

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

AMANDA CRISTINA ZANGIROLAMI

Funcionalização de materiais poliméricos para aplicação da Inativação
fotodinâmica em biofilmes bacterianos.

São Carlos

2022

AMANDA CRISTINA ZANGIROLAMI

Funcionalização de materiais poliméricos para aplicação da Inativação
fotodinâmica em biofilmes bacterianos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Física do Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutora
em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Dr^a. Kate Blanco

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2022

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

Zangirolami, Amanda Cristina

Funcionalização de materiais poliméricos para aplicação da Inativação fotodinâmica em biofilmes bacterianos / Amanda Cristina Zangirolami; orientador Kate Blanco -- São Carlos, 2022.

166 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Funcionalização. 2. Tubo endotraqueal. 3. Curcumina. 4. Biofilme. I. Blanco, Kate, orient. II. Título.

À todas as pesquisadoras e pesquisadores do Brasil, que mesmo em tempos difíceis se mantiveram fortes e perseverantes, apesar de todos o caos ao redor, com intuito de construir uma sociedade melhor para todxs.

AGRADECIMENTOS

Sinto-me uma pessoa privilegiada por ter pessoas tão especiais ao meu redor.

Começando pela minha família, pelo apoio incondicional ao longo desses anos, meus pilares e exemplos de caráter que pretendo sempre levar comigo. Minha mãe, pelo jeitinho dela de amar e dar suporte, pelas longas conversas não importa onde, pela dedicação e carinho de todo dia. Pelo meu pai, sempre forte e carinhoso, pelas risadas fáceis e estar presente em todos os momentos, sempre amparando e protegendo. Duas pessoas fortes, honestas, dedicadas e determinadas. Meus exemplos. Amo vocês.

Ao meu irmão, caçulinha, sempre comigo, brincando, brigando, badalando, trocando ideia. Não importa onde e quando, sempre juntos, meu parceiro de vida, meu eu masculino. Não seria o que sou sem você. Obrigada.

Á minha orientadora, Kate, pessoa mais amável e calma que já conheci. Sempre amparando, conversando, você foi fundamental não somente para o desenvolvimento da minha carreira científica, mas para que eu pudesse crescer como pesquisadora. Seu carinho e dedicação foram essenciais esses 6 anos juntas. Obrigada! Também não seria o que sou sem você.

Agradeço ao Cnpq e a Capes pelas bolsas de mestrado e doutorado concedidas para que pudesse ter o suporte financeiro para desenvolver a pesquisa.

Agradeço a todo grupo de óptica, aos funcionários da secretária (Wagner, Cris, Adriana e Bene), a Wanda e Evaldo, Lat e Liepo por todo apoio técnico.

Agradeço ao professor Vanderlei por todo suporte técnico, pelas reuniões e discussões sobre o trabalho, sempre tão construtivas.

Agradeço aos professores do grupo, Cris, Chico, Sebastião, Euclides, a Nati e a Lili, sempre auxiliando no projeto e dando suporte para que a pesquisa pudesse ser concluída.

Ao Leandro, grande amigo de trabalho e famoso quebra galho que sempre nos ajuda e resolve todos os tipos de problemas técnicos que aparecem no dia-a-dia.

Ao meu amor, parceiro de todas as horas, companheiro de festas, de estudos, de tempos difíceis como uma pandemia ou um final de doutorado, de viagens e comilanças por ai a fora. Sou grata por ter conhecido uma pessoa tão incrível como você. Espero formarmos um grande futuro juntos. Estamos só no início da jornada. Te amo.

Meu best friend Vicentes, maravilhoso desde 2010. Passamos por muito juntos, graduação em física, mestrado, pandemia, doutorado, menino, história para dar e vender, não? Te amo gato, na alegria e tristeza, sou grata pela sua amizade. Não seria o que sou sem você. Parceria de vida.

Leornado pela amizade filosófica, uma pessoa peculiar, com jeitinho só seu, todo metuculoso, tranquilo e sistemático, acho que por isso nos damos tão bem rsrs. Pessoa boa de papo, obrigada pelas inúmeras horas de debates e desabafos, no bandeco, no bar ou em casa. Pessoa de coração aberto, sempre presente, carinhoso e cuidadoso, um irmão que a vida deu.

A Marina, uma das bests mais antigas, guerreira, iluminada, batalhadora. Nos encontramos sem querer, nos apegamos por querer e hoje muito do meu amadurecimento é devido a você. Sempre sensata e com muita empatia, doida e engraçada, te amo!

Ash por tanto tempo de amizade, muitas horas de panepucci, cineminha, observatório e andanças por São Carlos. Uma pessoa incrível, de altos papos e de muitas piadas, nem sempre boas, mas o que vale é a intenção, não é mesmo?

Aos amigos que foram de pouquinho se juntando ao nosso balaio, Isis, maravilhosa, doce e engraçada. Roberta, pelo companheirismo, desabafos de pós e pelos muitos roles nessa cidade de sanca. Vitor, pessoa doce, quietinha e carinhosa, sempre presente nos momentos cruciais, para rir e chorar, além de acompanhar todos os roles! Salles, integrante mais novo do role, pelo companheirismo, pessoa que topa todas!

A minha querida amiga de infância Thálita por apesar da distância estar sempre presente, pelas risadas e papos cabeças, por sempre me fazer olhar para todos os lados e ver as coisas de uma maneira diferente.

Aos meus amigos do laboratório, sempre tão queridos. Larissa Marila pelo jeitinho único, mesmo a distância tão querida e importante. Amigas de baia desde o mestrado. Renan, sempre disposto a ajudar, sempre nos fazendo rir, determinado e honesto, um grande amigo. Camilinha pela jeitinho meigo e amável, sempre prestativa e carinhosa com todos. À Hilde, meu primeiro exemplo profissional, responsável e dedicada, um exemplo a ser seguido. Obrigada por todos os conselhos e pela amizade ao longo desses anos. Paulinha pelo jeitinho doce e delicada, amiga de todas as horas e todos os roles, animada e simpática sempre. Obrigada por me fazer ver outros lados e pelos conselhos valiosos, você fez toda a diferença dentro do lab. Camilinha pela amabilidade, pessoa de coração maior que ela, sendo prestativa e preocupados com as pessoas ao seu redor. Claudinha, minha querida, amiga atenciosa, corajosa, amável, prestativa, obrigada

pela amizade, pelos cafés e cervejas. Dirceu, como não amar? Carinhoso e atencioso, obrigada pelas filosofadas horas a fios, pelas cervejas e pelos conselhos, grande amigo e parceiro da vida. Shir pela amizade em todos os lugares e em todos os roles, determinada e carinhosa (do jeitinho dela) sempre presente, agradeço seu carinho. Ema pelo jeitinho quietinho, engraçado e dedicado. Ainda me deve um café hein?! Fabio Jr pelas risadas, trabalhos colaborativos e ensinamentos de vida. Rapha pela sinceridade, risadas e compartilhamentos dos corres da vida.

Sou grata a todos que passaram pela minha vida, meus professores, meus amigos, da escola, do cursinho, da graduação e da pós. Todos me modificaram de alguma forma e me fizeram a mulher que sou hoje.

RESUMO

ZANGIROLAMI, A. C. **Funcionalização de materiais poliméricos para aplicação da Inativação fotodinâmica em biofilmes bacterianos**. 2022. 166p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

As infecções adquiridas no hospital (HAI) são frequentes principalmente devido a introdução de equipamentos médicos nos pacientes como cateteres e tubos endotraqueais. A pandemia pelo coronavírus SARS-CoV-2 agravou o número de pacientes intubados devido a forma mais severa do vírus provocar insuficiência respiratória. A intubação é realizada pela introdução do tubo endotraqueal para facilitar a troca gasosa no paciente, podendo ocorrer a formação do biofilme em sua superfície. O biofilme é uma forma estratégica e de resistência microbiana contra agentes externos, sendo de 10 a 10000 vezes mais resistentes que células planctônicas. A Pneumonia Associada a Ventilação mecânica ocorre com uma probabilidade de 5 a 40% entre pacientes com ventilação, com uma porcentagem de até metade dos pacientes acometidos evoluírem ao óbito. Afim de evitar a formação de biofilme bacterianos e logo, estabelecimento de infecções, este estudo recorreu a uma estratégia de funcionalizar materiais poliméricos recorrendo a moléculas fotossensibilizadoras para aplicação da terapia fotodinâmica para eliminar biofilmes. A terapia fotodinâmica age localmente e não apresenta relatos de resistência bacteriana na literatura. A curcumina, fotossensibilizador natural e aprovada pelo FDA, foi funcionalizada e irradiada por uma fibra difusora acoplada a um laser (450nm). O presente trabalho teve 5 focos principais: caracterizações físico-químicas, otimização da reação de funcionalização nos materiais poliméricos, otimização da terapia fotodinâmica, construção de um sistema respiratório para simular um paciente intubado e os ensaios pré-clínicos. O tubo funcionalizado revelou uma alta estabilidade, com uma lenta degradação em pHs ácidos e neutros e em temperaturas mais baixas e média. Concentrações baixas de curcumina funcionalizada resultam em uma maior disponibilidade das moléculas, e resultando em uma redução total de biofilme de *S. aureus* (5R, 100J/cm²) e reduções maiores de 1log em espécies como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus* resistente a metilicina. Testes de citotoxicidade não revelou evidências de toxicidade em células de mamíferos e o sistema respiratório construído evidenciou a aplicação do tubo funcionalizado irradiado age como uma barreira fotodinâmica, evitando que a infecção migre para o tecido pulmonar. Estudos *in vivo* foram realizados em modelo suínos, com intubação e ventilação por

24h, resultando em uma redução significativa de biofilme formado no tubo funcionalizado nos animais intubados, sem efeitos adversos na mucosa oral, traqueal e pulmonar.

Palavras chaves: Funcionalização. Tubo endotraqueal. Curcumina. Biofilme.

ABSTRACT

ZANGIROLAMI, A. C. **Polymeric materials functionalized applying photodynamic therapy in bacterial biofilms**. 2022. 166p. Thesis (Doctor in Science) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The Hospital Acquired Infections are frequent mainly because of the introduction of medical devices in patients such as catheters and endotracheal tubes. The number of intubated patients was exacerbated in the pandemic of SARS-CoV-2, because the worst form of the disease can cause respiratory failure. The endotracheal tube is placed in the patient's trachea for air exchange. In the tubes' surfaces, bacterial cells can attach and develop the biofilm, a strategic bacterial form to develop and protect themselves against external agents, and it is 10 to 10000 more resistant than planktonic cells. Thus, pneumonia is a risk factor, and it affects 5-40% of ventilated patients, where half of these infected patients happen to die. Functionalization in polymeric materials, associated to photodynamic therapy, is a strategy that has been applied with success to avoid and decontaminated bacterial biofilms in medical devices. Therapy acts locally, and the literature has not reported bacterial resistance against it. Curcumin, a natural photosensitizer and FDA approved, was functionalized and irradiated by a cylinder fiber coupled to a laser (450nm). The present study contains 5 main focus: physical-chemical characterizations, optimization of functionalized reactions in polymeric materials and of photodynamic therapy, a respiratory system built to simulate an intubated patient and pre-clinical assays. Functionalized tube demonstrated to be high stable in acid and neutral pHs, and in low and middle temperatures. Low curcumin concentration functionalized in the tubes resulted in a better molecule availability, with a total *S. aureus* biofilm reduction (5R, 100J/cm²) and reductions higher than 1 log against *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* and methicillin-resistant *S. aureus*. Cytotoxicity assays hasn't revealed any toxic effect in mammal cells and the respiratory system support that the functionalized tube when irradiated can act such as a photodynamic barrier to avoid the infection spread and reach the lungs. *In vivo* studies were performed in pigs intubated and ventilated for 24h. Nine animals intubated with the functionalized tube and irradiated showed a significant reduction of biofilm development, without adverse effects in oral, tracheal and pulmonary mucosa.

