UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

LARISSA SOUZA AMARAL

Erradicação de biofilmes bacterianos mono e multiespécies pela terapia
fotodinâmica utilizando a microbiologia preditiva multivariada e novos
fotossensibilizadores

São Carlos
2020

LARISSA SOUZA AMARAL

Erradicação de biofilmes bacterianos mono e multiespécies pela terapia
fotodinâmica utilizando a microbiologia preditiva multivariada e novos
fotossensibilizadores

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos da Universidade de São Paulo,
como requisito para a obtenção do Título de
Doutora em Ciências (Bioengenharia).

Orientador: Profa. Dra. Janice Rodrigues
Perussi

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2020

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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

S323e Souza Amaral, Larissa
Erradicação de biofilmes bacterianos mono e
multiespécies pela terapia fotodinâmica utilizando a
microbiologia preditiva multivariada e novos
fotossensibilizadores / Larissa Souza Amaral;
orientadora Janice Rodrigues Perussi. São Carlos, 2019.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades em 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,
2019.

1. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. 2.
Microbiologia Preditiva. 3. Planejamento Fatorial. 4.
Biofilmes Bacterianos. 5. Staphylococcus aureus. 6.
Enterococcus faecalis. 7. Escherichia coli. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Larissa Souza Amaral

TÍTULO: " Erradicação de biofilmes bacterianos mono e multiespécies pela terapia fotodinâmica utilizando a microbiologia preditiva multivariada e novos fotossensibilizadores"

Data da defesa: 13/02/2020

Comissão Julgadora	Assinatura	Resultado
Prof(a). Dr(a). Janice Rodrigues Perussi IQSC/USP		Não votante
Prof(a). Dr(a). Eduardo Bessa Azevedo IQSC/USP	APROVADA
Prof(a). Dr(a). Alessandra Nara de Souza Rastelli UNESP	APROVADA
Prof(a). Dr(a). Fernanda de Freitas Anibal UFSCar	Aprovada
Prof(a). Dr(a). Anderson Orzari Ribeiro UFABC		aprovada
Prof(a). Dr(a). Andrei Leitão IQSC/USP		Aprovada

*Dedico a todas as formas de vida,
racionais ou irracionais, que
contribuíram de forma significativa
para a execução dessa pesquisa,
incluindo todos os milhares de
microrganismos que participaram
de minha rotina e propiciaram
resultados tão favoráveis para a
ciência!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha mãe Marilene Aparecida de Souza pelo apoio, presença (mesmo distante), amor, afeto e disposição de sempre me ajudar. Agradeço por sempre me mostrar que tenho para onde ir e que tenho um lar ao seu lado, independente do lugar.

Ao meu namorado Erich Potrich por estar ao meu lado diariamente ao longo de todos os anos em que fiz mestrado e doutorado. Tempo precioso repleto de consolo, crescimento, amizade e alegrias. Agradeço por me ajudar na compreensão de análises multivariadas, pela paciência, companhia diária e força.

A minha orientadora Janice Rodrigues Perussi pela excelente orientação durante minha trajetória acadêmica de Mestrado e Doutorado (2014 - 2020) na Universidade de São Paulo, pela confiança em meu trabalho, pela dedicação nas correções de meus resumos, artigos e apresentações. Agradeço pelos ensinamentos constantes em várias vertentes da vida. Levarei cada ensinamento com muito apressso e afeto. Agradeço por toda oportunidade a mim concedida.

Agradeço a todos os membros do Grupo de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP e agregados: Irwin Alexander, Carlos, Luiza, Ana Paula, Cristhian Camilo e Yuri. Sou grata pela convivência, pelos cafés da nossa humilde cafeteira, pelas conversas construtivas tanto da vida quanto dos experimentos, pela companhia nos almoços e jantares.

À todas as pessoas que me ajudaram indiretamente na obtenção dos resultados dessa tese, em especial ao Dr. Eduardo Bessa Azevedo por me apresentar através de um curso o uso do Planejamento Fatorial em experimentos e por sugestões valiosas ao longo do trabalho. Ao Dr. Marcio de Paula pela paciência e auxílio na obtenção de imagens pela Microscopia Eletrônica de Varredura.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço também à FAPESP e CEPOF pelo suporte financeiro para a realização dos experimentos.

RESUMO

AMARAL, L.S. Erradicação de biofilmes bacterianos mono e multiespécies pela terapia fotodinâmica utilizando a microbiologia preditiva multivariada e novos fotossensibilizadores. 2020. 144 F. Tese (Doutorado) – Programa Interunidades 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, São Carlos, 2020.

Estima-se que em 2050 a mortalidade por infecções causadas por bactérias resistentes chegue a 10 milhões de casos por ano. Devido à resistência bacteriana é prioritário o desenvolvimento de novas drogas e/ou tecnologias para a erradicação desses patógenos. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFD-A) é uma alternativa promissora, uma vez que sua ação ocorre por múltiplos alvos o que dificultaria o desenvolvimento de resistência. TFD-A envolve a combinação de um fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz visível de comprimento de onda adequado para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) levando o microrganismo à morte. O objetivo desse estudo foi utilizar técnicas variadas para evidenciar a fotoinativação de biofilmes bacterianos mono e multiespécies via TFD-A empregando-se a microbiologia preditiva e novos FSs ainda não utilizados para essa aplicação. O uso da microbiologia preditiva utilizando o Planejamento Fatorial 2^3 propiciou o entendimento particularizado e aprofundado dos melhores parâmetros bem como seus níveis, suas interações e os efeitos individuais em cada condição. A clorina CHL-OH-A possibilitou uma fotoinativação maior dos biofilmes de *E. coli* (39 e 62%), *E. faecalis* (79 e 92%) e multiespécies (48 e 72%) enquanto que a CHL-Ph-A para o biofilme de *S. aureus* resistente à metilicina (53 e 89%) nos dois comprimentos de onda utilizados (660 e 403 nm), respectivamente. A Microscopia Eletrônica de Varredura possibilitou a observação da alteração morfológica tanto das bactérias quanto da estrutura do biofilme. A Microscopia de Fluorescência (MF) permitiu comprovar a evasão citoplasmática decorrente da peroxidação da bicamada fosfolipídica, também observada pela Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier. A MF também foi importante para validar, qualificar e quantificar a acumulação das clorinas em biofilmes através da análise de intensidade $\times$ pixels. A Microespectroscopia Raman permitiu a observação dos biocomponentes bacterianos que podem ser possíveis alvos do processo fotodinâmico. A Microscopia Ótica bem como a Espectroscopia de absorção no visível utilizando safranina 1% foram essenciais para visualizar e constatar a desestruturação da matriz exopolissacarídica bem como quantificar a biomassa do biofilme, respectivamente. Potencializar os efeitos fotodinâmicos com iodeto de potássio (KI)

foi crucial para a obtenção de menores índices de sobrevivência bacteriana chegando a 100% de erradicação para *E. faecalis* e *S. aureus* resistente à meticilina. Ensaio de seletividade com Balb 3T3 Clone A31 e de hemólise dos eritrócitos foram fundamentais para a compreensão dos efeitos que as clorinas e os comprimentos de onda da luz usados na irradiação durante a TFD-A tem sobre a membrana citoplasmática de células eucarióticas. A comparação da TFD-A com o uso do antibiótico de largo espectro foi importante para observar a eficiência da técnica. Esses resultados mostram as vantagens e a importância de uma abordagem multivariada em experimentos que envolvam a TFD-A. Além disso, este estudo chama a atenção para os benefícios do uso de metodologias que possam evidenciar o efeito antimicrobiano além da constatação típica da morte celular. Além do mais, foi comprovado que as novas clorinas apresentam elevado potencial fotodinâmico *in vitro*, sendo ótimas candidatas como fotossensibilizador em abordagens clínicas.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Microbiologia Preditiva. Planejamento Fatorial. Biofilmes Bacterianos. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Enterococcus faecalis*. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

AMARAL, L.S. **Eradication of single and multi-species bacterial biofilms by photodynamic therapy using multivariate predictive microbiology and new photosensitizers.** 2020. 144 F. Tese (Doutorado) – Programa Interunidades 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, São Carlos, 2020.

By 2050 mortality due to infections caused by resistant bacteria is estimated to reach 10 million cases per year. As a result of the bacterial resistance, the development of new drugs and technologies for the eradication of these pathogens is a priority. Antimicrobial Photodynamic Therapy (A-PDI) can solve this problem since its action occurs by multiple targets, which would hinder the development of resistance. A-PDI involves the combination of a photosensitizer (PS), molecular oxygen, and visible light suitable to produce reactive oxygen species (ROS), leading the microorganisms to death. The objective of this study was to use varied techniques to evidence the photoinactivation of single and multi-species bacterial biofilms via A-PDI using predictive microbiology and new PSs not yet used for this applicability. The use of predictive microbiology using Factorial Design 2^3 has provided, in a multivariate and unprecedented way, a detailed and in-depth understanding of the best parameters as well as their levels, their interactions, and the personal effects in each condition. CHL-OH-A enabled greater photoinactivation of *E. coli* (39 and 62%), *E. faecalis* (79 and 92%) and multi-species (48 and 72%) biofilms, while CHL-Ph-A for methicillin-resistant *S. aureus* biofilm (53 and 89%) for both used wavelengths of 660 and 403 nm, respectively. Scanning Electron Microscopy made it possible to observe the morphological alteration of both bacteria and biofilm structure. Fluorescence microscopy (FM) allowed proving cytoplasmic evasion due to phospholipid bilayer peroxidation, also observed by Fourier Transform Infrared Absorption Vibrational Spectroscopy. FM was also essential to validate, qualify, and quantify chlorin accumulation in biofilms through intensity $\times$ pixel analysis. Raman microspectroscopy allowed the observation of bacterial biocomponents that may be possible targets of the photodynamic process. Optical microscopy, as well as visible absorption spectroscopy using 1% safranin, were essential to visualize and verify the disruption of the exopolysaccharide matrix as well as to quantify the biofilm biomass, respectively. Potentiating the photodynamic effects with potassium iodide was crucial to achieving lower bacterial survival rates reaching 100% eradication for methicillin-resistant *S. aureus* and *E. faecalis*. Balb 3T3 Clone A31 selectivity

and erythrocyte hemolysis assays were critical for understanding the effects that chlorins, light wavelengths used during A-PDI on the cytoplasmic membrane of eukaryotic cells. A comparison of A-PDI with the use of broad-spectrum antibiotic was essential to visualize A-PDI efficiency. These results show the advantages and importance of a multivariate approach in experiments involving A-PDI. Besides, this study draws attention to the benefits of using methodologies that may highlight the antimicrobial effect beyond the typical finding of cell death. Moreover, it has been shown that the new chlorins have high photodynamic potential in vitro and are a great candidate as photosensitizers in clinical approaches.

Keywords: Antimicrobial Photodynamic Therapy. Predictive Microbiology. Factorial Design. Bacterial Biofilm. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enterococcus faecalis*. *Escherichia coli*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estágios de formação do biofilme. (1) Adesão Reversível, (2) Adesão Irreversível, (3) Formação da matriz polimérica e por fim (4) Amadurecimento e dispersão.	35
Figura 2 - Representação dos mecanismos fotodinâmicos do tipo 1 e tipo 2.....	39
Figura 3 - Fórmula estrutural das clorinas: (A) CHL-OH-A; (B) CHL-Ph-A e (C) CHL-T. ..	40
Figura 4 - Diagrama de Pareto dos efeitos em função do teste t permitindo a visualização da significância dos parâmetros para cada FS: (A e D) CHL-OH-A; (B e E) para CHL-Ph-A e (C e F) para CHL-T. Utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm (A, B e C) e 403 nm (D, E e F). DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.....	55
Figura 5 - Gráfico de superfície de resposta (3D) da fotoinativação de biofilme de <i>E.coli</i> utilizando-se: A-C: CHL-OH-A + 660 nm; D-F: CHL-Ph-A + 660 nm e G-I: CHL-T + 660 nm; J-L: CHL-OH-A + 403 nm; M-O: CHL-Ph-A + 403 nm e P-R: CHL-T + 403 nm. Sendo A, D, G, J, M e P: Log UFC x TI x DL; B, E, H, K, O e Q: Log UFC x TI x C e, por fim, C, F, I, L, P e R: Log UFC x DL x C.	57
Figura 6 - Diagrama de Pareto dos efeitos em função do teste t permitindo a visualização da significância dos parâmetros para cada FS: (A e D) CHL-OH-A; (B e E) para CHL-Ph-A e (C e F) para CHL-T. Utilizando o comprimento de onda de 660 nm (A, B e C) e 403 nm (D, E e F). DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.....	64
Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta (3D) da fotoinativação de biofilme de <i>E. faecalis</i> utilizando: A-C: CHL-OH-A + 660 nm; D-F: CHL-Ph-A + 660 nm e G-I: CHL-T + 660 nm; J-L: CHL-OH-A + 403 nm; M-O: CHL-Ph-A + 403 nm e P-R: CHL-T + 403 nm. Sendo A, D, G, J, M e P: Log UFC x TI x DL; B, E, H, K, O e Q: Log UFC x TI x C e, por fim, C, F, I, L, P e R: Log UFC x DL x C.....	66
Figura 8 - Espectros de absorção UV-Vis das clorinas CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T possibilitando observar os picos que absorvem os comprimentos de onda utilizando para TFD-A (660 e 403 nm).....	70
Figura 9 - (A) Diagrama de Pareto dos efeitos em função do teste t permitindo a visualização da significância dos parâmetros para cada FS: (A e D) CHL-OH-A; (B e E) para CHL-Ph-A e (C e F) para CHL-T. Utilizando o comprimento de onda de 660 nm (A, B e C) e 403 nm (D, E e F). DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.....	74

Figura 10 - Gráfico de superfície de resposta (3D) da fotoinativação de biofilme de MRSA utilizando-se: **A-C**: CHL-OH-A + 660 nm; **D-F**: CHL-Ph-A + 660 nm e **G-I**: CHL-T + 660 nm; **J-L**: CHL-OH-A + 403 nm; **M-O**: CHL-Ph-A + 403 nm e **P-R**: CHL-T + 403 nm. Sendo **A, D, G, J, M e P**: $\text{Log UFC} \times \text{TI} \times \text{DL}$; **B, E, H, K, O e Q**: $\text{Log UFC} \times \text{TI} \times \text{C}$ e, por fim, **C, F, I, L, P e R**: $\text{Log UFC} \times \text{DL} \times \text{C}$ 76

Figura 11 - Diagrama de Pareto dos efeitos em função do teste t permitindo a visualização da significância dos parâmetros para cada FS: (**A e D**) CHL-OH-A; (**B e E**) para CHL-Ph-A e (**C e F**) para CHL-T. Utilizando o comprimento de onda de 660 nm (**A, B e C**) e 403 nm (**D, E e F**). DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação..... 82

Figura 12: Gráfico de superfície de resposta (3D) da fotoinativação de biofilme multiespécies: **A-C**: CHL-OH-A + 660 nm; **D-F**: CHL-Ph-A + 660 nm e **G-I**: CHL-T + 660 nm; **J-L**: CHL-OH-A + 403 nm; **M-O**: CHL-Ph-A + 403 nm e **P-R**: CHL-T + 403 nm. Sendo **A, D, G, J, M e P**: $\text{Log UFC} \times \text{TI} \times \text{DL}$; **B, E, H, K, O e Q**: $\text{Log UFC} \times \text{TI} \times \text{C}$ e, por fim, **C, F, I, L, P e R**: $\text{Log UFC} \times \text{DL} \times \text{C}$ 84

Figura 13: Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes bacteriano de *E. coli* (**A, B e C**); *E. faecalis* (**D, E e F**); MRSA (**G, H e I**) e multiespécies (**J, K e L**). As amostras controle (não submetidas à TFD-A) são representadas por **A, D, G e J**. Amostras submetidas à TFD-A utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm são representadas por **B, E, H e K**, enquanto que utilizando-se 403 nm, **C, F, I e L** para *E. coli*; *E. faecalis*; MRSA e multiespécies, respectivamente. 89

Figura 14: Microscopia de fluorescência utilizando-se o kit LIVE/DEAD™ dos biofilmes bacteriano de *E. coli* (**A, B e C**); *E. faecalis* (**D, E e F**); MRSA (**G, H e I**) e multiespécies (**J, K e L**). As amostras controle (não submetidas à TFD-A) são representadas por **A, D, G e J**. Amostras submetidas à TFD-A utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm são representadas por **B, E, H e K**, enquanto que utilizando-se 403 nm, **C, F, I e L** para *E. coli*; *E. faecalis*; MRSA e multiespécies, respectivamente..... 92

Figura 15: Microscopia de fluorescência dos ensaios de acumulação de CHL-OH-A (**A-F** para Biofilme de *E. coli*; **G-L** para biofilme de *E. faecalis* e **S-X** para biofilme multiespécies) e acumulação de CHL-Ph-A (**M-R** para biofilme de MRSA). Os tempos representados por 10 minutos são: **A, G, M e S**; 20 min: **B, H, N, T**; 30 min: **C, I, O e U**; 40 min: **D, J, P e V**; 50 min: **E, K, Q e W** e, por fim, 60 min: **F, L, R e X**. Todas as imagens foram obtidas com ampliação de 4x e escala de 200 μm . *As imagens foram convertidas para cor azul..... 95

Figura 16: Histograma da intensidade de fluorescência x pixels dos ensaios de acumulação de CHL-OH-A (**A-F** para Biofilme de *E. coli*; **G-L** para biofilme de *E. faecalis* e **S-X** para biofilme multiespécies) e acumulação de CHL-Ph-A (**M-R** para biofilme de MRSA). Os tempos representados por 10 minutos são: **A, G, M e S**; 20 min: **B, H, N, T**; 30 min: **C, I, O e U**; 40 min: **D, J, P e V**; 50 min: **E, K, Q e W** e, por fim, 60 min: **F, L, R e X**. *Destaques em azul representam o tempo que houve a maior acumulação das clorinas aos biofilmes. 97

Figura 17: Espectro Infravermelho com Transformada de Fourier das bactérias suspensas do biofilme antes e após a fotoinativação utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm (LED vermelho). **A, B e D:** utilizando-se CHL-OH-A e **C:** CHL-Ph-A..... 99

Figura 18: Espectro Infravermelho com Transformada de Fourier das bactérias suspensas do biofilme antes e após a fotoinativação utilizando-se o comprimento de onda de 403 nm (LED vermelho). **A, B e D:** utilizando-se CHL-OH-A e **C:** CHL-Ph-A..... 100

Figura 19: Análise microscópica da dispersão do biofilme após TFD-A. **A-C:** *E. coli*; **D-F:** *E. faecalis*; **G-I:** MRSA e **J-L:** Multiespécies. As amostras controle (sem TFD-A) são: **A, D, G e J** enquanto que as amostras submetidas à TFD-A são: **B, E, H e K** utilizando o comprimento de onda de 660 nm e **C, F, I e L**, 403 nm. Ampliação da imagem de 4x e escala de 200 µm. *Coloração em vermelho corresponde à safranina 1%. 102

Figura 20: Análise da biomassa dos biofilmes bacterianos constituídos de: **(1)** *E. coli*; **(2)** *E. faecalis*; **(3)** MRSA e **(4)** multiespécies antes e após TFD-A utilizando-se o comprimento de onda de 660 e 403 nm representados pelos diferentes tons de cinza. Ensaios apresentam média ± desvio padrão (n = 4 e ****P < 0,0005 representando 95% de confiança). 103

Figura 21: Visualização dos alvos da TFD-A por Microespectroscopia Raman. **A:** Microscopia do biofilme de *E. coli*; **B:** microscopia do biofilme de *E. faecalis*; **C:** microscopia do biofilme de *S. aureus* e **D:** microscopia do biofilme multiespécies. Em **E** pode-se observar o espectro Raman da região registrada na imagem de cada biofilme. 105

Figura 22: Viabilidade (Log UFC mL⁻¹) do biofilme de *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) e multiespécies após o tratamento com antibiótico cloridrato de ciprofloxacino. *ns = diferença estatisticamente não significativa. 107

Figura 23: Imagens representativas da cor das colônias após o cultivo das linhagens na superfície do ágar VC. **(A)** *E. coli*; **(B)** *E. faecalis* e **(C)** MRSA. 108

Figura 24: Teste de seletividade em fibroblastos Balb 3T3 Clone A31 utilizando-se as clorinas CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T e irradiação no comprimento de onda de 660 nm (**A**) e 403 nm (**B**). (*Ensaios 1-9 = parâmetros e níveis referentes à matriz experimental do PFC2³ com ponto central). (*) representam os resultados que constaram morte celular e ns = diferença não significativa. 109

Figura 25: Screening das concentrações de Iodeto de Potássio (0 – 100 µmol L⁻¹) para determinação de concentração não letal para os biofilmes monoespécie de *E. coli*, *E. faecalis* e MRSA e multiespécies. *ns = diferença estatística insignificante e ****P-value = 0,0001.. 111

Figura 26: Comparação dos percentuais de fotoinativação dos biofilmes de *E. coli* (**A, B, C**); *E. faecalis* (**D, E, F**); MRSA (**G, H, I**) e multiespécies (**J, K, L**) utilizando CHL-OH-A (**A, D, G, J**); CHL-Ph-A (**B, E, H, K**) e CHL-T (**C, F, I, L**). Os diferentes comprimentos de onda (660 ou

403 nm) são representados pelas variações de tons de cinza, bem como os maiores valores de percentuais de fotoinativação descritos no ensaio realizado representado de 1-8 que são os valores dos parâmetros descritos na matriz experimental do PFC 2³..... 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz experimental do Planejamento Fatorial Completo 2^3 (com triplicata no ponto central) apresentando os resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *E.coli* utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm e 403 nm. Os melhores resultados obtidos em $\Delta\log$ UFC mL⁻¹ estão marcados em cinza para cada FS. 52

Tabela 2 - Comparação dos melhores resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *E.coli* utilizando-se CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta). % = porcentagem de fotoinativação.53

Tabela 3 - Matriz experimental do Planejamento Fatorial Completo 2^3 (com triplicata no ponto central) apresentando os resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *E. faecalis* utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm e 403 nm. Os melhores resultados obtidos em $\Delta\log$ UFC mL⁻¹ estão marcados em cinza para cada FS.61

Tabela 4 - Comparação dos melhores resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *E. faecalis* utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta). % = porcentagem de fotoinativação.62

Tabela 5 - Matriz experimental do Planejamento Fatorial Completo 2^3 (com triplicata no ponto central) apresentando os resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *S. aureus* resistente à metilicina utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm e 403 nm. Os melhores resultados obtidos em $\Delta\log$ UFC mL⁻¹ estão marcados em cinza para cada FS.71

Tabela 6 - Comparação dos melhores resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta). % = porcentagem de fotoinativação.72

Tabela 7 - Matriz experimental do Planejamento Fatorial Completo 2^3 (com triplicata no ponto central) apresentando os resultados obtidos na fotoinativação do biofilme multiespécies constituído de *E. coli*; *E. faecalis* e *S. aureus* resistente à meticilina utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm e 403 nm. Os melhores resultados obtidos em $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ estão marcados em cinza para cada FS..... 80

Tabela 8 - Comparação dos melhores resultados obtidos na fotoinativação do biofilme multiespécies utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta). % = porcentagem de fotoinativação. 81

Tabela 9 - Condições experimentais utilizadas para a obtenção das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de fluorescência utilizando-se o kit LIVE/DEAD™. Em que TI = Tempo de Incubação (min); DL = Dose de Luz (J cm^{-2}) e C = Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$). 88

Tabela 10 - Concentração residual de bactérias após TFD-A em $\log \text{UFC mL}^{-1}$. Os itens destacados em cinza representam os melhores fotossensibilizadores dependendo do modelo de biofilme. *Resultados estatisticamente iguais de acordo com o teste de confiabilidade de 95%. 116

Tabela 11 - Comparação dos níveis dos parâmetros x comprimento de onda (660 e 403 nm), para cada clorina e modelo de biofilme, que favoreceram os melhores percentuais de fotoinativação. TI = Tempo de Incubação (min); DL = Dose de luz (J cm^{-2}) e C = concentração da clorina CHL-OH-A, CHL-Ph-A ou CHL-T ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Itens destacados em cinza representam a igualdade do nível do parâmetro TI para todos os modelos de biofilmes, todas as clorinas e para os dois comprimentos de onda (660 e 403 nm). Destaque em azul são os níveis idênticos de DL e C para o biofilme de *E.coli* irradiados em 660 e 403 nm. Para biofilme de *E. faecalis* os níveis iguais dos parâmetros DL e C são representados em laranja. Em verde são os níveis iguais dos parâmetros DL e C para o biofilme de MRSA e em amarelo para biofilme multiespécies. 126

Tabela 12 - Insignificância dos efeitos dos parâmetros (TI; DL e C) envolvidos na fotoinativação do biofilme de *E. coli*, *E. faecalis*, MRSA e multiespécies utilizando as clorinas:

CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T e comprimento de onda de 660 e 403 nm. TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm^{-2}) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$). V = LED vermelho (660 nm) e L= LED violeta (403 nm). *Todos os parâmetros marcados em vermelho ou violeta são estatisticamente insignificantes. 128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ágar VC	–	Ágar Vermelho Congo
ANOVA	–	Análise de Variância
C	–	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
CHL-OH-A	–	Clorina com grupo hidroxila (-OH)
CHL-Ph-A	–	Clorina com grupo fenil (-Ph)
CHL-T	–	Clorina com grupo 2-Amino- 2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (-
TRISMA)		
CIP	–	Cloridrato de Ciprofloxacina
DL	–	Dose de Luz (J cm^{-2})
EA	–	Espectroscopia de Absorção Uv-Vis
EPS	–	Exopolissacarídeos
FS e FSs	–	Fotossensibilizador (es)
FTIR	–	Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho
		com Transformada de Fourier, (do inglês: <u>F</u> ourier <u>T</u> ransform <u>I</u> nfra <u>R</u> ed)
IProp	–	Iodeto de Propídio
KI	–	Iodeto e Potássio
MEV	–	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	–	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	–	Microscopia ótica
mRaman	–	Microespectroscopia Raman
PFC 2 ³	–	Planejamento Fatorial Completo 2 ³
PIA	–	Polissacarídeo Intercelular de Adesão
S	–	SYTO [®] 9
TFD-A	–	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
TI	–	Tempo de Incubação (minutos)
UFC	–	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$ Graus Celsius

