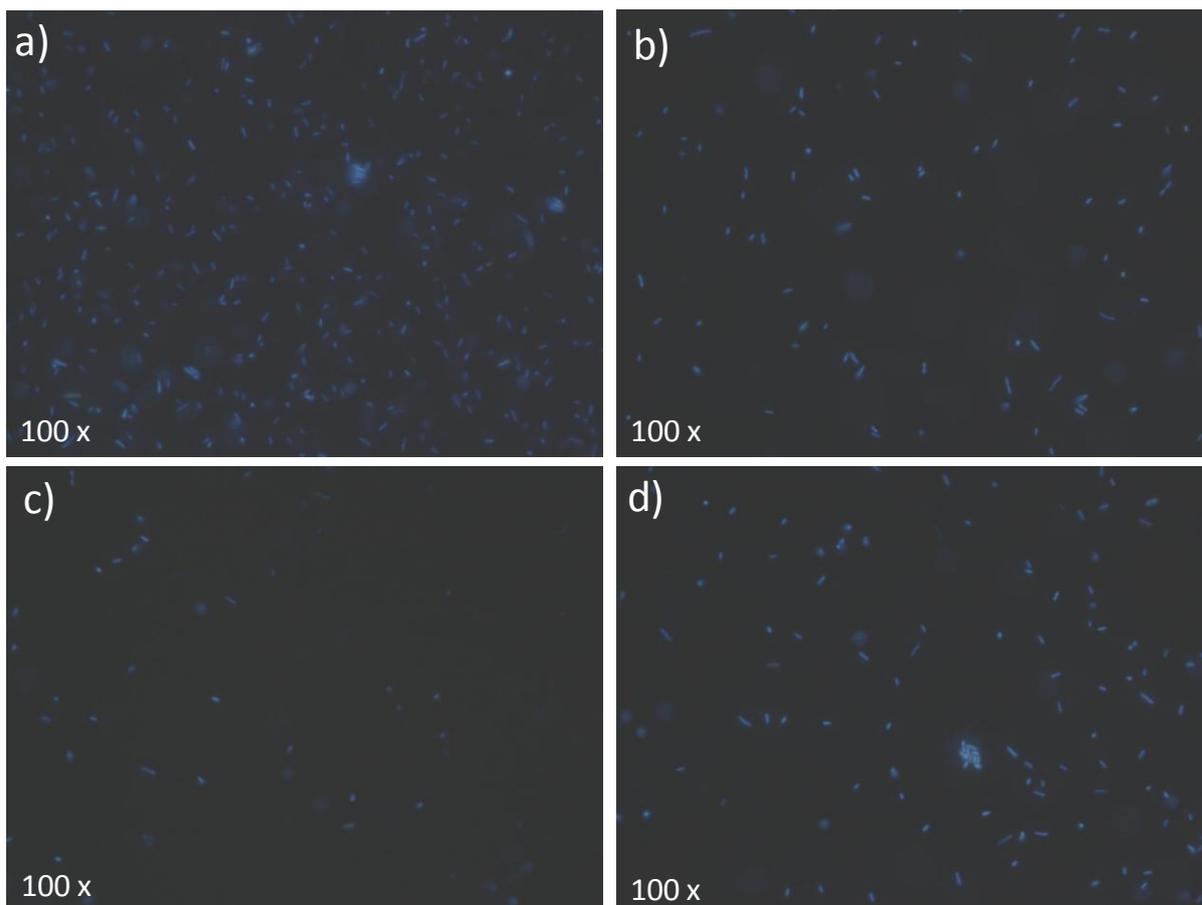
**Figura 40:** Microscopia de fluorescência de **(b)** *E. coli* e **(d)** Vero após 10 min de incubação com FcZnTcG na concentração de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ . Os controles de **(a)** *E. coli* e **(c)** Vero estão também representados.



A FcZnTc também demonstrou ser eficaz para fotoinativar seletivamente *E. coli*, pois na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , 10 min incubação e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ , foi capaz de inibir 74% deste microrganismo e reduzir apenas 9% de Vero (Figura 38). Os resultados de seletividade obtidos na presença de Hy foram similares ao de FcZnTc (Figura 38). A HyG, entretanto, inibiu um número maior de células bacterianas (~87%) que seu composto de origem (Hy), e provocou a morte de apenas 13% das células epiteliais (Figura 38). A figura 41 mostra através da microscopia de fluorescência os melhores resultados de fotoinativação de *E. coli* na presença de Hy, HyG e FcZnTc. É possível notar que independente do FS ocorreu uma redução

significativa do número de células bacterianas em relação ao controle. Devido à similaridade entre as microscopias de Vero, a figura 40d está representando a fotoinativação desta célula epitelial por Hy, HyG e FcZnTc.

**Figura 41:** Microscopia de fluorescência de *E. coli* após 10 min de incubação com **(b)** Hy, **(c)** HyG e **(d)** FcZnTc na concentração de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ . O controle de *E. coli* **(a)** está também representado.



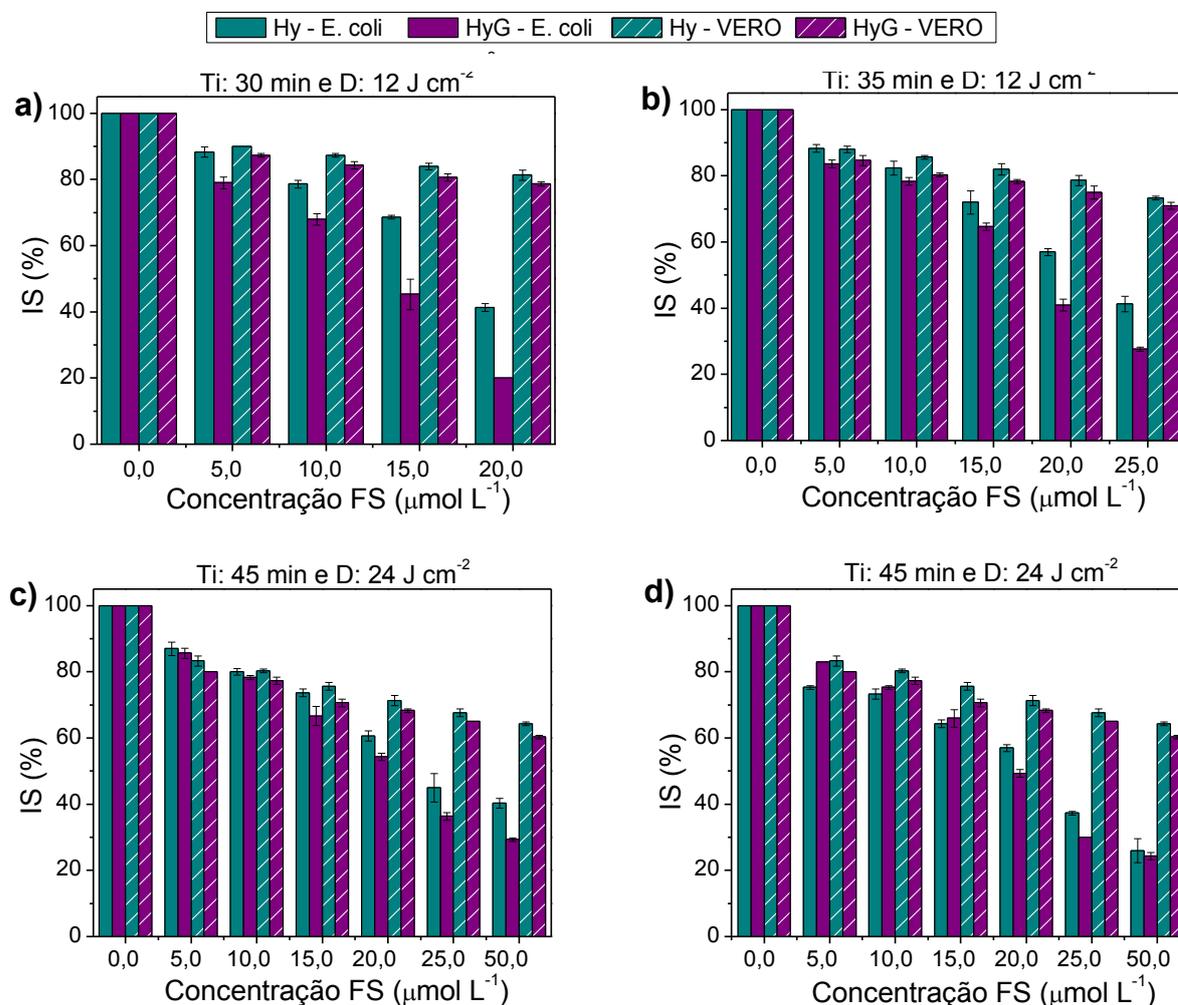
Portanto, é possível afirmar que o aumento da solubilidade de Hy e FcZn promoveu maior inibição de *E. coli* sem afetar drasticamente a sobrevivência das células epiteliais. Entretanto, se compararmos os resultados de fotoinativação seletiva entre as duas células bacterianas, é possível notar uma maior dificuldade para obter a seletividade de *E. coli*. Isso pode ser justificado pela necessidade de maiores doses de FS e luz para inibir *E. coli* em relação à *S. aureus*, o que conseqüentemente provocou maior diminuição no IS das células epiteliais. Isto está descrito na literatura, uma vez que os estudos de comparação de fotoinativação