Key words: Functionalization. Endotracheal tube. Curcumin. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Etapas do desenvolvimento de biofilme em superfícies (a)bióticas.	37
Figura 2 – Equipamentos médico-hospitalares que são implantados no paciente e podem servir de entrada para formação de biofilmes e infecções.	39
Figura 3 – Estrutura tautomerica da molécula de curcumina.	42
Figura 4: Etapas do estudo.	44

CAPÍTULO 04

Figure 4.1 - A) Entire tube with the three main regions: proximal (nearest of oral region), medial (intermediate region) and distal part (where cuff is designed); B) The diffuser cylinder fiber with 450 nm placed inside the tube; C) Tube cuts of 1cm made along the tube for biofilm quantification.	59
Figure 4.2 - Stability in pH. A) functionalized tube weight immersed in each pH solution for 15 days; B) pH measures results from each solution for 15 days; C) absorbance averages measured in an interval to 200 to 800 nm, from each pH solution with the tubes remaining immersed for 15 days; Score graphs of D) Results analysis from tube weight (g) x Time(h) (Fig. 4.2A); E) pH measures of each solution (Fig. 4.2B) and F) Absorbance for a time in each pH solution (Fig. 4.2C). *Analysis using Origin® and Statistics® software.	61
Figure 4.3 - ETcs' UV-vis normalized spectra submitted under various environmental circumstances, including A) temperature, B) pH, and light exposure; Spectra results have produced three primary significant spikes: 270, 432, and 570nm; C) Score graph highlighting variables positions according to the similarity among them by PC1 (x-axis) and PC2 (y-axis); D) Autovectors x components graph describing the contribution of each PC according to the results analyzed: PC1 have explained 51%, PC2 31%, and PC3 13% of the results; the following components have not been statistical as significative as the third ones for explaining the data.	63
Figure 4.4 - A) Reactor Image where the reactions were performed for 4h at 32°C in conditions of B) 1R; C) 2R and D) 3R.	66
Figure 4.5 - Physical-chemical characterization from each condition applied in functionalization: A) Fluorescence spectra of inner and B) outer surface of ETc and at both extremities (proximal and distal); FTIR at C) inner surface and D) outer surface	

of each condition; PCA* fluorescence spectra analyses with three significant components to explain data: E) PC1(64%) x PC2(26,5%) and F) PC1(64%) x PC3(8,5%). *PCA performed by Statistica®.	67
Figure 4.6 - Photodynamic inactivation in microbiological tests in <i>S. aureus</i> biofilm developed for 24h at A) ET and ETc 1R and 2R; B) ET and ETc 3R and 4R and C) Reduction of CFU/mL of biofilm in the four reactions tested. All ETc groups were irradiated internally and externally with cylindric diffuse fiber with 100J/cm ² . Groups (*) were statistically different from the control group by Tukey Test Anova one way with p-value < 0,05.....	69
Figure 4.7 - Photodynamic action at <i>S. aureus</i> biofilm formed in 24h after the ETc had been irradiated with three light doses: 200, 300 and 400 J/cm ² . (*) Groups statistically different from control by the Tukey Test Anova one-way with p-value <0,05.....	71
Figure 4.8 - Photodynamic inactivation of <i>S. aureus</i> biofilm (A) and <i>E. coli</i> (B) developed during 24h to the shelf life of functionalized tube test. The period of functionalized tubes tested was 6, 34, 46 and 455 days postreaction. Groups with (*) are statistically different compared to the control group by the Tukey test Anova one way with p-value <0,05.	72
Figure 4.9 - <i>In vitro</i> cell toxicity trials in control and tested groups with and without irradiation (C, ET and ETc) for 24h (A) and one week (B). Irradiation groups received 50 J/cm ² of light dose. Groups with (*) are statistically different from the control group by the Tukey Test Anova oneway with p-value <0,05.....	73

CAPÍTULO 05

Figura 5.1 - A) Foto da fibra cilíndrica difusora emitindo em 450 nm, construída pelo LAT; B) Imagem da fibra cilíndrica com as medidas realizadas de acordo com os eixos “x-y” utilizados para a caracterização da fibra cilíndrica difusora.	78
Figura 5.2 - Metodologia dos estudos de cinética da formação do biofilme de <i>S. aureus</i> desenvolvido no TE e no TEc ao longo de 24h na placa de 24 poços.....	80
Figura 5.3 - Caracterização da potência da fibra difusora medida com diferentes distâncias (z) em relação ao detector do medidor de potência, com a fibra dentro e fora dos tubos.	82
Figura 5.4 - Inativação fotodinâmica em biofilmes de <i>S. aureus</i> formados por 24h em TE (barra cinza clara) e TEc (barra cinza escura) com irradiações variando de 100 a 400J/cm ² .	

Grupos TEc foram pré-irradiados com 50J/cm ² em ambas as superfícies. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.	83
Figura 5.5 - Inativação fotodinâmica nos TEc com aumento nas doses de luz utilizadas, 100 a 600J/cm ² com duas fontes de luz, totalizando 34min50s. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.	84
Figura 5.6 - Resultado de IF em biofilmes de <i>S. aureus</i> desenvolvidos por 24h aplicando o 1° protótipo da fibra difusora com potência de 18 mW/cm e três posicionamentos da fibra em relação ao TEc: apenas interna (In) (coluna roxa hachurada), apenas externa (Ex) (coluna roxa hachurada) e interna e externa (In+Ex) (coluna roxa em xadrez) ao tubo. Grupos controle 0J/cm ² (coluna cinza lisa), iluminado 50J/cm ² (coluna cinza hachurada) e TEc 0J/cm ² (coluna roxa lisa) e TEc irradiado com 70mW/cm ² (coluna lilás hachurada) iluminação com ponteira apenas interna ao tubo durante 12min30s. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.	86
Figura 5.7 - Resultado de foto inativação do teste de homogeneidade do primeiro protótipo da fibra difusora iluminando o tubo interna e externamente durante 46 minutos, totalizando 50 J/cm ² ou por 60 minutos, totalizando 65 J/cm ² para inativação de biofilme de <i>S. aureus</i> formado durante 24h. Grupos controle (barra azul lisa), TEc 0J/cm ² (barra azul mais escura), TEc 50 ou 65J/cm ² (barras azuis hachuradas). Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05.	87
Figura 5.8 - Resultado de IF em biofilmes de <i>S. aureus</i> formados por 24h em pedaços de 2 cm de TEc e irradiados de maneira intervalar a cada 5 minutos. Cada grupo irradiado recebeu 25 J/cm ²	88
Figura 5.9 - Resultado de foto inativação do teste de homogeneidade do segundo protótipo da fibra difusora iluminando o tubo interna e externamente durante 8min30s, totalizando 50 J/cm ² e por 13min30s, totalizando 80 J/cm ² para inativação de biofilme de <i>S. aureus</i> formado durante 24h. Grupos controle sem iluminação (barra cinza lisa), controle 50J/cm ² (barra cinza hachurada), TEc 0J/cm ² (barra lilás lisa), TEc 50 ou 80J/cm ² (barras lilás ou roxa hachuradas, respectivamente). Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05.	89

- Figura 5.10 - Resultados de inativação fotodinâmica nos experimentos aplicando o 3° protótipo da fibra difusora, realizada em um pedaço com tamanhos 1 e 3 cm do tubo. Tubo de 3 cm foi cortado em 3 pedaços de 1cm para UFC/mL. Grupos TFD foram irradiados variando dois parâmetros: diferentes doses de luz (50, 80, 100 e 160 J/cm²) e a posição de iluminação da fibra em relação ao tubo: apenas interna (In), apenas externa (Ex) e/ou ambas as iluminações, interna e externa (1, 2 e 3) no pedaço de 3cm de TEc (dependentes da região). A dose de luz foi de 50 J/cm² (A) totalizando 6min30s de irradiação e 80 J/cm², totalizando 9min30s de irradiação (B). Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05. 90
- Figura 5.11 - Resultados das médias de redução de UFC/mL de cada protótipo testado em relação a cada grupo irradiado apenas internamente (I) ou externamente (E) ou em ambas as superfícies (I/E) com duas doses de luz 50 e 80 J/cm². 91
- Figura 5.12 - Ação fotodinâmica realizada testando diferentes tempos de irradiação pela fibra óptica difusora com 140mW/cm². Tempos testados de irradiação foram de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05. 91
- Figura 5.13 - Inativação Fotodinâmica em biofilme de *S. aureus* com iluminação constante pelo segundo protótipo da fibra difusora com 100mW/cm² (2° Protótipo) por 6h e 6h30 em TEc. 92
- Figura 5.14 - Resultados de formação de biofilme de *S. aureus* formado durante 24h no TE inteiro (A) e no TEc (B). Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05. 93
- Figura 5.15 - Resultados sobre a redução celular bacteriana de biofilme de *S. aureus* desenvolvido ao longo do TEc e iluminado com 100 J/cm² com fibra óptica difusora, interna e externamente ao tubo. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05. 94
- Figura 5.16 - Inativação fotodinâmica em biofilme bacterianos após o TEc ser incubado por tempos de 4, 7 e 12h em soluções com pH de 2, 4 e 10, sendo que A) resultados da inativação de biofilme de *S. aureus* e B) Inativação em biofilme de *E. coli*, ambos biofilmes formado por 24h em poços das placas de 24 poços a 37°C. Iluminação gerada

por Biotable a 40 mW/cm ² e ponteira a 70 mW/cm ² , totalizando 50J/cm ² em ambas superfícies. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05.....	95
Figura 5.17 - A) Resultados da inativação fotodinâmica em biofilme de <i>S. aureus</i> formado por 24h em todos os experimentos delineados pelo DoE; B) Gráfico de Pareto indicando variáveis significativas no DoE; C) Gráfico sobre os valores preditos vs valores observados.....	98
Figura 5.18 - A) Superfície de resposta entre as variáveis tempo de incubação e dose de luz com o fator resposta pós tratamento IF; B) Gráfico de contorno entre as duas variáveis tempo de incubação e dose de luz. Quanto mais intensa a cor vermelha, maior a quantidade bacteriana, que ocorre em menores tempos e quantidade de dose dada. Gráficos plotados pelo DoE realizado pelo software Statistica®.	99
Figura 5.19 - Resultado da inativação fotodinâmica de biofilme de <i>S. aureus</i> formado durante 24h realizada em tubo funcionalizado com curcumina (A) e porfirina (B). Irradiação no tubo funcionalizado com curcumina com biotable em 450 nm e no tubo funcionalizado com porfirina com biotable branca, ambas gerando uma dose de energia total de 50 J/cm ² . Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.	100
Figura 5.20 - Inativação fotodinâmica de biofilme de <i>S. aureus</i> formado nas superfícies do TE e do TE funcionalizado de 1 a 6 dias. Cada grupo recebeu uma dose total de luz equivalente ao tempo de formação de biofilme. O grupo com biofilme formado em 24h recebeu 100J/cm ² (50J na superfície interna e 50J na superfície externa), o grupo com formação de biofilme em 48h recebeu 200J/cm ² e assim consecutivamente com os outros. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle (C ₁) e a marcação (*) são os grupos diferentes estatisticamente com seu respectivo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.....	101
Figura 5.21 - Resultado sobre o ensaio de cinética do biofilme de <i>S. aureus</i> formado sobre os 4 tipos de tubo (TE, e TEc e iluminados e não iluminados); A) Gráfico da fração celular dos 4 grupos testados ao longo do tempo; B) gráfico em barras dos grupos controle sem luz (barra azul clara) e grupos IF (barra azul escura) dos 7 tempos testados. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.	102