$\Phi\Delta$ Rendimento quântico de formação de oxigênio singlete

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1 O Cenário dos antimicrobianos e a resistência bacteriana.....	33
1.2 BIOFILME: conceito, morfologia e componentes estruturais.....	34
1.3 Estágios de formação do biofilme	34
1.3.1 Adesão reversível	34
1.3.2 Adesão irreversível.....	35
1.3.3 Formação da matriz polimérica.....	35
1.3.4 Amadurecimento e dispersão	36
1.4 Relevância clínica	36
1.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana e fotossensibilizadores	37
2. OBJETIVOS	40
3. METODOLOGIAS	41
3.1 Procedimentos estatísticos	41
3.1.1 Planejamento fatorial completo 2 ³	42
3.2 Estruturas e espectros de absorção de CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T	42
3.3 Procedimentos Biológicos	42
3.3.1 Microrganismos, meios e condições de cultivo na forma planctônica.....	42
3.3.2 Formação dos biofilmes mono e multiespécies	43
3.3.3 Inativação fotodinâmica de biofilme mono e multiespécies	43
3.3.4 Quantificação do índice de sobrevivência por microgotas	44
3.3.5 Inativação do biofilme mono e multiespécies com antibiótico	44
3.3.6 Meios e condições de cultivo da linhagem Balb/3T3 Clone A31	44
3.3.7 Mensuração da atividade mitocondrial	45
3.3.8 Obtenção dos eritrócitos de sangue humano	45
3.4 Procedimentos de caracterização do biofilme e/ou do efeito fotodinâmico	45
3.4.1 Acumulação das clorinas em biofilme mono e multiespécies	45
3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
3.4.3 Microscopia de fluorescência com kit LIVE/DEAD™	46
3.4.4 Microespectroscopia Raman	47
3.4.5 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier.....	47
3.4.6 Análise da dispersão do biofilme após TFD-A por microscopia ótica	48

3.4.7 Análise da dispersão e biomassa do biofilme após TFD-A por espectroscopia no visível	48
3.4.8 Prova fenotípica de detecção de virulência para formação de biofilme.....	49
3.4.9 Screening e potencialização da fotoinativação utilizando-se iodeto de potássio	49
3.5 Seletividade do processo fotodinâmico em fibroblasto Balb/3T3 Clone A31	50
3.6 Fotólise dos eritrócitos	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Terapia Fotodinâmica utilizando-se CHL-OH-A, CHL-PH-A e CHL-T com LED 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta)	51
4.1.1 Fotoinativação de biofilmes de <i>E. coli</i> por TFD-A.....	51
4.1.2 Fotoinativação de biofilme de <i>E. faecalis</i> por TFD-A	60
4.1.3 Fotoinativação de biofilme de <i>S. aureus</i> resistente à metilicina por TFD-A	69
4.1.4 Fotoinativação de biofilme multiespécies por TFD-A	79
4.2 Análise morfológica dos biofilmes mono e multiespécies após TFD-A por MEV	88
4.3 Determinação da integridade da membrana das bactérias no biofilme.....	91
4.4 Acumulação do fotossensibilizador em biofilmes mono e multiespécies	94
4.5 Análise da peroxidação da membrana após TFD-A	98
4.6 Análise do efeito desestruturante e dispersivo da TFD-A sobre os biofilmes.....	100
4.7 Visualização dos componentes bacterianos em biofilme por microespectroscopia Raman	104
4.8 Inativação do biofilme mono e multiespécies com cloridrato de ciprofloxacino	106
4.9 Prova fenotípica para formação de biofilme	107
5.0 Seletividade de fibroblastos à TFD-A e análise da membrana de eritrócitos	108
5.1 Potencialização da TFD-A utilizando-se iodeto de potássio	110
6. DISCUSSÃO	115
7. CONCLUSÕES	131
8. REFERÊNCIAS	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Cenário dos antimicrobianos e a resistência bacteriana

Inicialmente os antimicrobianos, por exemplo a penicilina, eram obtidos a partir de alguns tipos de microrganismos e, após o conhecimento de sua estrutura química passaram a ser sintetizados em laboratórios. Logo, foram classificados pela sua estrutura química, seu espectro de ação, sua ação sobre o microrganismo e seu mecanismo de ação (TAVARES, 2001). Os mecanismos de ação dos antimicrobianos estão relacionados com a replicação do DNA; interferência na biossíntese do peptidoglicano; tradução; transcrição; membrana celular e com o metabolismo celular, sendo assim divididos em diversas classes (MORAR et al., 2010).

A disseminação da resistência bacteriana em microrganismos de importância clínica tornou-se um sério problema, devido à redução acentuada da eficácia nos tratamentos de infecções, resultando em maiores complicações e casos fatais (ANDERSON et al., 2011).

A resistência bacteriana é explicada por diversos mecanismos genéticos. O mecanismo genético intrínseco é associado a uma mutação cromossômica ou expressão cromossômica de um gene de resistência. O mecanismo extrínseco baseia-se na aquisição de um novo material genético por meio de bacteriófagos (transdução), incorporação de DNA (transformação) ou aquisição de um plasmídeo (conjugação). Assim, com a resistência adquirida, as bactérias podem produzir enzimas capazes de destruir ou inativar o antibiótico, alterar o sítio alvo impedindo a ação do mesmo e ainda impedir o acesso do antibiótico ao sítio da bactéria (DZIDIC et al., 2003).

A administração e o uso inadequados dos antimicrobianos ocasionam desordens genéticas nos microrganismos o que gera problemas para o tratamento de infecções, instigando uma nova era, a era pós-antibióticos. Nesta era, novas tecnologias começam a ser empregadas para o tratamento microbiológico sem a utilização de antibióticos, destacando-se a inativação pela destruição ou modificação da estrutura celular dos microrganismos; 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 no microrganismo (DOHMEN et al., 2008; KOHANSKI et al., 2010).

1.2 BIOFILME: conceito, morfologia e componentes estruturais

Os microrganismos, na maioria dos ambientes/superfícies bióticas (células, tecidos animais ou vegetais) e abióticas (plásticos, metais, vidros etc.), evoluem em um modo de crescimento sésil designado biofilme, caracterizado como bactérias de uma ou mais espécies incorporadas em uma matriz polimérica extracelular autoproduzida, presentes em praticamente todos os ecossistemas naturais e patogênicos (RITTMANN, 2017). A matriz polimérica é constituída por alguns nutrientes e minerais importantes que são presos e também eliminados pelo ambiente circundante (JAMAL et al., 2017). Os principais constituintes da matriz, em sua maioria, são proteínas (>2%), polissacarídeos (1-2%), moléculas de eDNA (<1%), RNA (<1%), íons (fixos e livres) e finalmente 97% de água entre outros (PERCIVAL et al., 2011; JAMAL, et al., 2017; SMITH et al., 1995; SLEYTE, 1997; FLEMMING et al., 2016; KOBAYASHI, 2007).

1.3 Estágios de formação do biofilme

A formação do biofilme pode ocorrer por pelo menos três mecanismos. O primeiro é pela redistribuição de células anexadas por motilidade em superfície, o segundo pela divisão binária de células anexadas e por fim, o terceiro que é o recrutamento de células do fluido em massa para o desenvolvimento de biofilmes. A contribuição de cada um desses mecanismos para a formação do biofilme dependerá do microrganismo envolvido, natureza da superfície sendo colonizada e as condições físico-químicas do ambiente (KASNOWSKI et al., 2010).

1.3.1 Adesão reversível

Os estágios de formação, constituição e diferenciação do biofilme são divididos em quatro. No primeiro estágio as bactérias estão na forma planctônica dispersas no meio começando a se aproximar de superfícies sólidas através de fluidos (movimento browniano) ou via quimiotaxia e motilidade (por flagelos e pili) (JAMAL et al., 2017), superando forças de repulsão entre as células e a superfície. A reversibilidade do processo de adesão é influenciada pelas forças de atração de van der Waals, eletrostáticas, interações hidrofóbicas e hidrodinâmicas (STOODLEY et al., 2002). Através da Fig. 1 pode ser observada a representação dos estágios de formação do biofilme.

Figura 1 - Estágios de formação do biofilme. (1) Adesão Reversível, (2) Adesão Irreversível, (3) Formação da matriz polimérica e por fim (4) Amadurecimento e dispersão.

Fonte: Autoria própria (2019).

1.3.2 Adesão irreversível

No segundo estágio ocorre a transição da fase reversível para a irreversível de aderência, através da produção de polímeros extracelulares e/ou pela produção de adesinas específicas na superfície das bactérias como flagelos e fímbrias que interagem com a superfície. Assim há uma imobilização dos microrganismos no substrato, iniciando a multiplicação. Essa fase de adesão também é influenciada pelas características das linhagens, da fase de crescimento, temperatura, meio de crescimento e presença de outros microrganismos, além da sinalização célula-célula denominada de *quorum-sensing*, caracterizada pela produção e detecção de moléculas sinalizadoras (auto-indutoras) (JAMAL et al., 2017; RENDUELES et al., 2012; AKANKSHA et al., 2018).

1.3.3 Formação da matriz polimérica

O terceiro estágio é marcado pela inicialização do desenvolvimento da arquitetura do biofilme, em que há a formação de agrupamentos no biofilme maduro. Nesse estágio, os polímeros extracelulares, em especial os exopolissacarídeos (EPS) servem como um “adesivo” e como meio de transporte para os nutrientes. As bactérias apresentam crescimento e

diferenciações fisiológicas e metabólicas específicas em relação às culturas planctônicas. Nesta fase de maturação, certos produtos de genes são expressos, que são considerados importantes para a formação de EPS (JAMAL et al., 2017). Há aglomerados de bactérias rodeadas de canais de água permitindo que nutrientes e oxigênio alcancem o interior além de permitir que metabólicos excretados difundam-se para fora.

1.3.4 Amadurecimento e dispersão

O último estágio é iniciado quando há a ocorrência de dispersão das bactérias do biofilme para o ambiente (RENDUELES et al., 2012). Durante o processo de separação, as comunidades microbianas, dentro do biofilme, produzem diferentes enzimas sacarolíticas que ajudam a liberar a superfície. Por exemplo, *Escherichia coli* produz *N*-acetil-heparosan liase, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* produzem alginato-liase e *Streptococcus equi* produz hialuronidase para a lise da matriz de EPS e posterior desprendimento (AKANKSHA et al., 2018). Nesta fase, as bactérias regulam a expressão de proteínas relacionadas à formação de flagelos, para permitir que elas se movam para um novo ambiente dando início a um novo ciclo (JAMAL et al., 2017).

1.4 Relevância clínica

O desprendimento de colônias bacterianas do biofilme e a locomoção para outro ambiente, propicia a propagação de infecção (ASHUTOSH et al., 2017). Dentre as infecções acometidas por formação de biofilmes as principais são: as endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites, infecções relacionadas à fibrose cística e como importantes colonizadores de implantes biomédicos, tais como cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses (JAMAL et al., 2017; ASHUTOSH et al., 2017). Estima-se que os biofilmes são responsáveis por 65-80% das infecções que ocorrem no corpo humano, e que devido à sua persistência e natureza crônica, impõem uma pressão sobre os sistemas de saúde em todo o mundo (HOIBY et al., 2011).

A matriz polimérica extracelular atua como um fator de virulência promovendo maior resistência e proteção contra a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para a vitalidade do microrganismo. Ela age como adsorvente ou reagente, diminuindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com o biofilme em um processo infeccioso, sendo impedida sua penetração, além dos microrganismos protegidos pela camada estarem menos

susceptíveis à fagocitose impedindo que os anticorpos do sistema imune possam inativá-los (RENDUELES *et al.*, 2012).

Dentro dos biofilmes, as bactérias evoluem de forma geneticamente semelhante, mas são fisiologicamente diferentes em comparação com as ancestrais. São metabolicamente inertes, replicam lentamente, modulam o sistema toxina-antitoxina, regulam a reparação do DNA e processos antioxidativos, aumentam o metabolismo do fosfato e exibem resistência às concentrações inibitórias mínimas de antibióticos (LEWIS *et al.*, 2010).

O tratamento medicamentoso normalmente inibe/elimina células planctônicas e a maioria das células de biofilme. No entanto, as bactérias tolerantes repovoam o biofilme, disseminam-se em forma planctônica e iniciam um novo ciclo de desenvolvimento do biofilme (STOODLEY *et al.*, 2002; AKANKSHA *et al.*, 2018; LEWIS *et al.*, 2010; ZHANG, 2014; KEREN *et al.*, 2011) que aumenta a duração do tratamento das doenças gerando microrganismos resistentes.

Segundo uma revisão publicada na *Antimicrobial Resistance*, estima-se que em 2050 a mortalidade por infecções causadas por bactérias resistentes chegue a 10 milhões de casos por ano, superando o número de mortes causadas por câncer e outras doenças responsáveis pela maioria das mortes no mundo. Além disso, o *Fórum Econômico Mundial* apresentou uma estimativa de que até 2050 haverá uma retração no produto interno bruto mundial de até 3% e uma despesa acumulada de 100 trilhões de dólares, com maior risco de mortalidade para os países com economias emergentes, como nos BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) (PEREIRA *et al.*, 2018). Devido a essa projeção, é necessário o desenvolvimento de novas terapias.

Dentro desse cenário, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFD-A) surge como uma alternativa promissora, uma vez que não há relatos, até então, de microrganismos resistentes ao tratamento.

1.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana e fotossensibilizadores

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFD-A) é um processo de fotoinativação que envolve a combinação de um corante de baixa toxicidade conhecido como fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz visível em um comprimento de onda adequado para a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (SPRING *et al.*, 2015), tais como o oxigênio singlete e radicais livres que são capazes de oxidar os constituintes e organelas celulares resultando em morte celular (HAMBLIN, 2016; HUANG, *et al.*, 2010).

O efeito fotodinâmico é explicado por dois mecanismos, o Tipo I e o Tipo II (Fig.2). Após absorver (A) um fóton, a molécula de FS passa do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_2) que, dependendo da energia, pode relaxar para o estado excitado singlete S_1 por conversão interna (CI). No estado excitado o FS pode retornar ao estado fundamental emitindo um fóton de energia através de processos radioativos de fluorescência (F) e não radioativos como as relaxações vibracionais ou pode ainda inverter seu spin espontaneamente através do processo de cruzamento entre sistemas (CS) e passar do estado S_1 para o estado tripleto (T_1). O T_1 pode sofrer decaimento para o estado fundamental através de processos radioativos de fosforescência (P) e não radioativos como relaxações vibracionais (BACELLAR et al., 2015; ONISZCZUKA et al., 2016).

O mecanismo **Tipo I** envolve a participação do FS em reações de transferência de elétrons entre a molécula do FS no seu estado excitado S_1 ou T_1 e o substrato, resultando na formação de íons radicais que tendem a reagir instantaneamente com o oxigênio molecular, produzindo uma mistura de intermediários de oxigênio altamente reativos como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas. O mecanismo **Tipo II** representa as reações de transferência de energia entre o FS no estado T_1 e o oxigênio molecular, cujo estado fundamental também é tripleto. Essas reações levam à formação de oxigênio singlete, uma espécie capaz de oxidar os constituintes e organelas celulares resultando na morte celular (SPRING et al., 2015; HAMBLIN, 2016; HUANG et al., 2010; BACELLAR et al., 2015; ONISZCZUKA et al., 2016; KASHEF et al., 2017).

Os fotossensibilizadores (FSs) são moléculas coloridas que apresentam grupos cromóforos que fazem com que essas substâncias se tornem ativadas pela absorção de radiação eletromagnética. Esses compostos, quando excitados, interagem diretamente com um substrato ou propicia a formação de oxigênio singlete e/ou radicais que agem destruindo os tecidos biológicos (PERUSSI et al., 2008).

Figura 2 - Representação dos mecanismos fotodinâmicos do tipo 1 e tipo 2

Fonte: Autoria própria (2019).

As clorinas (Fig. 3A-C), são bons exemplos de FSs e são consideradas compostos naturais derivados da clorofila. Apresentam alto coeficiente de absorção molar, alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e banda intensa de absorção na região de 400 e 650-670 nm. Irwin Alexander Patino Linares do Grupo de Fotossensibilizadores do IQSC sintetizou, em colaboração com o Prof. Kleber T. Oliveira da UFSCar, clorinas estericamente impedidas de se auto-agregarem através da reação de Diels-Alder entre o éster dimetilico de protoporfirina IX e 1-(2-Hidroxitil) -1H-pirrol-2,5-diona (CHL-OH-A e CHL-PH-A) (LINARES et al., 2017), que foram utilizadas de forma comparativa com outra clorina sintetizada pelo grupo de Química Bio-orgânica do Prof. Kleber T. Oliveira denominada Clorina TRISMA® (CHL-T) e já estudada em outras aplicações (MORITZ et al., 2017a; MORITZ et al., 2017b). Essas clorinas

serão utilizadas de forma inédita para a fotoinativação dos modelos de biofilme mono e multiespécies propostos nesse estudo com o auxílio do Planejamento Fatorial Completo 2³.

Figura 3 - Fórmula estrutural das clorinas: (A) CHL-OH-A; (B) CHL-Ph-A e (C) CHL-T.

Fonte: Autoria própria (2019).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi utilizar a TFD-A para fotoinativação de biofilmes mono e multiespécies compostos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (ATCC[®] 33591[™]), *Enterococcus faecalis* (ATCC[®] 29212[™]) e *Escherichia coli* (ATCC[®] 25922[™]) utilizando-se novas clorinas como fotossensibilizadores e caracterizando-se os biofilmes quanto à formação, constituintes e interação com FS após o processo fotodinâmico, evidenciando a eficiência.

Várias estratégias foram utilizadas com a finalidade de se alcançar o objetivo central proposto:

- ✓ Obter a fotoinativação de biofilme mono e multiespécies com as clorinas utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm (vermelho) e também de 403 nm (violeta);
- ✓ Utilizar análise multivariada para os ensaios de fotoinativação (Planejamento Fatorial 2³) e detalhar a significância, importância e variações de todos os parâmetros;
- ✓ Analisar a acumulação das clorinas no biofilme por microscopia de fluorescência com análise da intensidade de fluorescência × pixels;
- ✓ Mostrar a virulência das cepas para formação de biofilmes em Vermelho Congo;

- ✓ Caracterizar a morfoestrutura dos modelos de biofilmes após TFD-A através da Microscopia Eletrônica de Varredura;
- ✓ Analisar danos na membrana celular das bactérias em biofilme por microscopia de fluorescência utilizando-se o kit LIVE/DEAD™;
- ✓ Demonstrar a peroxidação da membrana citoplasmática por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier;
- ✓ Evidenciar os biocomponentes estruturais de cada cepa de bactéria em biofilme via Microespectroscopia Raman;
- ✓ Comparar a eficiência do uso do antibiótico cloridrato de ciprofloxacino frente à TFD-A;
- ✓ Analisar a capacidade de dispersão/desestruturação e a biomassa do biofilme após TFD-A via microscopia ótica e espectroscopia no visível com safranina 1%;
- ✓ Potencializar os danos ocasionados pela TFD-A utilizando-se iodeto de potássio;
- ✓ Testar a seletividade das clorinas perante os fibroblastos Balb/3T3 Clone A31;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade da TFD-A para eritrócitos de sangue humano, utilizada aqui como modelo para membranas eucarióticas.

3. METODOLOGIAS

3.1 Procedimentos estatísticos

De modo geral, os ensaios de fotoinativação bacteriana por TFD-A são realizados de forma univariada, isto é, varia-se um dos fatores de cada vez e mantêm-se os demais constantes. No entanto, utilizando-se experimentos multivariados é possível correlacionar os diferentes parâmetros e evidenciar as interações relevantes entre eles. O uso do planejamento experimental permite avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais quando comparados aos processos univariados (AMARAL et al., 2018). Dentre os métodos de planejamento experimental disponíveis na literatura, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, considerando-se que todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável serão investigadas.

3.1.1 Planejamento fatorial completo 2³

Para os ensaios foi escolhido o Planejamento Fatorial Completo 2³, em que **3** é o número de parâmetros (tempo de incubação; concentração do FS e dose de luz) e **2** é o número de níveis, ou seja, dois valores para cada parâmetro mais o ponto central. O planejamento fatorial completo é uma das primeiras etapas a ser realizada para identificar, dentre os parâmetros, o (s) que apresentam maior importância ou efeito sobre a resposta objetivo. Logo, nesse estudo, foi escolhido como níveis para todos os modelos de biofilme e para todos os FSs, tempo de incubação igual a 20 e 40 min (i.é. tempo em que a bactéria permanece em contato com a solução de FS para que ocorra a penetração), concentrações de FS de 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e dose de luz de 15 e 30 J cm^{-2} . Como pontos centrais: tempo de incubação igual a 30 min, concentração de 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e dose de luz de 22 J cm^{-2} . Todos os níveis foram combinados e seus efeitos analisados, bem como suas interações.

3.2 Estruturas e espectros de absorção de CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T

O espectro de absorção ótica foi sempre obtido, quando necessário, e previamente a qualquer experimento por meio de uma varredura UV-Vis de 300-800 nm utilizando-se um espectrofotômetro HITACHI U-2800 com a finalidade de definir a concentração do composto bem como visualizar a estabilidade dos picos de absorção referentes a banda Q e banda de Soret.

3.3 Procedimentos Biológicos

3.3.1 Microrganismos, meios e condições de cultivo na forma planctônica

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (ATCC® 33591™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212™) e *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) foram cultivadas, de forma planctônica, em meio BHI (do inglês: Brain Heart Infusion) puro, suplementado com 6,5% NaCl e meio LB (Luria Bertani) respectivamente, a 37°C por 18 h com agitação orbital a 250 rpm.

3.3.2 Formação dos biofilmes mono e multiespécies

Após cultivo planctônico, foi padronizada a densidade ótica, fazendo-se uso do espectrofotômetro HITACHI U-2800, de cada bactéria para DO_{600} igual a 0,9, em solução salina tamponada com fosfato - PBS (do inglês: Phosphate-Buffered Saline) preparada com NaCl 8,0g/L; KCl 0,2g/L; anidro Na_2HPO_4 1,14 g/L e KH_2PO_4 0,19 g/L. Para formação dos biofilmes, os experimentos se dividiram em dois: ① para monoespécie foi depositado sobre a placa CELLSTAR® de 96 poços 150 μ L de cada cepa, separadas, sendo completado com 150 μ L de meio BHI e ② para multiespécies utilizaram-se 50 μ L de cada cepa, no mesmo poço, completado com 150 μ L de meio BHI. As placas foram incubadas em estufa, de forma estática, por 48 h à 37 °C para formação do biofilme sobre os poços das placas. Os tempos de irradiação foram diferentes de acordo com o comprimento de onda utilizado e a dose de luz. Utilizando-se o LED violeta (403 nm) os tempos de irradiação foram: 486; 712 e 927 segundos para as doses de luz referente à 15, 22 e 30 $J\ cm^{-2}$, respectivamente. Já utilizando-se o LED vermelho (660 nm), para as mesmas doses de luz, os tempos de irradiação foram: 949; 1392 e 1899 segundos.

3.3.3 Inativação fotodinâmica de biofilme mono e multiespécies

Após 48 h os poços foram lavados uma vez com PBS sendo acrescentado a eles 150 μ L da solução de FS, previamente preparada, sendo ele CHL-OH-A, CHL-Ph-A ou CHL-T em concentração pré-estabelecida, assim, os biofilmes foram submetidos aos ensaios fotodinâmicos utilizando-se LED 660 nm (vermelho) com potência 15,8 $mW\ cm^{-2}$ e LED 403 nm (violeta) com potência 30,87 $mW\ cm^{-2}$. O tempo de irradiação foi determinado pela razão entre a dose desejada e a potência do LED. Para vias de comparação, não houve adição de FS nas placas controle, colocando-se no lugar 150 μ L de PBS, sem haver irradiação e posterior quantificação. Todos os experimentos foram realizados com base na matriz experimental do Planejamento Fatorial 2^3 correspondendo a 8 diferentes ensaios com acréscimo de um experimento com pontos centrais dos parâmetros.

3.3.4 Quantificação do índice de sobrevivência por microgotas

O biofilme foi desestruturado vagarosamente e homogeneizado retirando-se, em seguida, uma alíquota de 100 µL de cada poço da placa de 96 poços, (antes e após TFD-A) sendo realizada a diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-8} . Quatro alíquotas de 15 µL foram retiradas de cada diluição e depositadas em placas de ágar BHI sendo incubadas à 37°C por 18 h. Cada placa de ágar BHI foi dividida em quatro quadrantes, sendo cada um deles atribuídos a uma diluição. A quantificação foi realizada contando-se as colônias na diluição em que possuíam de 5 a 50 unidades formadoras de colônia (UFC). A quantidade de sobreviventes presentes na amostra foi determinada pela média do número de colônias, multiplicado pela diluição, sendo obtido o número de UFC por mililitro de solução.

3.3.5 Inativação do biofilme mono e multiespécies com antibiótico

Após cultivo planctônico, foi padronizada a densidade ótica de cada bactéria para DO₆₀₀ igual a 0,9 em PBS. Para formação dos biofilmes, os experimentos se dividiram em dois: ① para monoespécie foi depositado sobre a placa CELLSTAR® de 96 poços 150 µL de cada cepa, separadas, sendo completado com 100 µL de PBS e 50 µL de CIP e ② para multiespécies utilizou-se 50 µL de cada cepa, no mesmo poço, completado com 100 µL de PBS e 50 µL de CIP. Para comparação, não houve adição de antibiótico nas placas controle, colocando-se no lugar 50 µL de PBS. As placas foram incubadas em estufa, de forma estática, por 48 h à 37 °C, sendo então quantificadas.