entre *S. aureus* e *E. coli* mostram uma menor inibição da bactéria Gram-negativa que da Gram-positiva, mesmo aplicando maiores concentração de FS e dose de luz para atingir a fotoinativação. Hanakova e colaboradores observaram que os mesmos parâmetros de fotoinativação (concentração do FS TMPyP - 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e dose de luz 150  $\text{J cm}^{-2}$ ) provocaram em *S. aureus* uma inibição duas vezes maior que em *E. coli*. Além disso, mesmo aumentando a concentração do FS para 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a inativação máxima de *E. coli* foi de 80% [164]. Esses resultados foram similares ao estudo de Hamblin e colaboradores que após incubar *S. aureus* e *E. coli* por 30 min com o FS clorina (4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e irradiar com dose de luz de 40  $\text{J cm}^{-2}$  inibiu 100% de *S. aureus* e apenas 50% de *E. coli* [169]. Tegos e colaboradores também observaram uma inibição de *S. aureus* ~ 50% maior que de *E. coli* após aplicar as mesmas condições de fotoinativação, entretanto o FS estudado foi o fulereno catiônico [166]. Estes autores também avaliaram as condições ótimas para fotoinativação seletiva de *E. coli* utilizando o fulereno como FS e observaram que este FS provoca dano às células hospedeiras mesmo no escuro o que inviabilizou a seletividade.

#### 5.4.2.2. Biofilme

As figuras 42 e 43 mostram os resultados de fotoinativação seletiva do biofilme de *E. coli* após incubação com as hipericinas e ftalocianinas seguida de irradiação. Os parâmetros de fotoinativação foram distintos para cada etapa do desenvolvimento do biofilme de *E. coli*. Independente disso observou-se que apenas a presença dos FSs sem irradiação (dados não mostrados) ou somente a irradiação nas doses de luz estudadas (Figuras 42 e 43), não provocou inibição às células de *E. coli* ou epiteliais. Entretanto, o aumento da concentração dos FSs quando associados à irradiação, aumentaram a inibição bacteriana.

**Figura: 42:** Índice de sobrevivência de células Vero e do biofilme de *E. coli* nas diferentes etapas de formação ((a) adesão reversível, (b) adesão irreversível, (c) biofilme maduro e (d) dispersão), após incubação com diferentes concentrações de Hy e HyG e irradiação com LED amarelo. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).



Na etapa de adesão reversível as células bacterianas se apresentam menos expostas aos fatores externos que as células planctônicas, pois a matriz extracelular microbiana interage com a superfície do substrato [55]. Isso exigiu o aumento dos parâmetros de fotoinativação para inibição das células bacterianas aderidas em relação às planctônicas (Figura 36). Portanto, nesta etapa do biofilme, *E. coli* foi incubada por 30 min com os FSs em diferentes concentrações (5 - 20 µmol L<sup>-1</sup>) e irradiada com dose de luz de 12 J cm<sup>-2</sup>. Pôde-se observar que mesmo nestas condições, independente do FS, a inibição de *E. coli* aderida (Figuras 42a e 43a) foi menor que *E. coli* em suspensão (Figura 35).

A inibição bacteriana causada pelos FSs hidrossolúveis foi maior que seus compostos de origem. No caso das hipericinas ( $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), Hy provocou uma inibição de 59% no crescimento de *E. coli*, enquanto a HyG inibiu 80%. Em relação às ftalocianinas, nas mesmas condições de estudo, esta diferença foi maior, pois enquanto FcZn inativou apenas 12% de *E. coli*, a FcZnTc inibiu 61% e a FcZnTcG 83%. Estes valores de inibição bacteriana são menores que os obtidos para *S. aureus* nas mesmas condições de estudo (Figuras 31 e 32). Sugere-se que esta diferença ocorreu devido à diferença morfológica entre os microrganismos ter influenciado na menor acumulação intracelular dos FSs por *E. coli* que por *S. aureus* (Figura 23).

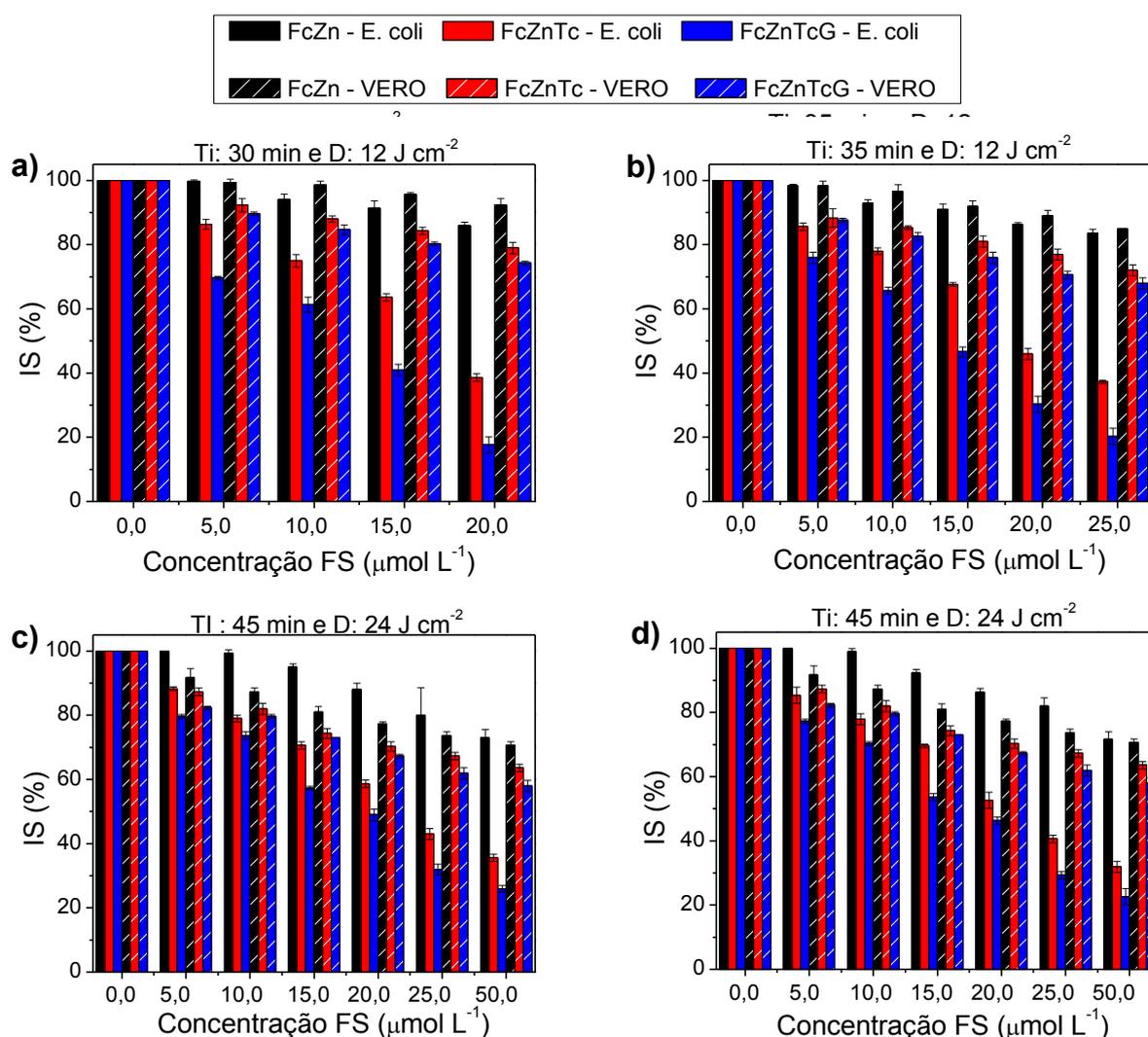
Com o desenvolvimento do biofilme (adesão irreversível) a acumulação intracelular dos FSs por *E. coli* diminuiu, tornando-se necessário o aumento do tempo de incubação (35 min) e da concentração dos FSs ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), para que após irradiação (dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ ) fosse possível obter aproximadamente a mesma inibição bacteriana que na etapa de adesão reversível (Figuras 42b e 43b). Este resultado pode ser explicado pelo aumento do número de células de *E. coli* na etapa de adesão irreversível em relação a etapa anterior [167], e pelo início da síntese de EPS pelas microcolônias microbianas, o que dificulta a penetração dos FSs [60].