- Figura 5.22 - A) Caracterização do espectro de fluorescência realizado nos tubos funcionalizados com e sem a base nas superfícies internas e externas dos tubos; B) IF em biofilme de *S. aureus* formados por 24h na superfície de tubos funcionalizados com e sem base mais a curcumina. Tubo sem adição da base foram irradiados com 50 e 100J/cm², enquanto TEc com a base foram irradiados com 50, 80 e 100J/cm². A iluminação foi realizada com a Biotable e a ponteira de irradiação. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05..... 103
- Figura 5.23 - Inativação fotodinâmica me biofilme desenvolvido por (A) *K. pneumoniae*; B) *P. aeruginosa* e C) cepa MRSA formada na superfície do TE e TEc durante 24h. As iluminações irradiadas nos grupos TFD foram de 50, 65, 80 e 100J/cm². Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05..... 104
- Figura 5.24 - Experimento para análise da força do biofilme pós TFD em A) MSSA e B) MRSA. Barras cinzas são controles 24h, barras azuis claras são biofilmes em TEc 0J/cm²; barra cinza média controle 48h, barras azuis escuras são TEc 48h 50J/cm²; barra cinza média hachurada controle 24h que foi recolocado para crescer; barra azuis médias hachuradas são as células que foram recolocadas para crescer mais 24h pós TFD. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05..... 106
- Figura 5.25 - Curvas de cinética de crescimento pea absorbância em 600nm de biofilme pós TFD utilizando TEc [5R] e 50 ou 80J/cm² em A) *S. aureus* e B) MRSA. 107
- Figura 5.26 - Resultados de IF com biofilmes multi espécies formados durante 24h e 48h nos tubos TE (0 e 50J/cm²) e TEc (0 e 50J/cm²) de A) *S. aureus*+*K. pneumoniae*; B) *S. aureus*+*P. aeruginosa*; C) *K. pneumoniae*+*P. aeruginosa*. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle marcação (*) são os grupos diferentes estatisticamente com seu respectivo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05..... 108
- Figura 5.27 - Resultados de IF com biofilmes multi-espécies formados durante 24h e 48h nos tubos TE (0 e 50J/cm²) e TEc (0 e 50J/cm²) de A) *S. aureus*+MRSA, B) *P. aeruginosa*+MRSA; C) *K. pneumoniae*+MRSA. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle e a marcação (*) são os grupos diferentes estatisticamente com seu respectivo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05..... 110

Figura 5.28 – Caracterização A) FTIR realizada na superfície interna (linha vermelha) e na superfície externa (linha preta); B) Intensidade de Fluorescência na superfície interna (linha vermelha) e na superfície externa (linha preta).....	112
Figura 5.29 - Imagens por AFM dos grupos: A e B) SU sem funcionalização; C e D) SU funcionalizada e analisada na superfície interna; E e F) SU funcionalizada e analisada na superfície externa.....	113
Figura 5.30 - Inativação fotodinâmica em biofilme de <i>E. coli</i> formado por 24h em SUC em 4 condições de concentração de curcumina diferentes. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.	114
Figura 5.31 - Inativação fotodinâmica em biofilme de <i>E. coli</i> formado de 1 a 11 dias em SU e SUC [3R] e iluminadas por 100J/cm ² . Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.	115

CAPÍTULO 06

Figure 6.1 - A) Image of the circulating system describing components and their positions in the system; from left to right: LGs, temperature control, trachea, inoculum solution, ET, peristaltic pumps, Orobox and mechanical ventilator; B) A representative figure describing the system.	123
Figure 6.2 - Covalent linkage of curcumin photosensitizer onto PVC-based ET producing the ET-curc device.	126
Figure 6.3 - Solid-state UV-Vis spectrum of ET-curc 1R (black), UV-Vis spectrum of ET-curc 1R solution (120 mg in 10 mL THF) (red), UV-Vis spectrum of curcumin in THF solution, [Curcumin] = 1.2×10^{-5} M (blue) and UV-Vis spectrum of a THF solution of non-functionalized ET (100 mg in 10 mL THF) (green).	127
Figure 6.4 - Selected regions (A, B, C) of ET-curc 5R prepared according to the procedure described in Table 2.	128
Figure 6.5 - A) Results of <i>S. aureus</i> biofilm development along the surface of the ET measured in linear position in the circulating system with four periods tested: one day (black square line), two days (red circle lines), three days (blue triangle line) and seven days (green triangle line); B) Results of CFU/mL quantification in LGs and ORO box at first, second, third and seventh days of circulation system. * Statistical difference	

between the groups according to the Tukey ANOVA test one-way with p-value < 0.05. (0 days imply the starting point with zero CFU, this point is not shown on the plot).

..... 130

Figure 6.6 - A) Photodynamic disinfection of biofilms developed for 24h in different functionalized tubes 4R and 5R and compared to control (ET) using only one light dose of 100 J/cm². B) Number of *S. aureus* cells from LGs and Oro box: control, ET-cure 4R and 5R; C and D) Photodynamic disinfection of biofilms developed with 24 h exposure of ET-cure 5R for different light doses. C) 1D – one light dose, 2D – two light doses, 3D – three-light doses and 4D – four-light doses. D) *S. aureus* biofilm developed in the control groups (ET- light gray bar) and photo disinfection groups after 24 hours; each light dose corresponded to 100 J/cm²; bacterial cells were counted along each tube. E) Optimized results of 7 days of inhibition of PS-ET biofilm irradiated four times a day with 100 J/cm² compared to the biofilm formed by seven days on the ET-cure surface; F) Number of bacterial cells in the LGs and ORO box in the experiment with four dose lights per day (100 J/cm² each) during seven days of the circulation system. *Statistical difference between groups according to one-way ANOVA, Tukey's test (p<0.05). 132

Figure 6.7 - A) CFU/mL of biofilm developed along ET and ET-cure 5R when the system was coupled with MV and *S. aureus*. The control groups were: ET MV (blue triangle line), and ET (black square line); photodynamic inactivation groups: ET-cure MV (green triangle line) and ET-cure (red circle line). B) *S. aureus* CFU/mL in the ORO box (light gray bar), in the Left Lung (medium gray bar) and Right Lung (dark gray bar) in ET and ET MV (controls) and ET-cure and ET-cure- MV (photodynamic inactivation). * Statistical difference between groups according to the ANOVA one test way Tukey (p<0.05). 134

CAPÍTULO 07

Figura 7.1 - UFC/mL recuperadas de cada cm das superfícies dos TE e TEcs intubados nos animais por 24h. iluminação no TEcs realizada pela fibra difusora com 4 doses de luz em 24h, cada dose gerando 100J/cm². Gráfico por box-plot realizado por estatística não paramétrica pelo software OriginLab®. 143

Figura 7.2 - UFC/mL da musoca oral (boca), na superfície interna do tubo (TI) em 8, 16 e 24h e na traqueia (TR), brônquios (BR) e pulmão (PU) em 24h dos grupos controle (TE) e grupos testados (TEc). Iluminação realizada pela fibra difusora com 4 doses por 24h,

cada dose com 100J/cm ² . *Diferença estatística entre grupos TEc com seus respectivos controle de acordo com Teste Tukey one way com p valor < 0,05.....	144
Figura 7.3 - Cortes das lâminas histológicas do tecido traqueal dos animais intubados com TE (P1 e P2) e com TEc (P3, P4, P5 e P6).	148
Figura 7.4 – Análises das lâminas histológicas do tecido pulmonar dos suínos intubados com TE (P1 e P2) e dos suínos intubados com TEc (P3, P4, P5 e P6).	150

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 04

Table 4.1 - Concentration of the reagents of functionalized reaction in 250 mL of DMSO.	57
Table 4.2 - Characterizing the main peaks of curcumin and PVC in the spectra of each reaction tested.....	68

CAPÍTULO 05

Tabela 5.1 - Descrição dos parâmetros otimizados nas três versões da emissão da fibra difusora acoplada ao laser com emissão em 450 nm.....	77
Tabela 5.2 - Tabela com os intervalos escolhidos de cada um dos 3 parâmetros analisados, com dois níveis superiores (+ α e +1) e dois níveis inferiores (- α e -1) e com ponto central.	79
Tabela 5.3 - Reduções (%) de biofilme de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> pós TFD de cada grupo testado em diferentes condições de TEc incubados em soluções com diferentes pH por diferentes tempos:.....	95
Tabela 5.4 - Matriz XY onde descreve o número dos experimentos, as 3 variáveis (pH, Tempo incubação e dose de energia) reais e codificadas. A última coluna representa a resposta de cada experimento realizado.	97
Tabela 5.5 - Resultados da % de redução do biofilme em cada espécie testada de acordo com a concentração da curcumina funcionalizada e a dose de luz dada a cada grupo.	105
Tabela 5.6 - Resultados da % de redução do biofilme multi-espécie testado de acordo com a concentração da curcumina funcionalizada e a dose de luz dada a cada grupo.	111

CAPÍTULO 06

Table 6.1- Description of the time when each group was irradiated according to the number of light doses.....	125
Table 6.2 - Reaction conditions used in the curcumin immobilization process and the final amount of incorporated curcumin in the ET-curc. ^{a)}	128
Table 6.3 - Quantification of incorporated curcumin in different ET-curc positions as described in Figure 4. ^{a)}	129

CAPÍTULO 07

Tabela 7.1 - Grupos de estudo e descrição dos protocolos envolvidos nos animais (n=3). ...	140
--	-----

Tabela 7.2 - Sugestão dos gêneros bacterianos isolados de cada grupo controle e TFD. Grupos TFD foram isolados após tratamento..... 145

LISTA DE ABREVIACÕES E ACRONIMOS

CFU/mL – Counting formed units per milliliter

ET – Endotracheal tube

ETc – Endotracheal tube curcumin functionalized

IF – Inativação fotodinâmica

KP – *Klebsiella pneumoniae*

MDR – Multi Drug Resistance

MRSA – Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

PA – *Pseudomonas aeruginosa*

PAV – Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica

PDT – Photodynamic Therapy

SA – *Staphylococcus aureus*

TE – Tubo Endotraqueal

TEc – Tubo endotraqueal funcionalizado

TFD – Terapia fotodinâmica

SU – Sonda uretral

SUc – Sonda uretral funcionalizada

VAP – Ventilator-Associated Pneumonia

VM – Ventilação Mecânica

UFC – Unidades formadoras de colônias

UFC/mL - Unidades formadoras de colônias por mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