3.3.6 Meios e condições de cultivo da linhagem Balb/3T3 Clone A31

Balb/3T3 Clone A31 (ATCC® CCL-163™) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro - RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, Cultilab) suplementado com soro fetal bovino a 10% e 0,01% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Para todos os experimentos, a viabilidade celular foi determinada através do método de contagem em câmara de Neubauer fazendo-se uso do teste discriminativo de células mortas e viáveis pela incorporação de um corante seletivo, no caso, o azul de tripano. Quando há perda da viabilidade (dano na membrana celular) o azul de tripano se incorpora na estrutura celular. Assim, 100 µL da suspensão celular foi misturado a 500 µL

de PBS e 400 µL de solução 0,4% de azul de tripano em água. 10 microlitros dessa mistura foi inserida na câmara de Neubauer sendo realizada a contagem celular. Para quantificação das células viáveis, a média aritmética do número de células foi multiplicada por 10^4 (correspondente à câmara de Neubauer) e pelo fator de diluição obtendo-se o número de células por mL de suspensão (FRESHNEY et al., 1994).

3.3.7 Mensuração da atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial é diretamente proporcional à viabilidade e proliferação celular e foi estimada pelo ensaio de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT). Após a irradiação e posterior incubação por 24 h, o meio de cultivo foi cuidadosamente aspirado e as células foram incubadas com 50 µL de MTT (1 mg mL⁻¹ em D-MEM) por 3 h. Após a remoção do MTT, foram adicionados 50 µL de etanol e 150 µL de 1: 1 isopropanol em PBS. Em seguida, a absorção de cada poço nas placas CELLSTAR® de 96 poços foi lida a 560 nm usando o Multiskan GO Thermo Scientific (DENIZOT et al., 1986; CARMICHAEL et al., 1987).

3.3.8 Obtenção dos eritrócitos de sangue humano

Quarenta mL de sangue humano foi obtido através da punção endovenosa do próprio experimentador realizada pelo Laboratório de Análises Clínicas da UNIMED (São Carlos, SP). A amostra foi coletada e conservada em 12 tubos estéreis contendo o anticoagulante EDTA sendo imediatamente encaminhados ao nosso laboratório para posterior análise.

3.4 Procedimentos de caracterização do biofilme e/ou do efeito fotodinâmico

3.4.1 Acumulação das clorinas em biofilme mono e multiespécies

Biofilmes mono e multiespécies foram cultivados em placas CELLSTAR® de 12 poços sendo utilizados 500 µL de cada cepa e, em seguida, foi adicionado 1 mL de caldo BHI, mantendo-as na estufa por 48 h a 37°C de forma estática. No fundo dos poços foram depositadas lamínulas de vidro KASVI® na qual os biofilmes aderiram ao longo das 48 h. Depois, as bactérias não aderentes foram cuidadosamente retiradas e os poços com as lamínulas foram

lavados com PBS. Logo em seguida, 500 μL da solução de FS: CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi adicionada sendo mantida por diferentes tempos de incubação: 10; 20; 30; 40; 50 e 60 min. A lâmina, ao fim de cada tempo de incubação, foi visualizada por microscopia de fluorescência em um microscópio de fluorescência (Olympus BX41) com objetiva de 40X com filtro dicromático de 500 nm, 460-490 nm de excitação e 520 nm de emissão. Por fim, as imagens obtidas foram analisadas com a finalidade de quantificar, através dos pixels, a intensidade. Para isso foi utilizado o software ImageJ®, o qual forneceu dados numéricos da imagem analisada (valor = contagem correspondente à intensidade da fluorescência $\times$ pixels).

3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Objetivando-se avaliar a formação de biofilme multiespécies, a interação entre as espécies, a matriz polimérica, bem como a estrutura após TFD-A, 500 μL de cada cepa foram adicionados em lâminas de poliestireno (1 x 1 cm) dispostas no fundo de placas de 12 poços e em seguida foi adicionado 1 mL de caldo BHI, mantendo-as na estufa por 48 h a 37°C. Ou ainda no lugar do BHI foi colocado 1 mL da solução de FS em concentração previamente definida, sendo irradiado. Em seguida os biofilmes foram lavados com PBS e fixados com 1 mL de glutaraldeído 2,5% por 1 hora. Em seguida, foi feita a desidratação da amostra com álcool etílico em diferentes concentrações: 10, 25, 50, 75, 90 e 100% por 20 min cada. Após a secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram metalizadas com ouro e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura LEO, modelo 440 com magnitude de 60,00 KX.

3.4.3 Microscopia de fluorescência com kit LIVE/DEAD™

Para visualização de danos na membrana das bactérias, o biofilme foi previamente cultivado em lâminas com oito poços (NucTMLab-Tek™ II – Thermo Fischer) à 37° C por 48 h. Para biofilme monoespécie foi acrescentando 200 μL da suspensão de cada bactéria acrescida à 200 μL de meio BHI e para biofilme multiespécies, 66 μL de cada suspensão bacteriana com 200 μL de BHI. Os poços da lâmina foram lavados com PBS e acrescentou-se 200 μL da solução de FS, sendo posteriormente irradiados. Para fins de comparação, foram acrescentados 200 μL de PBS. Posteriormente a cada poço foram acrescentados 100 μL da solução mistura, em igual proporção (i.e., foram preparados 2 mL no total, sendo 6 μL de Syto9

– 3,34 mmol L⁻¹ e 6 µL iodeto de propídio – 20 mmol L⁻¹ completando-se o volume com água destilada estéril) permanecendo em contato por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Decorrido o tempo, o excesso foi retirado com PBS e submetido à visualização em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) com objetiva de 40X com filtro dicromático de 500 nm, 460-490 nm de excitação e 520 nm de emissão.

3.4.4 Microespectroscopia Raman

Para obtenção de um espectro Raman com identificação de picos advindos de componentes estruturais de cada bactéria, o biofilme foi cultivado em lâminas com oito poços à 37° C por 48 h. Para biofilme monoespécie foi acrescentado 200 µL da suspensão de cada bactéria acrescida à 200 µL de meio BHI e para biofilme multiespécies, 66 µL de cada suspensão bacteriana com 200 µL de BHI. Os poços da lâmina foram lavados com PBS e posteriormente, a lâmina foi analisada pelo Microespectrofotômetro CRAIC operando com um laser em 830 nm, tempo de integração de 1500 ms, 20 s para obtenção do espectro e aumento de 20x.

3.4.5 Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier

A análise de FTIR (do inglês: Fourier Transform Infrared Spectroscopy) do biofilme antes e após a TFD-A foi feita após ser cultivado em placas CELLSTAR® de 12 poços. Para isso foi utilizado 500 µL de cada cepa e, em seguida, foi adicionado 1 mL de caldo BHI, mantendo-as na estufa por 48 h a 37 °C de forma estática. Depois, as bactérias não aderentes foram retiradas sendo o biofilme ressuspense em PBS (para amostra controle). Para as amostras após TFD-A, as bactérias aderentes foram retiradas sendo colocado 1 mL da solução de FS em concentração previamente definida sendo, em seguida irradiado. A amostra controle e a irradiada foram ressuspensas e submetidas a análise utilizando-se um Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier, modelo tensor 27 e marca Bruker, presente na Central de Análises Químicas do IQSC/USP. Todos os espectros foram obtidos com resolução de 4 cm⁻¹ com janela de varredura entre 3600-900 cm⁻¹ (YI-HSUAN et al., 2018).

3.4.6 Análise da dispersão do biofilme após TFD-A por microscopia ótica

Safranina apresenta grande potencial para corar polissacarídeos produzidos pelos biofilmes (MARC et al., 2008). Devido a isso, a presença da arquitetura polissacarídica foi utilizada como padrão para análise da dispersão após TFD-A corando-a com safranina 1% (em água destilada). Primeiramente os modelos de biofilme foram cultivados em placas CELLSTAR® de 24 poços. Para isso foram utilizados 150 µL de cada cepa (para biofilme monoespécie) e 50 µL de cada cepa para multiespécies, em seguida, foram utilizados 150 µL de caldo BHI, mantendo-as na estufa por 48 h a 37 °C de forma estática. No fundo dos poços foi colocada uma lamínula de vidro KASVI® na qual as bactérias se depositaram e formaram o biofilme. Em seguida, o meio de cultivo bem como as bactérias não aderentes, foram removidos dos poços, sendo as bactérias lavados por três vezes com PBS e então acrescentados 200 µL do FS, aguardando o TI e posteriormente sendo irradiado utilizando-se as melhores condições dos parâmetros bem como dos fotossensibilizadores para cada modelo de biofilme. A fotoinativação foi realizada utilizando-se ambos os LEDs 403 e 660 nm uma vez que o espectro ótico das clorinas tem bandas tanto na região de 400 como na região de 660 nm. Em seguida o biofilme depositado na lamínula foi corado com safranina 1% em água destilada acrescentando 200 µL da solução e deixando em contato por 10 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a lamínula foi cuidadosamente lavada com água destilada para remoção do excesso e posterior visualização da arquitetura do biofilme por microscopia ótica (Microscópio Olympus BX41) com objetiva de 40X.

3.4.7 Análise da dispersão e biomassa do biofilme após TFD-A por espectroscopia no visível

Para essa análise foram realizados todos os procedimentos citados no item 3.4.6, excetuando-se a presença da lamínula de vidro. Após as amostras serem submetidas a TFD-A, a solução de FS bem como as bactérias não aderentes foram cuidadosamente removidas, sendo acrescentado 200 µL da solução de safranina 1% (em água destilada) deixando em contato por 10 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, os poços da placa foram cuidadosamente lavados com água destilada até completa remoção do excesso da safranina não aderida à estrutura do biofilme. Em seguida foram acrescentados 100 µL de etanol para solubilização e posteriormente foi feita análise quantitativa da biomassa através da medição da

densidade ótica no comprimento de onda de 492 nm com um espectrofotômetro HITACHI U-2800 (MARC et al., 2008).

3.4.8 Prova fenotípica de detecção de virulência para formação de biofilme

O método do ágar vermelho congo foi realizado de acordo com Freeman et al., 1989. Foi utilizado o ágar BHI acrescido de 0.8 g L⁻¹ de Vermelho Congo (C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂ P.M.696,68, 40% – Êxodo científica). O corante vermelho congo foi previamente diluído em água e esterilizado a 121°C por 15 minutos sendo, em seguida, adicionado ao ágar BHI estéril ainda líquido aguardando o resfriamento e endurecimento à temperatura ambiente em fluxo laminar. As cepas bacterianas foram inoculadas na superfície do ágar através de espalhamento e incubadas aerobicamente a 37°C por 48 h de forma estática. As colônias que apresentaram cor preta foram consideradas cepas produtoras de biofilme.

3.4.9 Screening e potencialização da fotoinativação utilizando-se iodeto de potássio

Previamente ao uso do iodeto de potássio (KI) com a finalidade de potencializar a fotoinativação, foi realizado um *screening* das concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µmol L⁻¹ solubilizadas em água destilada com a finalidade de definir a concentração ideal de KI que não causasse danos na viabilidade. Assim, para o cultivo do biofilme monoespécie foram depositados sobre a placa CELLSTAR® de 96 poços 150 µL de cada cepa, separadas, e para multiespécies 50 µL de cada cepa, sendo completado com 150 µL de meio BHI para controle e BHI acrescido de KI sendo realizados cálculos cuidadosos para que no volume final contenha a concentração adequada de KI. As placas foram incubadas em estufa, de forma estática, por 48 h à 37°C para formação dos biofilmes sendo analisada a viabilidade através da quantificação por microgota. Após definir a concentração de KI ideal que não causasse danos isoladamente, essa concentração foi incorporada à solução de FS sendo repetido o processo de fotoinativação nas mesmas condições e utilizando-se ambos os LED's. As condições estudadas foram TI de 20; 30 e 40 min, DL de 15; 22 e 30 J cm⁻² e, por fim, concentração da solução de FS contendo IP de 5; 7,5 e 10 µmol L⁻¹.

3.5 Seletividade do processo fotodinâmico em fibroblasto Balb/3T3 Clone A31

Para os ensaios fotodinâmicos de seletividade, foram incubadas 1×10^5 células por mL⁻¹ de Balb/3T3 Clone A31 em placas CELLSTAR® de 96 poços com D-MEM por 24 h. Após a remoção do meio foram adicionadas 150 µL de solução de FS (CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T) nas mesmas condições da matriz experimental multivariada, ou seja, concentração de 5; 7,5 e 10 µmol L⁻¹. Após os tempos de incubação (20; 30 e 40 minutos), as soluções de FSs foram removidas e posteriormente adicionados 150 µL de D-MEM e, em seguida, as células foram irradiadas nas doses de 15; 22 e 30 J cm⁻² nos comprimentos de onda de 403 e 660 nm. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C com 95% de ar e 5% de CO₂ por 24 h para posterior análise da atividade mitocondrial.

3.6 Fotólise dos eritrócitos

O ensaio de citotoxicidade sobre os eritrócitos é bem simples e permite avaliar o efeito que o FS no escuro, o comprimento de onda e a intensidade luminosa sem o FS e a TFD-A têm sobre a membrana citoplasmática de células eucarióticas. As membranas dos Eritrócitos são consideradas modelos primários para o estudo de membrana citoplasmática de animais (MURADOR, 2007). Essa análise experimental baseou-se na determinação de hemoglobina liberada que está associada a lise celular. Para isso a amostra sanguínea previamente retirada foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos sendo cuidadosamente aspirado o plasma sanguíneo sendo, em seguida, completando com PBS no mesmo volume retirado. O procedimento para completa remoção do plasma foi repetido por três vezes. Por fim, os testes foram realizados utilizando-se placas CELLSTAR® de 24 poços, nas quais foram depositados 450 µL do concentrado de Eritrócitos acrescidos de: **Grupo 1:** 50 µL de PBS para controle; **Grupo 2:** 50 µL de PBS para análise da influência do comprimento de onda (403 e 660 nm) bem como intensidade luminosa (15; 22 e 30 J cm⁻²); **Grupo 3:** 50 µL de solução de FSs (CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T) nas concentrações de 5; 7,5 e 10 µmol L⁻¹ nos tempos de incubação de 20; 30 e 40 min para análise da citotoxicidade dos FSs sem irradiação e, **Grupo 4:** 50 µL dos FSs (CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T) nas concentrações de 5; 7,5 e 10 µmol L⁻¹ com os tempos de incubação de 20; 30 e 40 min e dose de luz de 15; 22 e 30 J cm⁻² utilizando-se ambos os comprimentos de onda de 660 e 403 nm.

Decorrido os processos, as amostras presentes nos poços das placas CELLSTAR® de 24 poços foram aspiradas, adicionadas em um microtubo e submetidas à centrifugação a 2000 rpm

por 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e analisado por um espectrofotômetro HITACHI U-2800 no comprimento de onda de 540 nm, uma das bandas de absorção Q da hemoglobina.

4. RESULTADOS

4.1 Terapia Fotodinâmica utilizando-se CHL-OH-A, CHL-PH-A e CHL-T com LED 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta)

4.1.1 Fotoativação de biofilmes de *E. coli* por TFD-A

Para a fotoativação de biofilme de *E. coli*, foi utilizado o PFC 2³, em que os parâmetros e seus níveis foram: ① tempo de incubação (TI) de 20 e 40 min; ② dose de luz (DL) 15 e 30 J cm⁻² utilizando-se o LED 660 e 403 nm e ③ concentração dos FS (CHL-OH-A; CHL-PH-A e CHL-T), 5 e 10 µmol L⁻¹. Também foram feitos experimentos com pontos centrais sendo eles: TI = 30 min; DL = 22 J cm⁻² e C = 7,5 µmol L⁻¹. A Tabela 1 representa o PFC 2³ com os níveis utilizados e os resultados obtidos.

Tabela 1: Matriz experimental do Planejamento Fatorial Completo 2^3 (com triplicata no ponto central) apresentando os resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *E.coli* utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm e 403 nm. Os melhores resultados obtidos em $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ estão marcados em cinza para cada FS.

Ensaio	TI (min)	DL (J cm ⁻²)	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LED 660 nm (vermelho)			LED 403 nm (violeta)		
				Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-OH-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-Ph-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-T	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-OH-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-Ph-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-T
Controle	-	-	-	9,37 $\pm$ 0,04	9,37 $\pm$ 0,04	9,37 $\pm$ 0,04	9,71 $\pm$ 0,03	9,71 $\pm$ 0,03	9,71 $\pm$ 0,03
1	20	15	5	8,30 $\pm$ 0,06	8,54 $\pm$ 0,03	9,95 $\pm$ 0,12	9,41 $\pm$ 0,05	7,13 $\pm$ 0,07	5,90 $\pm$ 0,11
2	20	15	10	8,18 $\pm$ 0,04	6,76 $\pm$ 0,03	8,43 $\pm$ 0,05	6,15 $\pm$ 0,03	5,65 $\pm$ 0,02	5,42 $\pm$ 0,04
3	20	30	5	6,49 $\pm$ 0,06	8,70 $\pm$ 0,17	8,46 $\pm$ 0,07	5,41 $\pm$ 0,08	6,12 $\pm$ 0,04	4,38 $\pm$ 0,06
4	20	30	10	7,57 $\pm$ 0,03	7,28 $\pm$ 0,09	7,63 $\pm$ 0,06	6,25 $\pm$ 0,09	5,35 $\pm$ 0,04	4,11 $\pm$ 0,02
5	40	15	5	6,57 $\pm$ 0,04	6,04 $\pm$ 0,08	7,00 $\pm$ 0,13	5,38 $\pm$ 0,06	4,56 $\pm$ 0,04	3,83 $\pm$ 0,09
6	40	15	10	5,76 $\pm$ 0,03	5,95 $\pm$ 0,07	6,00 $\pm$ 0,13	4,25 $\pm$ 0,05	4,04 $\pm$ 0,06	4,40 $\pm$ 0,05
7	40	30	5	6,11 $\pm$ 0,12	6,36 $\pm$ 0,05	8,11 $\pm$ 0,10	4,37 $\pm$ 0,04	4,37 $\pm$ 0,03	4,50 $\pm$ 0,05
8	40	30	10	6,15 $\pm$ 0,14	5,70 $\pm$ 0,12	7,68 $\pm$ 0,04	3,65 $\pm$ 0,03	4,58 $\pm$ 0,02	3,71 $\pm$ 0,04
9	30	22	7,5	7,08 $\pm$ 0,07	6,90 $\pm$ 0,08	7,95 $\pm$ 0,15	6,09 $\pm$ 0,08	5,83 $\pm$ 0,02	4,50 $\pm$ 0,03
10	30	22	7,5	6,90 $\pm$ 0,13	7,00 $\pm$ 0,18	8,01 $\pm$ 0,10	6,04 $\pm$ 0,05	5,85 $\pm$ 0,03	4,55 $\pm$ 0,04
11	30	22	7,5	6,90 $\pm$ 0,08	6,80 $\pm$ 0,11	7,80 $\pm$ 0,13	6,18 $\pm$ 0,04	5,84 $\pm$ 0,05	4,31 $\pm$ 0,10

* TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm⁻²) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$). DP = desvio-padrão.

Utilizando-se todas as clorinas: CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T foi observado (Tabela 2) que os maiores índices de fotoinativação foram obtidos quando houve irradiação com o comprimento de onda de 403 nm, correspondendo ao LED violeta. Analisando-se o DP do $\Delta \log_{10}$ UFC mL⁻¹ foi possível se observar que tanto a CHL-OH-A quanto a CHL-T apresentaram igualdade estatística quando irradiadas à 403 nm nas mesmas condições/parâmetros. Portanto o grau de fototoxicidade das clorinas perante o biofilme de *E. coli* utilizando-se o LED violeta é: **CHL-OH-A (62%) = CHL-T (62%) > CHL-Ph-A (58%** de fotoinativação). A sequência referente ao grau de fototoxicidade das clorinas não se alteram caso sejam utilizadas as mesmas condições dos parâmetros para as três clorinas (i.e., TI = 40 min; DL = 30 J cm⁻² e C = 10 µmol L⁻¹), com a finalidade de comparação (Tabela 1).

Tabela 2: Comparação dos melhores resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *E.coli* utilizando-se CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta). % = porcentagem de fotoinativação.

Comprimento de onda (nm)	CLORINAS					
	CHL-OH-A		CHL-Ph-A		CHL-T	
	Log UFC L ⁻¹	%	Log UFC mL ⁻¹	%	Log UFC mL ⁻¹	%
660	5,76 ± 0,03	38,5	5,70 ± 0,12	39,0	6,00 ± 0,13	36,0
403	3,65 ± 0,03	62,0	4,04 ± 0,06	58,0	3,71 ± 0,04	62,0

Por outro lado, utilizando-se o LED vermelho, foi possível se observar que a sequência do grau de fototoxicidade das clorinas se altera caso seja necessária a comparação com as mesmas condições dos níveis dos parâmetros (ensaio 6 da Tabela 1). Sem igualar os níveis dos parâmetros (i.e., TI = 40 min; DL = 15 J cm⁻² e C = 10 µmol L⁻¹ utilizando-se CHL-OH-A e CHL-T e as mesmas condições para CHL-Ph-A excetuando-se a DL sendo igual a 30 J cm⁻²) foi observado que a clorina CHL-Ph-A foi mais invasiva (39% de inativação). Porém CHL-Ph-A demandou o dobro de energia (30 J cm⁻²) em relação às demais clorinas. Então o grau de fototoxicidade das clorinas foi igual a: CHL-Ph-A (39%) > CHL-OH-A (38,5%) > CHL-T (36% de inativação). No entanto se levar em consideração a igualdade dos níveis dos parâmetros (ensaio 6 da tabela 1) para a finalidade de comparação, a sequência do grau de fototoxicidade das clorinas se altera. CHL-Ph-A e CHL-T passam a apresentar igualdade estatística de acordo com o DP e a CHL-OH-A se torna a mais invasiva ao biofilme de *E.coli*, então **CHL-OH-A (38,5%) > CHL-Ph-A (36,5%) = CHL-T (36% de inativação)**.

Sobre os efeitos de cada parâmetro bem como a interação entre eles (obtidos pelo programa Statistica® 13) utilizando-se **CHL-OH-A irradiada em 660 nm** (Fig. 4A), pode-se notar que quando há aumento do TI de 20 para 40 min e DL de 15 para 30 J cm⁻², em média, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de $1,48 \pm 0,07$ e $0,62 \pm 0,07$ respectivamente. Em contrapartida quando há aumento da concentração de 5 para 10 µmol L⁻¹ de CHL-OH-A o índice de sobrevivência em log UFC mL⁻¹ aumenta $0,04 \pm 0,07$. A insignificância estatística da concentração é verificada pelo fato do erro ser maior que o efeito. A interação TI*DL e DL*C possibilita um aumento de $0,58 \pm 0,07$ e $0,51 \pm 0,07$ log UFC mL⁻¹ enquanto que a interação TI*C permite a diminuição de $0,43 \pm 0,07$ log UFC mL⁻¹. Assim, pode-se concluir que TI é o parâmetro mais importante seguido pela DL para a fotoinativação de biofilme de *E. coli* utilizando a CHL-OH-A.

Quanto aos efeitos dos parâmetros utilizando-se **CHL-OH-A irradiada em 403 nm** (Fig. 4D), foi possível se observar que todos os parâmetros individuais, exceto o TI, bem como as combinações foram estatisticamente insignificantes.

Para a **CHL-Ph-A irradiada em 660 nm** (Fig. 4B), quando há aumento do tempo de incubação de 20 para 40 min e concentração de 5 para 10 µmol L⁻¹, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de $1,80 \pm 0,13$ e $0,98 \pm 0,13$ respectivamente. A interação TI*C permite o aumento de $0,61 \pm 0,13$ log UFC mL⁻¹. O TI é o parâmetro mais importante seguido pela C para fotoinativação do biofilme de *E. coli* utilizando CHL-PH-A. Os demais parâmetros: individual (C) e combinação (TI*DL/DL*C) são estatisticamente insignificantes. Analisando-se a **CHL-Ph-A irradiada em 403 nm** (Fig. 4E), apenas o TI foi significativo possibilitando o decaimento do índice de sobrevivência de $1,67 \pm 0,31$ log UFC mL⁻¹. Todos os outros parâmetros, bem como a interação entre eles, foram insignificantes.

Figura 4 - Diagrama de Pareto dos efeitos em função do teste t permitindo a visualização da significância dos parâmetros para cada FS: (A e D) CHL-OH-A; (B e E) para CHL-Ph-A e (C e F) para CHL-T. Utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm (A, B e C) e 403 nm (D, E e F). DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.

Fonte: Autoria própria (2019).

Já para a **CHL-T irradiada em 660 nm** (Fig. 4C), sobre os efeitos dos parâmetros bem como suas interações, foi possível observar que quando há aumento do tempo de incubação de 20 para 40 min e concentração de 5 para 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL^{-1} de $1,42 \pm 0,06$ e $0,94 \pm 0,06$ respectivamente, em contrapartida quando há aumento da dose de luz de 15 para 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ o índice de sobrevivência em log UFC mL^{-1} aumenta $0,13 \pm 0,06$ a insignificância estatística da dose de luz é verificada pelo fato do erro ser maior que o efeito e o *p-value* ser maior que 0,05. A interação TI*DL, DL*C e TI*C possibilita um aumento de $1,27 \pm 0,06$, $0,31 \pm 0,06$ e $0,23 \pm 0,06$ log UFC mL^{-1} . O TI é o parâmetro mais importante seguido pela C para fotoinativação do biofilme de *E. coli* utilizando CHL-T.

CHL-T irradiada em 403 nm (Fig. 4F) apresentou significância estatística nos parâmetros: TI e DL bem como a interação entre eles. Quando houve aumento do TI de 20 para 40 min e de DL de 15 para 30 J cm^{-2} , houve decaimento do índice de sobrevivência de *E. coli* de $0,84 \pm 0,19$ e $0,71 \pm 0,19$ log UFC mL^{-1} , respectivamente. A interação TI*DL, também possibilitou a diminuição dos valores de *E.coli* sobreviventes, sendo reportado o decaimento em log UFC mL^{-1} de $0,70 \pm 0,19$. O TI é o parâmetro mais significativo, seguido pela DL e pela interação TI*DL.