Com o biofilme maduro a fotoinativação de *E. coli* se tornou ainda mais difícil devido a maior concentração de EPS e de células bacterianas em relação a etapa anterior (Figura 44). Apesar disso, o aumento da concentração dos FSs para  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , do tempo de incubação para 45 min e a dose de luz para  $24 \text{ J cm}^{-2}$ , foi capaz de promover a inativação *E. coli*, principalmente na presença dos FSs hidrossolúveis. A HyG, FcZnTc e FcZnTcG inativaram 70%, 65% e 74% de *E. coli*, respectivamente enquanto, HyG e FcZn inibiram 60% e 27%, respectivamente (Figura 42c e 43c).

A etapa de dispersão permite que os FSs associados à irradiação inibam *E. coli* mais facilmente que na etapa anterior (biofilme maduro). Isso pode ser justificado por dois motivos: **i)** a concentração de EPS é reduzida facilitando a penetração dos FSs pelo biofilme; **ii)** ocorre a fragmentação de aglomerados de modo que ficam mais expostas à ação de agentes externos. Portanto, ocorre um aumento da acumulação dos FSs pelas células bacterianas (Figura 23) promovendo a inibição de até 80% de *E. coli* quando incubada com FcZnTcG (Figura 43d).

Os resultados de fotoinativação demonstram que o aumento da hidrossolubilidade dos FSs levou a uma maior inibição do biofilme de *E. coli*, independente da etapa de formação, podendo sugerir que este fato esteja relacionado à maior acumulação intracelular de HyG, FcZnTc e FcZnTcG por *E. coli*, que de Hy e FcZn. Apesar disso, foi possível observar que os parâmetros de fotoinativação deste estudo foram capazes de inibir mais o biofilme de *S. aureus* que o biofilme de *E. coli*, independente da etapa de formação do biofilme.

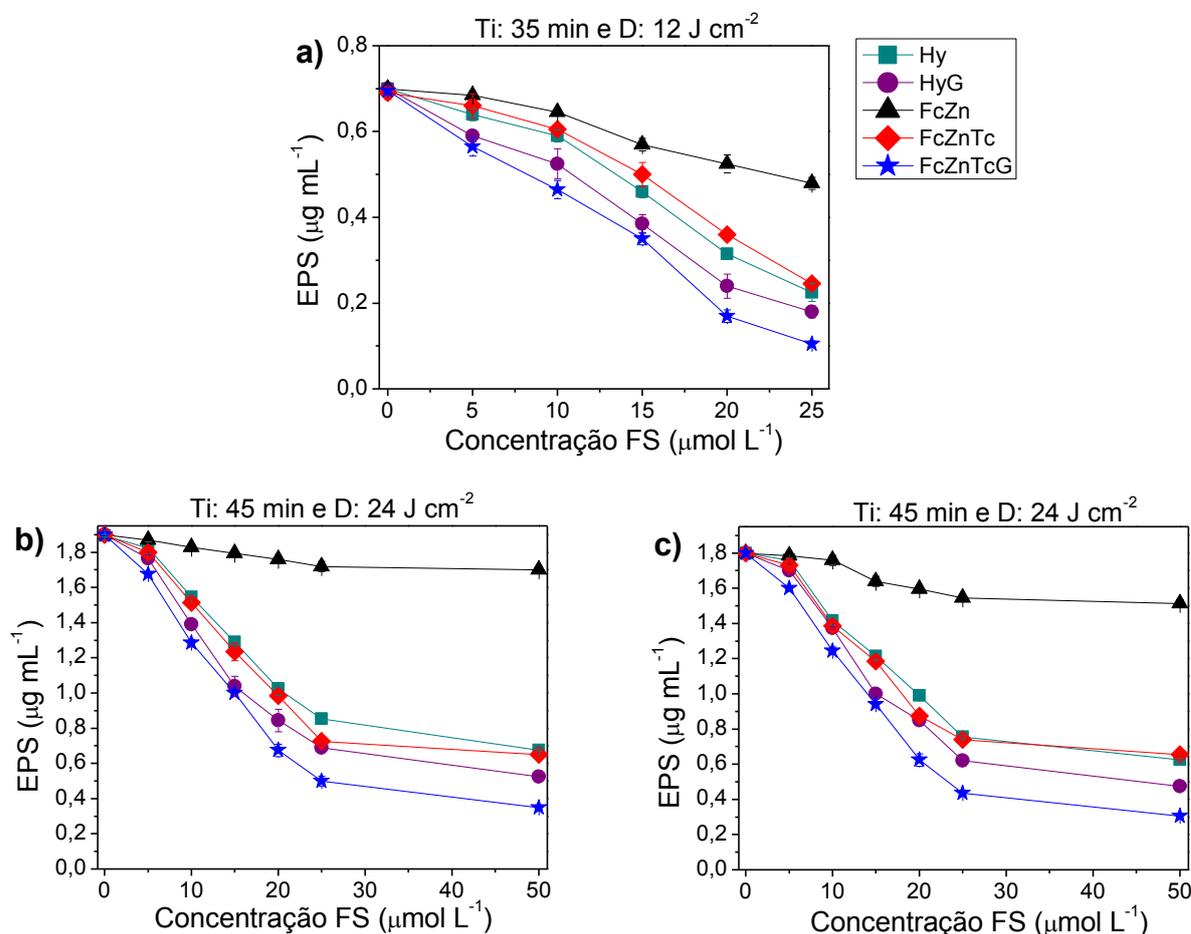
**Figura: 43:** Índice de sobrevivência de células Vero e do biofilme de *E. coli* nas diferentes etapas de formação ((a) adesão reversível, (b) adesão irreversível, (c) biofilme maduro e (d) dispersão), após incubação com diferentes concentrações de FcZn, FcZnTc e FcZnTcG, e irradiação com LED vermelho. Tempo de incubação (Ti) e Dose de luz (D).



Se compararmos os resultados de fotoinativação de *E. coli* com os obtidos para o biofilme de *S. aureus*, é possível observar que a seletividade de *E. coli* foi alcançada apenas para as etapas de adesão do biofilme e somente na presença de HyG e FcZnTcG. Este evento pode ser justificado pelo fato dos parâmetros de fotoinativação (Ti: 45 min, D: 24 J cm<sup>-2</sup> e concentração FS 50 μmol L<sup>-1</sup>) terem proporcionado uma grande redução de células epiteliais (~ 60%), enquanto que a inibição de *E. coli* não foi tão eficaz nas etapas de biofilme maduro e dispersão, se comparadas aquela obtida nas etapas de adesão (Figuras 42 e 43). Portanto, na etapa de adesão reversível HyG e FcZnTcG reduziram, respectivamente, 80% e 83% de *E. coli* e 20% e 25% de Vero (Figuras 42a e 43a). Na etapa de adesão irreversível estes mesmos FSs inibiram 73% e 80% de *E. coli* e somente cerca de 30% de Vero (Figuras 42b e 43b).

O fato de aPDT ter proporcionado maior inibição no biofilme de *S. aureus* que no biofilme de *E. coli*, pode ser explicado pela maior concentração de EPS sintetizada por esta bactéria Gram-negativa, conforme pode ser observado na figura 44.

**Figura: 44:** Concentração de EPS obtida nas diferentes etapas do biofilme de *E. coli* ((a) adesão irreversível, (b) biofilme maduro e (c) dispersão) após incubação com diferentes concentrações dos FSs e irradiação. Tempo de incubação (TI) e Dose de luz (D)