J/cm² - Joules por centímetro cuadrado

Cm – centímetros

mL – mililitro

μL – microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	35
2.1	Biofilmes em dispositivos.....	38
2.2	Funcionalização	39
2.3	Curcumina.....	41
2.4	Planejamento experimental (DoE).....	43
2.5	Etapas do estudo	44
3	– Avoiding Ventilator-Associated Pneumonia: Curcumin-Functionalized Endotracheal Tube and Photodynamic Action Artigo publicado na revista: Proceeding of National Academy of Sciences in 2020.....	45
3.1	Artigo publicado na revista: Proceeding of National Academy of Sciences in 2020	45
3.2	Objetivos:.....	45
4	– Otimização Da Reação De Funcionalização Em Materiais Poliméricos	53
4.1	Tubo Endotraqueal.....	53
4.2	Objetivos do capítulo:	53
4.3	Abstract.....	53
4.3.1	Introduction	54
4.3.2	Material and Methods	56
4.3.3	Results	60
4.3.4	Partial Conclusion	73
5	OTIMIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA	75
5.1	Objetivos do capítulo:	75
5.2	Materiais e Métodos.....	75
5.2.1	Reagentes.....	75
5.2.2	Reação de funcionalização no tubo inteiro.....	76
5.2.3	Micro-organismos.....	76

5.2.4	Inativação fotodinâmica.....	76
5.3	Resultados	81
5.3.1	Tubo Endotraqueal.....	81
5.3.2	Sonda Uretral	111
5.4	Conclusão Parcial.....	115
6	Prevention of ventilation-associated pneumonia applying a functionalized endotracheal tube and photodynamic therapy: a proof of principle with an artificial intubation model	117
6.1	Simulação do Sistema Respiratório de uma pessoa intubada.....	117
6.2	Objetivos do capítulo:	117
6.2.1	Abstract	118
6.2.2	Introduction.....	118
6.2.3	Material and methods.....	120
6.2.4	Results and Discussion.....	125
6.2.5	Partial Conclusion.....	135
7	Experimentos <i>In Vivo</i>	137
7.1	Objetivos do capítulo:	137
7.2	Resumo.....	138
7.3	Material e Métodos.....	139
7.3.1	Preparação e/ou obtenção do TE funcionalizado.....	139
7.3.2	Fonte de Luz.....	139
7.3.3	Modelo animal	139
7.3.4	Análises Estatísticas.....	143
7.4	Resultados	143
7.4.1	Avaliação do TE e TE funcionalizado	143
7.4.2	Lâminas Histológicas.....	146
7.4.3	Conclusão Parcial.....	151
	Anexo A – Referências capítulo 5	159

7.4.4	Photoactivation Of Immobilized Curcumin On The Endotracheal Tube: Cytotoxic Effects And Physical-Chemical Stability	159
7.4.5	References	159
	Prevention of ventilation-associated pneumonia applying a functionalized endotracheal tube and photodynamic therapy: a proof of principle with an artificial intubation model.....	163
7.4.6	References	163

1 INTRODUÇÃO

As infecções adquiridas no hospital (HAI) são recorrentes e alarmantes devido ao comprometimento do sistema imune do paciente, aumento no tempo de internação e ocasionando a morte. Com a pandemia de covid-19, os números de internação tiveram um grave aumento devido aos sintomas de insuficiência respiratória de pacientes acometidos pelas mutações mais graves do vírus. As HAI estão relacionadas a instalação de equipamentos médico hospitalares em paciente e a Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) é uma das infecções nosocomiais mais comuns e frequentes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e pode estar relacionada ao prolongamento do tempo de internação e pela ventilação mecânica associada a instalação do tubo endotraqueal. O tubo é instalado no paciente para facilitar a entrada e saída de gases da respiração e pode dar acesso a células bacterianas se aderirem em sua superfície e formar o biofilme. Biofilme é uma forma estratégica de micro-organismos se organizarem e se protegerem contra agentes externos como temperatura, mudança de pH e agentes antimicrobianos como antibióticos. Embora existam medidas preventivas para evitar este tipo de contaminação, esta pneumonia é facilmente adquirida e preocupante devido a dificuldade do diagnóstico, que muitas vezes é realizado de maneira tardia. A PAV é frequentemente confundida com outras inflamações recorrentes em pacientes pós cirurgias, e quando é diagnosticada seu tratamento tem baixa eficaz principalmente devido a resistência bacteriana.

O presente estudo sugere a aplicação da terapia fotodinâmica como alternativa para evitar e inativar os micro-organismos que possam vir a colonizar a superfície do tubo ou de outros materiais poliméricos, funcionalizando a superfície dos mesmos com moléculas fotossensíveis, os fotossensibilizadores (FS). A terapia fotodinâmica associa três componente: FS, luz e oxigênio celular. O FS quando iluminado pelo comprimento de onda adequado seus fótons são excitados e duas reações podem ocorrer, produzindo espécies reativas de oxigênio e/ou oxigênio singleto. Ambos os produtos reacionais são nocivos as células e podem levá-las a morte. Nos dias atuais a TFD se mostra mais poderosa por ser tópica e devido a literatura atual não mostrar resistência bacteriana a terapia.

A curcumina é derivada de um produto natural, extraída do rizoma *Curcuma longa*, e vem sendo amplamente estudada devido a suas propriedades físico-químicas como caráter antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Possui duas formas: keto e enol por ser uma molécula tautomérica e a forma predominante irá depender de fatores externos como a presença

e a natureza do solvente, temperatura e pH. por ser uma molécula hidrossolúvel, estudos recorrem a diversas técnicas e formulações para incorporação da curcumina a fim de melhorar sua solubilidade e biodisponibilidade em meios mais aquosos. Neste trabalho a estratégia utilizada foi a funcionalização desta molécula a materiais poliméricos, como o tubo endotraqueal.

A funcionalização de diversas moléculas como antibióticos e metais vem sendo exploradas em equipamentos médicos devido a dificuldade de combater biofilmes em superfícies como na superfície de cateteres e de tubos endotraqueais. Biofilmes desenvolvidos nestes materiais médicos, se mantêm protegidos das células do hospedeiro e de seu sistema imune pela proteção que a matriz extra polimérica lhe traz. Logo, a funcionalização se mostra fundamental para evitar a contaminação ocorrer. A funcionalização da curcumina foi realizada nas superfícies do TE, seguida pela caracterização do novo material e de estudos de estabilidade e degradação do FS recorrendo à análises do comportamento da curcumina em diferentes condições como pHs, temperaturas e foto exposição à luz ambiente. A efetividade da TFD foi realizada a partir de estudos *in vitro* pelo desenvolvimento de biofilmes de espécies bacterianas gram positivas e negativas, em tubos com e sem curcumina, e com a aplicação de uma fonte de luz emitindo na região do azul (450nm). Além disso, a citotoxicidade do tubo funcionalizado foi analisada de acordo com a ISO 10993-5A para materiais com aplicação médica, com experimentos *in vitro* realizados em células de mamíferos. Um sistema de simulação de um paciente intubado foi montado para aproximar os ensaios de uma rotina hospitalar e encontrar os melhores parâmetros para os experimentos *in vivo*. Por fim, ensaios pré-clínicos foram realizados de acordo com os parâmetros anteriores, almejando que o trabalho avance para os ensaios clínicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O ambiente hospitalar é propício e rico na diversidade de micro-organismos potenciais contaminadores devido ao alto fluxo dos profissionais de saúde e de pacientes colonizados, com possibilidades destas espécies oportunistas se encontrarem em equipamentos médicos, tubulações e ar condicionados. As infecções adquiridas no hospital (HAI) são altamente recorrentes e preocupantes devido ao comprometimento do sistema imune do paciente, aumento no tempo de internação e ocasionando a morte(1). As HAI estão relacionadas a instalação de equipamentos médico hospitalares em paciente como Infecções associadas aos cateteres urinários (IACU), Infecção de Sítio Cirúrgico (ISC), Infecções da Corrente Sanguínea Associadas à Linha Central (ICSALC) e a Pneumonia Associada a ventilação mecânica (PAV). Entre as HAI, as infecções nosocomiais são as mais frequentes em pacientes intubados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). A pandemia do coronavírus causador da covid-19 agravou os casos de internação, elevando os números de intubação devido a insuficiência respiratória adquirida pelos portadores do vírus em casos mais severos. Estima-se que de 71-88% de pacientes portadores do vírus na forma grave precisou de uma ventilação mecânica. (2) O tubo endotraqueal é posicionado na traqueia do paciente para facilitar a troca dos gases respiratórios para ventilação mecânica do paciente(3). O tubo é instalado quando o paciente passou por algum trauma, choque, cirurgia ou insuficiência respiratória. Uma estimativa evidencia que 50 milhões de pacientes são intubados por ano no mundo. (4) A superfície do tubo oferece espaço e proteção para anexação de células microbianas, onde elas estão fora do alcance do sistema imune, logo, as mesmas conseguem se dispersar e desenvolver os biofilmes. Estes biofilmes podem ser desenvolvidos em menos de 48h após ventilação mecânica (VM). A Pneumonia Associada a ventilação Mecânica (PAV) é uma infecção no parênquima pulmonar em pacientes expostos a VM, com uma ocorrência de 60-70%.(5) Este tipo de pneumonia pode estar relacionada ao prolongamento do tempo de internação e de ventilação mecânica e pela permanência nas UTIs, e pode ser dividida em duas fases: de início precoce (até o quarto dia de VM), envolvendo micro-organismos da flora orofaríngea em pacientes saudáveis; ou início tardio (após o quinto dia de VM), em pacientes com fator de risco para patógenos multirresistentes. (6) A suspeita de pneumonia ocorre quando um paciente desenvolve febre ou hipotermia, expectoração purulenta, alterações laboratoriais sugestivas de inflamação (leucocitose ou leucopenia) e hipóxia, associados ao surgimento de opacidade nova e persistente na radiografia de tórax. A principal problemática desta infecção é o diagnóstico tardio ocasionado pela falta de sensibilidade de técnicas para diagnóstico ou devido a

dificuldade em distinguir a PAV de outras inflamações que são frequentes pós traumas ou cirurgias. Medidas profiláticas agrupadas em um “pacote de cuidados” são realizadas: inclinação da maca em 45°, profilaxia contra úlceras de estresse e trombose venosa profunda; ajuste da sedação até que o paciente consiga seguir comandos, monitoramento da pressão do *cuff* (7), enxague oral com clorexidina e redução da permanência da VM monitorando os pacientes diariamente para se preparar para a extubação. Caso a PAV não seja tratada, ela pode levar a quadros de sepse, dano tecidual e no cérebro também em casos de recém nascidos. (1) Espécies gram negativas são as mais comuns de serem isoladas neste tipo de pneumonia, como *Pseudomonas aeruginosa* (24%), *Enterobacteriaceae* (14%) e *Haemophilus* (10%), além de gram positivas também serem encontradas, com *Staphylococcus aureus* (20%) sendo a principal. (1) Além destas espécies, existe um grupo chamado de ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp) que são espécies multirresistentes aos antibióticos comerciais e também podem ser encontradas em infecções no trato respiratório e relacionadas a instalação de outros cateteres. (8-9)