Os gráficos de superfície (3D) obtidos pela interação de Log UFC mL^{-1} x (TI x DL / TI x C / DL x C) estão representados na Fig. 5(A-R) no qual a cor verde significa menores valores de índice de sobrevivência (Log UFC mL^{-1}) e a cor vermelha, os maiores. Foram construídos três gráficos para cada FS em cada comprimento de onda, podendo-se visualizar os efeitos dos parâmetros para o índice de sobrevivência de *E.coli* em biofilme.

Figura 5 - Gráfico de superfície de resposta (3D) da fotoinativação de biofilme de *E.coli* utilizando-se: **A-C**: CHL-OH-A + 660 nm; **D-F**: CHL-Ph-A + 660 nm e **G-I**: CHL-T + 660 nm; **J-L**: CHL-OH-A + 403 nm; **M-O**: CHL-Ph-A + 403 nm e **P-R**: CHL-T + 403 nm. Sendo **A, D, G, J, M e P**: Log UFC x TI x DL; **B, E, H, K, O e Q**: Log UFC x TI x C e, por fim, **C, F, I, L, P e R**: Log UFC x DL x C.

CHL-OH-A
+
660 nm

CHL-Ph-A
+
660 nm

Fonte: autoria própria (2019).

CHL-T
+
660 nm

CHL-OH-A
+
403 nm

Fonte: autoria própria (2019).

CHL-Ph-A
+
403 nm

CHL-T
+
403 nm

Fonte: autoria própria (2019).

4.1.2 Fotoinativação de biofilme de *E. faecalis* por TFD-A

Para a fotoinativação de biofilme de *E. faecalis*, também foi utilizado o PFC 2³, em que os parâmetros e seus níveis foram: ① tempo de incubação (TI) de 20 e 40 min; ② dose de luz (DL) de 15 e 30 J cm⁻² utilizando o LED 660 e 403 nm e ③ concentração dos FS (CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T), de 5 e 10 µmol L⁻¹. Também foram feitos experimentos com pontos centrais sendo eles: 30 min de TI; DL de 22 J cm⁻² e C de 7,5 µmol L⁻¹.

A fotoinativação do biofilme de *E. faecalis* estão apresentados na Tabela 3, com bastante variação de acordo com o FS utilizado bem como a fonte luminosa. Assim como ocorreu no biofilme de *E. coli*, para *E. faecalis* todas as clorinas foram mais invasivas quando irradiadas com o LED 403 nm. **CHL-OH-A irradiado a 403 nm** apresentou um índice de fotoinativação correspondendo à **92%**, sendo observado na Tabela 4 as porcentagens de inativação equivalentes ao decaimento em Log UFC mL⁻¹. Para a **CHL-Ph-A** a inativação foi de **88%** e para **CHL-T** foi de **86%** possibilitando uma fototoxicidade de **CHL-OH-A > CHL-Ph-A > CHL-T**.

Como observado na Tabela 3 para as clorinas CHL-Ph-A e CHL-T, quando irradiadas com 403 nm, houveram dois pontos experimentais que foram considerados estatisticamente iguais de acordo com o DP (demarcados em cinza) porém foram escolhidos como melhores os que apresentaram a concentração menor, equivalente a 5 µmol L⁻¹.

Analisando o potencial fototóxico das clorinas utilizando o LED 660 nm, foi observado que a **CHL-OH-A** possibilitou o máximo decaimento do índice de sobrevivência de $2,00 \pm 0,05$ log UFC mL⁻¹ com 40 min de TI, DL de 30 J cm⁻² e C de 10 µmol L⁻¹ o equivalente à aproximadamente **79%** de inativação enquanto que a **CHL-Ph-A** **45%** e a **CHL-T** **54%**. Portanto a sequência da citotoxicidade das clorinas para o biofilme de *E. faecalis* é **CHL-OH-A > CHL-T > CHL-Ph-A**, utilizando o LED 660 nm.

Tabela 3: Matriz experimental do Planejamento Fatorial Completo 23 (com triplicata no ponto central) apresentando os resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *E. faecalis* utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm e 403 nm. Os melhores resultados obtidos em $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ estão marcados em cinza para cada FS.

Ensaio	LED 660 nm (vermelho)						LED 403 nm (violeta)			
	TI	DL	C	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
	(min)	(J cm ⁻²)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	log UFC mL ⁻¹ CHL-OH-A	log UFC mL ⁻¹ CHL-Ph-A	log UFC mL ⁻¹ CHL-T	log UFC mL ⁻¹ CHL-OH-A	log UFC mL ⁻¹ CHL-Ph-A	log UFC mL ⁻¹ CHL-T	log UFC mL ⁻¹ CHL-T
Controle	-	-	-	9,38 $\pm$ 0,07	9,38 $\pm$ 0,07	9,38 $\pm$ 0,07	9,71 $\pm$ 0,03	9,71 $\pm$ 0,03	9,71 $\pm$ 0,03	9,71 $\pm$ 0,03
1	20	15	5	8,11 $\pm$ 0,08	8,20 $\pm$ 0,09	8,11 $\pm$ 0,16	5,55 $\pm$ 0,06	6,15 $\pm$ 0,05	5,22 $\pm$ 0,06	5,22 $\pm$ 0,06
2	20	15	10	6,95 $\pm$ 0,16	7,28 $\pm$ 0,08	5,28 $\pm$ 0,06	5,39 $\pm$ 0,13	5,50 $\pm$ 0,06	5,21 $\pm$ 0,05	5,21 $\pm$ 0,05
3	20	30	5	7,85 $\pm$ 0,17	7,70 $\pm$ 0,16	7,95 $\pm$ 0,20	4,09 $\pm$ 0,15	4,87 $\pm$ 0,06	4,07 $\pm$ 0,02	4,07 $\pm$ 0,02
4	20	30	10	7,23 $\pm$ 0,07	7,60 $\pm$ 0,07	6,78 $\pm$ 0,14	4,41 $\pm$ 0,11	5,59 $\pm$ 0,04	3,94 $\pm$ 0,03	3,94 $\pm$ 0,03
5	40	15	5	7,28 $\pm$ 0,10	7,11 $\pm$ 0,16	5,40 $\pm$ 0,08	3,24 $\pm$ 0,07	4,34 $\pm$ 0,08	4,32 $\pm$ 0,06	4,32 $\pm$ 0,06
6	40	15	10	5,08 $\pm$ 0,09	5,18 $\pm$ 0,08	4,85 $\pm$ 0,13	2,25 $\pm$ 0,10	3,23 $\pm$ 0,07	2,96 $\pm$ 0,09	2,96 $\pm$ 0,09
7	40	30	5	4,28 $\pm$ 0,07	6,18 $\pm$ 0,04	4,32 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,07	1,35 $\pm$ 0,02	1,35 $\pm$ 0,02
8	40	30	10	2,00 $\pm$ 0,05	5,26 $\pm$ 0,08	5,52 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,05	1,19 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 0,04	1,39 $\pm$ 0,04
9	30	22	7,5	6,00 $\pm$ 0,09	6,70 $\pm$ 0,15	6,05 $\pm$ 0,05	2,49 $\pm$ 0,04	4,92 $\pm$ 0,05	4,93 $\pm$ 0,03	4,93 $\pm$ 0,03
10	30	22	7,5	5,92 $\pm$ 0,14	6,87 $\pm$ 0,06	6,00 $\pm$ 0,10	2,54 $\pm$ 0,03	5,04 $\pm$ 0,03	4,90 $\pm$ 0,05	4,90 $\pm$ 0,05
11	30	22	7,5	5,97 $\pm$ 0,15	7,10 $\pm$ 0,24	6,00 $\pm$ 0,09	2,48 $\pm$ 0,05	4,95 $\pm$ 0,04	4,85 $\pm$ 0,05	4,85 $\pm$ 0,05

* TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm⁻²) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$). DP = desvio-padrão.

Tabela 4: Comparação dos melhores resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *E. faecalis* utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta). % = porcentagem de fotoinativação.

Comprimento de onda (nm)	CLORINAS					
	CHL-OH-A		CHL-Ph-A		CHL-T	
	Log UFC L ⁻¹	%	Log UFC mL ⁻¹	%	Log UFC mL ⁻¹	%
660	2,00 ± 0,05	79,0	5,18 ± 0,08	45,0	4,32 ± 0,05	54,0
403	0,74 ± 0,05	92,0	1,13 ± 0,07	88,0	1,35 ± 0,02	86,0

Através da Figura 6 pode-se analisar com mais clareza a significância dos parâmetros para cada FS. Para a **CHL-OH-A + 660 nm** (Fig. 6A), nota-se que os parâmetros: TI, DL e C, bem como a interação do TI*DL e TI*C apresentam significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam um *p-value* < 0,05. Quanto aos efeitos dos parâmetros e das interações entre ele foi observado que quando há aumento do TI de 20 para 40 min, DL de 15 para 30 J cm⁻² e C de 5 para 10 µmol L⁻¹ de CHL-OH-A, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de 2,88 ± 0,12, 1,51 ± 0,12 e 1,56 ± 0,12 respectivamente. A interação TI*DL e TI*C possibilita um decaimento de 1,52 ± 0,12 e 0,67 ± 0,12 log UFC mL⁻¹ enquanto que a interação DL*C permite o aumento de 0,12 ± 0,12 log UFC mL⁻¹ demonstrando insignificância estatística. O TI é o parâmetro mais importante seguido pela DL e por fim pela C para a fotoinativação do biofilme de *E. faecalis* utilizando CHL-OH-A. Para **CHL-OH-A + 403 nm** (Fig. 6D) os únicos parâmetros significativos foram o TI e a DL. Quando há aumento do tempo de incubação de 20 para 40 minutos e de DL de 15 para 30 J cm⁻² há uma diminuição da sobrevivência de *E. faecalis* de 2,98 ± 0,47 e 1,44 ± 0,47 log UFC mL⁻¹. Os demais parâmetros bem como as interações foram estatisticamente insignificantes, sendo o TI o parâmetro mais importante seguido pela DL.

Para a **CHL-Ph-A + 660 nm** (Fig. 6B) os parâmetros: TI e C bem como a interação entre TI*C e DL*C apresentam significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam *p-value* < 0,05. Quando há aumento do TI de 20 para 40 min e C de 5 para 10 µmol L⁻¹, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de 1,76 ± 0,11 e 0,97 ± 0,11. A interação TI*C e DL*C possibilita uma diminuição de 0,45 ± 0,11 e decréscimo de 0,46 ± 0,11 log UFC mL⁻¹. Por outro lado, a DL e a interação TI*DL apresentam uma diminuição de 0,26 ± 0,11 e 0,17 ± 0,11 (*p-value* = 0,196308) em log UFC mL⁻¹, respectivamente, demonstrando insignificância estatística. O TI é o

parâmetro mais importante seguido pela C, para fotoinativação de biofilme de *E. faecalis* utilizando CHL-Ph-A. Para **CHL-Ph-A + 403 nm** (Fig. 6E) apenas os parâmetros TI e DL foram estatisticamente significativos. Quando há aumento do tempo de incubação, há diminuição do log UFC mL⁻¹ $3,05 \pm 0,48$ e de $1,64 \pm 0,48$ quando há aumento da DL. O TI é o parâmetro mais importante seguido da DL.

Já para a **CHL-T 660 nm** (Fig. 6C) a significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam *p-value* < 0,05, é observada nos parâmetros: TI, DL e C bem como todas as interações. Quando se aumenta o TI de 20 para 40 min e C de 5 para 10 µmol L⁻¹, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de $2,01 \pm 0,02$ e $0,84 \pm 0,02$ em contrapartida, quando há aumento da DL de 15 para 30 µmol L⁻¹ o índice de sobrevivência em log UFC mL⁻¹ diminui $0,23 \pm 0,02$. A interação TI*DL permite um decréscimo de $0,43 \pm 0,02$ log UFC mL⁻¹ enquanto que as interações TI*C e DL*C permitem um aumento de $1,16 \pm 0,02$ e $0,85 \pm 0,02$ log UFC mL⁻¹. O TI é o parâmetro mais importante seguido pela C e, por fim, a DL para a fotoinativação do biofilme de *E. faecalis* utilizando CHL-T. Como pode ser observado pela Fig. 5F, **CHL-T + 403 nm** (Fig. 6F) apresentou, como parâmetro significativo apenas o TI, propiciando uma diminuição em log UFC mL⁻¹ de $2,01 \pm 0,69$.

Figura 6 - Diagrama de Pareto dos efeitos em função do teste t permitindo a visualização da significância dos parâmetros para cada FS: (A e D) CHL-OH-A; (B e E) para CHL-Ph-A e (C e F) para CHL-T. Utilizando o comprimento de onda de 660 nm (A, B e C) e 403 nm (D, E e F). DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.

A fim de analisar os níveis dos parâmetros com o índice de sobrevivência de *E. faecalis* (Log UFC mL⁻¹), os gráficos de superfície (3D) obtidos pela interação de Log UFC (TI × DL / TI × C / DL × C) estão representados na Fig. 7(A-R). A cor verde significa menores valores de índice de sobrevivência (Log UFC), quanto mais intenso, menor é Log UFC e a cor vermelha, os maiores. São três gráficos para cada FS em cada comprimento de onda (660 ou 403 nm), podendo-se visualizar os efeitos dos parâmetros para o índice de sobrevivência de *E. faecalis* em biofilme.

Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta (3D) da fotoinativação de biofilme de *E. faecalis* utilizando: **A-C**: CHL-OH-A + 660 nm; **D-F**: CHL-Ph-A + 660 nm e **G-I**: CHL-T + 660 nm; **J-L**: CHL-OH-A + 403 nm; **M-O**: CHL-Ph-A + 403 nm e **P-R**: CHL-T + 403 nm. Sendo **A, D, G, J, M e P**: Log UFC $\times$ TI $\times$ DL; **B, E, H, K, O e Q**: Log UFC $\times$ TI $\times$ C e, por fim, **C, F, I, L, P e R**: Log UFC $\times$ DL $\times$ C.

CHL-OH-A
+
660 nm

CHL-Ph-A
+
660 nm

Fonte: autoria própria (2019).

CHL-T
+
660 nm

CHL-OH-A
+
403 nm

Fonte: autoria própria (2019).

CHL-Ph-A
+
403 nm

CHL-T
+
403 nm

Fonte: autoria própria (2019).

4.1.3 Fotoinativação de biofilme de *S. aureus* resistente à metilicina por TFD-A

Os resultados obtidos da fotoinativação do biofilme de *S. aureus* (MRSA) bem como os percentuais de inativação bacteriana estão dispostos na Tabela 5 e 6 respectivamente. Utilizando **CHL-OH-A** irradiada com o comprimento de onda de 660 nm nota-se que o máximo decaimento do índice de sobrevivência foi $4,53 \pm 0,03 \log \text{UFC mL}^{-1}$ com 40 min de tempo de incubação, dose de luz de 30 J cm^{-2} e concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ o equivalente à **53%** de inativação. Com os mesmos parâmetros da CHL-OH-A, a **CHL-T** apresentou o máximo decaimento do índice de sobrevivência de $4,62 \pm 0,02 \log \text{UFC mL}^{-1}$ o equivalente à **52%** de inativação.

Com a clorina **CHL-Ph-A** o máximo decaimento do índice de sobrevivência obtido foi de $4,52 \pm 0,03 \log \text{UFC mL}^{-1}$ com 40 min de tempo de incubação, dose de luz de 30 J cm^{-2} e concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ o equivalente à **53%** de inativação.

Nota-se que para a inativação de biofilme de *S. aureus* utilizando CHL-Ph-A foi necessária uma concentração menor de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ comparando com CHL-OH-A e CHL-T para obter resultados semelhantes. Observa-se também que os decaimentos obtidos com CHL-OH-A e CHL-Ph-A podem ser considerados iguais estatisticamente devido ao DP. Porém a CHL-Ph-A apresenta a vantagem de se utilizar uma concentração mais baixa. Então a ordem de fototoxicidade das clorinas, quando irradiadas com o LED vermelho, para biofilme de *S. aureus* é **CHL-Ph-A > CHL- OH-A > CHL-T**.

Assim como observado nos modelos de biofilmes monoespécie constituídos de *E. coli* e *E. faecalis*, para MRSA não foi diferente. Os melhores resultados obtidos foram quando todas as clorinas foram irradiadas com o comprimento de onda de 403 nm. Esse fato é explicado pelo fato da banda de Soret nesse comprimento de onda possuir um coeficiente de absorção molar muito maior do que as bandas Q, fazendo com que as clorinas absorvam muito mais a luz irradiada e com isso produzam mais espécies reativas que vão matar os microrganismos (Fig. 8). A **CHL-Ph-A** apresentou o maior potencial fototóxico, levando à **89,6%** de morte bacteriana, utilizando os parâmetros do ensaio 8 disposto na Tabela 5. Nas mesmas condições a **CHL-T** possibilitou **81%** de inativação com o decaimento máximo de $1,85 \pm 0,03 \log \text{UFC mL}^{-1}$. A clorina **CHL-OH-A** apresentou dois resultados considerados estatisticamente iguais (parâmetros experimentais dispostos na Tabela 5) possibilitando 79% de inativação (Tabela 6).

Portanto o grau de fototoxicidade das clorinas utilizando o comprimento de onda de 403 nm é **CHL-Ph-A > CHL-T > CHL-OH-A**.

Figura 8 - Espectros de absorção UV-Vis das clorinas CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T possibilitando observar os picos que absorvem os comprimentos de onda utilizados para TFD-A (660 e 403 nm).

Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 5: Matriz experimental do Planejamento Fatorial Completo 23 (com triplicata no ponto central) apresentando os resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *S. aureus* resistente à metilina utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm e 403 nm. Os melhores resultados obtidos em $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ estão marcados em cinza para cada FS.

Ensaio	TI (min)	DL (J cm ⁻²)	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LED 660 nm (vermelho)			LED 403 nm (violeta)		
				Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-OH-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-PH-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-T	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-OH-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-Ph-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-T
Controle	-	-	-	9,65 $\pm$ 0,03	9,65 $\pm$ 0,03	9,65 $\pm$ 0,03	9,82 $\pm$ 0,03	9,82 $\pm$ 0,03	9,82 $\pm$ 0,03
1	20	15	5	7,70 $\pm$ 0,18	7,78 $\pm$ 0,11	8,48 $\pm$ 0,05	5,34 $\pm$ 0,04	5,82 $\pm$ 0,10	5,51 $\pm$ 0,04
2	20	15	10	7,04 $\pm$ 0,10	7,36 $\pm$ 0,14	7,80 $\pm$ 0,03	5,49 $\pm$ 0,04	5,21 $\pm$ 0,12	5,81 $\pm$ 0,03
3	20	30	5	7,23 $\pm$ 0,09	7,46 $\pm$ 0,06	7,43 $\pm$ 0,05	5,77 $\pm$ 0,03	5,39 $\pm$ 0,06	5,40 $\pm$ 0,04
4	20	30	10	6,95 $\pm$ 0,16	7,40 $\pm$ 0,04	6,11 $\pm$ 0,04	6,20 $\pm$ 0,15	5,40 $\pm$ 0,04	4,13 $\pm$ 0,04
5	40	15	5	7,51 $\pm$ 0,04	6,11 $\pm$ 0,16	7,15 $\pm$ 0,06	4,32 $\pm$ 0,06	3,94 $\pm$ 0,11	4,20 $\pm$ 0,05
6	40	15	10	6,11 $\pm$ 0,11	5,90 $\pm$ 0,12	5,28 $\pm$ 0,05	4,23 $\pm$ 0,07	3,95 $\pm$ 0,10	4,29 $\pm$ 0,06
7	40	30	5	5,59 $\pm$ 0,04	4,52 $\pm$ 0,03	6,85 $\pm$ 0,07	2,02 $\pm$ 0,03	1,78 $\pm$ 0,06	2,85 $\pm$ 0,04
8	40	30	10	4,53 $\pm$ 0,03	5,20 $\pm$ 0,02	4,60 $\pm$ 0,02	1,99 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,07	1,85 $\pm$ 0,03
9	30	22	7,5	6,63 $\pm$ 0,02	6,48 $\pm$ 0,05	6,70 $\pm$ 0,11	5,63 $\pm$ 0,07	5,85 $\pm$ 0,03	4,85 $\pm$ 0,11
10	30	22	7,5	6,62 $\pm$ 0,14	6,48 $\pm$ 0,06	6,70 $\pm$ 0,09	5,64 $\pm$ 0,04	5,90 $\pm$ 0,05	4,85 $\pm$ 0,09
11	30	22	7,5	6,63 $\pm$ 0,05	6,49 $\pm$ 0,04	6,74 $\pm$ 0,06	5,48 $\pm$ 0,07	5,70 $\pm$ 0,05	4,70 $\pm$ 0,05

* TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm⁻²) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$). DP = desvio-padrão.

Tabela 6: Comparação dos melhores resultados obtidos na fotoinativação do biofilme de *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta). % = porcentagem de fotoinativação.

Comprimento de onda (nm)	CLORINAS					
	CHL-OH-A		CHL-Ph-A		CHL-T	
	Log UFC L ⁻¹	%	Log UFC mL ⁻¹	%	Log UFC mL ⁻¹	%
660	4,53 ± 0,03	53,0	4,52 ± 0,03	53,0	4,60 ± 0,02	52,0
403	2,02 ± 0,03	79,0	1,02 ± 0,07	89,6	1,85 ± 0,03	81,0

Através das Figura 8 pode-se analisar com mais clareza a significância dos parâmetros para cada FS. Para a **CHL-OH-A** utilizando o LED 660 nm (Fig. 9A), nota-se que os parâmetros: TI, DL e C, bem como todas as interações apresentam significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam *p-value* < 0,05.

Quando há aumento do TI de 20 para 40 min, DL de 15 para 30 J cm⁻² e C de 5 para 10 µmol L⁻¹ de CHL-OH-A, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de 1,29 ± 0,01, 1,01 ± 0,01 e 0,84 ± 0,01 respectivamente. A interação TI*DL e TI*C possibilita um decaimento de 0,73 ± 0,01 e 0,38 ± 0,01 log UFC mL⁻¹ enquanto que a interação DL*C permite o aumento de 0,18 ± 0,01 log UFC mL⁻¹. O TI é o parâmetro mais importante seguido pela DL e por fim pela C, para a fotoinativação de *S. aureus* resistente à metilicina utilizando CHL-OH-A.

Para a **CHL-Ph-A irradiada a 660 nm** (Fig. 9B) é possível notar que os parâmetros: TI, DL e C bem como a interação entre TI*DL apresentam significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam *p-value* < 0,05.

Quando há aumento do TI de 20 para 40 min, DL de 15 para 30 µmol L⁻¹ e C de 5 para 10 µmol L⁻¹, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de 2,06 ± 0,10, 0,64 ± 0,10 e 0,34 ± 0,10 respectivamente. A interação TI*DL possibilita uma diminuição de 0,50 ± 0,10. O TI é o parâmetro mais importante seguido pela DL e por fim pela C, para a fotoinativação de *S. aureus* resistente à metilicina utilizando CHL-PH-A.

Já para a **CHL-T** (Fig. 9C) é possível notar que os parâmetros: TI, DL e C bem como todas as interações apresentam significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam *p-value* < 0,05.

Quando há aumento do TI de 20 para 40 min, DL de 15 para 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e C de 5 para 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL^{-1} de $1,48 \pm 0,04$, $0,92 \pm 0,04$ e $1,52 \pm 0,04$. A interação TI*DL permite um aumento de $0,43 \pm 0,04$ log UFC mL^{-1} (*p-value* = 0,000398) enquanto que as interações TI*C e DL*C permitem um decréscimo de $0,53 \pm 0,04$ e $0,25 \pm 0,04$ log UFC mL^{-1} . A concentração é o parâmetro mais importante seguido pelo TI e por fim pela DL para a fotoinativação de *S. aureus* resistente à metilicina utilizando CHL-T.

Analisando-se os efeitos dos parâmetros de todas as clorinas porém utilizando o LED 403 nm foi possível observar que apenas o TI foi significativo para a fotoinativação de biofilme de MRSA utilizando a clorina **CHL-OH-A** e **CHL-Ph-A** (Fig. 9D e E). Alterando o nível do TI foi possível obter $2,56 \pm 0,59$ log UFC mL^{-1} de decaimento da sobrevivência de MRSA em biofilme com *p-value* = 0,012581 para CHL-OH-O e para CHL-Ph-A $2,78 \pm 0,91$ log UFC mL^{-1} . Por outro lado, utilizando a clorina **CHL-T** (Fig. 9F), tanto o TI quando a DL foram estatisticamente significativos. Aumentando o nível de ambos os parâmetros foi possível obter uma diminuição de log UFC mL^{-1} de $1,91 \pm 0,27$ e $1,41 \pm 0,27$ para TI e DL, respectivamente. O tempo de incubação foi o parâmetro mais importante seguido da dose da luz.

Figura 9 - (A) Diagrama de Pareto dos efeitos em função do teste t permitindo a visualização da significância dos parâmetros para cada FS: (A e D) CHL-OH-A; (B e E) para CHL-Ph-A e (C e F) para CHL-T. Utilizando o comprimento de onda de 660 nm (A, B e C) e 403 nm (D, E e F). DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.

Fonte: Autoria própria (2019).

Os gráficos de superfície (3D) obtidos pela interação de $\text{Log UFC} \times (\text{TI} \times \text{DL} / \text{TI} \times \text{C} / \text{DL} \times \text{C})$, foram feitos com a finalidade de analisar os níveis dos parâmetros com o índice de sobrevivência de *S. aureus* (Log UFC), todos estão representados na Fig. 10(A-R). A cor verde significa menores valores de índice de sobrevivência (Log UFC), quanto mais intenso, menor é Log UFC e a cor vermelha, os maiores. São três gráficos para cada FS e comprimento de onda (660 ou 403 nm), podendo-se visualizar os efeitos dos parâmetros para o índice de sobrevivência de *S. aureus* em biofilme.

