

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

### RESUMO

ZANGIROLAMI, A. C. **Inativação fotodinâmica aplicada a biofilmes de *S. aureus* formados em tubo endotraqueal**. 2018. 145 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

As infecções bacterianas têm atingindo o ser humano por diversos caminhos e sua resistência a antimicrobianos crescendo cada vez mais. A capacidade dos microorganismos formarem biofilme em superfícies que podem afetar diretamente a saúde do homem. A formação de biofilme microbiano pode ocorrer em superfícies como em tubos de água, ar condicionado, dispositivos médicos como endoscópios, cateteres e tubos endotraqueais (TE). Pacientes debilitados por causas diversas situações como traumas, estado de inconsciência (coma) e insuficiência respiratória podem ser portadores do TEH. Este tubo é instalado na traqueia e facilita a troca gasosa no organismo debilitado. Na superfície deste tubo endotraqueal, células bacterianas, gram positivas ou negativas, podem se anexar e formar colônias, desenvolvendo assim um biofilme neste tubo. Essas células formam uma matriz extra polimérica (EPS) que protege as colônias contra agentes externos. A Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) pode ocorrer entre 48 a 72h após a instalação deste tubo no paciente. A principal bactéria que causa esta pneumonia é a gram positiva, o *Staphylococcus aureus* a qual apresenta linhagens resistentes a antibióticos. A resistência microbiana é um problema de adaptação das células microbianas a agentes antimicrobianos de prática clínica. Uma das estratégias para combater as infecções hospitalares é a inativação fotodinâmica. A terapia utiliza três componentes: molécula fotossensível, luz e oxigênio celular. O fotossensibilizador, na presença da luz e oxigênio celular podem formar espécies reativas de oxigênio que levam a célula a morte. Não existe relatos que esta opção de terapia cause a resistência microbiana, sendo assim uma alternativa ao insucesso de alguns antibióticos. A curcumina, derivada da *Curcuma longa* é uma molécula natural, hidrofóbica e que apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias e antitumorais com absorção de luz na região de 430 nm. Este estudo combina o uso da inativação fotodinâmica associada a molécula de curcumina para tratamentos de biofilme de *S. aureus* desenvolvidos em TE.

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

### INTRODUÇÃO

As bactérias são um dos seres vivos mais antigos no planeta, logo tiveram inúmeras evoluções para perpetuarem a espécie e sobreviverem. As bactérias utilizam vários mecanismos para sobreviver e se proteger contra defesas dos hospedeiros. Apresentam como mecanismos de patogenicidade apêndices como cílios e flagelos para locomoção e anexação em uma superfície podendo liberar fatores de virulência tóxicos para o hospedeiro como homem e animais. Devido a sua alta capacidade de adquirir

resistência contra fatores externos prejudiciais às células, as bactérias podem se adaptar a fatores diversos e povoar lugares diversos como mares, rochas, árvores, telhado de uma casa, mesa de jantar, maca em centro cirúrgico ou até mesmo em materiais médicos instalados em pacientes.

As bactérias possuem a capacidade de se instalar em superfícies estáveis e formarem colônias que pode dar origem aos biofilmes microbianos. Os biofilmes são comunidades de micro-organismos aderidos a uma superfície e entre si e cobertas por uma matriz extracelular polimérica que confere estabilidade contra agentes externos como temperatura e pH. Por isso, os micro-organismos em biofilmes estão associados a infecções onde há superfícies de materiais como sonda, cateter e implantes, principalmente em hospitais em Unidade de Tratamento Intensivo (UTIs).

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

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

O uso da TFD tem registro desde de 1900 quando um cientista descreveu sobre o efeito do corante acridina sob o protozoário *Paramecia* na presença da luz solar.(2) Três componentes são necessários para a aplicação da TFD: luz, molécula fotossensível e oxigênio celular. A molécula fotossensível chamada fotossensibilizador (FS) é irradiado em um comprimento de onda ideal para a absorção da luz na molécula fotossensível. Os elétrons que estão no nível fundamental da molécula do FS recebem esses fótons e passam para o estado excitado. No decaimento destes elétrons eles podem ir para o estado tripleto e ocorrer dois tipos de reações que ocorrem por transferência de energia (1) ou compartilhamento de elétrons. (2) O produto da reação do tipo 1 compartilha elétrons origina espécies reativas de oxigênio. Na reação do tipo 2, a transferência de energia é dada ao oxigênio presente na célula, originando o oxigênio singleto. Estas espécies de produtos são citotóxicas e podem levar a célula a morte. O FS pode ser aplicado de forma tópica ou sistêmica sob a lesão, tecido ou em um local a ser fotossensibilizado. O tempo de interação entre o FS e o local tratado é chamado de tempo de incubação. Neste tempo a molécula entra nas células desejadas, para que quando a luz for irradiada, o efeito ocorra dentro das células e as mesmas sejam mortas. Estudos relatam que o FS é atraído para o tecido com maior atividade celular.(3) As células tumorais que apresentam alta taxa metabólica apresenta uma afinidade do FS.