Biofilmes são considerados uma forma estratégica de micro-organismos se agruparem sob uma superfície (a)biótica e se desenvolveram. A estrutura é heterogênea e complexa, incluindo a formação de micro colônias envoltas na matriz que inclui componentes do hospedeiro como fibrina e eritrócitos e há canais para escoamento de água e nutrientes. A primeira fase é a anexação reversível das colônias microbianas a superfície. A escolha do local para a anexação se dá por meio da capacidade de adsorção de nutrientes e proteção das células contra fatores externos. O TE se mostra ideal para que as colônias se adiram, uma vez que o tubo permanece imóvel e também pela dificuldade do sistema imunológico de acessar estes micro-organismos. O segundo passo é a anexação irreversível das células a superfície, onde as células formam a matriz extra poliméricos (representa 90% do biofilme), formando canais para água, nutrientes e secreções, desenvolvendo uma arquitetura complexa. A terceira etapa é a maturação das células seguida pela dispersão de algumas células para colonizar outras partes da superfície. (10) A Figura 1 esquematiza as etapas descritas acima para a formação de biofilme. Devido a toda essa complexidade o biofilme apresenta uma resistência de 10 a 10000 vezes maior a agentes antimicrobianos comparado com células planctônicas, sendo uma forma de resistência microbiana. (11) Cada espécie bacteriana apresenta um mecanismo para o reconhecimento e anexação de células a superfícies. Dependendo da espécie, pode estar relacionada a uma forma de resistência. Estudos com *S. aureus* resistente a metilina (MRSA)

discutiram sobre a possibilidade desta espécie desenvolver biofilmes mais fortes que a sua espécie sensível a meticilina (MSSA). Entretanto, estudos realizaram isolamento de colônias de MSSA e MRSA em diferentes locais no paciente: feridas, TE, garganta, sangue, anus, lavagem bronquioalveolar, secreções e catarros. As espécies foram isoladas e a verificação do operon *icaABCD* foi realizada a fim de identificar e relacionar cada gene de acordo com a força do biofilme. Os resultados mostraram uma prevalência de 51,5% dos genes *icaABCD*, 26,1% de genes *icaABD* e 15,4% de genes *icaAD*. Genes *icaABCD* e *icaABD* produziram significativamente mais biofilme que o gene *icaAD*. Logo, o gene *icaABCD* foi mais presente em espécies de MRSA, embora existam espécies MSSA com a presença deste gene também. Este operon está relacionada a tradução da proteína adesina intracelular polissacarídea (PIA)(12), considerada um fator de virulência da *S. aureus*.

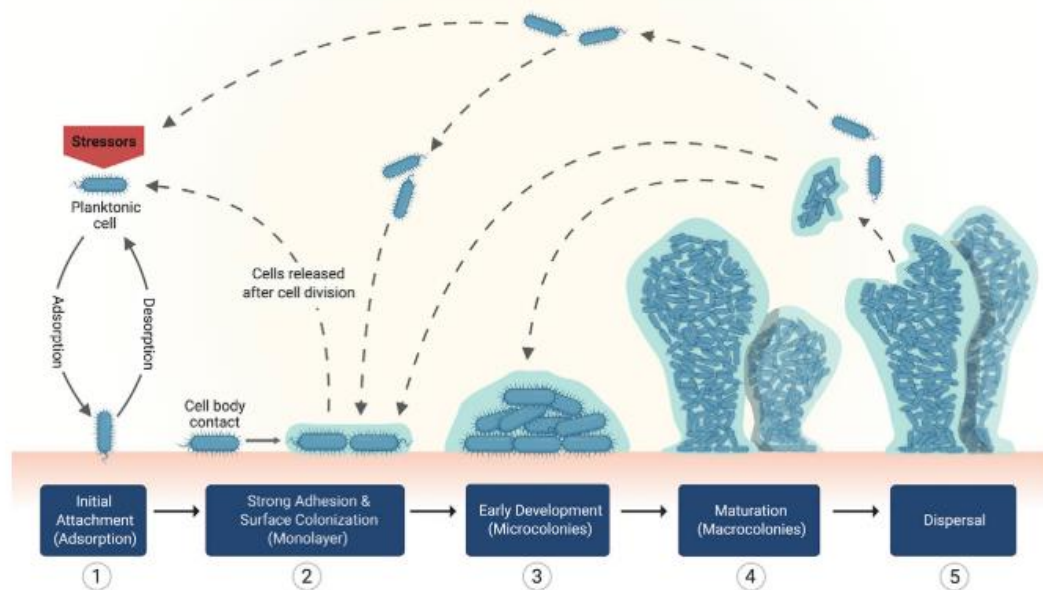


Figura 1 - Etapas do desenvolvimento de biofilme em superfícies (a)bióticas.

Fonte: Adaptada de SOTO *et al.* (11)

Espécies como *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* possuem fatores de virulência que as impulsiona a se tornarem multirresistentes (MDR), além de também serem capazes de formar biofilme. *P. aeruginosa* (PA) é uma espécie oportunista multirresistente, relacionada a infecções agudas ou crônicas pulmonares e no trato urinário. Esta gram negativa possui quatro sistemas de quorum sensing conhecidos: *las*, *rhl*, *Pseudomonas quinolone* (*pgs*), e *iqs*. Quorum sensing é a forma de comunicação através da liberação de sinais químicos que as bactérias utilizam para através da densidade celular controlar seus fatores de virulência, adesão e

resistência antimicrobiana. Sistema *las* sintetiza o auto indutor N-3-oxo-dodecanoil-homoserinelactona (3OC12-HSL). Sistema *rhl* produz auto indutor N-butanol-homo serina lactona (C4-HSL), sintetizado pelo auto indutor *rhlI*. Todos estes sistemas estimulam a produção e regulação de fatores de virulência que atuam na aderência microbiana e formação do biofilme. (8) Além disso, a PA possui um ou dois flagelos que auxiliam na motilidade celular, o que auxilia na melhor dispersão do biofilme da espécie. (13)

Biofilmes multi espécie são mais comuns de serem encontrados. Crescimentos poli microbianos podem resultar em interações sinérgicas, neutras ou antagônicas. Interações sinérgicas são caracterizadas por ocorrer uma co-agregação e cooperação metabólica, como por exemplo a utilização de metabólitos da espécie 1 pela espécie 2. (14) Em casos de antagonismo ocorre a competição por nutrientes e inibição de crescimento, como o que ocorre quando a PA está na presença da *S. aureus*, possuindo mecanismos de defesa como liberação de toxinas como piacinina, protease LasA (endo peptidase) e uma anti-staphylococcus. (15)

A *K. pneumoniae* (KP) faz parte de espécies ameaçadoras por ser resistente aos carbapenemos, uma classe de antibióticos beta lactâmico recomendado para infecções por espécies resistentes. Além disso, a KP possui um fenótipo hiper virulento, ocasionando infecções invasivas em tecidos envolvendo locais diferentes. Fatores de virulência presentes nestas espécies são os sideróforos, pili, formação de células hiper mucoides e a cápsula polissacarídea, sendo esta última considerada o principal fator de virulência desta espécie. A cápsula está diretamente relacionada a severidade das infecções por conferir proteção as bactérias contra o reconhecimento e a fagocitose pelo sistema imunológico do hospedeiro. Estudos mostraram uma redução da produção de IL-8, uma citocina inflamatória com função de ativação e recrutamento de neutrófilos para eliminar a infecção no local. (16) Quando em presença do antibiótico polimixina a KP tem a produção da cápsula aumentada. (17) Os sideróforos são compostos orgânicos secretados em situações de stress celular capazes de captar íons de ferro. (14)

2.1 Biofilmes em dispositivos

Biofilmes podem se formar em diferentes locais como em equipamentos médicos: lentes de contato, marcapassos, cateteres diversos, próteses cardíacas, implantes cardíacos ou ortopédicos e tubos endotraqueais. (18) Estes biofilmes são comumente multi espécies e a figura 2 esquematiza possíveis equipamentos que são instalados e passíveis de serem locais para a formação de biofilmes.

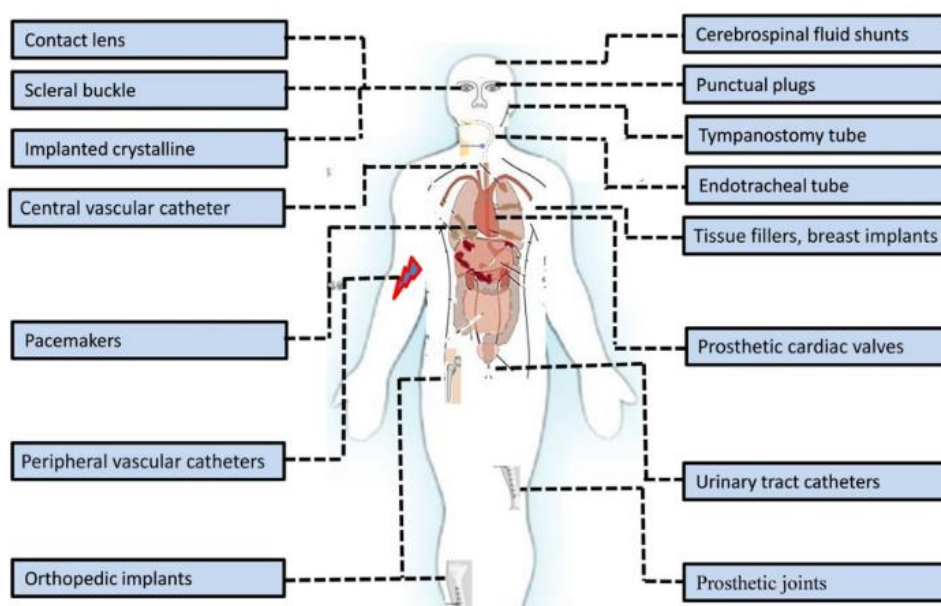


Figura 2 – Equipamentos médico-hospitalares que são implantados no paciente e podem servir de entrada para formação de biofilmes e infecções.