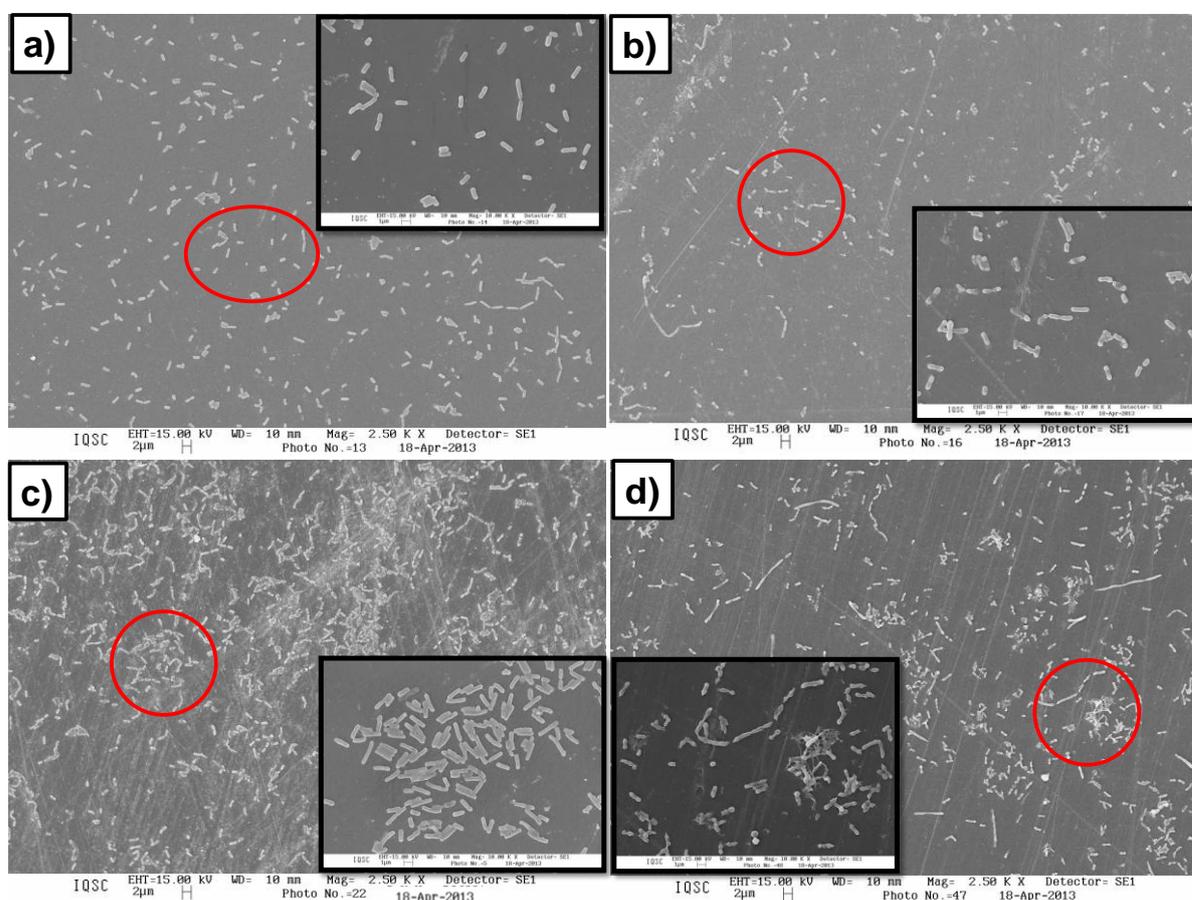


Assim como observado para o biofilme de *S. aureus*, a evolução do biofilme de *E. coli* promoveu um aumento da concentração de EPS. Na etapa de adesão irreversível foi determinada uma concentração inicial de EPS no valor de 0,8 μg mL<sup>-1</sup>. Com o desenvolvimento do biofilme (biofilme maduro) este valor aumentou para 1,9 μg mL<sup>-1</sup> e depois diminuiu para 1,8 μg mL<sup>-1</sup> (dispersão). Independente disso, a incubação do biofilme de *E. coli* com os FSs associado à irradiação promoveu uma redução na concentração deste polissacarídeo. Essa redução foi intensificada com o aumento da concentração dos FSs, sendo mais evidente na presença de HyG e FcZnTcG. Vale destacar que a FcZn foi o FSs que menos reduziu o EPS (no máximo

28%) , esse fato pode ter contribuído para a pequena inibição de *E. coli* causada por este FS após irradiação.

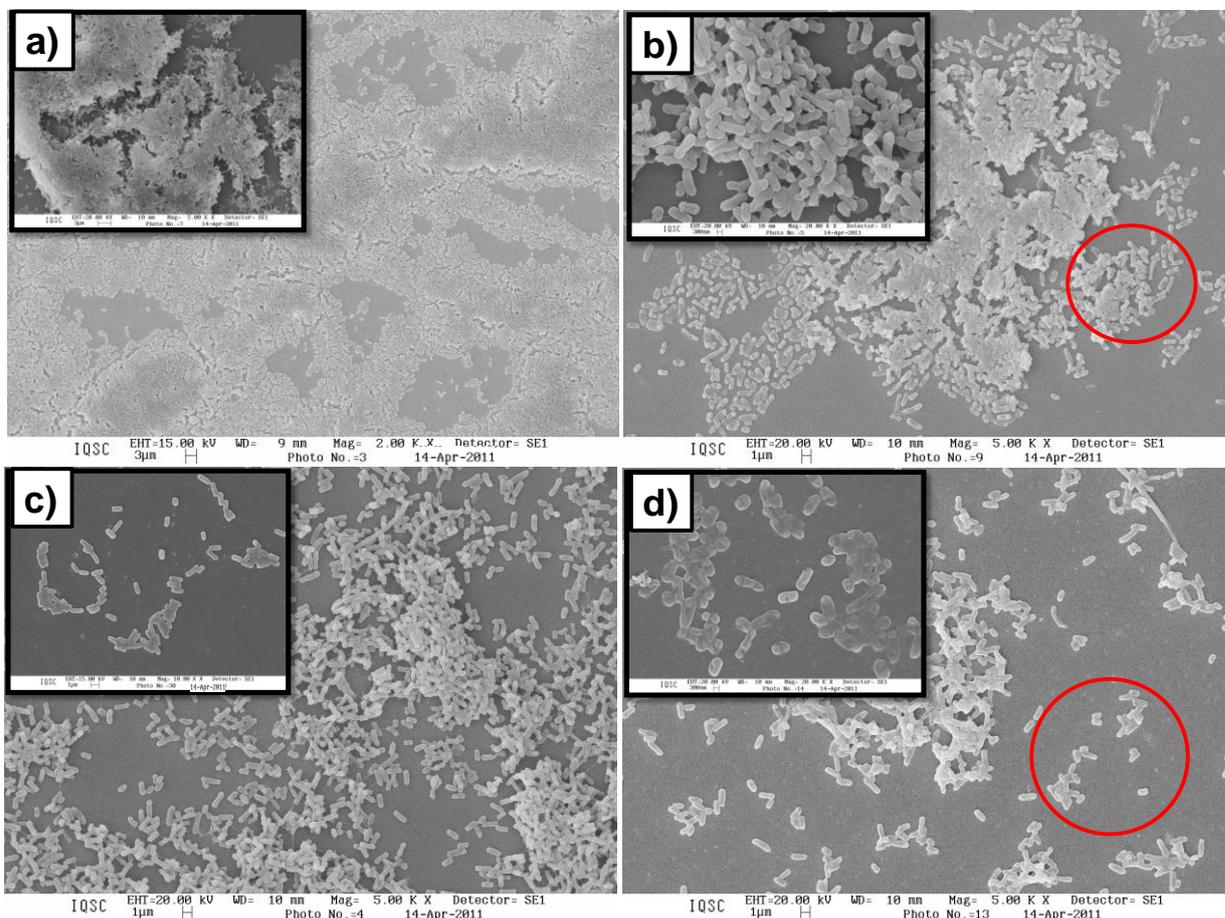
Visto que a FcZnTcG foi o FS que promoveu maior inibição do biofilme de *E. coli* em todas as etapas de formação, imagens de micrografia foram obtidas para ilustrar a ação desta ftalocianina. As figuras 45 e 46 mostram o MEV das diferentes etapas do biofilme de *E. coli* antes e após fotoinativação na presença de FcZnTcG.

**Figura 45:** Biofilme de *E. coli* nas etapas de **(b)** adesão reversível e **(d)** adesão irreversível após incubação com FcZnTcG e dose de luz  $12 \text{ J cm}^{-2}$ . Seus respectivos controles estão representados pelas letras **(a)** e **(c)**.



Estas micrografias comprovam a ação fotodinâmica de FcZnTcG que levou à inibição do biofilme de *E. coli*, uma vez que é possível observar uma redução do número de bactérias após fotoinativação em relação ao controle em todas as etapas do biofilme. A alteração morfológica em *E. coli* também é perceptível após incubação com a ftalocianina e irradiação com LED vermelho.

**Figura 46:** Biofilme de *E. coli* nas etapas de **(b)** biofilme maduro e **(d)** dispersão após 45 min de incubação com FcZnTcG ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e dose de luz  $24 \text{ J cm}^{-2}$ . Seus respectivos controles estão representados pelas letras **(a)** e **(c)**.



Os resultados obtidos para fotoinativação do biofilme de *E. coli* são comparáveis aos mostrados na literatura até o momento. Vale destacar que estes estudos avaliam apenas o biofilme maduro e não investigam os danos que os parâmetros de fotoinativação possam causar nas células hospedeiras. Vilela e colaboradores estudaram o efeito fotodinâmico dos FSs azul de metileno (MB), azul de toluidina (AT) e verde de malaquita (VM) na inibição do biofilme maduro de *E. coli* (quatro dias de formação). As concentrações dos FSs foram  $300$ ,  $150$  e  $3000 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o MB, AT e VM, respectivamente. O biofilme bacteriano foi incubado por 30 min com os FSs e depois irradiado com dose de luz de  $18 \text{ J cm}^{-2}$ . Essas condições reduziram 14, 15 e 67% de *E. coli* quando na presença de MB, AT e VM, respectivamente [170]. Não conhecemos estudos descrevendo fotoinativação seletiva do biofilme *E. coli*.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que a hidrofiliicidade é uma característica que aumenta a eficiência fotodinâmica dos FSs. Esse fato pôde ser observado nos ensaios de fotoinativação de *E. coli* e *S. aureus*, uma vez que os FSs mais hidrossolúveis (HyG, FcZnTc e FcZnTcG) provocaram maior inibição das bactérias que seus compostos de origem hidrofóbicos (Hy e FcZn). Sugere-se que essa inibição esteja relacionada à maior acumulação intracelular dos FSs hidrofílicos pelas bactérias comparando com Hy e FcZn.