Normalmente, em células microbianas, o acesso é tópico, o FS é aplicado sob a contaminação desejada.

A curcumina é um pigmento de coloração alaranjada, hidrofóbica e fotossensível, com uma maior absorção no espectro visível na região do azul, aproximadamente em 430 nm. Neste estudo, a curcumina foi escolhida para o estudo como o principal FS utilizado para a inativação do biofilme de *S. aureus*. A luz azul, por ter um menor comprimento de onda atinge camadas mais superficiais de uma amostra ou mesmo de um tecido. A proposta deste estudo foi associar a TFD em biofilmes microbianos presentes em tubos endotraqueais com o objetivo de desestruturá-los além de causar a morte de bactérias. A dissertação foi dividida em quatro capítulos devido a variabilidade de experimentos realizados com diferentes formulações, otimização da TFD, entrega do FS e para uma melhor apresentação dos resultados e discussões de cada etapa do trabalho. Esta característica para o trabalho é importante devido a aplicação do projeto.

## CONCLUSÃO

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

Soluções preparadas com tween 80 e Pluronio com curcumina foram citotóxicos no escuro em biofilme de *S. aureus*.

- Solução de curcumina natural em baixas concentrações inativou 100% das células de *E. coli*;
- Solução de curcumina sintética foi tve resultados melhores para inativação do biofilme de *S. aureus*;
- CSS foi a curcumina que teve melhores resultados de inativação, com redução de 92% de células com melhor grupo testado com os parâmetros: concentração de 1,25 mg/mL, 2h de incubação e com uma dose de energia de 50 J/cm<sup>2</sup>.
- O uso do sonificador acoplado a TFD reduziu 100% as células do biofilme de *S. aureus*;
- O planejamento experimental indicou que a dose de luz, seguida pelo tempo de incubação e concentração de FS são as variáveis que mais influenciaram neste experimento.
- Por análises no Origin<sup>®</sup> foi possível traçar modelos de curvas de crescimento entre os grupos testados;
- Através dos testes de cinética entre os grupos controle e teste observou-se uma diferença no comportamento de crescimento entre as curvas;
- Não houve formação do halo na placa de Petri contaminada;
- Tubo nebulizador com curcumina reduziu aproximadamente 76% das células bacterianas em 6h de formação do biofilme;
- CSV nebulizada no tubo nas concentrações de 3 e 8 mg/mL evitaram a anexação de aproximadamente 90% das células de *S. aureus*;

- No 2º planejamento experimental, a dose de luz irradiada na amostra foi a variável mais influente nos resultados da inativação celular;
  - Melhor resultado foi com 55 minutos de nebulização e 80 J/cm<sup>2</sup>, com redução celular de aproximadamente 87%.
- No 3º planejamento experimental, o tempo de nebulização na amostra foi a variável mais influente nos resultados da inativação celular;
- Houve correlações entre os dados preditos e experimentais estudados pelo programa Estatística;
  - Melhor resultado foi com 55 minutos de nebulização e 80 J/cm<sup>2</sup>, com redução celular de aproximadamente 90%.
- Conseguiu-se sintetizar ambas porfirinas e obter um rendimento razoável para que os experimentos ocorressem.
- Os testes de estabilidade otimizaram o tempo de reação e concluiu-se que o DMSO era o melhor solvente uma vez que não alterou macroscopicamente a estrutura do tubo.
- Através de testes prévios e reações testadas conseguiu-se otimizar as reações para que a imobilização de moléculas fotossensíveis ocorresse. A otimização foi alcançada variando-se temperatura, tempo de reação, concentração dos FS e retirando o oxigênio da reação.
- Verificou-se que com a ligação do tubo a etilenodiamina ocorria oxidação ou liberação de HCl uma vez que a cor do tubo passava de transparente para preto.
- A análise dos espectros de IR e UV-Vis não se concluiu se ocorreu ligação entre o tubo e a 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil) porfirina, sendo necessário futuramente caracterizar utilizando outras técnicas.
- Pela análise dos espectros de IR e UV-Vis foi possível concluir que aparentemente a reação entre o tubo de PVC e curcumina ocorreu.