Figura 10 - Gráfico de superfície de resposta (3D) da fotoinativação de biofilme de MRSA utilizando-se: **A-C**: CHL-OH-A + 660 nm; **D-F**: CHL-Ph-A + 660 nm e **G-I**: CHL-T + 660 nm; **J-L**: CHL-OH-A + 403 nm; **M-O**: CHL-Ph-A + 403 nm e **P-R**: CHL-T + 403 nm. Sendo **A, D, G, J, M e P**: Log UFC x TI x DL; **B, E, H, K, O e Q**: Log UFC x TI x C e, por fim, **C, F, I, L, P e R**: Log UFC x DL x C.

CHL-OH-A
+
660 nm

CHL-Ph-A
+
660 nm

Fonte: Autoria própria (2019).

CHL-T
+
660 nm

CHL-OH-A
+
403 nm

Fonte: Autoria própria (2019).

CHL-Ph-A
+
403 nm

CHL-T
+
403 nm

4.1.4 Fotoinativação de biofilme multiespécies por TFD-A

A fotoinativação do biofilme multiespécies constituído de *E. coli*, *S. aureus* resistente à meticilina e *E. faecalis* foi realizada utilizando o PFC 2³. A Tabela 7 permite a visualização da matriz experimental, em que há a presença dos valores de cada parâmetro bem como os resultados obtidos.

A clorina **CHL-OH-A**, quando irradiada com o comprimento de onda de 660 nm, apresentou um máximo decaimento do índice de sobrevivência de $5,28 \pm 0,03 \log \text{UFC mL}^{-1}$ com 40 min de tempo de incubação, dose de luz de 15 J cm^{-2} e concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ o equivalente à **46%** de inativação (Tabela 8). Para as mesmas condições, a **CHL-T** possibilitou o decaimento do índice de sobrevivência de $5,34 \pm 0,04 \log \text{UFC mL}^{-1}$ o equivalente à **45,5%** de inativação. Utilizando a **CHL-Ph-A** foi necessária uma concentração menor de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ permitindo uma maior vantagem em relação às demais que necessitam do dobro da concentração, com um máximo decaimento do índice de sobrevivência de $5,63 \pm 0,03 \log \text{UFC mL}^{-1}$ o equivalente à **42,5%** de inativação. No entanto a maior inativação obtida foi observada com a CHL-OH-A com 3,58% a mais que a CHL-Ph-A. Logo, a sequência de fototoxicidade foi: **CHL-OH-A > CHL-T > CHL-Ph-A**.

Por outro lado, quando as clorinas foram irradiadas com o comprimento de onda de 403 nm, foi possível observar que todas apresentaram um índice de inativação mais elevado em comparação ao comprimento de onda de 660 nm. Todas as clorinas possibilitaram o maior grau de fotoinativação nas mesmas condições dos parâmetros (Tabela 7). As clorinas **CHL-OH-A** e **CHL-T** possibilitaram **72%** de inativação enquanto que a **CHL-Ph-A** **58%**. Portanto o grau de fototoxicidade das clorinas para fotoinativação de biofilme multiespécies utilizando o LED 403 foi **CHL-OH-A = CHL-T > CHL-Ph-A**.

Tabela 7: Matriz experimental do Planejamento Fatorial Completo 23 (com triplicata no ponto central) apresentando os resultados obtidos na fotoinativação do biofilme multiespécies constituído de *E. coli*; *E. faecalis* e *S. aureus* resistente à metilina utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm e 403 nm. Os melhores resultados obtidos em $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ estão marcados em cinza para cada FS.

Ensaio	TI (min)	DL (J cm ⁻²)	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LED 660 nm (vermelho)			LED 403 nm (violeta)		
				Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-OH-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-Ph-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-T	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-OH-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-Ph-A	Média $\pm$ DP log UFC mL ⁻¹ CHL-T
Controle	-	-	-	9,79 $\pm$ 0,02	9,79 $\pm$ 0,02	9,79 $\pm$ 0,02	9,68 $\pm$ 0,03	9,68 $\pm$ 0,03	9,68 $\pm$ 0,03
1	20	15	5	8,30 $\pm$ 0,04	8,54 $\pm$ 0,04	9,78 $\pm$ 0,09	6,84 $\pm$ 0,09	6,53 $\pm$ 0,09	5,90 $\pm$ 0,05
2	20	15	10	8,18 $\pm$ 0,06	6,76 $\pm$ 0,03	8,36 $\pm$ 0,05	6,52 $\pm$ 0,04	6,74 $\pm$ 0,05	6,43 $\pm$ 0,03
3	20	30	5	6,49 $\pm$ 0,09	8,70 $\pm$ 0,17	8,30 $\pm$ 0,07	5,42 $\pm$ 0,04	5,84 $\pm$ 0,03	5,39 $\pm$ 0,05
4	20	30	10	7,04 $\pm$ 0,06	7,11 $\pm$ 0,03	7,11 $\pm$ 0,03	5,15 $\pm$ 0,02	5,12 $\pm$ 0,03	5,11 $\pm$ 0,06
5	40	15	5	6,48 $\pm$ 0,08	5,63 $\pm$ 0,03	6,70 $\pm$ 0,13	4,38 $\pm$ 0,03	4,56 $\pm$ 0,05	5,83 $\pm$ 0,02
6	40	15	10	5,28 $\pm$ 0,03	5,85 $\pm$ 0,09	5,34 $\pm$ 0,04	3,27 $\pm$ 0,07	4,59 $\pm$ 0,08	4,41 $\pm$ 0,07
7	40	30	5	7,43 $\pm$ 0,02	6,18 $\pm$ 0,08	8,46 $\pm$ 0,05	4,38 $\pm$ 0,05	5,19 $\pm$ 0,10	4,50 $\pm$ 0,05
8	40	30	10	6,62 $\pm$ 0,05	6,51 $\pm$ 0,11	6,57 $\pm$ 0,02	2,67 $\pm$ 0,04	4,10 $\pm$ 0,02	2,66 $\pm$ 0,03
9	30	22	7,5	6,85 $\pm$ 0,12	6,85 $\pm$ 0,05	7,48 $\pm$ 0,03	5,07 $\pm$ 0,02	5,83 $\pm$ 0,05	5,53 $\pm$ 0,04
10	30	22	7,5	6,86 $\pm$ 0,14	6,84 $\pm$ 0,06	7,49 $\pm$ 0,08	4,95 $\pm$ 0,04	5,85 $\pm$ 0,02	5,48 $\pm$ 0,04
11	30	22	7,5	6,85 $\pm$ 0,09	6,84 $\pm$ 0,03	7,48 $\pm$ 0,06	5,04 $\pm$ 0,05	5,81 $\pm$ 0,03	5,54 $\pm$ 0,03

* TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm⁻²) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$). DP = desvio-padrão.

Tabela 8: Comparação dos melhores resultados obtidos na fotoinativação do biofilme multiespécies utilizando CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T irradiados nos comprimentos de onda de 660 nm (vermelho) e 403 nm (violeta). % = porcentagem de fotoinativação.

Comprimento de onda (nm)	CLORINAS					
	CHL-OH-A		CHL-Ph-A		CHL-T	
	Log UFC L ⁻¹	%	Log UFC mL ⁻¹	%	Log UFC mL ⁻¹	%
660 nm	5,28 ± 0,03	46,0	5,63 ± 0,03	42,5	5,34 ± 0,04	45,5
403 nm	2,67 ± 0,04	72,0	4,10 ± 0,02	58,0	2,57 ± 0,03	74,0

O diagrama de Pareto dos efeitos (Fig. 11 A-F) possibilita a visualização com mais clareza a significância dos parâmetros para cada FS nos diferentes comprimentos de onda. Para a **CHL-OH-A** utilizando LED 660 nm (Fig. 11A), os parâmetros: TI e C, bem como todas as interações apresentam significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam *p-value* < 0,05. Quando se aumenta o TI de 20 para 40 min e C de 5 para 10 µmol L⁻¹ de CHL-OH-A, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de 1,04 ± 0,08 e 0,39 ± 0,08 respectivamente. A interação TI*DL e DL*C possibilita um aumento de 1,31 ± 0,08 e 0,26 ± 0,08 log UFC mL⁻¹ enquanto que a interação TI*C permite a diminuição de 0,60 ± 0,08 log UFC mL⁻¹. TI é o parâmetro mais importante seguido pela C para fotoinativação do biofilme multiespécies utilizando CHL-OH-A.

Os parâmetros: TI, DL e C bem como a interação entre TI*DL e TI*C, para a **CHL-Ph-A** utilizando o LED 660 nm (Fig. 11B) apresentam significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam *p-value* < 0,05. Observa-se para a CHL-Ph-A que quando há aumento do TI de 20 para 40 min e C de 5 para 10 µmol L⁻¹, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL⁻¹ de 1,74 ± 0,03 e 0,71 ± 0,03 respectivamente, por outro lado, quando há aumento da DL de 15 para 30 µmol L⁻¹ há aumento de 0,43 ± 0,03. As interações TI*DL e TI*C possibilitam um aumento em log UFC mL⁻¹ de 0,17 ± 0,03 e 0,97 ± 0,03. O TI é o parâmetro mais importante seguido pela concentração e pela dose de luz para a fotoinativação do biofilme multiespécies utilizando CHL-Ph-A.

Figura 11 - Diagrama de Pareto dos efeitos em função do teste t permitindo a visualização da significância dos parâmetros para cada FS: (A e D) CHL-OH-A; (B e E) para CHL-Ph-A e (C e F) para CHL-T. Utilizando o comprimento de onda de 660 nm (A, B e C) e 403 nm (D, E e F). DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.

Fonte: Autoria própria (2019).

Analisando o Gráfico de Pareto (Fig. 11C) para a **CHL-T**, quando irradiada no comprimento de onda de 660 nm, é possível notar que tanto o TI quanto a C e a interação TI*DL apresentam significância estatística de acordo com o teste *t-student* estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95% em que apresentam *p-value* < 0,05. Quando há aumento do TI de 20 para 40 min e C de 5 para 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, há diminuição na sobrevivência em log UFC mL^{-1} de $1,62 \pm 0,11$ e $1,46 \pm 0,11$, respectivamente. A interação TI*DL permite uma diminuição de $1,42 \pm 0,11$ log UFC mL^{-1} . O TI é o parâmetro mais importante seguido pela C.

Analisando-se os efeitos dos parâmetros quando as clorinas são submetidas à irradiação com fonte luminosa de 403 nm foi possível observar que para **CHL-OH-A** (Fig. 11D) todos os parâmetros principais (TI, DL e C) foram considerados significantes assim como também suas interações, excetuando-se DL*C. Quando se aumentou os níveis dos parâmetros TI, DL e C foi possível obter uma diminuição em log UFC mL^{-1} das bactérias presentes em biofilme multiespécies de $2,31 \pm 0,12$; $0,85 \pm 0,12$ e $0,85 \pm 0,12$, respectivamente. Para as interações foi possível observar que TI*C também possibilita um decaimento de $0,06 \pm 0,12$ log UFC mL^{-1} , por outro lado, a interação TI*DL favorece um aumento de $0,55 \pm 0,12$ log UFC mL^{-1} . TI é o parâmetro mais importante seguido da DL e da C. Para a clorina **CHL-Ph-A**, apenas o TI foi significativo estatisticamente propiciando a redução de $1,45 \pm 0,25$ log UFC mL^{-1} (Fig. 10E). Para a clorina **CHL-T** (Fig. 11F) todos os parâmetros foram estatisticamente significativos. Quanto às interações apenas TI*C foi significativa. Ao se alterar os níveis do TI, DL e C foi observado o decaimento do índice de sobrevivência das bactérias em biofilme. Os valores obtidos foram de $1,38 \pm 0,24$; $1,26 \pm 0,24$ e $0,78 \pm 0,24$ log UFC mL^{-1} para TI, DL e C, respectivamente. Para a interação TI*C, pelas análises realizadas, foi possível observar também um decaimento em log UFC mL^{-1} de $0,90 \pm 0,24$.

Os resultados também podem ser visualizados pelos gráficos de superfície (3D) obtidos pela interação de Log UFC $\times$ (TI $\times$ DL / TI $\times$ C / DL $\times$ C). Esses gráficos foram feitos com a finalidade de analisar os níveis dos parâmetros com o índice de sobrevivência de bactérias presentes no biofilme multiespécies (Log UFC mL^{-1}), todos estão representados na Fig. 12 (A-R). Assim como os demais, a cor verde significa menores valores de índice de sobrevivência (Log UFC), quanto mais intenso, menor é Log UFC e a cor vermelha, os maiores. São três gráficos para cada FS, podendo-se visualizar os efeitos dos parâmetros para o índice de sobrevivência das bactérias em biofilme multiespécies.

Figura 12: Gráfico de superfície de resposta (3D) da fotoinativação de biofilme multiespécies: **A-C**: CHL-OH-A + 660 nm; **D-F**: CHL-Ph-A + 660 nm e **G-I**: CHL-T + 660 nm; **J-L**: CHL-OH-A + 403 nm; **M-O**: CHL-Ph-A + 403 nm e **P-R**: CHL-T + 403 nm. Sendo **A, D, G, J, M e P**: Log UFC $\times$ TI $\times$ DL; **B, E, H, K, O e Q**: Log UFC $\times$ TI $\times$ C e, por fim, **C, F, I, L, P e R**: Log UFC $\times$ DL $\times$ C.

CHL-OH-A
+
660 nm

CHL-Ph-A
+
660 nm

Fonte: Autoria própria (2019).

CHL-T
+
660 nm

CHL-OH-A
+
403 nm

Fonte: Autoria própria (2019).

CHL-Ph-A
+
403 nm

CHL-T
+
403 nm

Fonte: Autoria própria (2019).

4.2 Análise morfológica dos biofilmes mono e multiespécies após TFD-A por MEV

MEV foi utilizada para caracterizar a estrutura do biofilme, a morfologia das bactérias, bem como buscar evidências do processo fotooxidativo causados pela TFD-A empregando-se as três clorinas. Para isso, todos os modelos de biofilmes foram submetidos à análise por MEV nas melhores condições experimentais (descritas na Tabela 9) obtidas na fotoxidação utilizando-se o PFC 2³ com comprimento de onda de 660 e 403 nm.

Tabela 9: Condições experimentais utilizadas para a obtenção das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de fluorescência utilizando-se o kit LIVE/DEAD™. Em que TI = Tempo de Incubação (min); DL = Dose de Luz (J cm^{-2}) e C = Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Comprimento de onda de 660 nm				
Biofilme	Clorina	TI	DL	C
<i>E. coli</i>	CHL-OH-A	40	15	10
<i>E. faecalis</i>	CHL-OH-A	40	30	10
<i>S. aureus</i>	CHL-Ph-A	40	30	5
Multiespécies	CHL-OH-A	40	15	10
Comprimento de onda de 403 nm				
<i>E. coli</i>	CHL-OH-A	40	15	10
<i>E. faecalis</i>	CHL-OH-A	40	30	10
<i>S. aureus</i>	CHL-Ph-A	40	30	10
Multiespécies	CHL-OH-A	40	30	10

Foi possível observar os arranjos, bem como a interação bactéria-bactéria (Fig. 13). Após a TFD-A as imagens evidenciaram a estrutura de bacilos e cocos danificadas, com arranjos desiguais, projeções assimétricas e estruturas de superfície não característica de amostras íntegras (sem TFD-A), denotando fotoxidação de componentes da membrana e da parede celular.

Figura 13: Microscopia Eletrônica de Varredura dos biofilmes bacteriano de *E. coli* (A, B e C); *E. faecalis* (D, E e F); MRSA (G, H e I) e multiespécies (J, K e L). As amostras controle (não submetidas à TFD-A) são representadas por A, D, G e J. Amostras submetidas à TFD-A utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm são representadas por B, E, H e K, enquanto que utilizando-se 403 nm, C, F, I e L para *E. coli*; *E. faecalis*; MRSA e multiespécies, respectivamente.

MRSA, Controle

MRSA, LED Vermelho

MRSA, LED Violeta

Multiespécies, Controle

Multiespécies, LED Vermelho

Multiespécies, LED Violeta

Fonte: Autoria própria (2019).

4.3 Determinação da integridade da membrana das bactérias no biofilme

A integridade da membrana de bactérias presentes no biofilme foi determinada por microscopia de fluorescência utilizando-se o kit LIVE/DEAD™. O kit é constituído de dois marcadores, o verde fluorescente SYTO®9 (S) e o vermelho fluorescente iodeto de propídio (IProp). S penetra em células íntegras ou não, devido à sua baixa massa molar, no entanto, o IProp penetra apenas em células com a membrana citoplasmática danificada devido à sua alta massa molar resultando na redução da intensidade de S quando ambos os corantes coexistem na célula. Essa análise foi feita antes (Fig. 14A, D, G e J) e após TFD-A (Fig. 14B, E, H e J para 660 nm e Fig. 14C, F, I e L utilizando o comprimento de onda de 403 nm para biofilme de *E. coli*, *E. faecalis*, MRSA e multiespécies, respectivamente, nas melhores condições experimentais obtidas na fotoxidação utilizando o PFC 2³ (representado na Tabela 9).

A comprovação da perda da integridade da membrana citoplasmática bacteriana ocorre pela presença da cor vermelha, por outro lado, quando há integridade, i.e., sem evasão citoplasmática decorrente da fotoxidação, a estrutura bacteriana apresenta coloração verde. Bactérias que apresentam a membrana citoplasmática intacta estão presente em todas as Fig. 14 A-L uma vez que não houve 100% de fotoinativação.

Figura 14: Microscopia de fluorescência utilizando-se o kit LIVE/DEAD™ dos biofilmes bacteriano de *E. coli* (A, B e C); *E. faecalis* (D, E e F); MRSA (G, H e I) e multiespécies (J, K e L). As amostras controle (não submetidas à TFD-A) são representadas por A, D, G e J. Amostras submetidas à TFD-A utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm são representadas por B, E, H e K, enquanto que utilizando-se 403 nm, C, F, I e L para *E. coli*; *E. faecalis*; MRSA e multiespécies, respectivamente.

Antes, MRSA, Controle

Depois, MRSA, LED Vermelho

Depois, MRSA, LED Violeta

Antes, Multiespécies, Controle

Depois, Multiespécies, LED Vermelho

Depois, Multiespécies, LED Violeta

Fonte: Autoria própria (2019).

4.4 Acumulação do fotossensibilizador em biofilmes mono e multiespécies

O ensaio de acumulação foi realizado de forma quali e quantitativa. O objetivo principal foi fazer uma varredura com tempos de incubação de 10; 20; 30; 40; 50 e 60 minutos observando-se pela imagem de microscopia de fluorescência o teor de FS acumulado nas bactérias em biofilme nos respectivos tempos. Posteriormente as imagens obtidas foram submetidas a uma varredura de pixels através do *software* ImageJ ® quantificando a fluorescência pela formação de um espectro/histograma de intensidade. Foram utilizadas as clorinas CHL-OH-A (biofilmes de *E. coli*, *E. faecalis* e multiespécies) e CHL-Ph-A (biofilme de MRSA), as quais apresentaram as melhores respostas de fotoinativação.

Os resultados qualitativos vistos na Fig. 15A-X estão de acordo com as análises quantitativas da intensidade de fluorescência $\times$ pixels (Fig. 16A-X). Esses achados corroboram os resultados do PFC 2³, que quando analisado, apresentou pelo diagrama de Pareto a significância estatística do parâmetro TI para todos os modelos de biofilmes bem como para todas as clorinas. O que significa dizer que elevando-se o nível do parâmetro TI de 20 para 40, houve um maior decaimento em log UFC mL⁻¹ da fotoinativação bacteriana. O que se observa na Fig. 15B, H, N e T, correspondente à 20 min de incubação e Fig. 15D, J, P referente à TI igual a 40 min, corroborado com os histogramas da Fig. 16, é que houve um considerável aumento da intensidade de fluorescência devido a um maior acúmulo, de acordo com o aumento do tempo, justificando-se os maiores índices de inativação.

Embora tenha sido vista uma elevação da acumulação à medida que se aumentou o tempo, houve uma estabilidade em 40 minutos não sendo possível observar o aumento da intensidade/acúmulo em 50 e 60 minutos. Essa observação foi crucial para concluir que 40 minutos de incubação é o tempo ideal, não havendo a necessidade de aumento e nem de redução para a obtenção de melhores resultados. Esse resultado se repetiu para a acumulação de CHL-Ph-A em biofilme de MRSA e CHL-OH-A para os biofilmes de *E. coli*, *E. faecalis* e multiespécies.

Figura 15: Microscopia de fluorescência dos ensaios de acumulação de CHL-OH-A (**A-F** para Biofilme de *E. coli*; **G-L** para biofilme de *E. faecalis* e **S-X** para biofilme multiespécies) e acumulação de CHL-Ph-A (**M-R** para biofilme de MRSA). Os tempos representados por 10 minutos são: **A, G, M e S**; 20 min: **B, H, N, T**; 30 min: **C, I, O e U**; 40 min: **D, J, P e V**; 50 min: **E, K, Q e W** e, por fim, 60 min: **F, L, R e X**. Todas as imagens foram obtidas com ampliação de 4x e escala de 200 μm . *As imagens foram convertidas para cor azul.

Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 16: Histograma da intensidade de fluorescência x pixels dos ensaios de acumulação de CHL-OH-A (A-F para Biofilme de *E. coli*; G-L para biofilme de *E. faecalis* e S-X para biofilme multiespécies) e acumulação de CHL-Ph-A (M-R para biofilme de MRSA). Os tempos representados por 10 minutos são: A, G, M e S; 20 min: B, H, N, T; 30 min: C, I, O e U; 40 min: D, J, P e V; 50 min: E, K, Q e W e, por fim, 60 min: F, L, R e X. *Destaques em azul representam o tempo que houve a maior acumulação das clorinas aos biofilmes.

Fonte: Autoria própria (2019).

4.5 Análise da peroxidação da membrana após TFD-A

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier baseia-se na obtenção de espectros que sinalizam a frequência e a intensidade da radiação infravermelha absorvida quando um feixe atravessa ou reflete na amostra possibilitando análises quali e quantitativas de ligações químicas (CANEVAROLO, 2006).

O uso da FTIR foi fundamental para se verificar a presença da banda em 1740 cm^{-1} (C=O) que indica o grupo éster funcional do fosfolipídio presente na membrana citoplasmática das bactérias. A banda em 1740 cm^{-1} é considerada uma banda que indica a taxa de peroxidação dos fosfolipídios. Os espectros representados pelas Fig. 17A-D e Fig. 18A-D apresentam a banda de peroxidação em 1740 cm^{-1} (em azul) quando os biofilmes são submetidos à TFD-A utilizando-se 660 ou 403 nm.

Analisando-se individualmente é possível se observar que em todos os gráficos o pico de 1740 cm^{-1} , que surge quando a amostra é fototinativada, é antagonista a um vale no mesmo comprimento de onda de uma amostra controle (sem TFD-A), evidenciando o efeito fotoxidativo do processo.

Embora a intensidade do pico esteja diretamente relacionada com a quantidade de bactérias que apresentam a membrana peroxidada, essa análise comparativa só pode ser realizada entre o controle e após a TFD-A, dentro de cada condição individual, uma vez que o biofilme foi advindo do mesmo inóculo. No entanto, quando os lotes dos inóculos são diferentes, pode haver efeitos pronunciados no desenvolvimento do biofilme, dando um aspecto diferenciado ao espectro (KROUKAMP et al, 2010; POUSTI et al, 2018 e MOHAMMAD et al, 2018). Isso justifica porque, ao se comparar o pico da banda de peroxidação entre diferentes comprimentos de onda utilizados para a fotoinativação (403 e 660 nm) os resultados não corroboram em relação aos índices em $\log\text{ UFC mL}^{-1}$, se for levado em consideração as intensidades dos picos. Os resultados sugerem que a TFD-A leva a peroxidação da membrana citoplasmática das bactérias estando de acordo com os ensaios de integridade de membrana com o kit LIVE/DEAD.

Figura 17: Espectro Infravermelho com Transformada de Fourier das bactérias suspensas do biofilme antes e após a fotoinativação utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm (LED vermelho). **A, B e D**: utilizando-se CHL-OH-A e **C**: CHL-Ph-A.

Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 18: Espectro Infravermelho com Transformada de Fourier das bactérias suspensas do biofilme antes e após a fotoinativação utilizando-se o comprimento de onda de 403 nm (LED vermelho). **A, B e D**: utilizando-se CHL-OH-A e **C**: CHL-Ph-A.

Fonte: Autoria própria (2019).

4.6 Análise do efeito desestruturante e dispersivo da TFD-A sobre os biofilmes

Há muito tempo vários autores (HEILMANN et al., 1996; CRAMTON et al., 2001; DEIGHTON et al., 2001; MORETRO et al., 2003; TORMO et al., 2005; SEIDLER, et al., 2008) tem utilizado a safranina como um corante alternativo ao cristal violeta para avaliar a biomassa total do biofilme.

A safranina age corando a matriz exopolissacarídica (SEIDLER, et al., 2008) produzida pelas bactérias durante a formação de biofilme. A estrutura exopolissacarídica pode ser visualizada através da Fig. 19 D, G e J (controle = sem TFD-A), denotando uma extensa e densa estrutura, em vermelho, recobrindo as bactérias. Nota-se que para todos os modelos de biofilmes: *E. coli*; *E. faecalis*, MRSA e multiespécies houve intensa desestruturação da matriz

exopolissacarídica o que possibilita uma dispersão das bactérias do biofilme. A análise quantitativa, realizada através da mensuração da absorbância da safranina por espectroscopia no visível, (Fig. 20) corrobora com os resultados obtidos pelas imagens de microscopia ótica (Fig. 18), mostrando a diminuição da biomassa dos biofilmes.