Devido à maior complexidade morfológica de *E. coli*, os parâmetros de fotoinativação para inibir ~100% desta bactéria na forma planctônica, foi cerca de duas vezes maior que os utilizados para inibir a mesma porcentagem de *S. aureus*. Apesar disso, todos os FSs, com exceção de FcZn, foram capazes de promover a fotoinativação seletiva de ambos os microrganismos.

Os biofilmes, por apresentarem fatores de resistência como o EPS, dificultaram a ação fotodinâmica dos FSs. Apesar disso, os FSs hidrofílicos foram capazes de inativar todas as etapas do biofilme de *S. aureus* e *E. coli*. Pode-se destacar que houve maior inativação de *S. aureus* que de *E. coli*, principalmente nas 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> etapas do biofilme. Isso pode ser justificado pela maior concentração de EPS sintetizado por *E. coli* que por *S. aureus*, o que dificultou a acumulação intracelular do FSs.

Com o desenvolvimento dos biofilmes foi necessário aumentar o tempo de incubação e a concentração dos fotossensibilizadores bem como a dose de luz para irradiação, o que provocou maior dano às células epiteliais Vero, dificultando a obtenção de seletividade. Entretanto, no caso do biofilme de *S. aureus* os FSs HyG e FcZnTcG alcançaram as condições de fotoinativação seletiva. Já estas condições somente foram obtidas por FcZnTcG nas etapas de adesão reversível e irreversível do biofilme de *E. coli*, uma vez que nas demais etapas a inibição de *E. coli* não foi tão significativa em relação a *S. aureus* e o dano causado em Vero foi maior.

Portanto, este trabalho mostra que a hidrofiliicidade dos FSs é uma característica fundamental para inibir *S. aureus* e *E. coli*, mesmo quando na forma de biofilme. Sugere-se que este fato esteja diretamente relacionado a dois motivos **i)** maior acumulação intracelular destes FSs pelos microrganismos e, **ii)** eficiência fotodinâmica dos FSs em reduzir a concentração do EPS, uma vez que esse polissacarídeo é a principal barreira dos biofilmes contra agentes externos.

**REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

1. Miranda, J.M. et al., *Comparison of antimicrobial resistance in Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Listeria monocytogenes strains isolated from organic and conventional poultry meat.* **J Food Prot**, 2008. 71(12): p. 2537-42.
2. Tortora G.J., Case C.L., *Microbiology: an introduction.* 2010, San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
3. Dohmen, P.M., *Antibiotic resistance in common pathogens reinforces the need to minimise surgical site infections.* **J Hosp Infect**, 2008. 70 Suppl 2: p. 15-20.
4. de Melo, W.C., et al., *Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection.* **Expert Rev Anti Infect Ther**, 2013. 11(7): p. 669-93.
5. Estrela, A.B., Heck M.G., Abraham W.R., *Novel approaches to control biofilm infections.* **Curr Med Chem**, 2009. 16(12): p. 1512-30.
6. Dai, T., Huang, Y.Y., Hamblin, M.R. *Photodynamic therapy for localized infections--state of the art.* **Photodiagnosis Photodyn Ther**, 2009. 6(3-4): p. 170-88.
7. Maisch, T., *A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment.* **Mini Rev Med Chem**, 2009. 9(8): p. 974-83.
8. Jori, G., et al., *Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications.* **Lasers Surg Med**, 2006. 38(5): p. 468-81.
9. Vatansever, F., et al., *Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond.* **FEMS Microbiol Rev**, 2013. 37(6): p. 955-89.
10. Simplicio F.I, Hioka N., *Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços no desenvolvimento de medicamentos.* **Quim Nova**, 2002. 25: p. 801-7.
11. Garcia F.S, Bentley M.V., *Phthalocyanine dyes: importance and future directives for use in photodynamic therapy of cancer.* **Trends in Photochemistry & Photobiology**, 2003. 10: p. 77-82.

---

<sup>1</sup>De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

12. Bernal C., Guimarães A.P.P, Ribeiro A.O, Oliveira K.T., Imasato H., Perussi J.R., *Selective photoinactivation of C. albicans and C. dubliniensis with hypericin. Laser physics.* 2011. 21: p. 245-50.
13. Melo W.C.M.A., Perussi J.R., Hamblin M.R., (2013) *Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.08.001>.
14. Ryskova L., Slezak R., *Photodynamic Antimicrobial Therapy. Cent. Eur. J. Biol.*, 2010. 5: p. 400-6.
15. Hoiby, N., et al., *Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents*, 2010. 35(4): p. 322-32.
16. Herrmann, M., *Monopoly pricing of an antibiotic subject to bacterial resistance. J Health Econ*, 2010. 29(1): p. 137-50.
17. Takesue, Y., et al., *Impact of a hospital-wide programme of heterogeneous antibiotic use on the development of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. J Hosp Infect*, 2010. 75(1): p. 28-32.
18. Cunha, B.A., *Antibiotic resistance. Control strategies. Crit Care Clin*, 1998. 14(2): p. 309-27.
19. Levy, S.B., *Antibiotic resistance-the problem intensifies. Adv Drug Deliv Rev*, 2005. 57(10): p. 1446-50.
20. Alanis, A.J., *Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res*, 2005. 36(6): p. 697-705.
21. Oliveira, A., *Microrganismos multirresistentes*, in *Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle*, 2005, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 341-47.
22. Socha, A.M., et al., *Structure-activity studies of echinomycin antibiotics against drug-resistant and biofilm-forming Staphylococcus aureus and Enterococcus faecalis. Bioorg Med Chem Lett*, 2009. 19(5): p. 1504-7.
23. Lo, T.S., Borchardt, S.M., *Antibiotic-associated diarrhea due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009. 63(4): p. 388-9.
24. Thurman, A.R., et al., *Post-cesarean delivery infectious morbidity: Focus on preoperative antibiotics and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Am J Infect Control*, 2010. 38(8): p. 612-6.

25. Di Giacobbe, A., et al., *Diffusion of methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 strains in central Italy*. **Int J Antimicrob Agents**, 2011. 37(4): p. 339-46.
26. Chambers, H.F., Deleo F.R., *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. **Nat Rev Microbiol**, 2009. 7(9): p. 629-41.
27. Patel, S.J., Saiman, L., *Antibiotic resistance in neonatal intensive care unit pathogens: mechanisms, clinical impact, and prevention including antibiotic stewardship*. **Clin Perinatol**, 2010. 37(3): p. 547-63.
28. Aslani, M.M., et al., *Characterization of enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern*. **Int J Infect Dis**, 2011. 15(2): p. e136-9.
29. Chang S, *Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the van A resistance gene*. **N Engl J Med.**, 2003. 348: p. 1342-47.
30. Kohanski, M.A., DePristo, M.A., Collins, J.J., *Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis*. **Mol Cell**, 2010. 37(3): p. 311-20.
31. Todar, K. *Bacterial resistance to antibiotics*. 2011; Available from: <http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>.
32. Ito, T., et al., *Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC*. **Drug Resist Updat**, 2003. 6(1): p. 41-52.
33. Gorwitz, R.J., et al., *Changes in the prevalence of nasal colonization with Staphylococcus aureus in the United States, 2001-2004*. **J Infect Dis**, 2008. 197(9): p. 1226-34.
34. Maclean, M., et al., *The role of oxygen in the visible-light inactivation of Staphylococcus aureus*. **J Photochem Photobiol B**, 2008. 92(3): p. 180-4.
35. Schito, G.C., *The importance of the development of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect**, 2006. 12 Suppl 1: p. 3-8.
36. Xia, J., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus antibiotic resistance and virulence*. **Biosci Trends**, 2013. 7(3): p. 113-21.
37. Yaguchi, K., et al., *Virulence factors of avian pathogenic Escherichia coli strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan*. **Avian Dis**, 2007. 51(3): p. 656-62.

38. Wiles, T.J., R.R. Kulesus, and M.A. Mulvey, *Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli*. **Exp Mol Pathol**, 2008. 85(1): p. 11-9.
39. Trabulsi, L., *Microbiologia*. 5 ed. 2008, São Paulo: Atheneu.
40. Naveen, R. and E. Mathai, *Some virulence characteristics of uropathogenic Escherichia coli in different patient groups*. **Indian J Med Res**, 2005. 122(2): p. 143-7.
41. Mellata, M., et al., *Role of avian pathogenic Escherichia coli virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages*. **Infect Immun**, 2003. 71(1): p. 494-503.
42. Available from: <http://www.broadinstitute.org>.
43. Sherley, M., D.M. Gordon, and P.J. Collignon, *Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of Escherichia coli*. **Microbiology**, 2004. 150: p. 1539-46.
44. Collignon, P., *Resistant Escherichia coli--we are what we eat*. **Clin Infect Dis**, 2009. 49(2): p. 202-4.
45. Tao, R., et al., *Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China*. **Environ Pollut**, 2010. 158(6): p. 2101-9.
46. Candelas F.G., Martínez J.L., Galán J.C., Baquero F., *The Evolution of Antibiotic Resistance*. **Genetics Evolut Infect Dis**, 2011. 6: p. 305-337.
47. Hulscher, M.E., Grol, R.P., van der Meer, J.W., *Antibiotic prescribing in hospitals: a social and behavioural scientific approach*. **Lancet Infect Dis**, 2010. 10(3): p. 167-75.
48. James, G.A., et al., *Biofilms in chronic wounds*. **Wound Repair Regen**, 2008. 16(1): p. 37-44.
49. Worthington, R.J., Richards, J.J. Melander, C., *Small molecule control of bacterial biofilms*. **Org Biomol Chem**, 2012. 10(37): p. 7457-74.
50. Chen, L., Wen, Y.M., *The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies*. **Int J Oral Sci**, 2011. 3(2): p. 66-73.
51. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. **Emerg Infect Dis**, 2002. 8(9): p. 881-90.