Fonte: Adaptada de YADAV *et. al.*(18)

2.2 Funcionalização

A funcionalização de equipamentos médicos se mostra como alternativa para evitar e descontaminar superfícies contra a formação de biofilme. No caso do TE se mostra ideal, uma vez que o sistema imune e a ação de antibióticos não se mostra eficiente devido ao não acesso dos fármacos as células patógenas. A literatura vem revelando um elevado crescimento de trabalhos explorando a funcionalização de superfícies poliméricas associando diferentes moléculas como metais (prata, ouro, paládio e cobre, óxido de titânio e de zinco); antibióticos; pequenas moléculas como as ceraginas, que são mimetizadores não peptídicos AMPs (peptídeos antimicrobianos) (4) e moléculas fotossensíveis. (1) A prata é um dos metais mais utilizados com ação antimicrobiana. A funcionalização da prata tem sido estudada por mais de 30 anos devido a sua capacidade de dano a proteínas celulares, interrupção dos sinais celulares, aumento na permeabilidade da membrana celular, promoção da geração de radicais livres, levando a morte bacteriana. Além disso, a prata pode agir como inibidor competitivo com cátions metálicos que se ligam em sítios ativos enzimáticos. (19) Estudos com interação entre a prata e espécies como *E. coli* resultaram em oxidação e comprometimento de moléculas como glicose, glicerol, fumarato, succinato e D-eL-lactato; em *Candida albicans*, a enzima responsável pela síntese da parede celular e isomerase fosfomanose foram inibidas pelos íons da prata. (20) Existem estudos sobre o revestimento com prata no TE preveniu formação de biofilme e um decréscimo na formação de muco em menos de 24h, entretanto a presença da

prata não impediu a colonização bacteriana nas vias aéreas quando comparadas ao tubo sem o revestimento. (21) Outros estudos mostraram que apesar da presença de colônia tenha diminuído, não foi possível relacionar este fato a presença da PAV. (22) Portanto, devido a ação antimicrobiana da prata, não houve uma alta aderência médica a sua utilização.(4)

A incorporação de antibióticos a superfícies é um grande atrativo, entretanto existem desafios em relação a liberação destes fármacos como o controle da temperatura. Existem estudos corrigindo este problema de cinética com o desenvolvimento de formulações como hidrogéis termo responsivos para liberação controlada de antibióticos. (23) Há muitos mecanismos de ação antibacteriana, que podem ser por ação na parede bacteriana, na membrana plasmática, na membrana externa, no metabolismo energético, na síntese proteica, na produção ou replicação de material genético. Entretanto, uma preocupação atualmente são as cepas resistentes a certas classes de antibióticos, como os β -lactâmicos, utilizados comercialmente. Uma alternativa proposta pelo estudo é a utilização da inativação fotodinâmica que pode ser utilizada unicamente ou associada a outras terapias para atingir um sinergismo para realizar a desinfecção bacteriana.

A terapia fotodinâmica tem sido aplicada desde o século passado para tratamentos de cânceres e descontaminações. A terapia é composta pela ação de três componentes: uma molécula fotossensível, a luz no comprimento de onda adequada e o oxigênio celular. O fotossensibilizador quando irradiado no comprimento de onda adequado excitará os elétrons que ocupam o estado fundamental para o estado excitado. Os elétrons ocupantes do estado excitado tendem a ir para um estado de menor energia devido a instabilidade, podendo ocorrer um cruzamento intersistema, onde estes elétrons vão para o estado tripleto. Este estado é de relativa menor energia e de maior duração, onde dois tipos de reações físico-químicas podem acontecer, do tipo I e/ou do tipo II. Durante a reação do tipo I, ocorre a transferência de elétrons do FS para um substrato orgânico ou com moléculas vizinhas gerando radicais livres ou íons radicais. Estes radicais podem interagir com o oxigênio celular produzindo espécies reativas de oxigênio. Estas espécies como superóxido, hidroxila e radicais derivados de lipídeos podem levar a oxidação de biomoléculas importantes para o desenvolvimento das células. (24) Já a reação do tipo II ocorre a transferência de energia destes elétrons para o oxigênio celular, gerando o oxigênio singlete, espécie altamente nociva a célula devido a possibilidade de interação com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácidos nucleicos. O resultado desta interação pode levar a alterações na permeabilidade celular, e danos nas organelas, provocando a morte celular via apoptose ou necrose. (25) As vantagens da técnica é um efeito local, concentrado no

tecido alvo, rápido e não causar resistência microbiana, uma vez que as espécies reativas não são específicas e ter um período de vida bem curto.(24) Estudos mostraram que fotossensibilizadores neutros ou aniônicos são eficientes contra gram positivas. (24). Este resultado pode ser dado devido a estrutura das espécies gram-positivas: a parede celular é composta por moléculas do peptidoglicano e de ácido lipoteicóico que são mais porosas e permitem que o FS atravesse. Já a parede das espécies gram-negativas é composta por uma membrana externa separada do peptideoglicano pelo periplasma. Esta membrana externa age como uma barreira física entre a célula e o meio externo, podendo conter proteínas e poros para passagem de nutrientes ou enzimas envolvidas na integridade da estrutura ou na morfologia da bactéria. Os mecanismos de morte celular podem ser pelo dano no DNA do micro-organismo ou pelo dano da membrana citoplasmática, liberando componentes celulares ou pela inativação do sistema de transporte ou enzimas. (24)

2.3 Curcumina

Curcumina é uma molécula ativa e fotossensível originária do rizoma da planta *Curcuma longa* com uma proporção de 2-5% do rizoma. A planta é originária do sul e sudeste da Ásia e tem sido utilizada por décadas na culinária asiática e indiana como especiaria e medicamento na medicina oriental para tratamento como inflamações e feridas. (26) A molécula foi isolada pela primeira vez em 1815 e sua estrutura foi descrita pela primeira vez em 1910. (26) Durante as últimas décadas, este composto fotoativo tem sido largamente estudado e testado para diversas aplicações, principalmente devido a propriedades como anti-inflamatórias, antibacterianas, antioxidante, anti viral e quimioprotetiva. Estudos comprovaram os efeitos da molécula para: redução de doenças cardiovasculares (colesterol no sangue, infarto de miocárdio e inibição da agregação de plaquetas), proteção a cardio toxicidades (como nos pulmões e fibrose), prevenção de quadros clínicos como artrite reumatoide, doença de Alzheimer (27) e esclerose múltipla(28); prevenção da oxidação de LDL, supressão trombose e de sintomas associados a diabetes II, inibição da replicação do vírus HIV, auxilia na cicatrização de feridas. (29)

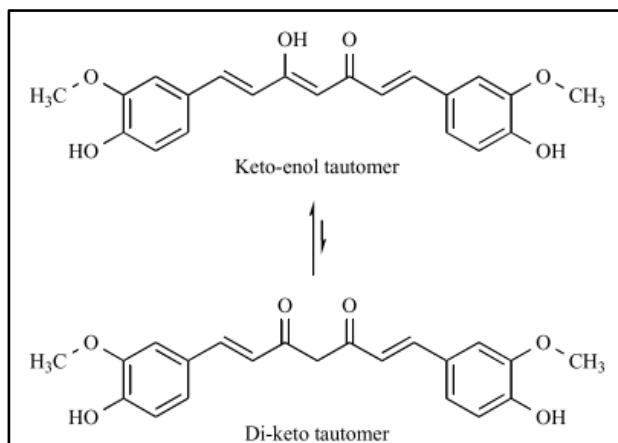


Figura 3 – Estrutura tautomerica da molécula de curcumina.
Fonte: Adaptada de LEUNG *et al.*

A molécula de curcumina é um tautômero, isto é, possui duas estruturas, keto e enol. Estas duas formas estruturais podem coexistir ou podem estar mais ou menos presentes dependendo de fatores externos como solventes, temperatura e pH da solução. A aplicação da curcumina limitada por ser insolúvel em água, porém possui solubilidade em solventes orgânicos como etanol, acetona e dimetil sulfóxido (DMSO).(30) Para aplicações biológicas, a curcumina tem sido associada a outros compostos para aumentar não somente sua solubilidade em meios aquosos, mas também para aumentar sua eficácia e liberação controlada no alvo desejado. Lipossomas, nanopartículas, micelas, complexos lipídicos e polímeros naturais (como quitosana)(31) tem sido associados a curcumina e são exemplos de formulações desenhadas para aumentar biodisponibilidade da molécula.

A estrutura ressonante da molécula é sensivelmente influenciada de acordo com fatores externos como solventes, formulações interagentes, temperatura e pH. Solventes e formulações com caráter anfifílico, como surfactantes, auxiliam na biodisponibilidade da curcumina devido à natureza dos surfactantes por ser compostos de uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. A temperatura aumenta a desordem dos átomos devido ao acréscimo de movimentos rotacionais, translacionais e vibracionais na molécula, influenciando assim comportamentos biológicos e químicos da molécula. Logo, o seu espectro de absorção e espectro de intensidade de fluorescência poderão variar de acordo com estes fatores presentes descritos, variando de 415nm (acetona) a 430nm (metanol) e o espectro de emissão de fluorescência variará, de 524nm a 557nm, respectivamente. A curcumina foi escolhida neste estudo por ser aprovada pelo FDA para projetos clínicos por não apresentar toxicidade a células de mamíferos e pela literatura relatar a ação da curcumina contra fatores de virulência

bacteriana como no crescimento de biofilmes e pela inativação do sistema de quórum sensing em espécies de *K. pneumoniae* (9), *Porphyromonas gingivalis* (32) e *P. aeruginosa*.(8)

Além da espécie *S. aureus*, principal micro-organismo coletado em TE de pacientes nas UTIs, outras espécies nosocomiais frequentes neste tipo de material e em outras infecções recorrentes como em cateteres urinários foram testadas pra otimizar os experimentos aplicando inativação fotodinâmica em biofilme única e multi-espécie. Entre as espécies testadas se encontra: *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* resistente a meticilina.

2.4 Planejamento experimental (DoE)

Métodos estatísticos são fundamentais para uma análise de dados de alta confiabilidade por seguir cálculos estatísticos para verificação dos dados e retirar informações precisas na área científica e empresarial. Quimiometria como o planejamento experimental de dados é fundamental para aprimorar processos e propor metodologias eficientes em um tempo curto e sensível para uma maior reprodutividade da metodologia proposta e testada. (33) As vantagens da realização do planejamento são: triagem das variáveis mais influentes no modelo em estudo (34); otimização da quantidade de experimentos a realizar, reduzindo o volume experimental; redução dos custos; resultados com uma maior confiabilidade e possibilidade de obter um modelo matemático para previsão dos resultados de acordo com a variabilidade do comportamento do valor das variáveis não testados. (33) Além disso, é possível analisar o estudo simultâneo das variáveis, separando seus efeitos; redução do número experimental sem prejuízos a análise de dados; realização da pesquisa em etapas de modo iterativo e determinação da confiabilidade dos dados. Existem diversos softwares pagos e gratuitos disponíveis para realização do DoE.

O primeiro passo é descobrir qual o objetivo principal dos experimentos identificando os fatores que irão influenciar os processos, a faixa de variação dos mesmos e as condições financeiras e ambientais possíveis. Em seguida realizar a triagem das variáveis, identificando quais as possíveis mais influentes nos processos e se a faixa proposta é coerente. A terceira etapa é o cálculo do modelo matemático para a superfície de resposta para que a região ótima de trabalho seja encontrada. Neste trabalho o software Statistica® foi utilizado, licenciado pela Universidade de São Paulo (USP).

2.5 Etapas do estudo

Portanto, o presente estudo conta com 4 principais etapas realizadas, iniciando com os testes piloto do tubo funcionalizado com suas caracterizações físico químicas e os primeiros ensaios *in vitro* (1). Em seguida foram realizados os estudos de otimização da reação de funcionalização, testando diferentes concentrações de curcumina funcionalizada e seus testes de estabilidade, degradação e de citotoxicidade. (2) Logo, os estudos de otimização da terapia fotodinâmica foram realizados, testando concentrações de curcumina funcionalizada, doses de luz, tempos e espécies de biofilmes bacterianos desenvolvidos diferentes. (3) Na fase 4 um sistema para simular o sistema respiratório foi construído para encontrar a melhor concentração de curcumina funcionalizada e quantidade de doses de luz irradiadas. Para finalizar, a fase 5 foi a realização dos ensaios *in vivo* no modelo de suínos para provar segurança e eficácia do novo material e da técnica para ser aplicada nos ensaios clínicos.