As amostras submetidas à TFD-A utilizando o comprimento de onda 660 ou 403 nm foram obtidas através da combinação dos parâmetros (TI, DL e C) que possibilitaram as melhores respostas nos níveis de fotoinativação, todos os níveis dos parâmetros bem como as clorinas utilizadas estão descritos na Tabela 9.

Todos os dados de absorbância da safranina na região do visível obtidos das amostras que foram submetidas ao procedimento fotodinâmico foram analisados através da ANOVA One-way com Tukey obtendo-se um *p-value* significativo correspondente à 0,0004 estando dentro do intervalo de confiança de 95%. É notável a variação nos índices de absorbância entre o controle e a amostra após TFD-A para ambos os comprimentos de onda.

Para o biofilme de *E. coli* foi observada 49,4% de redução na biomassa utilizando-se o comprimento de onda de 660 nm e 68,4% em 403 nm. Para o biofilme de *E. faecalis* foi observada a maior redução na biomassa em comparação com os demais modelos. Utilizando-se a irradiação vermelha de 660 nm foi obtida a redução de 68,2% enquanto que a violeta (403 nm) 89,3%. Para o biofilme de MRSA observou-se a maior redução (82,8%) na biomassa utilizando-se o LED violeta. Já utilizando-se o LED vermelho, observou-se uma diminuição de 46,2%. Por fim, para o biofilme multiespécies, o comprimento de onda de 403 nm também, teve o efeito mais pronunciado levando a redução de 74,1% enquanto que utilizando-se 660 nm, apenas 49,8%.

Figura 19: Análise microscópica da dispersão do biofilme após TFD-A. **A-C:** *E. coli*; **D-F:** *E. faecalis*; **G-I:** MRSA e **J-L:** Multiespécies. As amostras controle (sem TFD-A) são: **A, D, G** e **J** enquanto que as amostras submetidas à TFD-A são: **B, E, H** e **K** utilizando o comprimento de onda de 660 nm e **C, F, I** e **L**, 403 nm. Ampliação da imagem de 4x e escala de 200 µm. *Coloração em vermelho corresponde à safranina 1%.

Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 20: Análise da biomassa dos biofilmes bacterianos constituídos de: (1) *E. coli*; (2) *E. faecalis*; (3) MRSA e (4) multiespécies antes e após TFD-A utilizando-se o comprimento de onda de 660 e 403 nm representados pelos diferentes tons de cinza. Ensaios apresentam média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$ e **** $P < 0,0005$ representando 95% de confiança).

Fonte: Autoria própria (2019).

Os maiores níveis de redução da biomassa foram observados para o biofilme de *E. faecalis* para ambos os comprimentos de onda. Em sequência o biofilme multiespécies, *E. coli* e MRSA para 660 nm enquanto que MRSA, multiespécies e *E. coli* para 403 nm. Esses resultados se diferenciam entre as linhagens bacterianas e entre os diferentes comprimentos de onda, pois é dependente da biomassa da comunidade bacteriana após a formação do biofilme bem como o efeito da TFD-A diante de duas fontes de irradiação diferentes.

Importante ressaltar que a biomassa do biofilme, não necessariamente, tem relação direta com a viabilidade bacteriana, uma vez que a quantificação da biomassa leva em consideração todos os constituintes do biofilme, incluindo estruturas não vivas como a matriz exopolissacarídica e não apenas a bactéria isolada. Observa-se que a TFD-A proporcionou um efeito desestruturante na arquitetura do biofilme seguida da dispersão das bactérias. Essas conclusões estão de acordo com todos os resultados obtidos conforme as Fig. 19 e Fig. 20.

4.7 Visualização dos componentes bacterianos em biofilme por microespectroscopia Raman

A microespectroscopia Raman foi fundamental para se visualizar e compreender a presença de diferentes estruturas que são possíveis alvos da TFD-A. Quando se analisa o espectro Raman de uma bactéria que tem naturalmente em sua composição: DNA/RNA, polissacarídeo e proteínas é de se esperar que ela apresente outros biocomponentes que são mais ou menos específicos de algum gênero ou espécie. Todos os picos refletem, em geral, similaridades na composição bioquímica de todas as espécies de acordo com resultados descritos na literatura. Em suma, cada pico representa uma característica da amostra sendo: 266 – 400 cm^{-1} (cadeias acíclicas de carbono e carboidratos) (IVLEVA et al., 2009); 539 cm^{-1} (deformação do anel glicosídico C-O-C); 784 cm^{-1} (citosina, uracila, alongamento do anel); 838 cm^{-1} (vibração de cadeias alicíclicas e alifáticas); 955 cm^{-1} (vibração do grupo ν C-O-C e presença de triptofano); 1059 e 1120 cm^{-1} (carboidratos, principalmente C-C, C-O, C-O-H) cm^{-1} ; 1173 cm^{-1} (tirosina; guanina e citosina; ácidos graxos, ácidos esteáricos); 1211 cm^{-1} (amido III; C-C alongamento de tirosina, fenilalanina, triptofano/ proteína); 1337 cm^{-1} (CH_2 e CH_3 - ácidos graxos e deformação de proteína; alongamento N-H /amida III; C-C - alongamento de triptofano e adenina e guanina) e 1450 cm^{-1} (deformações de CH_2 e CH_3 – lipídios e proteínas) (IVLEVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; WANG et al., 2013).

Raros picos diferentes foram detectados nas amostras (destacados com asterisco em verde) como: 1382 cm^{-1} (representa os constituintes da parede celular – peptidoglicano), não visualizado em biofilmes monoespécie, apenas no multiespécies, sendo detectado onde é mais densa a concentração bacteriana, como pode ser visto pela Fig. 21D. O pico em 907 cm^{-1} (C-O-C - ligação glicosídica/dissacarídeos) também foi detectado onde há maior concentração bacteriana.

Figura 21: Visualização dos alvos da TFD-A por Microespectroscopia Raman. **A:** Microscopia do biofilme de *E. coli*; **B:** microscopia do biofilme de *E. faecalis*; **C:** microscopia do biofilme de *S. aureus* e **D:** microscopia do biofilme multiespécies. Em **E** pode-se observar o espectro Raman da região registrada na imagem de cada biofilme.

Fonte: Autoria própria (2019).

4.8 Inativação do biofilme mono e multiespécies com cloridrato de ciprofloxacino

O antibiótico foi utilizado para comparação com a TFD-A. Para isso foram realizados testes com as concentrações de 0; 5; 7,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No gráfico representado na Fig.22 pode ser observada as reduções em log UFC mL^{-1} em cada biofilme com o uso de diferentes concentrações.

Em termos numéricos, para o biofilme de *E. coli* houve decaimento em Log CFU mL^{-1} do controle $9,06 \pm 0,19$ para $6,04 \pm 0,09$; $5,40 \pm 0,05$ e $4,72 \pm 0,20$ quando submetido às concentrações de 5; 7,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Nas mesmas concentrações o biofilme de *E. faecalis* mostrou mais resistência ao antibiótico reduzindo do controle $9,16 \pm 0,30$ para $7,56 \pm 0,13$; $6,54 \pm 0,04$ e, por fim, $5,38 \pm 0,30$ nas diferentes concentrações empregadas.

Para **MRSA**, partindo-se do controle de $9,08 \pm 0,19$, quando submetido à 5; 7,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CIP, os níveis de sobrevivência reduziram até o log UFC mL^{-1} $5,08 \pm 0,20$; $5,31 \pm 0,13$ e $4,65 \pm 0,12$ respectivamente. Nota-se que os valores de viabilidade obtidos quando MRSA foi submetida à inativação com CIP não variaram, sendo estatisticamente iguais (nas concentrações de 5 e 5,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Por fim, a sensibilidade do biofilme **multiespécies** ao antibiótico foi observada quando se comparou o controle $9,34 \pm 0,13$ em relação à $7,16 \pm 0,19$; $6,60 \pm 0,10$ e $5,50 \pm 0,17$ quando submetidos às concentrações de 5; 7,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Todos os resultados foram submetidos a ANOVA One-Way com Tukey para múltiplas comparações dos resultados obtidos entre os modelos de biofilmes. O intervalo de confiança para a análise de variância ANOVA One-Way foi de 95% com $p\text{-value} < 0,0001$ para o tratamento dos dados entre colunas, ou seja, entre diferentes modelos de biofilmes e $p\text{-value}$ igual a 0,0740 para diferentes concentrações de CIP para cada biofilme.

Figura 22: Viabilidade (Log UFC mL⁻¹) do biofilme de *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e multiespécies após o tratamento com antibiótico cloridrato de ciprofloxacino. *ns = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: Autoria própria (2019).

4.9 Prova fenotípica para formação de biofilme

O método do Vermelho Congo (VC) foi utilizado com a finalidade de se detectar a formação de biofilmes pelas linhagens: *E. coli*; *E. faecalis* e MRSA. Já se sabe pela literatura que todas as linhagens utilizadas nesse estudo têm, como fator de virulência em comum, a habilidade de formar biofilme. O objetivo foi apenas visualizar tal habilidade bacteriana fazendo-se uso do Agar VC e enfatizar a importância de serem desenvolvidos métodos para combater essas linhagens que podem atuar como agentes patogênicos.

As bactérias formadoras de biofilmes são reconhecidas na superfície do ágar VC através da coloração preta (FREEMAN et al., 1989) e foi observada como positivo para todas as linhagens da Fig. 23.

Figura 23: Imagens representativas da cor das colônias após o cultivo das linhagens na superfície do ágar VC. (A) *E. coli*; (B) *E. faecalis* e (C) MRSA.

Fonte: Autoria própria (2019).

5.0 Seletividade de fibroblastos à TFD-A e análise da membrana de eritrócitos

A seletividade do processo de fotoinativação das bactérias em biofilme foi avaliada através do uso de fibroblastos Balb/3T3 Clone A31. O objetivo do estudo foi avaliar se houve efeito citotóxico do processo fotodinâmico aos fibroblastos. Os ensaios foram realizados nas condições expressas na matriz experimental do PFC 2³ utilizada para a fotoinativação dos diferentes modelos de biofilmes. A Fig. 24 A e B representam o resultado obtido. Foi utilizado TI = 20 min para as condições 1, 2, 3 e 4 e 40 min para 5, 6, 7 e 8. Para DL igual a 15 J cm⁻² as condições foram 1, 2, 5 e 6 e 30 J cm⁻² foram 3, 4, 7 e 8. Para a concentração das clorinas, as condições 1, 3, 5 e 7 representam 5 µmol L⁻¹ enquanto que as condições 2, 4, 6 e 8 representam 10 µmol L⁻¹. O ponto central é representação pela condição 9, com TI = 30, DL de 22 J cm⁻² e C equivalente à 7,5 µmol L⁻¹.

Os resultados obtidos mostraram que para todas as clorinas CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T e comprimentos de onda 660 e 403 nm houve completa morte dos fibroblastos em todas as condições testadas de 1-9.

Já o teste de citotoxicidade sobre eritrócitos de sangue humano mostrou o inverso em relação aos fibroblastos. Não houve diminuição do índice de sobrevivência dos eritrócitos após a TFD-A nas mesmas condições da matriz experimental do PFC 2³.

Figura 24: Teste de seletividade em fibroblastos Balb 3T3 Clone A31 utilizando-se as clorinas CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T e irradiação no comprimento de onda de 660 nm (**A**) e 403 nm (**B**). (*Ensaio 1-9 = parâmetros e níveis referentes à matriz experimental do PFC2³ com ponto central). (*) representam os resultados que constaram morte celular e ns = diferença não significativa.

Fonte: Autoria própria (2019).

Os eritrócitos são glóbulos anucleados que contêm hemoglobina, uma proteína que possui uma parte não proteica chamada de grupo heme (considerado um complexo de ferro responsável por captar oxigênio). A utilização de eritrócitos nesse teste é vantajosa pois avalia o efeito que o processo fotodinâmico tem na membrana celular eucariótica. Sabe-se que as membranas dos eritrócitos são consideradas modelos primários para o estudo da membrana citoplasmática celular animal (MURADOR et al., 2007).

O experimento foi realizado com base na aferição da hemoglobina, via espectroscopia, após a TFD-A. A liberação da hemoglobina está diretamente relacionada com a lise celular decorrente do processo. No entanto, em nenhuma das condições foi possível se observar a presença de hemoglobina no sobrenadante, o que comprova que a TFD-A utilizando-se as clorinas CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T não foram nocivas às membranas celulares quando submetidas à irradiação de 660 e 403 nm.

5.1 Potencialização da TFD-A utilizando-se iodeto de potássio

Antes dos ensaios de potencialização da TFD-A utilizando-se o iodeto de potássio (KI), foi realizada uma varredura (*screening*) com a finalidade de se obter uma concentração de KI que não interferisse no processo de formação do biofilme ao longo das 48 h e que também não levasse à inativação celular. A Fig. 25A-D representa efeitos de diferentes concentrações de IP sobre a viabilidade bacteriana nos quatro modelos de biofilmes.

Todos os resultados obtidos foram explorados através da análise de variância (ANOVA One-Way) com teste de múltiplas comparações de Tukey. Para o biofilme de *E. coli*, a concentração de KI que não propiciou a redução da viabilidade bacteriana correspondeu à 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, havendo declínio com o aumento da concentração. Os mesmos resultados foram observados para os demais modelos de biofilme constituídos de *E. faecalis*, MRSA e biofilme multiespécies. De uma forma geral a concentração ideal de KI para todos os modelos de biofilmes, que não possibilita a inviabilidade celular e nem prejudica o desenvolvimento do biofilme ao longo das 48 h, foi de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 25: *Screening* das concentrações de Iodeto de Potássio (0 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para determinação de concentração não letal para os biofilmes monoespécie de *E. coli*, *E. faecalis* e MRSA e multiespécies. *ns = diferença estatística insignificante e ****P-value = 0,0001.

Fonte: Autoria própria (2019).

Após definir a concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, foram realizados ensaios com os mesmos níveis dos parâmetros (TI, DL e C) definidos na matriz experimental do PFC 2³. O objetivo principal foi avaliar o efeito de potencialização do KI na fotoinativação dos biofilmes bacterianos.

Sem o uso de KI, as condições mais favoráveis para os maiores índices de fotoinativação foram obtidas quando utilizado o LED violeta (403 nm). A presença do KI propiciou índices ainda mais elevados de fotoinativação em ambos os comprimentos de onda de 660 e 403 nm. No entanto, a luz violeta também possibilitou maior inativação com a presença de KI.

Nos biofilmes constituídos de bactérias gram-positivas, i.e., *E. faecalis* e MRSA, houve a completa erradicação de células viáveis quando submetidas à fotoinativação com o comprimento de onda de 403 nm para todas as clorinas CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T suplementadas com KI (Fig. 26D-I). Os demais biofilmes constituídos de *E. coli* (Fig. 26A-C) e o multiespécies (Fig. 26J-L) também apresentaram bons índices de inativação quando suplementados com KI.

Figura 26: Comparação dos percentuais de fotoinativação dos biofilmes de *E. coli* (A, B, C); *E. faecalis* (D, E, F); MRSA (G, H, I) e multiespécies (J, K, L) utilizando CHL-OH-A (A, D, G, J); CHL-Ph-A (B, E, H, K) e CHL-T (C, F, I, L). Os diferentes comprimentos de onda (660 ou 403 nm) são representados pelas variações de tons de cinza, bem como os maiores valores de percentuais de fotoinativação descritos no ensaio realizado representado de 1-8 que são os valores dos parâmetros descritos na matriz experimental do PFC 2³.

Fonte: Autoria própria (2019).

Fonte: Autoria própria (2019).

6. DISCUSSÃO

O processo de resistência bacteriana a antibióticos apresentou um rápido e descontrolado crescimento nas últimas décadas, sendo um dos maiores problemas de saúde pública (KUREK et al., 2013), passando a ser tratado como uma ameaça crescente e permanente para sistemas de saúde no mundo todo (SVARA et al., 2011).

No biofilme, as bactérias apresentam a mesma genética que em cultura planctônica, no entanto, suas atividades bioquímicas diferem em 40%, apresentando uma dificuldade mais acentuada para serem eliminadas devido à resistência adquirida (WIESCH et al., 2011). Levando-se em consideração essa dificuldade, a terapia fotodinâmica antimicrobiana pode ser empregada como uma opção para o uso indiscriminado de antibióticos, diminuindo assim o problema relacionado à resistência bacteriana. A metodologia não acarreta resistência às bactérias devido ao imenso número de alvos possíveis onde as EROs podem atuar impedindo qualquer tipo de adaptação/mutação bacteriana.

Todas as cepas bacterianas utilizadas (*E. coli*; *E. faecalis* e *S. aureus* resistente à meticilina) foram testadas quanto à prova fenotípica de formação de biofilme feita através da visualização, em ágar vermelho congo, da capacidade de formar o polissacarídeo intercelular de adesão (PIA). PIA é um componente da matriz exopolissacarídica do biofilme que medeia a adesão das células de vida livre às superfícies (LEE et al., 2016). As cepas produtoras de PIA produzem colônias negras denotando positividade à formação do biofilme, o que ocorreu para todas. A confirmação da virulência para a formação de biofilme, por parte das linhagens aqui utilizadas, chama a atenção para a necessidade de serem desenvolvidos meios que possibilitem a erradicação desses microrganismos quando associados em biofilme.

Nesse estudo foi utilizada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFD-A), com os fotossensibilizadores (FSs): CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T e os comprimentos de onda de 660 e 403 nm objetivando-se inativar biofilmes mono e multiespécies de *E. coli*, *E. faecalis* e *S. aureus* resistente à meticilina. Todas as clorinas utilizadas foram previamente caracterizadas e utilizadas em estudos anteriores (LINARES et al., 2017; MORITZ et al., 2017a; GONÇALVES, 2015), o que permitiu uma maior compreensão da diversidade de resultados dependendo da concentração utilizada, dose de luz necessária e efeitos para cada modelo de biofilme.

Tabela 10: Concentração residual de bactérias após TFD-A em log UFC mL⁻¹. Os itens destacados em cinza representam os melhores fotossensibilizadores dependendo do modelo de biofilme. *Resultados estatisticamente iguais de acordo com o teste de confiabilidade de 95%.

	CHL-OH-A	CHL-Ph-A	CHL-T
Clorinas irradiadas à 660 nm			
<i>E. coli</i>	5,76 ± 0,03	5,70 ± 0,12	6,00 ± 0,13
<i>E. faecalis</i>	2,00 ± 0,05	5,18 ± 0,08	4,32 ± 0,05
<i>S. aureus</i>	4,53 ± 0,03	4,52 ± 0,03	4,60 ± 0,02
Multiespécies	5,28 ± 0,03	5,63 ± 0,03	5,34 ± 0,04
Clorinas irradiadas à 403 nm			
	CHL-OH-A	CHL-Ph-A	CHL-T
<i>E. coli</i>	3,65 ± 0,03	4,04 ± 0,06	3,70 ± 0,04
<i>E. faecalis</i>	0,74 ± 0,05	1,13 ± 0,07	1,35 ± 0,02
<i>S. aureus</i>	2,02 ± 0,03	1,02 ± 0,07	1,85 ± 0,03
Multiespécies	2,67 ± 0,04*	4,10 ± 0,02	2,66 ± 0,03*

De forma geral, o biofilme mais susceptível à TFD-A foi o constituído de *E. faecalis* o que permitiu um $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ de 7,38, seguido por 5,13; 4,51 e 3,61 para MRSA, multiespécies e *E. coli*, utilizando-se CHL-OH-A/CHL-Ph-A/CHL-OH-A/CHL-OH-A, respectivamente. Todos as reduções apresentadas ($\log \text{UFC mL}^{-1}$) se referem à irradiação no comprimento de onda 660 nm. Por outro lado, utilizando o comprimento de onda 403 nm, também houve um maior $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ de 8,97 para o biofilme de *E. faecalis* utilizando-se a CHL-OH-A, seguido por MRSA, multiespécies e *E. coli* com $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ igual a 8,80 (CHL-Ph-A); 7,11 (CHL-OH-A) e 6,06 (CHL-OH-A), respectivamente. Um resumo comparativo dos dados de fotoinativação para todas os modelos de biofilmes, clorinas e comprimentos de onda utilizados podem ser vistas na Tabela 10.

Como observado nos resultados apresentados na Tabela 10, nota-se que nas melhores condições obtidas, os biofilmes constituídos pelas bactérias gram-positivas *E. faecalis* e MRSA foram mais sensíveis à TFD-A em relação ao biofilme das bactérias gram-negativas *E. coli* e também o biofilme multiespécies. Vários estudos sugerem que as bactérias gram-positivas são mais sensíveis à TFD-A em comparação com as gram-negativas devido às diferenças estruturais na parede celular. Enquanto gram-positivas apresentam uma parede espessa de peptidoglicano bastante porosa sobre a membrana citoplasmática as gram-negativas apresentam uma fina camada de peptidoglicano com uma membrana externa altamente seletiva, assim, a penetração do FS ocorre com mais facilidade em gram-positivas do que em gram-negativas (LIU et al., 2015; NAGATA et al., 2012; ANNUNZIO et al., 2017).

Apesar de *E. faecalis* e MRSA serem do mesmo grupo (gram-positivas) é possível observar diferenças na sensibilidade, uma vez que *E. faecalis* foi mais sensível que MRSA. Essas diferenças (de sensibilidade à TFD-A) em bactérias pertencentes ao mesmo grupo foram observadas em vários estudos, evidenciando que a estrutura celular não seja um fator limitante para o sucesso da TFD-A (JORI et al., 2006; TSAI et al., 2009; KSHEF et al., 2013). No entanto a diferença no índice de fotoinativação entre *E. faecalis* e MRSA pode ser justificada através de vários fatores.

Um fator importante é que *S. aureus*, em biofilme, modula a composição lipídica da membrana citoplasmática em resposta ao estresse ambiental incluindo temperatura, pressão osmótica, salinidade, pH e aglomeração (PEREZ-LOPEZ et al., 2019). *S. aureus*, em biofilme, modula os níveis de lipídios insaturados a nível de ramificação lipídica, composição do grupo de cabeça e a presença de pigmentos de membrana, como carotenoides (CRONAN e GELMANN, 1975; GRUSZECKI, e STRZĄŁKA, 2005). O fato de ser utilizada nesse estudo

como biofilme já garante que, a aglomeração celular em biofilme, seja um fator desencadeador de estresse celular que leva a essas modificações e ao acúmulo lipídico e de carotenoide. Importante ressaltar que essas alterações lipídicas na membrana das bactérias influenciam diretamente nas propriedades biofísicas da bicamada fosfolipídica relacionada ao empacotamento lipídico acarretado pelo carotenoide e a complacência mecânica da membrana (ERNST et al., 2016 e PEREZ-LOPEZ et al., 2019). Essa pode ser uma justificativa para que, em algumas condições e para o uso de alguns FSs, o biofilme de MRSA seja mais resistente que o de *E. faecalis*. Sabe-se que MRSA em biofilme apresenta maior acúmulo de lipídios em consequência do maior acúmulo de carotenoide, que culmina no aumento da rigidez da membrana (PEREZ-LOPEZ et al., 2019). A rigidez da membrana citoplasmática pode ser um empecilho no transporte de substâncias para dentro e para fora da bactéria, podendo interferir diretamente na quantidade de FS absorvido e posteriormente na formação de EROs, resultando em uma maior resistência.

Além da rigidez da membrana citoplasmática ser mais acentuada em células estacionárias (células do biofilme) de MRSA devido ao acúmulo de carotenoide e posteriormente de lipídios e isso acarretar na sensibilidade de MRSA à TFD-A, a presença do carotenoide, por si só, já justificaria a resistência dessa linhagem perante outras do mesmo grupo (gram-positiva).

Carotenoides são um grupo de pigmentos dourados presentes na membrana citoplasmática de *S. aureus*, sendo a estafiloxantina, de coloração laranja-amarelado, o tipo mais comum dessa linhagem (PEREZ-LOPEZ et al., 2019). O mecanismo biossintético da estafiloxantina é regulado por genes organizados no operon crtOPQMN com um promotor σ^B dependente de crtO e uma região terminal crtN (PELZ et al., 2005). Esse mesmo operon regula outros genes (osmC/ohr) também envolvidos na defesa contra o estresse oxidativo gerado por hidroperóxidos, ânion superóxidos além das EROs incluindo radicais hidroxila, peroxinitrito e peróxido de oxigênio (PANDEY et al., 2019). Sabe-se que o carotenoide produzido pela *S. aureus*, e em maior quantidade em biofilmes, apresenta relação direta com a proteção da célula a danos oxidativos. Quando há a formação do oxigênio singlete, decorrente da irradiação dos FSs, há a interação com o carotenoide tornando-o excitado e retornando rapidamente ao estado fundamental dissipando energia na forma de calor. Assim, o carotenoide tem a capacidade de quelar o oxigênio singlete devido ao número de duplas ligações conjugadas e aos grupos ligados às extremidades da cadeia (UENOJO et al, 2007). Portanto espera-se que no biofilme de MRSA, a resistência ao oxigênio singlete seja mais acentuada do que em bactérias não pigmentadas (COKER et al, 2018). No entanto não há na literatura estudos específicos que relatem a proteção

oxidativa de MRSA ao oxigênio singlete advindo do processo fotodinâmico da TFD-A. Isso gera uma certa dúvida se a resistência de MRSA em relação à *E. faecalis*, nesse estudo, pode ser atribuída a presença do pigmento antioxidante, porém não deixa de ser um ponto importante a ser estudado em pesquisas futuras.

Um fator intrigante é que quando o biofilme de MRSA e de *E. faecalis* foram irradiados no comprimento de onda de 403 nm e utilizando-se a CHL-Ph-A, as quantidades em log UFC mL⁻¹ de linhagens sobreviventes ($1,13 \pm 0,07$ para *E. faecalis* e $1,02 \pm 0,07$ para MRSA - Tabela 10) foram consideradas estatisticamente iguais, sendo que esperava-se haver diferenças já que uma cepa é pigmentada com antioxidante e a outra não. Nesse ponto é importante explicar por que o efeito protetivo, advindo do antioxidante estafiloxantina, não foi observado em MRSA nas condições supracitadas e também por que isso ocorreu apenas com a clorina CHL-Ph-A quando irradiada à 403 nm.