Através dos testes in vitro o tubo funcionalizado com curcumina reduziu aproximadamente 75% das células bacterianas.

## REFERÊNCIAS

- 1 Carmona-Vargas, C.C.; Alvez, L.; et al. Combining batch and continuous flow setups in the end-to-end synthesis of naturally occurring curcuminoids. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 2, p. 366–374, 2017.
- 2 Simplicio, F.; Maionchi, F.; et al. Divulgação. **Quim Nova**, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002.
- 3 Issa, M.C.A.; Manela-Azulay, M. Terapia fotodinâmica: Revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.
- 4 Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711–745, 1995.
- 5 Davey, M.E.; O’toole, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.

- 6 Lindsay, D.; Holy, A. von Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 4, p. 313–325, 2006.
- 7 Loosdrecht, M.C. van; Lyklema, J.; et al. Influence of interfaces on microbial activity. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 1, p. 75–87, 1990.
- 8 Flemming, C A Palmer R J Arrage, A A van der mei, H.C.; White, D.C. Cell surface physicochemistry alters biofilm development of pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide mutants. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 13, n. 3, p. 213–231, 1998.
- 9 Donlan, R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.
- 10 Zottola, E.A.; Sasahara, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry- Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–148, 1994.
- 11 Boyd, a; Chakrabarty, A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: role of the alginate exopolysaccharide. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, p. 162–168., 1995.
- 12 James, G. MINIREVIEW Biofilms , the Customized Microniche. v. 176, n. 8, p. 2137–2142, 1994.
- 13 Stoodley, P.; Lewandowski, Z.; et al. Liquid Flow in Biofilm Systems Liquid Flow in Biofilm Systems. v. 60, n. 8, p. 2711–2716, 1994.
- 14 Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; et al. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.
- 15 Hall-Stoodley, L.; Stoodley, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 7–10, 2005.
- 16 Exner, M.; Kramer, A.; et al. Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. **American Journal of Infection Control**, v. 33, n. 5 SUPPL. 1, p. 26–40, 2005.
- 17 MacKay, W.G.; Leanord, A.T.; et al. Water, water everywhere nor any a sterile drop to rinse your endoscope. **Journal of Hospital Infection**, v. 51, n. 4, p. 256–261, 2002.
- 18 Nelson, D.B. Recent advances in epidemiology and prevention of gastrointestinal endoscopy related infections. **Curr Opin Infect Dis**, v. 18, n. 4, p. 326–330, 2005.
- 19 Vickery, K.; Pajkos, A.; et al. Removal of biofilm from endoscopes: Evaluation of detergent efficiency. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 3, p. 170–176, 2004.
- 20 Tredget, E.E.; Shankowsky, H.A.; et al. Pseudomonas infections in the thermally injured patient. **Burns**, v. 30, n. 1, p. 3–26, 2004.
- 21 Bennett, R.W. Atypical Toxigenic Staphylococcus and Non-Staphylococcus aureus Species on the Horizon? An Update. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1123–1126, 1996.

- 22 Bergdoll, M.S.; Reiser, R.F.; et al. a New Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin F, Associated With Toxic-Shock-Syndrome Staphylococcus Aureus Isolates. **The Lancet**, v. 317, n. 8228, p. 1017–1021, 1981.
- 23 Gómez, M.I.; Lee, A.; et al. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 842–848, 2004.
- 24 Lowy, F. the chromosome, as well as the extrachromosomal elements. 6 These genes are transferred between staphylococcal strains, species, or other gram-positive bacterial species through the extrachromosomal elements. 7. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520–532, 1998.
- 25 Pav, D. Pneumonia associada à ventilação mecânica. n. 5,
- 26 Engoren, M. Lack of association between atelectasis and fever. **Chest**, v. 107, n. 1, p. 81–84, 1995.
- 27 Zeitoun, S.S.; Barros, A.L.B.L. de; et al. Incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes submetidos à aspiração endotraqueal pelos sistemas aberto e fechado: estudo prospectivo - dados preliminares. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 46–52, 2001.
- 28 Teixeira, P.J.Z.; Hertz, F.T.; et al. Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 6, p. 540–548, 2004.
- 29 Frimer, A.A. The Reaction of Singlet Oxygen with Olefins: The Question of Mechanism. **Chemical Reviews**, v. 79, n. 5, p. 359–387, 1979.
- 30 Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1–18, 1997.
- 31 Machado, A.D.H. Relativa Ao Estado Fundamental. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- 32 Ogilby, P.R.; Foote, C.S. Chemistry of Singlet Oxygen. 42. Effect of Solvent, Solvent Isotopic Substitution, and Temperature on the Lifetime of Singlet Molecular Oxygen ( $^1\delta g$ ). **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 11, p. 3423–3430, 1983.
- 33 Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., Peng, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.
- 34 Hamblin, M.R.; Luke Newman, E. New trends in photobiology. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–8, 1994.
- 35 Jones, L.R.; Grossweiner, L.I. Singlet oxygen generation by Photofrin® in homogeneous and light-scattering media. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 26, n. 3, p. 249–256, 1994.
- 36 Jori, G.; Schindl, L.; et al. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized processes in vivo. **Journal of**

**Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 101–107, 1996.

37 Spikes, J.D. Phthalocyanines As Photosensitizers in Biological Systems and for the Photodynamic Therapy of Tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 43, n. 6, p. 691–699, 1986.

38 Rosenthal, I. Phthalocyanines As Photodynamic Sensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 6, p. 859–870, 1991.

39 Gold, M.H.; Bradshaw, V.L.; et al. Split-face comparison of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone for photodamage. **Dermatologic Surgery**, v. 32, n. 6, p. 795–801, 2006.

40 Futsaether, C.M.; Kjeldstad, B.; et al. Intracellular pH changes induced in *Propionibacterium acnes* by UVA radiation and blue light. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 31, n. 3, p. 125–131, 1995.

41 Touma, Dany J.; Gilchrest, B.A. Topical photodynamic therapy: A new tool in cosmetic dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p. 124–130, 2003.

42 Scientific, E.; Ireland, P.; et al. *Cancer Letters*, 24 (1984) 291-- 297. v. 24, 1984.

43 Reddi, E. Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 37, n. 3, p. 189–195, 1997.

44 Goldstein, J.L.; Brown, M.S.; et al. ENDOCYTOSIS : Concepts Receptor System. **Receptor**, p. 1–39, 1985.

45 Zhang, X.; Rodgers, M.A.J. Energy and electron transfer reactions of the MLCT state of ruthenium tris(bipyridyl) with molecular oxygen: A laser flash photolysis study. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 34, p. 12797–12803, 1995.

46 Song, I.S.; Cha, J.S.; et al. Characterization, in Vivo and in Vitro Evaluation of Solid Dispersion of Curcumin Containing d- $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate and Mannitol. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 10, 2016.

47 Pulido-Moran, M.; Moreno-Fernandez, J.; et al. Curcumin and health. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 1–22, 2016.

48 Kharat, M.; Du, Z.; et al. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1525–1532, 2017.

49 Ammon, H.P.; Wahl, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta medica**, v. 57, n. 1, p. 1–7, 1991.

50 Mondal, S.; Ghosh, S.; et al. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, 2016.

51 Li, M.; Ngadi, M.O.; et al. Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. **Food Chemistry**, v. 165, p. 29–34, 2014.

52 Kim, Y.J.; Lee, H.J.; et al. Optimization and validation of high-performance liquid

- chromatography method for individual curcuminoids in turmeric by heat-refluxed extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10911–10918, 2013.
- 53 Priyadarsini, K.I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.
- 54 Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; et al. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.
- 55 Yao, M.; Xiao, H.; et al. Delivery of Lipophilic Bioactives: Assembly, Disassembly, and Reassembly of Lipid Nanoparticles. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 53–81, 2014.
- 56 Kim, J.E.; Kim, A.R.; et al. In vitro peroxynitrite scavenging activity of diarylheptanoids from *Curcuma longa*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 481–484, 2003.
- 57 Wang, Y.J.; Pan, M.H.; et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867–1876, 1997.
- 58 Vajragupta, O.; Boonchoong, Preechar Berline, L.J. Manganese Complexes of Curcumin Analogues: Evaluation of Hydroxyl Radical Scavenging Ability, Superoxide Dismutase Activity and Stability towards Hydrolysis. **Free Radical Research**, v. 38, n. 3, p. 303–314, 2004.
- 59 Environment, H.; Island, R. Curcumin - Biological and medicinal properties — Biological and 10 Curcumin Medicinal Properties. n. May 2016, 2006.
- 60 Phase I clinical trial of curcumin , a chemopreventive agent , in patients with high-risk or pre-malignant lesions. n. January 2017, 2000.
- 61 Hosseini, A.G. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 84–97, 2015.
- Souza, L.M. (2015). Fotossensibilizadores no controle de larvas do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).
- Silva, A.P. (2017). Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica.
- 64 Perussi, J.R. Inativação Fotodinâmica de microrganismos. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.
- 65 Ceri, H.; Olson, M.E.; et al. The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771, 1999.
- 66 Tiba, M.R.; Nogueira, G.P.; et al. Estudo dos fatores de virulência associados ?? forma????o de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 58–62, 2009.
- 67 Gordon, O.N.; Luis, P.B.; et al. Oxidative Transformation of Demethoxy- and