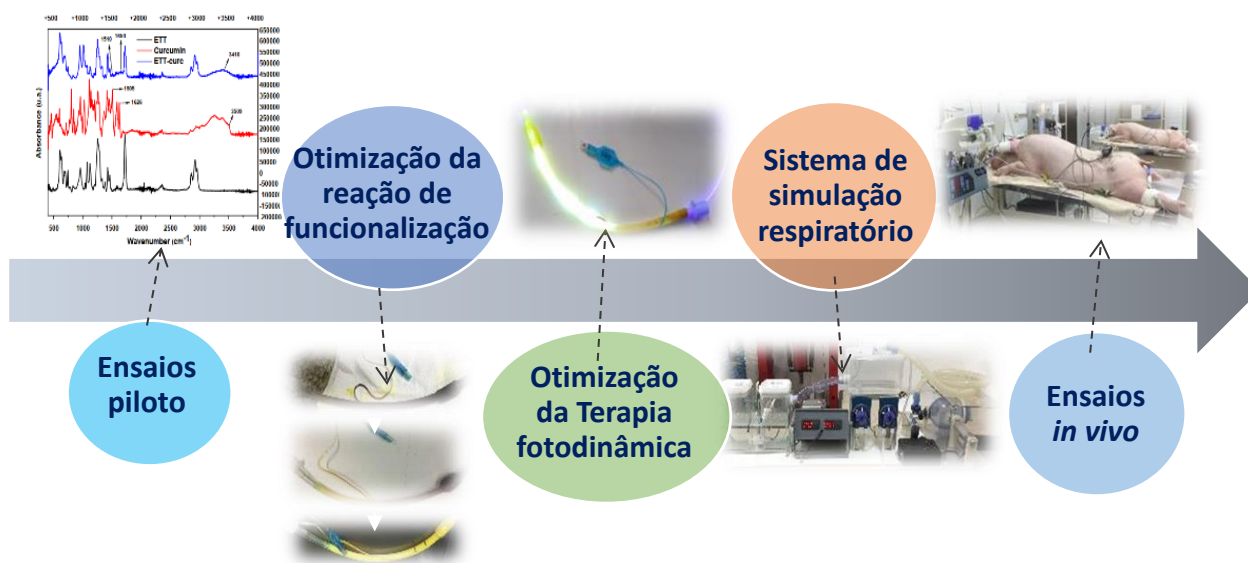


Figura 4 - Etapas do estudo.
Fonte: Elaborada pela autora.

3 – AVOIDING VENTILATOR-ASSOCIATED PNEUMONIA: CURCUMIN-FUNCTIONALIZED ENDOTRACHEAL TUBE AND PHOTODYNAMIC ACTION ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA: PROCEEDING OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES IN 2020

3.1 Artigo publicado na revista: Proceeding of National Academy of Sciences in 2020

3.2 Objetivos:

Geral:

- Realizar os primeiros ensaios de caracterizações físico-químicas do tubo funcionalizado com curcumina, assim como realizar os ensaios piloto *in vitro* de inativação fotodinâmica em biofilmes bacterianos.

Específicos:

- Caracterizações físico-químicas como espectroscopia de infravermelho (FTIR), intensidade de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia confocal, microscopia Raman e análise de flexibilidade do material pelo teste de tensão deformação do novo material.
- Ensaios piloto para verificar a foto inativação de biofilmes de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* formados por 24h utilizando doses de luz iguais a 50J/cm².



Avoiding ventilator-associated pneumonia: Curcumin-functionalized endotracheal tube and photodynamic action

Amanda C. Zangirolami^a, Lucas D. Dias^a, Kate C. Blanco^a, Carolina S. Vinagreiro^b, Natalia M. Inada^a, Luis G. Arnaut^b, Mariette M. Pereira^b, and Vanderlei S. Bagnato^{a,c,1}

^aSão Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, SP 13566-590, Brazil; ^bCoimbra Chemistry Centre, Department of Chemistry, University of Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal; and ^cThe Hagler Institute for Advanced Studies, Texas A&M University, College Station, TX 77843-3120

Contributed by Vanderlei S. Bagnato, July 10, 2020 (sent for review April 16, 2020; reviewed by Merrill A. Biel and Tayyaba Hasan)

Hospital-acquired infections are a global health problem that threatens patients' treatment in intensive care units, causing thousands of deaths and a considerable increase in hospitalization costs. The endotracheal tube (ETT) is a medical device placed in the patient's trachea to assist breathing and delivering oxygen into the lungs. However, bacterial biofilms forming at the surface of the ETT and the development of multidrug-resistant bacteria are considered the primary causes of ventilator-associated pneumonia (VAP), a severe hospital-acquired infection for significant mortality. Under these circumstances, there has been a need to administrate antibiotics together. Although necessary, it has led to a rapid increase in bacterial resistance to antibiotics. Therefore, it becomes necessary to develop alternatives to prevent and combat these bacterial infections. One possibility is to turn the ETT itself into a bactericide. Some examples reported in the literature present drawbacks. To overcome those issues, we have designed a photosensitizer-containing ETT to be used in photodynamic inactivation (PDI) to avoid bacteria biofilm formation and prevent VAP occurrence during tracheal intubation. This work describes ETT's functionalization with curcumin photosensitizer, as well as its evaluation in PDI against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. A significant photoinactivation (up to 95%) against Gram-negative and Gram-positive bacteria was observed when curcumin-functionalized endotracheal (ETT-cur) was used. These remarkable results demonstrate this strategy's potential to combat hospital-acquired infections and contribute to fighting antimicrobial resistance.

hospital-acquired infection | ventilator-associated pneumonia | biofilms | endotracheal tube | photodynamic therapy

Hospital-acquired infections are a worldwide public health problem, causing thousands of deaths every day (1) in addition to increased healthcare costs (the United States: \$33 billion per year, ref. 2; Europe: €13–24 billion per year, ref. 3). Among hospital procedures, mechanical ventilation with an endotracheal tube (ETT) is commonly used to facilitate the oxygen flow from the oropharynx into the trachea (4) in postoperative or posttraumatic patients. However, its use may increase the risk of nosocomial pneumonia by 6–21 times (5, 6). These occur since bacteria from the environment aggregate on the ETT surface. Therefore, they become permanently attached and can later be broncho-aspirated. This colonization produces extracellular polysaccharides and develops a microbial biofilm and, in most of these cases, leads to ventilator-associated pneumonia (VAP) (7–9). The infection is hard to fight since colonies are formed in the airways, where the adaptation mechanisms include changes in quorum sensing and the consequent production of virulence factors. Thus, oral or systemic antibiotics have shown intrinsic difficulties in acting, and the problem becomes even more severe when bacteria develop additional resistance.

In this regard, the use of an antimicrobial-coated ETT is currently a vital strategy to reduce and eliminate biofilm formation

and, hence, VAP (10, 11). Different coatings on the ETT have been used to reach this aim, such as silver sulfadiazine (12), silver (13–16), silver sulfadiazine/chlorhexidine (17), gentamicin (18), silver-palladium-gold (19), rose bengal (11), and gendine (10). Most of them present some antibacterial effect but present limitations as well (12).

Besides coating with metals or metal-based particles, other studies have demonstrated that photodynamic therapy (PDT) is a useful tool on microorganism photoinactivation and can become a potential alternative for the treatment and eradication of microbial infections (20–27). PDT combines an appropriate source light, a photosensitizer, and molecular oxygen (O₂) to produce reactive oxygen species (ROS: singlet oxygen and oxygen-centered radicals), destroying targeted cells and microorganisms (28–31). Furthermore, PDT is simple to use and can be repeated. It offers a long-term treatment to obtain complete elimination of biofilms, a cost-effective therapeutic option, and an independent approach toward the resistance pattern of bacteria to antibiotics, showing the absence of photoresistant strains (32–36). According to recent literature (37), the infectious focus is in the region of contact, as shown in Fig. 1, which is the region where the microorganisms can migrate to the lungs, resulting in

Significance

Hospital-acquired infections also caused by multidrug-resistant bacteria are currently one of the most severe problems that our society faces, which constitute an excellent risk for humankind. The absence of alternatives to combat these types of infections leaves humanity highly vulnerable. Therefore, it becomes imperative to develop new technologies to fight bacterial infections, with alternative mechanisms of action relative to the classical antibiotics. Since ventilator-associated pneumonia (VAP) occurs in patients under mechanical ventilation, an urgent need is needed to prevent, decrease, and combat infectious pathogens at the endotracheal tube (ETT). In this paper, we demonstrate a practical methodology to prepare a regular photosensitizer-containing ETT, with effective photodynamic activity for microbial inactivation. The process is efficient and safe for the patient.

Author contributions: K.C.B., M.M.P., and V.S.B. designed research; A.C.Z., L.D.D., K.C.B., C.S.V., and N.M.I. performed research; L.D.D., L.G.A., and M.M.P. contributed new analytic tools; A.C.Z., L.D.D., K.C.B., M.M.P., and V.S.B. analyzed data; and A.C.Z., L.D.D., K.C.B., M.M.P., and V.S.B. wrote the paper.

Reviewers: M.A.B., University of Minnesota Medical Center; and T.H., Harvard Medical School.

The authors declare no competing interest.

Published under the PNAS license.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: vander@ifsc.usp.br.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2006759117/-DCSupplemental>.

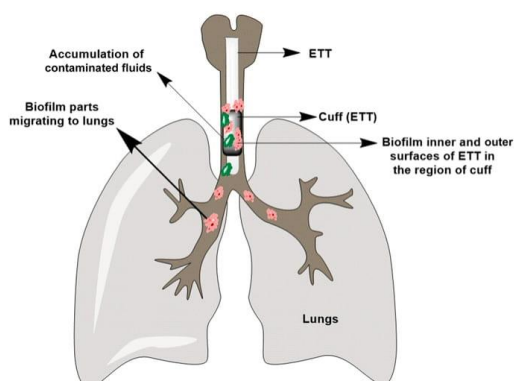


Fig. 1. Representative diagram of ETT positioning. Contact is made by the cuff located at the lower end, allowing the action of the breathing machine. At this point lies the critical part of accumulation of contaminated liquids and the formation of biofilms that lead to infections.

VAP. It is necessary to go much further, by promoting inactivation mainly in the region of the inflated balloon contact and beyond. Similarly, bathing the tube and promoting lighting does not help much, due to leaching of the fluids that wash out the photosensitizer from the interest region. The tube itself must be a photosensitizer. Among photosensitizers used so far, curcumin is one of the most studied molecules with high antimicrobial activity (38–40), showing three reactive functional groups (one diketone moiety and two phenolic groups) (41). The curcumin antibacterial effects are related to ROS production and intracellular accumulation, causing irreversible bacterial cell membrane damage, leading to cell death even in biofilms form (42).

Based on this knowledge, the aim of this study is focused on the development of an efficient chemically bonded photosensitizer to the ETT, introduced in the airway, promoting PDT with reduction/elimination of biofilm formation in orotracheal intubation to prevent the lungs from infections, overcoming presently posed limitations. Here, we report the chemical functionalization of commercially available polyvinyl chloride (PVC)-based ETT with curcumin photosensitizer and demonstrate the potentialities of its practical use. Spectroscopic and mechanical characterization of the curcumin-functionalized endotracheal tube (ETT-curc) has shown the maintenance of its required properties and allowed to investigate the mechanism of action of microorganism's inactivation at the ETT surface. Antimicrobial activity and biofilm inhibition by the ETT-curc were evaluated against Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*). Finally, this functionalization is performed with an entirely safe and innocuous substance that does not provide any significant modification of the ETT properties, and the

presence of the organism does not constitute any risk for the patients.