Surpreendentemente as buscas por justificativas para esse comportamento possibilitaram o entendimento de que as linhagens de MRSA não são privilegiadas com um efeito antioxidativo extremo quando submetidas à TFD-A utilizando-se o comprimento de onda de 403 nm. Sabe-se que os carotenoides são fotossensíveis devido às ligações C=C conjugadas e estudos na literatura mostraram que extratos de estafiloxantina advindos de MRSA, apresentam forte absorção na janela de 400 a 500 nm, sendo mais intensa em 460 nm (DONG et al., 2019). Como o biofilme de MRSA foi irradiado com o comprimento de onda à 403 nm, pode ter ocorrido a fotólise, parcial ou integral, da estafiloxantina possibilitando a perda do efeito antioxidante e por isso a inativação de MRSA e *E. faecalis* foram equiparadas quando CHL-Ph-A foi irradiada à 403 nm. No entanto é necessário compreender por que esse fenômeno (morte bacteriana equiparada para MRSA e *E. faecalis* utilizando luz de 403 nm) foi observado apenas quando utilizada a clorina CHL-Ph-A, a qual possibilitou os maiores índices de morte para MRSA.

Todas as variações de sensibilidade dos diferentes modelos de biofilmes não se explicam exclusivamente através da análise da estrutura bacteriana, mas também de acordo com o FS utilizado, sendo a sinergia de ambas as condições o determinante para a resposta objetivo (inativação). As clorinas CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T apresentam rendimentos quânticos de formação do oxigênio singlete (Φ_{Δ}), determinados pelo método indireto, $0,49 \pm 0,04$; $0,40 \pm 0,05$ e $0,46 \pm 0,03$, respectivamente (LINARES et al., 2017; MORITZ et al., 2017a; GONÇALVES 2015). Apesar dos valores de Φ_{Δ} obtidos pelo método indireto da CHL-OH-A e CHL-Ph-A não serem estatisticamente diferentes, houve diferenças quando se obteve o Φ_{Δ} pelo método direto, o que possibilitou concluir que a CHL-OH-A apresenta o maior Φ_{Δ} com

$0,77 \pm 0,04$ sendo $0,69 \pm 0,04$ para CHL-Ph-A. Havendo um Φ_{Δ} maior, é de se esperar que ocorra um índice de inativação mais elevado, porém não foi o observado em biofilme de MRSA que apresentou uma redução mais acentuada utilizando-se a CHL-Ph-A com irradiação a 660 e 403 nm. Como já ressaltado, a sensibilidade de MRSA à CHL-Ph-A irradiada em 403 nm possibilitou índices maiores até mesmo equiparados à *E. faecalis*. Assim sendo, é necessário analisar outro fator que contribua para que a clorina CHL-Ph-A propicie um índice de sobrevivência menor em relação aos outros FSs, ou seja, que explique por que é mais ativa em relação às demais para o biofilme de MRSA.

Um outro fator extremamente importante na obtenção dos melhores índices de fotoinativação, foi o uso dos diferentes comprimentos de onda (660 nm/vermelho e 403 nm/violeta). Em todas as condições, para todos os FSs e para todos os modelos de biofilmes foi observado que o comprimento de onda de 403 nm possibilitou os níveis mais elevados de fotoinativação bacteriana. Esse achado pode ser explicado por dois importantes elementos. O primeiro é que o pico de absorção na região do violeta, para todas as clorinas, é maior. Sendo maior, há uma maior absorção quando irradiado e consequentemente, uma maior formação de oxigênio singlete e maior morte bacteriana. O segundo é que a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda, o que significa dizer que quanto maior o comprimento de onda, menor será a energia. Logo, o comprimento de onda em 403 nm apresenta uma energia bem mais acentuada que em 660 nm, possibilitando a incorporação dessa maior energia contida nos fótons às clorinas, levando-as a um estágio excitado em maior intensidade impedindo que essa energia seja perdida de forma mais rápida através da fluorescência ou fosforescência.

Além das variações nos índices de fotoinativação com relação à clorina utilizada, aos modelos de biofilmes e à fonte luminosa, houve variações quanto aos níveis dos parâmetros (TI, DL e C) que possibilitaram os percentuais mais elevados de fotoinativação. Apenas o tempo de incubação, de 40 minutos, foi idêntico para todas as condições experimentais, i.e., todos os modelos de biofilmes, todas as clorinas e ambos os comprimentos de onda de 660 e 403 nm. No entanto há melhores resultados sendo obtidos com DL de 15 e 30 J cm⁻² como também concentração de 5 e 10 µmol L⁻¹.

O TI apresentou o melhor nível (40 minutos) em todas as condições e se justifica de acordo com a morfologia bacteriana e a estrutura do biofilme. Os biofilmes bacterianos secretam uma mistura de polissacarídeos, proteínas (compostas principalmente de D-aminoácidos), ácidos graxos e uma variedade de ácidos nucléicos, denominados de substância polimérica extracelular, do inglês EPS. O biofilme consiste de, aproximadamente, 80% de EPS desempenhando um importante papel em sua formação (KHATOON et al., 2018) ou de 75 –

90% de EPS a depender da espécie bacteriana e a camada fica mais densa quanto mais próxima da microcolônia de acordo com Costerton, 1999. O EPS é uma matriz pegajosa composta principalmente de canais de água que servem como um meio para a distribuição de nutrientes e oxigênio para as bactérias e como uma plataforma para a fixação das bactérias na superfície (CHANG, 2017). Além de proteger as bactérias das defesas do hospedeiro ocasionadas pelos anticorpos, glóbulos brancos e monócitos, também protege as bactérias da ação dos antibióticos auxiliando na resistência à antibioticoterapia (KHATOON et al., 2018). Muitos antibióticos administrados não conseguem penetrar a camada de EPS (KAWCZYK-KRUPKA et al., 2018) e a TFD-A tem se tornando uma boa alternativa a esse dilema devido ao seu potencial desestruturante do biofilme (SURESH, et al., 2019).

A habilidade de desestruturação do biofilme através da TFD-A foi visualizada nesse estudo não apenas através da determinação dos níveis de viabilidade celular ($\log \text{UFC mL}^{-1}$) que evidenciam, em específico, a desestruturação da integridade celular, mas também através da análise quantitativa da biomassa estrutural do biofilme e também pela visualização de sua arquitetura por microscopia ótica. A safranina, por apresentar a habilidade em corar o EPS (SEIDLER et al., 2008), possibilitou a observação de resultados surpreendentes. Não necessariamente o fato de apresentar a biomassa reduzida ou a arquitetura do biofilme desestruturada/dispersada, significa dizer que houve morte celular embora os resultados, tanto de viabilidade bacteriana quanto da biomassa e da visualização estrutural por microscopia, estão em completo acordo. No entanto nesse estudo, a safranina permitiu a observação do quão a TFD-A teve efeito desestruturante na arquitetura do biofilme possibilitando a dispersão das bactérias, antes imersas e envoltas na matriz exopolissacarídica.

A possibilidade de desintegrar toda a arquitetura do biofilme é um importante passo para que a bactéria tenha um maior contato com o FS e o oxigênio singlete formado tenha um maior efeito oxidativo perante a membrana citoplasmática. Então essa ação desestruturante pode ser responsável por potencializar ainda mais o efeito fotodinâmico. Por outro lado, não serão todas as bactérias dispersas da arquitetura do biofilme que irão morrer. Como mostrado nos estudos de viabilidade, houve células sobreviventes, fruto da dispersão do biofilme ocasionada pela TFD-A mas ainda não suficiente para ocasionar a morte celular.

A dispersão do biofilme já ocorre naturalmente, por ser o último estágio de sua formação. O processo é regulado e caracterizado pela troca fenotípica ativa envolvendo a detecção de sinais ambientais e sua transdução através de complexas redes reguladoras até efetores finais que permitem a liberação de células individuais e/ou agregados multicelulares (PETROVA e SAUER, 2016). A literatura atesta ampla disparidade de mecanismos

moleculares usados para inativar um biofilme ou interromper seu crescimento nas espécies bacterianas (GUILHEN et al., 2017). Quatro mecanismos reguladores da dispersão, principalmente em espécies gram-negativas, foram descritos até agora: 1) sensor de *quorum sensing* (QS); 2) nucleotídeo baseado na sinalização do segundo mensageiro envolvendo bis-(30-50)-cíclico; 3) monofosfato de diguanosina (c-di-GMP) e 4) e pequena via reguladora de RNA (FAZLI et al., 2014; SOLANO et al., 2014; WOLSKA et al., 2016; PETROVA e SAUER, 2016). Como já relatado, através dos resultados obtidos, foi observada uma dispersão em todos os modelos de biofilmes utilizados nesse estudo. Sabendo-se que diferentes estratégias são usadas para dispersar células do biofilme, incluindo a degradação da matriz extracelular pela ação de nucleases, glicosidases ou proteases, ruptura de estruturas da superfície celular, redução da tensão superficial com moléculas surfactantes ou indução de morte celular local (GUILHEN et al., 2017), acredita-se, que o efeito dispersivo e desestruturante observado nesse estudo ocorreu em decorrência da morte de parte das bactérias ocasionada por danos fotooxidativos da TFD-A.

A morte de algumas bactérias presentes na estrutura do biofilme acarreta um *pool* celular diminuído, levando à produção reduzida de pequenas moléculas autoindutoras (MA) (Waters e BASSLER, 2005). MAs são responsáveis pela regulação e dispersão do biofilme sendo diferentes em cada categoria bacteriana. Para gram-positivas as MAs são moléculas peptídicas (Sturme et al., 2002; Thoendel e Horswill, 2010). As MAs de bactérias gram-negativas são as lactonas acil-homoserina (Kaplan, 2010; Kim et al., 2013) e há MAs de “linguagem universal” como o diéster de furanosil borato utilizado para comunicação entre bactérias gram-positivas e negativas (LOWERY et al., 2008). Havendo baixa produção de MAs, em decorrência da baixa população celular, ocorre a intensa dispersão das bactérias em biofilmes e isso justifica todos os resultados obtidos mostrando a dispersão/desestruturação após a TFD-A.

O efeito dispersivo da TFD-A sobre os biofilmes também pode ser explicado através da constituição da matriz extracelular. Sabe-se que alguns dos componentes da matriz como o DNA extracelular (eDNA), RNA e proteínas apresentam uma importante função estrutural do biofilme para uma extensa variedade de bactérias. Embora estejam presentes em quantidades pequenas (<1% para eDNA, <2% para RNA e <2% para proteínas) (PERCIVAL et al., 2011; JAMAL, et al., 2017; SMITH et al., 1995; SLEYTE, 1997; FLEMMING et al., 2016; KOBAYASHI, 2007), é compreendido que essas moléculas são possíveis alvos da TFD-A (LIU et al., 2015).

Ácidos nucleicos (DNA e RNA) são um alvo primário da TFD-A, ainda em discussão e vários estudos sugeriram que ocorre uma ligação entre o FS e os ácidos nucleicos oxidando-os

e levando as bactérias à morte (LIU et al., 2015). Embora o eDNA e algumas moléculas de RNA em biofilme não estejam internamente à célula e sim presente na estrutura exopolissacarídica, pode-se supor que essas moléculas também são alvos da TFD-A e passíveis de serem oxidadas, o que poderia gerar formação de canais na estrutura do EPS. O mesmo ocorre para as proteínas que podem ser danificadas/degradadas pela TFD-A (VISICK e CLARKE, 1995), nesse caso, as proteínas presentes no EPS. Proteínas e ácidos nucleicos presentes na estrutura bacteriana são alvos da TFD-A, no entanto as bactérias apresentam diversos mecanismos de reparo aos danos proteotóxicos e o mesmo vale para os ácidos nucleicos, ou seja, pode ocorrer o dano oxidativo inicial mas sem acarretar consequências biológicas devido ao intenso reparo celular (LIU et al., 2015). No caso de biofilmes, as moléculas de eDNA, RNA e proteínas, vistas como alvo da TFD-A, estão também presentes externamente à bactéria, cumprindo funções estruturais na matriz exopolissacarídica, assim sendo, são alvos fáceis da TFD-A sem possíveis reparos. Chega-se à conclusão de que a fotoxidação/degradação dessas estruturas (eDNA, RNA e proteínas) presentes no EPS possibilitam uma perturbação e posterior abertura de canais maiores na estrutura do biofilme, favorecendo uma maior penetração do FS, bem como do oxigênio singlete formado quando o FS é irradiado, ao longo da camada de EPS e pela população bacteriana. Com isso a TFD-A possibilita a morte de grande parte dessas bactérias presentes no biofilme, o que reduz o *pool* celular, levando à pouca expressão de MAs, culminando na dispersão e total desestruturação da arquitetura do biofilme, confirmada pelo estudo aqui realizado.

Embora venham a ocorrer todos esses processos, os microrganismos em biofilme ainda são menos susceptíveis à TFD-A em comparação à cultura planctônica. Isso ocorre porque a matriz constituída de EPS limita a fácil penetração do FS, demandando um tempo maior para que o FS flua pelos canais presentes no EPS, o que justifica que para todos os modelos de biofilmes, 20 minutos foram insuficiente para a incubação do FS. Embora sejam bons parâmetros para a fotoinativação de biofilmes, infelizmente com esse resultado obtido não foi possível obter a seletividade perante a cultura em monocamada de fibroblastos (i.e., inativar o biofilme e manter estáveis os índices de fibroblastos). Não houve seletividade, i.e., morte das bactérias em biofilme e estável viabilidade dos fibroblastos. Assim houve completa morte celular dos fibroblastos quando submetidos à TFD-A. Justifica-se esse achado, de acordo com o TI. Células eucarióticas necessitam de um tempo de incubação maior do FS e esse tempo ficou equiparado à incubação perante os biofilmes. Quando as linhagens de fibroblastos foram submetidas à TFD-A houve completa oxidação das estruturas celulares. Seria necessário

averiguar a seletividade dos parâmetros utilizando-se modelos eucarióticos mais estruturados que não sejam apenas em monocamada.

Com base nessas necessidades foi utilizada uma outra abordagem para estudo da seletividade da fotoinativação de biofilmes perante células eucarióticas. Nesse estudo foi utilizado o ensaio de fotólise de eritrócitos que se baseia na ruptura da membrana citoplasmática e posterior liberação de hemoglobina quando submetido à TFD-A. Esse ensaio é utilizado para prever medicamentos que podem fotossensibilizar a pele humana (DHANALEKSHMI et al., 2019). Supreendentemente não houve morte celular quando os eritrócitos foram submetidos à TFD-A utilizando-se as clorinas CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T e comprimentos de onda de 660 e 403 nm. Todas as condições dos parâmetros (TI, DL e C) testadas (Tabela 9) evidenciaram a não citotoxicidade do processo perante os eritrócitos. Embora estudos já realizados utilizando-se Photogem® e sangue sem plasma tenham evidenciado 100% de hemólise e sangue total (sem remoção de plasma) apenas 10,7% de hemólise (QUATRINI et al., 2019), o resultado obtido aqui evidenciou alto índice de sobrevivência, concluindo que não houve hemólise após a TFD-A.

A ausência de hemólise nesse ensaio pode ser justificada pela não citotoxicidade e fototoxicidade das clorinas bem como pela fonte luminosa utilizada (660 e 403 nm). Além disso é importante ressaltar que os aglomerados de eritrócitos obtidos após serem extraídos da corrente sanguínea e posteriormente serem centrifugados para retirada do plasma, formam um “tapete” em condições *in vitro* devido à sedimentação dos mesmos no fundo das placas de poços. Esse “tapete” de eritrócitos formado possibilita a construção de uma barreira a qual impede que a luz (660 ou 403 nm) entre em contato com todos os eritrócitos após a acumulação com as clorinas, culminando na total viabilidade celular. No entanto as células superficiais, embora sejam submetidas e venham a culminar na hemólise, não apresentaram uma quantidade significativa de hemoglobina liberada no sobrenadante, ficando indetectável ao equipamento. Esse resultado foi observado mesmo levando-se em consideração que a luz vermelha (660 nm) apresenta maior potencial de penetração (MA et al., 2019) concluindo-se que, de fato, a TFD-A não possibilita a cito e a fototoxicidade aos eritrócitos.

Retomando às análises dos parâmetros envolvidos na TFD-A, ao averiguar os outros níveis dos parâmetros DL e C para fotoinativação do biofilme de *E. coli* foi observado que permaneceram idênticos quando se alterou a o comprimento de onda de 660 para 403 nm, para cada clorina individualmente, favorecendo os melhores resultados. Ou seja, 15 J cm⁻² para CHL-OH-A e CHL-T enquanto que foi necessário o dobro de energia para CHL-Ph-A de 30 J cm⁻² para a obtenção de um resultado de fotoinativação melhor. A demanda pelo dobro de

energia pode ser explicada tanto pela estrutura bacteriana complexa de *E. coli*, (membrana externa, espaço periplasmático, parede celular fina e membrana citoplasmática) (LIU et al., 2015) considerada uma gram-negativa quanto pela formação de oxigênio singlete pela CHL-Ph-A ser menor que as demais. Em contrapartida a concentração de todas as clorinas permaneceu idêntica ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) quando se alterou o modelo de biofilme e o comprimento de onda, sendo esses resultados observados em azul na Tabela 11.

Para o biofilme de *E. faecalis* os níveis permaneceram idênticos quando houve alteração do comprimento de onda de 660 para 403 nm utilizando-se clorinas CHL-OH-A e CHL-T (destacado em laranja). O mesmo padrão não foi observado para a CHL-Ph-A, havendo inversão dos níveis quando se altera o comprimento de onda de 660 para 403 nm, aumentando-se a DL e reduzindo-se a C. Já para o biofilme de MRSA, assim como TI, a DL também se estabilizou em 30 J cm^{-2} para todas as condições, possibilitando melhores índices de fotoinativação. Não foi observada essa estabilidade para a concentração (exceto para CHL-T), oscilando entre 5 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A intensa instabilidade de padrões nos níveis dos parâmetros para a fotoinativação do biofilme multiespécies quando se altera o comprimento de onda de 660 para 403 nm, foi observada. Apenas permaneceram estáveis os níveis de C para CHL-OH-A e CHL-T quando se alterou o comprimento de onda. Os demais níveis variaram conforme as condições experimentais variavam, o que pode ser explicado pela presença de diferentes microrganismos que apresentam variadas características estruturais, possibilitando um padrão instável e explicável quanto aos níveis dos parâmetros.

Tabela 11: Comparação dos níveis dos parâmetros x comprimento de onda (660 e 403 nm), para cada clorina e modelo de biofilme, que favoreceram os melhores percentuais de fotoinativação. TI = Tempo de Incubação (min); DL = Dose de luz (J cm^{-2}) e C = concentração da clorina CHL-OH-A, CHL-Ph-A ou CHL-T ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Itens destacados em cinza representam a igualdade do nível do parâmetro TI para todos os modelos de biofilmes, todas as clorinas e para os dois comprimentos de onda (660 e 403 nm). Destaque em azul são os níveis idênticos de DL e C para o biofilme de *E.coli* irradiados em 660 e 403 nm. Para biofilme de *E. faecalis* os níveis iguais dos parâmetros DL e C são representados em laranja. Em verde são os níveis iguais dos parâmetros DL e C para o biofilme de MRSA e em amarelo para biofilme multiespécies.

Clorinas irradiadas em 660 nm									
	CHL-OH-A			CHL-Ph-A			CHL-T		
	TI	DL	C	TI	DL	C	TI	DL	C
<i>E. coli</i>	40	15	10	40	30	10	40	15	10
<i>E. faecalis</i>	40	30	10	40	15	10	40	30	5
<i>S. aureus</i>	40	30	10	40	30	5	40	30	10
Multiespécies	40	15	10	40	15	5	40	15	10

Clorinas irradiadas em 403 nm									
	CHL-OH-A			CHL-Ph-A			CHL-T		
	TI	DL	C	TI	DL	C	TI	DL	C
<i>E. coli</i>	40	15	10	40	30	10	40	15	10
<i>E. faecalis</i>	40	30	10	40	30	5	40	30	5
<i>S. aureus</i>	40	30	5	40	30	10	40	30	10
Multiespécies	40	30	10	40	30	10	40	30	10

Um outro aspecto importante de se discutir e analisar é referente aos parâmetros (TI, DL e C) que não foram significativos na TFD-A com base na análise dos resultados obtidos com a realização do PFC 2³. Após a realização de todos esses experimentos de fotoinativação lidando com três diferentes fotossensibilizadores (CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T), dois comprimentos de onda (660 e 403 nm) e quatro modelos de biofilmes bacterianos mono e multiespécies, chegou-se a uma extensa variação de possíveis análises levando-se em consideração todos os parâmetros envolvidos no processo, como TI, DL e C bem como seus níveis 20, 30 e 40 min; 15, 22 e 3 J cm^{-2} e 5, 7,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Foram observadas muitas diferenças para todos os modelos de biofilme que foram submetidos a condições variadas de fotoinativação. Em relação aos parâmetros, cada análise possibilitou compreender quais são as variáveis importantes para a obtenção de uma melhor resposta (maior fotoinativação). A Tabela 12 mostra todos os parâmetros que não foram significativos para a fotoinativação dos variados biofilmes.

Compreender e listar os parâmetros que não são significativos permite analisar e construir uma nova matriz experimental, caso seja necessário, com o objetivo de se obter uma resposta melhor. O que significa dizer que todos esses parâmetros individuais (TI, DL e C) que foram demarcados em vermelho e violeta devem ser evitados, ou seja, não há a necessidade de alterar os seus níveis, para mais ou para menos, com o intuito de que se obtenha um resultado melhor (maior índice de inativação). Como observado, quando há a alteração da DL, por exemplo, de 15 para 30 J cm⁻², significa dizer que o aumento não possibilitou uma maior fotoinativação e que o valor obtido foi insignificante. O mesmo ocorre para os demais parâmetros e consequentemente, para as interações.

Para um melhor resultado, basta apenas alterar os níveis que são significativos, para mais ou para menos de acordo com o coeficiente regressor de cada parâmetro, dentro da matriz experimental utilizada. Essa análise individualizada da significância ou insignificância estatística dos parâmetros ajuda a reduzir consideravelmente a quantidade de experimentos a serem realizados com o intuito de se obter uma melhor resposta objetivo fazendo-se uso do PFC 2³ (AMARAL et al., 2018).

Mudando de perspectiva, ao se comparar a TFD-A com o uso do antibiótico CIP, houve relevantes e diferentes graus de inativação. Foi observado um $\Delta \log \text{UFC mL}^{-1}$ com a concentração máxima de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para todos os casos de 4,34 (*E. coli*); 3,78 (*E. faecalis*); 4,43 (*S. aureus*) e 3,84 (multiespécies). A ordem de sensibilidade foi *S. aureus* (48,8% de inativação) > *E. coli* (47,9% de inativação) > *E. faecalis* (41,3% de inativação) > multiespécies (41% de inativação). Nesse caso o antibiótico age bloqueando determinadas enzimas das bactérias que têm um papel fundamental no metabolismo e na reprodução bacteriana, levando-as à morte celular. No entanto, infelizmente, as células do biofilme microbiano possuem propriedades e padrões de expressão gênica distintos das células na forma planctônica, as quais incluem as variações fenotípicas na atividade enzimática, composição da parede celular e estrutura de superfície que aumentam a resistência a antibióticos e outros antimicrobianos (REIS et al., 2019).

Tabela 12: Insignificância dos efeitos dos parâmetros (TI; DL e C) envolvidos na fotoinativação do biofilme de *E. coli*, *E. faecalis*, MRSA e multiespécies utilizando as clorinas: CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T e comprimento de onda de 660 e 403 nm. TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz ($J\ cm^{-2}$) e C = concentração ($\mu mol\ L^{-1}$). V = LED vermelho (660 nm) e L= LED violeta (403 nm). *Todos os parâmetros marcados em vermelho ou violeta são estatisticamente insignificantes.

	CHL-OH-A						CHL-Ph-A						CHL-T					
	TI	DL	C	TI*DL	TI*C	DL*C	TI	DL	C	TI*DL	TI*C	DL*C	TI	DL	C	TI*DL	TI*C	DL*C
Biofilme de <i>E. coli</i>																		
V																		
L																		
Biofilme de <i>E. faecalis</i>																		
V																		
L																		
Biofilme de <i>S. aureus</i> resistente à meticilina																		
V																		
L																		
Biofilme Multiespécies																		
V																		
L																		

Devido a isso, apesar de bons resultados utilizando-se o CIP, a TFD-A apresenta várias vantagens sobre ele. A primeira é que TFD-A não apresenta um sítio de ação específico, além de não agir de forma sistêmica como os antibióticos; a segunda é que não há relatos de resistência de bactérias a TFD-A; e por fim, as células ao final da irradiação já estão bem danificadas, impedindo que ocorra a adaptação, uma vez que há fotoxidação da membrana (LAURO et al., 2011; SCHASTAK et al., 2014). As espécies reativas de oxigênio geradas visam estruturas celulares e diferentes vias metabólicas (LAURO et al., 2011; SCHASTAK et al., 2014). Por esse motivo também se faz importante conhecer a constituição celular bacteriana, e com essa finalidade foi realizada a mRaman, bem como as demais microscopias, como MEV e MF para retratar os danos morfoestruturais e danos na membrana.

O conhecimento da constituição bacteriana, possibilita o conhecimento de sua interação com moléculas antimicrobianas, seja antibiótico ou FS. Em TFD-A os principais alvos para inativação bacteriana são os lipídios, as proteínas e os ácidos nucleicos (LIU et al., 2015), como já exposto aqui. Os estudos por espectroscopia mRaman realizados, possibilitaram não só identificar a presença de proteínas, ácidos nucleicos como também apontar a presença, em sua maior parte, de polissacarídeos presentes na matriz polimérica do biofilme, comprovando e mostrando a constituição de um biofilme.