Bisdemethoxycurcumin: Products, Mechanism of Formation, and Poisoning of Human Topoisomerase II $\alpha$ . **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 989–996, 2015.

68 Rosa, L.P.; Silva, F.C. da; et al. Application of photodynamic therapy, laser therapy, and a cellulose membrane for calcaneal pressure ulcer treatment in a diabetic patient: A case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, n. October 2016, p. 235–238, 2017.

69 Liu, C.-H.; Leea, W.-S.; et al. Photodynamic inactivation against *Pseudomonas aeruginosa* by curcumin microemulsions. **Royal Society Advances**, v. 6, p. 63013–63022, 2016.

70 Singh, R.; Hjorth Tønnesen, H.; et al. The influence of Pluronic® on dark cytotoxicity, photocytotoxicity, localization and uptake of curcumin in cancer cells: studies of curcumin and curcuminoids XLIX. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 12, n. 3, p. 559–575, 2013.

71 Correa, J.C.; Bagnato, V.S.; et al. Previous Illumination of a Water Soluble Chlorine Photosensitizer Increases Its Cytotoxicity 1. v. 22, n. 9, p. 1387–1394, 2012.

72 Oliveira, K.T. De; Souza, J.M. De; et al. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310–335, 2015.

73 Romanko, Y.S.; Tsyb, A.F.; et al. Effect of photodynamic therapy with photodithazine on morphofunctional parameters of M-1 sarcoma. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 138, n. 6, p. 584–589, 2004.

74 CORREA, J.C. Fotodegradação do photoditazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser. p. 114, 2006.

75 Quishida, C.C. ampo. C.; Carmello, J.C. abrin.; et al. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 2, p. 685–694, 2015.

76 Dovigo, L.N.; Carmello, J.C.; et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. **Biofouling**, v. 29, n. 9, p. 1057–1067, 2013.

Sonitech (2018). Sonificador.

78 Coleman, D.E.; Montgomery, D.C. A systematic approach to planning for a designed industrial experiment. **Technometrics**, v. 35, n. 1, p. 1–12, 1993.

79 Blanco, K.C.; Inada, N.M.; et al. Treatment of recurrent pharyngotonsillitis by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 138–139, 2017.

80 Reis, E. **Estatística descritiva**. 2008.

Action, P. Diagrama de Pareto.

82 Piyasena, P.; Mohareb, E.; et al. Inactivation of microbes using ultrasound: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 207–216, 2003.

83 McClements, D.J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 9, p. 293–9, 1995.

84 Hegge, A.B.; Vukicevic, M.; et al. Solid dispersions for preparation of phototoxic supersaturated solutions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): Studies on curcumin and curcuminoides L. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 95–105, 2013.

85 Haukvik, T.; Bruzell, E.; et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, n. 10, p. 666–673, 2009.

Correa, J. (2006). Fotodegradação do Photodithazine e a citotoxicidade dos fotoprodutos formados após a irradiação com o laser.

Quishida, C.C.C. (2013). Estudo da eficácia da terapia fotodinâmica, mediada pelos fotossensibilizadores Photodithazine® e Curcumina, sobre biofilmes multi-espécies formados por *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

88 COSTA, J.B.; COSTA, A.L.; et al. Os principais fatores de risco da pneumonia associada à ventilação mecânica em UTI adulta. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, p. 80–92, 2016.

89 Oliveira, M.; Nunes, S.F.; et al. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1–2, p. 187–191, 2007.

Omron (2018). Nebulizador.

91 Sánchez, M.J.; Mauricio, J.E.; et al. Antimicrobial properties of ZSM-5 type zeolite functionalized with silver. **Materials Letters**, v. 191, p. 65–68, 2017.

92 Rice, K.C.; Mann, E.E.; et al. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 19, p. 8113–8118, 2007.

93 DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de varredura- Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: 2007.