52. Epstein, A.K., et al., *Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry*. **Nanotechnology**, 2011. 22(49): p. 494007.
53. Melo L. F., Fletcher, M., Capdeville, B., *Biofilms — Science and Technology*. Vol. 223. 1992, Birmingham: Kluwer academic publisher.
54. Monds, R.D. O'Toole, G.A., *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*. **Trends Microbiol**, 2009. 17(2): p. 73-87.
55. Wiencek, K.M., Fletcher. M., *Bacterial adhesion to hydroxyl- and methyl-terminated alkanethiol self-assembled monolayers*. **J Bacteriol**, 1995. 177(8): p. 1959-66.
56. Rendueles, O. Ghigo, J.M., *Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors*. **FEMS Microbiol Rev**, 2012.
57. Flemming, H.C., Neu, T.R. Wozniak,D.J., *The EPS matrix: the "house of biofilm cells"*. **J Bacteriol**, 2007. 189(22): p. 7945-7.
58. O'Toole, G.A., Kolter R., *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. **Mol Microbiol**, 1998. 30(2): p. 295-304.
59. Davies, D., *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*. **Nat Rev Drug Discov**, 2003. 2(2): p. 114-22.
60. Sutherland, I., *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. **Microbiology**, 2001. 147(1): p. 3-9.
61. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J., *Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era*. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2013. 3(4): p. a010306.
62. Taraszkievicz, A., et al., *Innovative strategies to overcome biofilm resistance*. **Biomed Res Int**, 2013. 3: p. 650-653.
63. Whitehead, N.A., et al., *Quorum-sensing in Gram-negative bacteria*. **FEMS Microbiol Rev**, 2001. 25(4): p. 365-404.
64. Waters, C.M. Bassler, B.L. *Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria*. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 2005. 21: p. 319-46.
65. Miller, M.B. Bassler, B.L. *Quorum sensing in bacteria*. **Annu Rev Microbiol**, 2001. 55: p. 165-99.

66. Czajkowski, R. Jafra, S., *Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules*. **Acta Biochim Pol**, 2009. 56(1): p. 1-16.
67. Withers, H., Swift, S., Williams, P. *Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria*. **Curr Opin Microbiol**, 2001. 4(2): p. 186-93.
68. Reading, N.C. Sperandio, V., *Quorum sensing: the many languages of bacteria*. **FEMS Microbiol Lett**, 2006. 254(1): p. 1-11.
69. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. **Annu Rev Microbiol**, 1995. 49: p. 711-45.
70. Wilking, J.N., et al., *Liquid transport facilitated by channels in Bacillus subtilis biofilms*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2013. 110(3): p. 848-52.
71. Characklis, W.G., Marshall, K. C. , *Biofilm: A basis for an interdisciplinary approach* in *Biofilms*, W.G. Characklis, Marshall, K. C, Editor. 1990, John Wiley and Sons Inc: New York.
72. Sohbatzadeh, F., et al., *E. coli, P. aeruginosa, and B. cereus bacteria sterilization using afterglow of non-thermal plasma at atmospheric pressure*. **Appl Biochem Biotechnol**, 2010. 160(7): p. 1978-84.
73. Sureshkumar, A., et al., *Effective bacterial inactivation using low temperature radio frequency plasma*. **Int J Pharm**, 2010. 396(1-2): p. 17-22.
74. De Prijck, K., et al., *Prevention of Candida albicans biofilm formation by covalently bound dimethylaminoethylmethacrylate and polyethylenimine*. **Mycopathologia**, 2010. 170(4): p. 213-21.
75. Isao Sawada, R.F., Tatsuya Ito, Yoshikage Ohmukai, Tatsuo Maruyama, Hideto Matsuyama, *Development of a hydrophilic polymer membrane containing silver nanoparticles with both organic antifouling and antibacterial properties*. **Journal of Membrane Science**, 2012. 387(1): p. 1-6.
76. Lonn-Stensrud, J., et al., *Furanones, potential agents for preventing Staphylococcus epidermidis biofilm infections?* **J Antimicrob Chemother**, 2009. 63(2): p. 309-16.
77. Hentzer, M., et al., *Inhibition of quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria by a halogenated furanone compound*. **Microbiology**, 2002. 148(Pt 1): p. 87-102.

78. Giacometti, A., et al., *RNA III inhibiting peptide inhibits in vivo biofilm formation by drug-resistant Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, 2003. 47(6): p. 1979-83.
79. Balaban, N., et al., *Treatment of Staphylococcus aureus biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP*. **Antimicrob Agents Chemother**, 2007. 51(6): p. 2226-9.
80. Balaban, N., et al., *Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant Staphylococcus epidermidis*. **J Infect Dis**, 2003. 187(4): p. 625-30.
81. Ehrlich, G.D., et al., *Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections*. **Clin Orthop Relat Res**, 2005. 437: p. 59-66.
82. Carmen, J.C., et al., *Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics*. **Am J Infect Control**, 2005. 33(2): p. 78-82.
83. Tetz, G.V., Artemenko, N.K., Tetz, V.V., *Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics*. **Antimicrob Agents Chemother**, 2009. 53(3): p. 1204-9.
84. Kalpana, B.J., Aarthy, S., Pandian, S.K., *Antibiofilm activity of alpha-amylase from Bacillus subtilis S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens*. **Appl Biochem Biotechnol**, 2012. 167(6): p. 1778-94.
85. Jansen, B., Kohnen, W., *Prevention of biofilm formation by polymer modification*. **J Ind Microbiol**, 1995. 15(4): p. 391-6.
86. Danese, P.N., *Antibiofilm approaches: prevention of catheter colonization*. **Chem Biol**, 2002. 9(8): p. 873-80.
87. Shunmugaperumal, T., *Microbial colonization of medical devices and novel preventive strategies*. **Recent Pat Drug Deliv Formul**, 2010. 4(2): p. 153-73.
88. Pavithra, D., Doble, M., *Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants--issues and prevention*. **Biomed Mater**, 2008. 3(3): p. 34-40.
89. Matsumura, Y., et al., *Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate*. **Appl Environ Microbiol**, 2003. 69(7): p. 4278-81.
90. Feng, Q.L., et al., *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. **J Biomed Mater Res**, 2000. 52(4): p. 662-8.

91. Shangguan, Y.Y., et al., *The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)*. **Biomaterials**, 2006. **27**(11): p. 2349-57.
92. Ong, S.E., et al., *Influence of silicon concentration on the haemocompatibility of amorphous carbon*. **Biomaterials**, 2007. **28**(28): p. 4033-8.
93. Rutherford, S.T., Bassler, B.L., *Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control*. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2012. **2**(11).
94. Jiang, T., Li, M., *Quorum sensing inhibitors: a patent review*. **Expert Opin Ther Pat**, 2013. **23**(7): p. 867-94.
95. Pan, J., Ren, D., *Quorum sensing inhibitors: a patent overview*. **Expert Opin Ther Pat**, 2009. **19**(11): p. 1581-601.
96. Del Pozo, J.L., Rouse, M.S., Patel, R., *Bioelectric effect and bacterial biofilms. A systematic review*. **Int J Artif Organs**, 2008. **31**(9): p. 786-95.
97. Iqbal, K., et al., *Effect of high-intensity focused ultrasound on Enterococcus faecalis planktonic suspensions and biofilms*. **Ultrasound Med Biol**, 2013. **39**(5): p. 825-33.
98. Hall-Stoodley, L., et al., *Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in Streptococcus pneumoniae clinical isolates*. **BMC Microbiol**, 2008. **8**: p. 173.
99. Craigen, B., Dashiff, A., Kadouri, D.E., *The Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove Staphylococcus aureus Biofilms*. **Open Microbiol J**, 2011. **5**: p. 21-31.
100. Machado, A.E.H., *Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas*. **Quim Nova**, 2000. **23**: p. 237-43.
101. Hamblin, M.R., Hasan, T., *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?* **Photochem Photobiol Sci**, 2004. **3**(5): p. 436-50.
102. Zupan, K., et al., *Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation*. **J Photochem Photobiol B**, 2008. **90**(2): p. 105-12.
103. Dovigo, L.N., et al., *Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant Candida albicans and Candida glabrata*. **Mycoses**, 2011. **54**(2): p. 123-30.