A análise da integridade da membrana celular (bicamada lipídica), um importante alvo da TFD-A, foi realizada por MF utilizando um marcador contido no kit LIVE/DEAD™, por FTIR e também por MEV. As análises foram feitas utilizando-se as melhores condições para fotoinativação obtidas neste estudo. Sabe-se que a TFD-A propicia uma modificação oxidativa da membrana fosfolipídica, podendo ser visualizada a alteração da fluidez e a organização da membrana, bem como a função da proteína de membrana que quando intensa culminam em morte celular (LAGANOWSKY et al., 2014). Foi verificado, pelas imagens obtidas por MF e MEV, não só a falta de integridade da membrana após TFD-A, mas também a eficiência dos FSs para o processo. FTIR contribuiu significativamente para a visualização da banda de peroxidação da bicamada fosfolipídica estando de completo acordo com a MF com uso do kit LIVE/DEAD™.

Um ponto importante a ser observado durante todo o estudo é que não houve a erradicação total dos biofilmes nas condições utilizadas sem a potencialização com KI. A priori, seria utilizado um método, chamado de Metodologia de Superfície de Resposta para a obtenção do ponto ótimo de inativação o qual contribuiria para encontrar os valores ideais de cada parâmetro para 100% de inativação. No entanto durante o processo preliminar (não descrito nesse texto) foi observado que os índices de sobrevivência permaneciam constantes, para todos os modelos de biofilme, e não diminuía quando submetidos a novas condições. Fazendo-se busca por trabalhos semelhantes abordando biofilmes, foi observado que outros autores tiveram problemas em erradicar 100% os biofilmes (SHRESTHA et al., 2012; MANTAREVA et al., 2016; AL-AHMAD et al., 2017; MAMONE et al., 2016; KASHEF et al., 2013; KASHEF et al., 2015; DURABPOUR et al., 2016; SHI et al., 2016; CARMELLO et al., 2017; RONQUI et al., 2016; MANTAREVA et al., 2011; MISBA et al., 2017; DARABPOUR et al., 2017). Sendo assim, tornou-se de extrema importância a tentativa de melhorar a diminuição dos índices de sobrevivência para a concentração celular utilizada.

Potencializar os efeitos oxidativos da TFD-A utilizando-se o iodeto de potássio (KI) foi fundamental e vários autores têm utilizado essa estratégia (VIEIRA et al., 2019; WEN et al., 2017; HUANG et al., 2018a; GHAFARI et al., 2018; HUANG et al., 2018b).

Basicamente, o KI atua de forma sinérgica juntamente com EROs advindas da TFD-A através da formação de espécies reativas de iodo de vida mais longa que a do oxigênio singlete permanecendo ativo mesmo após o tratamento com TFD-A (VECCHIO et al., 2015). Existem duas vias possíveis pelas quais o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pode reagir com o iodeto. A primeira via é explicada pela transferência de um elétron do iodeto para $^1\text{O}_2$ para formar um ânion superóxido e radical iodeto. O radical iodeto se dimeriza formando o iodo molecular o qual reagirá com o iodeto para formar o ânion tri-iodeto. Nesse caso, os radicais de iodo seriam então espécies reativas de vida curta as quais potencializam a morte pela TFD-A. O superóxido formado nessa via sofrerá dismutação formando o peróxido de hidrogênio (WEN et al., 2017). Na segunda via ocorre uma reação de adição entre o $^1\text{O}_2$ e o iodeto para formar o peroxi-iodeto que apresenta tempo de vida curto e é responsável pela morte celular (VECCHIO et al., 2015; WEN et al., 2017; VIEIRA et al., 2019).

Nesse estudo foi mostrado que a adição do sal inorgânico KI juntamente com TFD-A utilizando as clorinas CHL-OH-A; CHL-Ph-A e CHL-T contribuiu significativamente para obtenção dos resultados de fotoinativação, chegando a 100% de morte para os biofilmes de *E. faecalis* e de MRSA, reduzindo-se consideravelmente os índices de sobrevivência para os biofilmes constituídos de *E. coli* e multiespécies.

7. CONCLUSÕES

✓ Nesse estudo, três FSs foram avaliados: CHL-OH-A, CHL-Ph-A e CHL-T. A clorina CHL-OH-A possibilitou uma fotoinativação maior dos biofilmes de *E. coli* seguida de *E. faecalis* e multiespécies enquanto que a CHL-Ph-A foi mais eficiente para o biofilme de *S. aureus* resistente à metilicina para ambos os comprimentos de onda empregados.

✓ A utilização do PFC 2³ para fotoinativação dos biofilmes propiciou nesse estudo, de forma inédita, o entendimento particularizado e aprofundado dos melhores parâmetros (TI, DL e C) bem como seus níveis, suas interações e os efeitos individuais em cada condição.

✓ 40 minutos é o tempo suficiente para penetração das clorinas na estrutura do biofilme e nas bactérias.

✓ MEV foi crucial para visualização da alteração morfológica ocasionada pelos danos fotooxidativos/desestruturantes na parede e membrana celular. As imagens estão de acordo com os resultados da viabilidade celular bem como com a MF que evidenciaram a peroxidação da bicamada lipídica culminando na evasão citoplasmática.

✓ mRaman demonstrou a presença dos biocomponentes estruturais bacterianos como proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios presentes na membrana citoplasmática que são considerados possíveis alvos da TFD-A.

✓ Foi observada a dispersão/desestruturação/perturbação da arquitetura do biofilme, constituída de EPS após TFD-A.

✓ A redução na biomassa dos biofilmes obtida por espectroscopia corroborou os resultados de microscopia e de viabilidade bacteriana, os quais atestam redução dos índices de sobrevivência e de quantidade de EPS.

✓ Ensaios com fibroblastos sugerem que não há seletividade da TFD-A, no entanto, o teste de hemólise de eritrócitos humanos como modelos de membranas eucarióticas, mostrou completa seletividade, ou seja, ausência de cito/fototoxicidade da TFD-A às células. Esses resultados são contraditórios e até o momento não se tem uma explicação para eles.

✓ Comparação com uso de CIP mostrou que o antibiótico é eficiente porém menos que a TFD-A.

✓ A potencialização da TFD-A com KI propiciou os maiores índices de inativação bacteriana obtidos para todos os biofilmes.

8. REFERÊNCIAS

Akanksha, R.; Anamika, T.; Shivangi, S. et al. aBiofilm: a resource of anti-biofilm agents and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance. **Nucleic Acids Res.**, v. 46, p. 894-900, 2018.

Al-Ahmad, A.; Walankiewicz, A.; Hellwig, E. et al. Photoinactivation Using Visible Light Plus Water-Filtered Infrared-A (vis+wIRA) and Chlorine e6 (Ce6) Eradicates Planktonic Periodontal Pathogens and Subgingival Biofilms. **Front Microbiol.**, v. 7, p. 1900, 2017.

Amaral, L. S.; Azevedo, E. B.; Perussi, J.R. The response surface methodology speeds up the search for optimal parameters in the photoinactivation of *E. coli* by photodynamic therapy. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 22, p. 26-33, 2018.

Anderson, D.I; Hughes, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 35, p. 901-911, 2011.

Annunzio, S.R.; Freitas, L.M.; Blanco, A.L. et al. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B.**, v. 178, p. 545-550, 2017.

Ashutosh, K.; Anwar, A.; Mamta, R. et al. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **Int J Med Microbiol.**, v. 307, p. 481-489, 2017.

Bacellar, I.O.L.; Tsubone, T.M.; Pavani, C. et al. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, p. 20523–20559, 2015.

Bemporad, D.; Luttmann, C.; Essex, J.W. Computer simulation of small molecule permeation across a lipid bilayer: dependence on bilayer properties and solute volume, size, and cross-sectional area. **Biophys J.**, v. 87, p. 1-13, 2004.

Canevarolo, J. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Artliber, 2006.

Carmello, J.C.; Alves, F.; Mima, E.G.O. Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and non-*Albicans Candida* species using Phorodithazine®. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 17, p. 194-199, 2017.

Carmichael, J.; Degraff, W.G.; Gazdar, A.F., *et al.* Evaluation of a Tetrazolium-Based Semiautomated Colorimetric Assay - Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Res.**, v.15, n.47, p. 936-42, 1987.

Chang, C.Y. Surface sensing for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Front. Microbiol.**, v.8, 2017.

Coker, M. S.; Forbes, L. V.; Plowman-Holmes, M. et al. Interactions of staphyloxanthin and enterobactin with myeloperoxidase and reactive chlorine species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.646, p. 80-80, 2018.

Costerton, J.W. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 11, n. 3-4, p. 217-21, 1999.

Cramton, S.E.; Gerke, C.; Götz, F. In vitro methods to study *Staphylococcal* biofilm formation. **Methods to study Staphylococcal biofilms**, v. 336, n. 1, p. 239-255, 2001.

Cronan, J.E.; Gelmann, E.P. Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. **Bacteriol. Rev.**, v. 39, n. 3, p. 232–256, 1975.

Darabpour, E.; Kashef, N.; Mashayekhan, S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 14, p. 211-7, 2016.

Darabpour, E.; Kashef, N.; Amini, S. M. et al. Fast and effective photodynamic inactivation of 4-day-old biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using methylene blue-conjugated gold nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 37, p. 134-140, 2017.

Deighton, M.A.; Capstick, J.; Domalewski, E.; et al. Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. **Methods in enzymology**, v. 336, n. 1, p. 177-195, 2001.

Dhanalekshmi, K. I.; Magesan, P.; Sangeetha, K.; et al. Preparation and characterization of core-shell type Ag@SiO₂ nanoparticles for photodynamic cancer therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, 2019.

Dohmen, P.M. Antibiotic resistance in common pathogens reinforces the need to minimize surgical site infections. **J Hosp Infect**, v. 70 suppl 2: p. 15-20, 2008.

Dong, Pu-Ting; Mohammad, H.; Hui, J. et al. Photolysis of Staphyloxanthin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Potentiates Killing by Reactive Oxygen Species. **Adv. Sci.**, 2019.

Dropa, M. Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de B-lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.

Dzidic, S.; Bedekovic, V. Horizontal gene transfer emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Aca. Pharmacol. Sin**, v. 24, n.6, p.519-526, 2003.

Ernst, R.; Ejsing, C. S.; Antonny, B. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids. **J. Mol. Biol.**, v. 428, n. 24, p. 4776–4791, 2016.

Fazli, M.; Almblad, H.; Rybtke, M.L.; Givskov, M.; Eberl, L., e Tolker-Nielsen, T. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol.*, v. 16, p. 1961–1981, 2014.

Flemming, H.; Wingender, J.; Szewzyk, U. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol.**, v. 14, 2016.

Freeman, J.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. **J Clin Pathol.**, v.42, p. 872-874, 1989.

Freshney, R.I. Culture of animal cells. New York: Wiley-Liss Inc; 1994. 486p 113. Denizot F, Lang R. Rapid Colorimetric Assay for Cell-Growth and Survival - Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability. **J Immunol Methods.**, v.89, n.2, p.271-7, 1986.

Ghaffari, S.; Sarp, A. S. K.; Lange, D.; *et al.* Potassium iodide potentiated photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* using Toluidine Blue: Comparative analysis and post-treatment biofilm formation study. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 24, p. 245-249, 2018.

Guilhen, C.; Forestier, C.; Balestrino, D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. **Mol Microbiol.**, v.105, n.2, p.188-210, 2017.

Gonçalves, J.L.S. Caracterização físico-química e fotodinâmica de fotossensibilizadores: efeito da modificação química para aumentar a solubilidade em meio aquoso. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. doi:10.11606/T.75.2015.tde-29062015-153459, 2015.

Gruszecki, W.I. ; Strzałka, K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.**, v. 1740, n. 2, p. 108–115, 2005.

Hamblin, M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Curr Opin Microbiol.**, v. 33, p. 67–73, 2016.

Hamblin, M.R. Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation by inorganic salts. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v. 15, n.11, p. 1059-1069, 2017.

Heilmann, C.; Gerke, C.; Perdreau-Remington, F.; *et al.* Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 277-282, 1996.

Heger, M.; van Golen, R.F.; Broekgaarden, M. et al. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. **Pharmacol Rev.**, v. 66, p. 222-307, 2014.

Hoiby, N.; Ciofu, O.; Johansen, H.K., et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **Int J Oral Sci.**, v. 3, p. 55-65, 2011.

Huang, L.; Dai, T.; Hamblin, M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. **Methods Mol Biol.**, v. 635, p. 155–73, 2010.

Huang, L.; Bhayana, B.; Xuan, W.; *et al.* Comparison of two functionalized fullerenes for antimicrobial photodynamic inactivation: Potentiation by potassium iodide and photochemical mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 186, p. 197-206, 2018a.

Huang, L.; El-Hussein, A.; Xuan, W.; *et al.* Potentiation by potassium iodide reveals that the anionic porphyrin TPPS4 is a surprisingly effective photosensitizer for antimicrobial photodynamic inactivation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 179, p. 277-286, 2018b.

Ivleva, N.P.; Wagner, M.; Horn, H. et al. Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy. **Anal Bioanal Chem.**, v. 393, p. 197–206, 2009.

Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc.** p. 1-5, 2017.

Jori, G.; Fabris, C.; Soncin, M. et al., Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, p. 468-481, 2006.

Kaplan, J.B.; Ramasubbu, N. Role of activesite residues of dispersin B, a biofilm-releasing b-hexosaminidase from a periodontal pathogen, in substrate hydrolysis. **Febs J.**, v. 274, p. 5987–5999, 2010.

Kashef, N.; Akbarizare, M.; Kamrava, S.K. Effect of sub-lethal photodynamic inactivation on the antibiotic susceptibility and biofilm formation of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 10, p. 368-73, 2013.

Kashef, N.; Borgheu, Y.S.; Djavid, G.E. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. **Photodiagnosis Photodyn.Ther.**, v.10, p. 150-155, 2013.

Kashef, N.; Karami, S.; Djavid, G.E. Phototoxic effect of hypericin alone and in combination with acetylcysteine on *Staphylococcus aureus* biofilms. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 12, p. 186-92, 2015.

Kashef, N.; Ying-Ying, H. and Hamblin, M.R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for relapsed or refractory mycosis fungoides: A systemic review. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 17, p. 87-91, 2017.

Kasnowski, M.C; Mantilla, S.P.S., Oliveira, L.A.T., et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.**, p. 1679-7353, 2010.

Kawczyk-Krupka, A.; Pucelik, B.; Miedzybrodzka, A. *et al.* Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 23, p. 132-143, 2018.

Keren, I.; Minami, S.; Rubin, E. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persists. **MBio**, v. 2, 2011.

Khatoon, Z.; McTiernan, C. D.; Suuronen, E. J. *et al.* Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, v.4, n, 12, 2018.

Kim, S.M.; Park, J.H.; Lee, H.S.; *et al.* LuxR homologue smcr is essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis and biofilm detachment, and its expression is induced by host cells. **Infect Immun.**, v. 81. P. 3721–3730, 2013.

Kobayashi, K. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 4920–4931, 2007.

Kohanski, M.A.; Depristo, M.A.; Collins, J.J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. **Mol Cell**, v. 37, n.3, p. 311-20, 2010.

Kroukamp, O.; Dumitrache, R.G.; Wolfaardt, G.M. Pronounced effect of the nature of the inoculum on biofilm development in flow systems. *Appl Environ Microbiol.*, v. 76, n.18, p.6025-31, 2010.

Kurek, A.; Grudniak, A.M.; Kraczkiewicz-Dowjat, A. et al. New antibacterial therapeutics and strategies. **Pol J Microbiol.**, v.60, n.1, p.3-12, 2011.

Laganowsky, A.; Reading, E.; Allison, T.M. et al. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. **Nature**, v. 510, p. 172-175, 2014.

Lauro FM, Pretto P, Covolo L, Jori G, Bertoloni G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. **Photochem Photobiol Sci.**, v. 1, p. 468-470, 2011.

Lee, J.; Bae, Y.; Han, A.; *et al.* Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 707-714, 2016.

Lewis, K. Persister cells. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 64, p. 357–372, 2010.

Linares, I.A.P.; Oliveira, K.T.; Perussi, J.R. Chlorin derivatives sterically-prevented from self-aggregation with high antitumor activity for photodynamic therapy. **Dyes and Pigments**, v. 145, p. 518-527, 2017.

Liu, Y.; Zaat, S.; Breukink, E. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, v.1, p. 140-167, 2015.

Lowery, C.A.; Dickerson, T.J.; Janda, K.D. Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. **Chem Soc Rev.**, v. 37, p. 1337–1346, 2008.

Ma, W.; Wang, T.; Zang, L.; et al. Bactericidal effects of hematoporphyrin monomethyl ether-mediated blue-light photodynamic therapy against *Staphylococcus aureus*. **Photochem Photobiol Sci.**, v. 18, n. 1, p. 92-97, 2019.

Mamone, L.; Ferreyra, D.D.; Gándara, L. *et al.* Photodynamic inactivation of planktonic and biofilm growing bacteria mediated by a meso-substituted porphyrin bearing four basic amino groups. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 161, p. 222-229, 2016.

Mantareva, V.; Angelov, I.; Kussovski, V. Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. **Eur J Med Chem.**, v. 46, p. 4430-40, 2011.

Mantareva, V.; Kussovski, V.; Durmuş, M. et al. Photodynamic inactivation of pathogenic species *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* with lutetium (III) acetate phthalocyanines and specific light irradiation. **Lasers Med Sci.**, v. 31, p. 1591-1598, 2016.

Misba, L.; Zaidi, S.; Khan, A.U. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 18, p. 24-33, 2017.

Mohammad, P.; Jesse, G. Altered biofilm formation at plasma bonded surfaces in microchannels studied by attenuated total reflection infrared spectroscopy. **Surface Science**, v. 676, p. 56-60, 2018.

Morar, M.; Whidht, G.D. The Genomic enzymology of antibiotic resistance. **Annu Rev Genet.**, v. 44, p. 25-51, 2010.

Moretro, T.; Hermansen, L.; Holck, A.L.; *et al.* Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5648-5655, 2003

Moritz, M.N.O.; Gonçalves, J.L.S.; Linares, I.A.P. et al. Semi-synthesis and PDT activities of a new amphiphilic chlorin derivative. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 17, p. 39-47, 2017.

Moritz, M.N.O.; Rossa, C.; Oliveira, K.T. Phototoxicity in a laryngeal cancer cell line enhanced by a targeting amphiphilic chlorin photosensitizer. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 19, p. 355-362, 2017.

Murador, P. D. E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.29, n.2, p. 168-178, 2007.

Nagata, J.Y.; Hioka, N.; Kimura, E. et al., Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 9, p. 122-131, 2012.

Oliveira, F.S.S.; Giana, H.E.; Silveira, J.L. Discrimination of selected species of pathogenic bacteria using near-infrared Raman spectroscopy and principal components analysis. **J Biomed Opt.**, v. 17, p.10, 2012.

Oniszcuka, A.; Wojtunik-Kulesza, K.A.; Oniszcuk, T. et al. The potential of photodynamic therapy (PDT) -Experimental investigations and clinical use. **Biomed. Pharmacother.**, v. 83, p. 912–929, 2016.

Ormond, A.; Freeman, H. Effects of substituents on the photophysical properties of symmetrical porphyrins. **Dyes and Pigments**, v. 96, p. 440-448, 2013.

Pandey, S.; Sahukhal, G.S.; Elasri, M.O. The msaABCR Operon Regulates the Response to Oxidative Stress in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.*, v. 4; n. 21, 2019.

Pelz, A.; Wieland, Karsten-Peter; Putzbach, K. *et al.* Structure and Biosynthesis of Staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. **J Biol Chem.**, v.280, n.37, p.32493-8, 2005.

Pereira, A. H. C.; Pinto, J. G.; Freitas, M. A. A.; et al. Methylene blue internalization and photodynamic action against clinical and ATCC *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 22, p. 43-50, 2018.

Perez-Lopes, M. I.; Mendez-Reina, R.; Trier, S., *et al.* Variations in carotenoid content and acyl chain composition in exponential, stationary and biofilm states of *Staphylococcus aureus*, and

their influence on membrane biophysical properties. **Biochim Biophys Acta Biomembr.**, v. 1861, n.5, p. 978-987, 2019.

Percival, S.L.; Malic, S.; Cruz, H. *et al.* Introduction to biofilms. Biofilm. **Vet Med.**, v. 6, p. 41–68, 2011.

Perussi, J. R.; Imasato, H.; Bagnato, V.S. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Novas técnicas ópticas para área da saúde**. São Paulo: Livraria da Física; p. 161-84, 2008.

Petrova, O.E.; Sauer, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. **Curr Opin Microbiol.**, v.30, p. 67–78, 2016.

Pousti, M., Joly, M., Roberge, P., *et al.* Linear Scanning ATR-FTIR for Chemical Mapping and High-Throughput Studies of *Pseudomonas* sp. Biofilms in Microfluidic Channels. **Anal Chem.**, v. 18, p. 14475-14483, 2018.

Quatrini, C. T.; Blanco, K. C.; Soares, J. M. Photodynamic inactivation for in vitro decontamination of *Staphylococcus aureus* in whole blood. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, 2019.

Reis, A.C.M; Regis, W.F.M.; Rodrigues, L.K.A. Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy: An alternative approach for reducing cariogenic bacteria. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 26, p. 179-189, 2019.

Rendueles, O. e Ghigo, J.M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36, p. 972-89, 2012.

Rittmann, B.E. Biofilms, Active substrata, and me. **Water Res.**, 2017.

Ronqui, M.R.; de Aguiar Coletti, T.M.; de Freitas, L.M. *et al.* Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. **J Photochem Photobiol B.**, v. 158, p. 122-9, 2016.

Seidler, M. J.; Salvenmoser, S.; Muller, F. C. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrob. agents chemother.**, p. 4130–4136, 2008.

Seidler, M. J.; Salvenmoser, S.; Muller, F. C. *In vitro* effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.28, p. 568–573, 2006.

Schastak, S.; Ziganshyna, S.; Gitter, B. et al. Efficient photodynamic therapy against gram-positive and gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength. **PLoS One**, v. 5, p. 11674, 2014.

Shi, H.; Li, J.; Zhang, H. et al. Effect of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms: An in vitro study. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 15, p. 40-5, 2016.

Shrestha, A.; Hamblin, M.R.; Kishen, A. Characterization of a Conjugate between Rose Bengal and Chitosan for Targeted Antibiofilm and Tissue Stabilization Effects as a Potential Treatment of Infected Dentin. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 56, p. 4876-4884, 2012.

Sleytr, U.B. Basic and applied S-layer research: an overview. **FEMS Microbiol Rev**, v. 20, p. 5-12, 1997.

Smith, D.W.H.; Walker, D.; Mannhold, R. et al. Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design. 3 ed: Wiley Verlag; p.268, 2012.

Smith, J. e Fratâmico, P. M. Factors involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. **J Food Prot.**, v.58, p.696-708, 1995.

Solano, C.; Echeverez, M.; Lasa, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Curr Opin Microbiol.**, v.18, p.96–104, 2014.

Spring, B.Q.; Rizvi, I.; Xu, N. et al. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 14, p. 1476–1491, 2015.

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, G. *et al.* Biofilms as complex differentiated Communities. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 187–209, 2002.

Sturme, M.H.J.; Kleerebezem, M.; Nakayama, J. *et al.* Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. **Anton Van Leeuw.**, v. 81, p. 233–243, 2002.

Suresh, M. K.; Biswas, R.; Biswas, L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Int. J. Med.**, v. 309, n, I, p. 1-12, 2019.

Svara, F.; Rankin, D.J. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. **BMC Evol Biol.**, v.11, n.1, p.130, 2011.

Tavares, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos. São Paulo. Atheneu; 2001.

Thoendel, M., and Horswill, A.R. Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. **Adv Appl Microbiol.**, v. 71, p. 91–112, 2010.

Tormo, M.A.; Knecht, E.; Götz, F.; *et al.* Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer. **Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 2465-2475, 2005.

Tsai, T.; Yang, Y.T.; Wang, T.H. *et al.* Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. **Lasers Surg. Med.**, v. 41, p. 316-322, 2009.

Waters, C.M.; Bassler, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v.21, p. 319–346, 2005.

Wang, H.; Ding, S.; Wang, G., et al. In situ characterization and analysis of Salmonella biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. **Int. j. food microbial.**, v. 167, p. 293-302, 2013.

Wen, X.; Zhang, X.; Szewczyk, G.; *et al.* Potassium iodide potentiates antimicrobial photodynamic inactivation mediated by Rose Bengal: in vitro and in vivo studies. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 27, p. 61-67, 2017.

Wiesch, P.A.; Kouyos, R.; Engelstadter, J. *et al.* Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. **Lancet infect dis.**, v. 11, n.3, p.236-47, 2011.

Wolska, K.I.; Grudniak, A.M.; Rudnicka, Z.; Markowska, K. Genetic control of bacterial biofilms. **J Appl Genet.**, v. 57. p. 225–238, 2016.

Uenojo, M.; Maróstica, J.; Roberto, M. *et al.* Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v.30, n.3, p. 616-622, 2007.

Vecchio, D.; Gupta, A.; Huang, L.; *et al.* Bacterial Photodynamic Inactivation Mediated by Methylene Blue and Red Light Is Enhanced by Synergistic Effect of Potassium Iodide. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, n. 9, p. 5203-5212, 2015.

Vieira, C.; Santos, A.; Mesquita, M. Q. *et al.* Advances in aPDT based on the combination of a porphyrinic formulation with potassium iodide: Effectiveness on bacteria and fungi planktonic/biofilm forms and viroes. **J. Porphyrins Phthalocyanines**, v. 23, p. 1–12, 2019.

Visick, J.E.; Clarke, S. Repair, refold, recycle: How bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. **Mol Microbiol.**, v. 16, p. 835-845, 1995.

Yi-Hsuan, H.; Jun-Hui, Z.; Wen-Ching, C., *et al.* An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on *Candida albicans*. **Int J Mol.**, v.2, p. 19-24, 2018.

Zhang, Y. Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. **Emerg Microbes Infect.**, v. 3 , 2014.