104. Pereira, C.A., et al., *Susceptibility of Candida albicans, Staphylococcus aureus, and Streptococcus mutans biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study*. **Lasers in medical science**, 2011. 26(3): p. 341-8.
105. Sharma, M., et al., *Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2008. 52(1): p. 299-305.
106. Engelhardt, V., Krammer, B., Plaetzer, K., *Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of Staphylococcus aureus*. **Photochemical & photobiological sciences**, 2010. 9(3): p. 365-9.
107. Dai, T., et al., *Photodynamic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in a mouse skin abrasion model*. **Lasers Surg Med**, 2010. 42(1): p. 38-44.
108. Soncin, M., et al., *Approaches to selectivity in the Zn(II)-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant Staphylococcus aureus*. **Photochem Photobiol Sci**, 2002. 1(10): p. 815-9.
109. Demidova, T.N., et al., *Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria*. **J Photochem Photobiol B**, 2005. 81: p. 15-25.
110. Usacheva, M.N., Teichert, M.C., Biel, M.A., *Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms*. **Lasers Surg Med**, 2001. 29(2): p. 165-73.
111. Lee, C.F., et al., *delta-Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on Pseudomonas aeruginosa planktonic and biofilm cultures*. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, 2004. 75(1-2): p. 21-5.
112. Hashimoto, M.C., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy on drug-resistant Pseudomonas aeruginosa-induced infection. An in vivo study*. **Photochemistry and photobiology**, 2012. 88(3): p. 590-5.
113. Dai, T., et al., *Photodynamic therapy for Acinetobacter baumannii burn infections in mice*. **Antimicrob Agents Chemother**, 2009. 53(9): p. 3929-34.
114. Garcez, A.S., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection*. **Lasers Surg Med**, 2007. 39(1): p. 59-66.

115. Chabrier-Rosello, Y., et al., *Sensitivity of Candida albicans germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity*. **Antimicrob Agents Chemother**, 2005. 49(10): p. 4288-95.
116. Donnelly, R.F., et al., *Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O*. **J Photochem Photobiol B**, 2007. 86(1): p. 59-69.
117. Mima, E.G., et al., *Susceptibility of Candida albicans to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 2010. 109(3): p. 392-401.
118. Dai, T., et al., *Blue dye and red light: a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous Candida albicans infections in mice*. **Antimicrob Agents Chemother**, 2011. 57: p. 5710-5717.
119. Henderson, B.W. and T.J. Dougherty, *How does photodynamic therapy work?* **Photochem Photobiol**, 1992. 55(1): p. 145-57.
120. Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M., Sala, R., *Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology*. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 2007. 21(3): p. 293-302.
121. Allison, R., Moghissi R., *Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms*. **Clin Endosc**, 2013. 46(1): p. 24-9.
122. Oleinick, N.L., Evans, H.H., *The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms*. **Radiat Res**, 1998. 150(5 Suppl): p. S146-56.
123. Plaetzer, K., et al., *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*. **Lasers Med Sci**, 2009. 24(2): p. 259-68.
124. Huang, L., et al., *Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria*. **Lasers Surg Med**, 2012. 44(6): p. 490-9.
125. Cassidy, C.M., et al., *Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice*. **J Photochem Photobiol B**, 2009. 95(2): p. 71-80.
126. Parker J. G., *Optical determination of the collisional lifetime of singlet molecular oxygen*. **J. Am. Chem. Soc.**, 1982. 104: p. 2067-69.
127. Brovko, L., *Photodynamic treatment: a new efficient alternative for surface sanitation*. **Adv Food Nutr Res**, 2010. 61: p. 119-47.

128. Allison Ron R., et al., *Photosensitizers in clinical PDT. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004. 1: p. 27-42.
129. Dougherty, T.J., *Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. Photochem Photobiol*, 1987. 46(5): p. 569-73.
130. Moser, J.G., *2nd and 3rd generation photosensitizers*. 1998, Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
131. Derycke, A.S., de Witte, P.A., *Liposomes for photodynamic therapy. Adv Drug Deliv Rev*, 2004. 56(1): p. 17-30.
132. Ytzhak, S., et al., *Lipid composition affects the rate of photosensitized dissipation of cross-membrane diffusion potential on liposomes. J Phys Chem B*, 2010. 114(31): p. 10097-104.
133. Lee, Y.E., Kopelman, R., *Polymeric nanoparticles for photodynamic therapy. Methods Mol Biol*, 2011. 726: p. 151-78.
134. Gupta, A., et al., *Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. Biotechnol Adv*, 2013. 31(5): p. 607-31.
135. Mckeown, N.B., *Phthalocyanines Materials: Synthesis, Structure and Function*. 1998, Cambridge: Cambridge University Press.
136. Phillips, D., *Chemical Mechanisms in Photodynamic Therapy with Phthalocyanines. Prog. Reaction Kinetics*, 1997. 22: p. 170-300.
137. Bonnet, R., *Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. Chemical Society Reviews*, 1995. 24 p. 19-33.
138. Ozoemena K., Nyokong K.N., *Photosensitized transformation of 4-chlorophenol in the presence of aggregated and non-aggregated metallophthalocyanines. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2001. 139: p. 217-24.
139. Kubin, A., et al., *Hypericin--the facts about a controversial agent. Curr Pharm Des*, 2005. 11(2): p. 233-53.
140. Vuong, T.T., et al., *Hypericin incorporation and localization in fixed HeLa cells for various conditions of fixation and incubation. Photochem Photobiol Sci*, 2011. 10(4): p. 561-8.
141. Zanolli, P., *Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. CNS Drug Rev*, 2004. 10(3): p. 203-18.

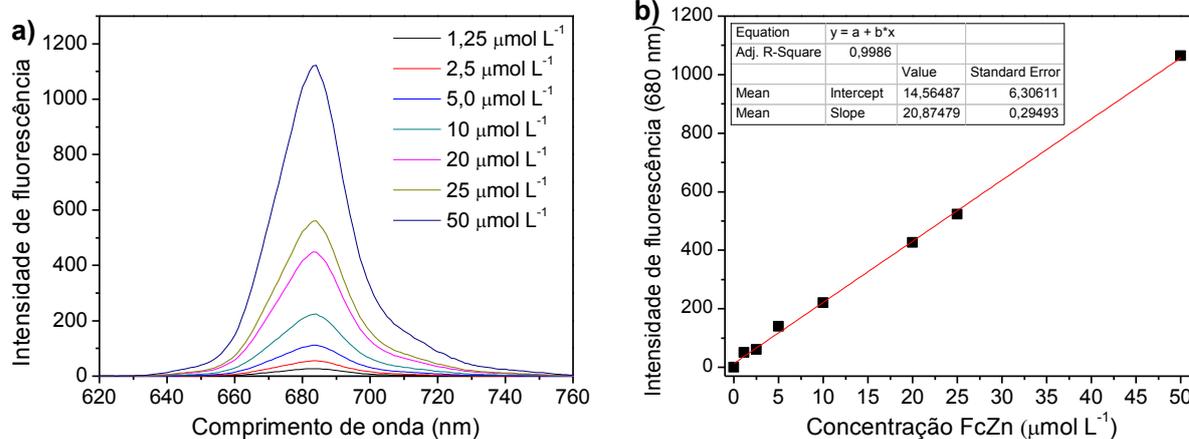
142. Malkin J, M.Y., *Hypericin derived triplet states and transients in alcohols and water*. **Photochem Photobiol**, 1993. **57**: p. 929-933.
143. Cassimiro D L., Ribeiro C A. , Crespi M S., Boralle N *Structural aspects, thermal behavior, and stability of a self-assembled supramolecular polymer derived from flunixin–meglumine supramolecular adducts*. **Thermochimica Acta** 2012. **529**: p. 59-67.
144. Kussovski, V., et al., *Photodynamic inactivation of Aeromonas hydrophila by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity*. **FEMS Microbiol Lett**, 2009. 294(2): p. 133-40.
145. Fischer F., Sinna J. , Maier-Borsta W., Lorenza W.J., Schlag P.M., *A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers*. **Clinica Chimica Acta**, 1998. 274: p. 89-104.
146. Becker, B.F., *Towards the physiological function of uric acid*. **Free Radic Biol Med**, 1993. 14(6): p. 615-31.
147. Tegos, G.P., et al., *Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers*. **Chem Biol**, 2005. 12(10): p. 1127-35.
148. Lyklema, J., *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. Vol. 1. 2000, UK: Academic Press.
149. Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A., *In vitro growth and analysis of Candida biofilms*. **Nat Protoc**, 2008. 3(12): p. 1909-24.
150. Freshney, R., *General techniques of cell culture*. 1997, New york: Cambridge University Press.
151. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J Biol Chem**, 1951. 193(1): p. 265-75.
152. Vanhaecke, E., et al., *Kinetics of Pseudomonas aeruginosa adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity*. **Appl Environ Microbiol**, 1990. 56(3): p. 788-95.
153. Barton, A.J., Sagers,R.D., Pitt, W.G., *Measurement of bacterial growth rates on polymers*. **J Biomed Mater Res**, 1996. 32(2): p. 271-8.
154. Doyle, R.J., *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. 1990, Washington, D. C.: American Society of Microbiology.
155. An, Y., Friedman, R.J., *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications*. 2000, Totowa: Human Press Inc.

156. Lappin-Scott, H.M., Costerton, W., *Microbial biofilm*. Biotechnology Research. 2003, Cambridge: Cambridge University Press
157. Vercellino Tony , M.A., et al., *Attachment of organo-selenium to polyamide composite reverse osmosis membranes to inhibit biofilm formation of S. aureus and E. coli*. **Desalination**, 2013. 309: p. 291-95.
158. Bober, C., Cooney, M., *Quantification of Single-Species Marine Biofilm with Alcian Blue*. **Journal of young investigators**, 2005. 12: p. 30-38.
159. Hamblin, M.R., Mroz, P., *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational, and Clinical*. Engineering in Medicine & Biology. 2008, Boston: Artech House Publishers.
160. Skoog, D.A., Nieman H.F., *Princípios de análise instrumental* 5<sup>a</sup> ed. 2002, Porto alegre: Bookman.
161. Everett, D., *Basic Principles Of Colloid Science*. 1994, UK: The Royal Society of Chemistry.
162. Bernal, C., *Hipericina, photodithazine e photogem: um estudo comparativo da atividade fotodinâmica*, in *Química*. 2011, Universidade de São: São Carlos.
163. Epstein, A.K., et al., *Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2011. 108(3): p. 995-1000.
164. Hanakova, A., et al., *The application of antimicrobial photodynamic therapy on S. aureus and E. coli using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin*. **Microbiol Res**, 2014. 169(2-3): p. 163-70.
165. Ashkenazi, H., Nitzan, Y., Gal,D., *Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on gram-positive and -negative bacterial*. **Photochem Photobiol**, 2003. 77(2): p. 186-91.
166. Tegos, G.P., et al., *Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers*. **Chem. Biol.**, 2005. 12(10): p. 1127-35.
167. Elias, S., Banin, E., *Multi-species biofilms: living with friendly neighbors*. **FEMS Microbiol Rev**, 2012. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.
168. Di Poto, A., et al., *The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on Staphylococcus aureus biofilms*. **Biomaterials**, 2009. 30(18): p. 3158-66.

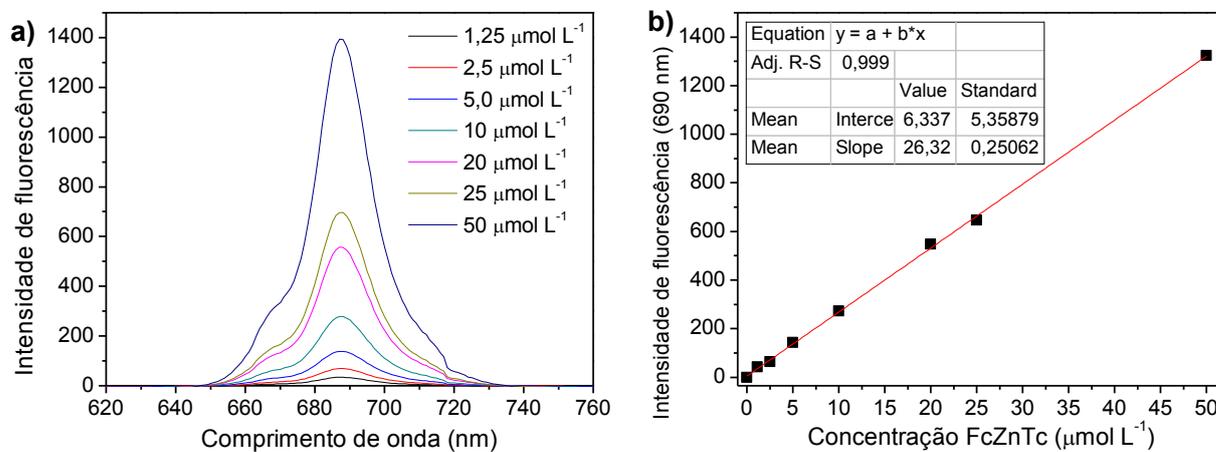
169. Hamblin, M.R., et al., *Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria*. **J Antimicrob Chemother**, 2002. 49(6): p. 941-51.
170. Vilela, S.F., et al., *Photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study*. **Arch Oral Biol**, 2012. 57(6): p. 704-10.

## ANEXO A

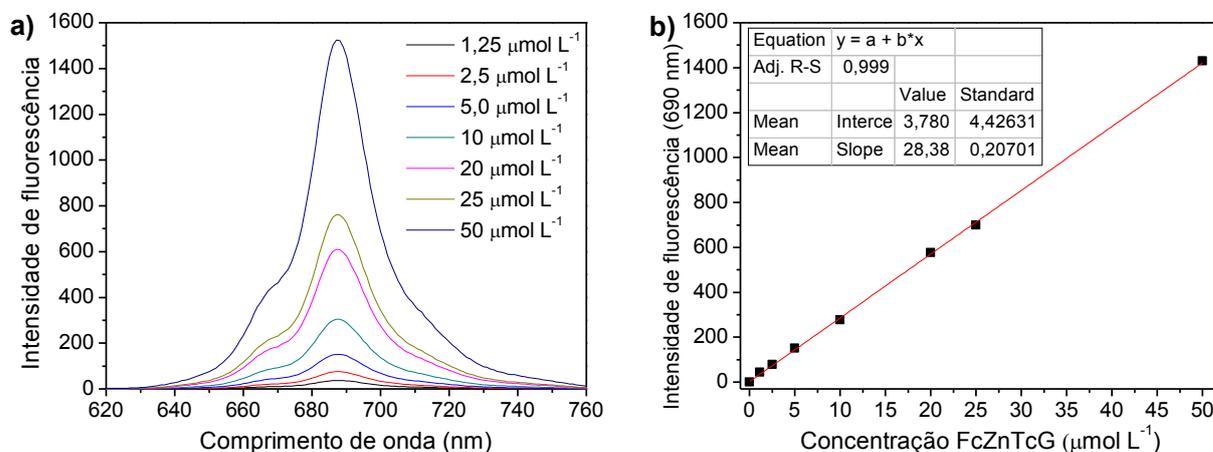
**Figura 47: (a)** Espectro de emissão da FcZn em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica da FcZn obtida a partir das intensidades de fluorescência em 680 nm.



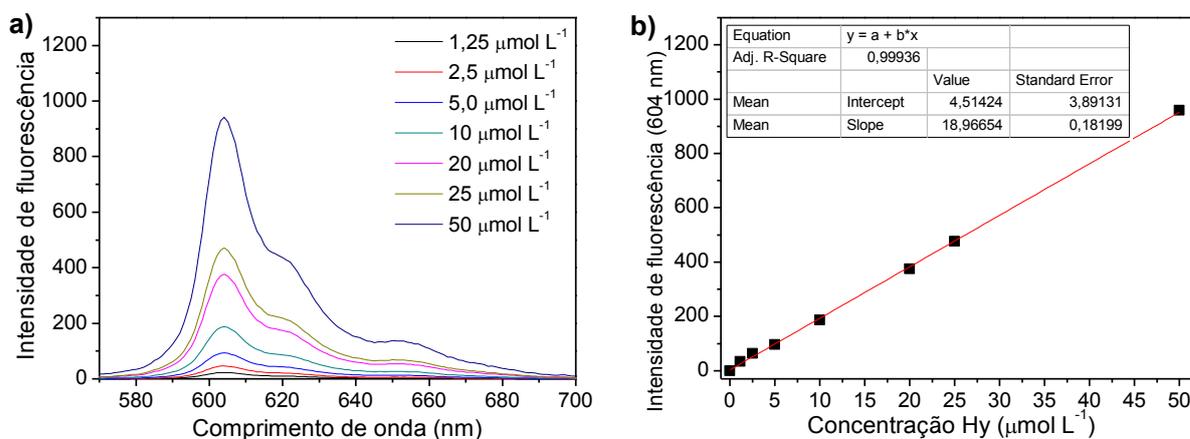
**Figura 48: (a)** Espectro de emissão da FcZnTc em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica da FcZnTc obtida a partir das intensidades de fluorescência em 690 nm.



**Figura 49: (a)** Espectro de emissão da FcZnTcG em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica da FcZnTcG obtida a partir das intensidades de fluorescência em 690 nm.



**Figura 50: (a)** Espectro de emissão de Hy em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica de Hy obtida a partir das intensidades de fluorescência em 604 nm.



**Figura 51: (a)** Espectro de emissão de HyG em diferentes concentrações. **(b)** Curva analítica de HyG obtida a partir das intensidades de fluorescência em 604 nm.