Results

Preparation of Curcumin-PVC-Based Endotracheal Tube. The ETT system is in permanent contact with the air track's liquids. Considering that biofilms formed both on the outside and inside the tube, the polymer surface's chemical functionalization with photosensitizing molecules constitutes the best approach for the preparation of photoactivated ETT, as shown in Fig. 2. Moreover, this approach prevents the continuous washing of the photosensitizer, which is a crucial issue for its long-living action.

This study started with the linkage of the curcumin photosensitizer onto clinically approved ETT (Fig. 3A) made by PVC. First, the chemical stability was evaluated in different organic solvents at several temperatures. For that, the ETT was divided into small fragments, which were introduced in a different flask containing organic solvents, such as 1,2-dimethoxyethane (DME), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), tetrahydrofuran (THF), and dimethyl sulfoxide (DMSO) within a temperature ranging from 30 °C to 50 °C (SI Appendix, Table S1). Then, optimization studies, at a small scale, were performed to promote the covalent linkage of curcumin to PVC-based ETT. From the macroscopic structural analysis of the ETT, it was concluded that the most efficient approach was the one that used DMSO as solvent and Cs_2CO_3 base, an under inert atmosphere, along 4 h (Fig. 2). The final solution's ultraviolet-visible (UV-Vis) measurements determined the indirect quantification of the amount of functionalized curcumin compared with a standard 0.5% curcumin solution. A homemade reactor was developed (SI Appendix, Fig. S1) to carry out the functionalization of PVC-based ETT with curcumin. The images of the clinically available ETT and the ETT-curc are presented in Fig. 3A and B, respectively.

Characterization of ETT-curc. ETT-curc was characterized by UV-Vis fluorescence emission spectroscopy. The fluorescence emission spectrum, acquired from the outside surface of the ETT-curc and presented in Fig. 4, showed the steady emission band at 550 nm, typical of curcumin photosensitizer.

FT-IR spectroscopy was then used to characterize the small pieces of the ETT-curc compared with curcumin and non-functionalized ETT material (SI Appendix, Figs. S2 and S5). The FT-IR spectrum of curcumin showed characteristic vibrational peaks at $3,509\text{ cm}^{-1}$ (hydroxyl group -OH), $1,600\text{--}1,650\text{ cm}^{-1}$ (C = O), $1,509\text{ cm}^{-1}$ (C = C ethylene), and $1,250\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C group ether). The spectrum of ETT-curc presented similar peaks at $3,506\text{ cm}^{-1}$ (hydroxyl group -OH), $1,600\text{--}1,650\text{ cm}^{-1}$ (C = O), $1,512\text{ cm}^{-1}$ (C = C ethylene), and $3,432\text{ cm}^{-1}$ (water), which corroborated with the presence of curcumin on ETT-curc. The saddle shift between the pure curcumin spectrum with the ETT-curc indicates the molecules' chemical bond to the polymer surface. Moreover, the shift and shape modification on the OH group vibration ($3,510\text{ cm}^{-1}$) and the C = O vibration ($1,628\text{ cm}^{-1}$) are indicative of the chemical bond between curcumin photosensitizer and the polymer surface (43).

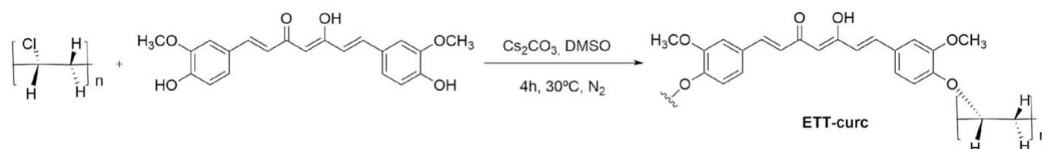


Fig. 2. Scheme of the covalent linkage of curcumin photosensitizer onto PVC-based ETT.

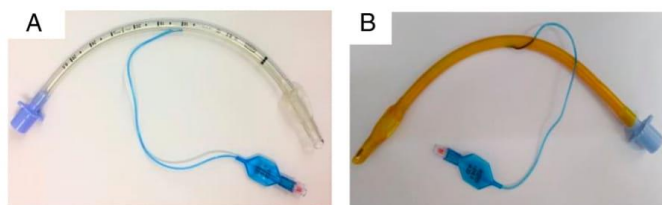


Fig. 3. (A) PVC-based ETT. (B) ETT-curc. The yellowish color of the surface indicates the presence of curcumin.

To analyze the physical structure of the ETT-curc and evaluate the efficiency of the ETT surface covering with the curcumin, scanning electron microscopy (SEM) was performed before and after the functionalization process on the ETT-curc surface (Fig. 5A and B), respectively. As expected, the microscopy image of the nonfunctionalized ETT (Fig. 5A) is similar to those previously reported in the literature (44). In contrast, ETT-curc clearly shows the presence of the curcumin photosensitizer on the ETT surface without altering its global physical structure (Fig. 5B). It should be noted that preserving the original tube's quality is of fundamental importance for an application. Moreover, the presence of curcumin in the ETT-curc whole area guarantees that no biofilm misses the action of the photo-activated curcumin. That is an essential characteristic to guarantee the efficiency of microorganism's elimination on ETT-635477740000 Besides, both ETT and ETT-curc were submitted to tensile tests to evaluate the mechanical properties maintenance after the functionalization procedure (SI Appendix, Fig. S3). Each tube was subjected to a force (axial direction of the ETT) that tended to move them to rupture. Fig. 6 shows the tensile stress (MPa) vs. tensile strain (%) of ETT (black) and ETT-curc (red). Two ETT and three ETT-curc were analyzed, and the obtained values of the tensile strain 285 and 286 for ETT and 231, 236, and 263 for ETT-curc can be considered as not compromising the mechanical properties of the ETT.

The quantification of functionalized-curcumin onto ETT was calculated by UV-Vis, following the Beer-Lambert law, where the absorbance values of the initial and final reaction medium and washing solutions were measured. The difference in initial concentration and final concentration plus the washing solutions gave a calculated percentage of 0.5% of linked curcumin. Finally,

the stability of the ETT-curc, under a range of pH values (2.0, 4.5, 7.0, 8.0, and 10.0), mimicking the biological systems, was analyzed by UV-Vis absorption spectroscopy, recorded at different times (0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 168 h, 408 h, and 576 h), and data are presented in SI Appendix, Fig. S4. From the analysis of the UV-Vis spectra, it was concluded in this range of pH, the presence of curcumin or degradation products in solution was not observed in any case simulating situations corresponding to pulmonary acidosis and alkalosis.

In Vitro Antimicrobial Activity Tests. To evaluate the potential antimicrobial of the ETT-curc, in vitro tests were performed using different bacterial strains (*S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*) in the inner and outer surfaces of small pieces of ETT and ETT-curc. After contamination, each set of 1-cm pieces was subdivided into two groups: the first group was placed in the dark and the second group was irradiated inside and outside with 450-nm light (70 mW/cm²), and a fluence rate of 50 J/cm² (illumination for 12 min). After illumination, the number of microorganisms remained in the tube was evaluated. The resulted data are presented in Fig. 7. When compared to the original ETT, all conditions led to a significant decrease in bacterial colonies. PDT action represented by the ETT-curc with light showed a significant microbial reduction, demonstrating the proof of principle proposed. The question concerning the fact that the functionalized surface has an equivalent effect as the free molecules in contact with microorganisms was confirmed. The functionalized surface promotes photodynamic action for microbial control at an acceptable level. The results indicate a single application of light, a microbial reduction of about 95% for *S. aureus*, 72% for *E. coli*, and 73% for *P. aeruginosa*, compared with the control. The PDT groups are statically different from the control groups ($P < 0.05$). Such a reduction, with a single illumination, is a quite promising result, which might be even better if the illumination is repeated. In a second in vitro experiment, the continuous growth of the biofilm after illumination was simulated. Considering that the ETT installed in patients is in constant exposure to bacterial species and an ideal nutritional and environmental conditions for pathogenic strains development is present, an in vitro simulation of this scenario, together with the treatment proposed in this study, was performed. The results are presented in Fig. 8. The ETT-curc containing bacterial biofilm (*S. aureus*) was irradiated, at 50 J/cm², (once every 24 h) and evaluated along 6 d. After each illumination, ETT-curc returned to optimal microbial growth conditions. In Fig. 8, it is shown that PDT reduced the number of bacterial colonies present in ETT-curc after each therapy session, although ETT-curc continues in this microbial multiplication environment. It was also shown that ETT-curc remains active after six PDT sessions with 23.76% microbial reduction. The PDT groups of days 1, 2, and 5 are statically different from the control groups. This simulation system allowed us to evaluate the possibility of implementing repeated or continuous

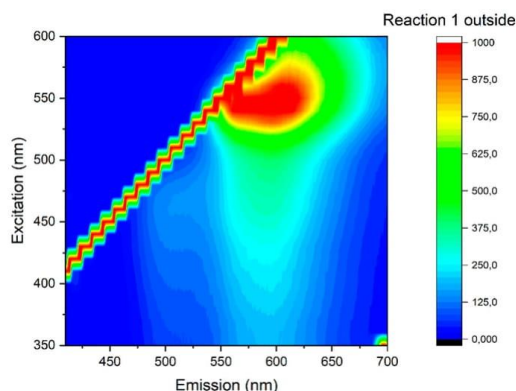


Fig. 4. Fluorescence spectrum on the outside surface of the ETT-curc.

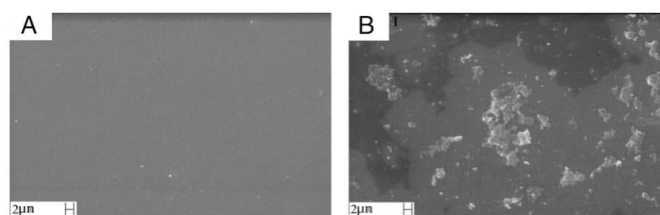


Fig. 5. SEM of ETT (A) and ETT-curc (B). The sample with curcumin shows good covering of the surface.

illumination without degradation of the photosensitizer immobilized onto ETT. Besides the fluctuations, the ETT-curc, without illumination, shows a prevalence of 85% (average) of the biofilm along the days when compared with control (ETT alone). The functionalized surface without light has a small effect on the growth, consistent with a day experiment. However, the use of the ETT-curc, with illumination, provided around 40% of the control, demonstrating a considerable reduction in biofilm formation.

Bacterial Biofilm Formation. The experiment was designed to evaluate the biofilm's kinetics developed on the ETT without and with curcumin over time. The bacterial biofilm developed in ETT and ETT-curc in different times. After the contamination, the light groups were washed twice with a phosphate-buffered saline (PBS) solution and submitted to PDT with the Biotable device. Each experiment had three repetitions, and the groups were: 1) only bacteria on the ETT, and 2) bacteria with PS functionalized on ETT. The methodology is described in *SI Appendix, Fig. S6*. The light doses each group received are described at *SI Appendix, Table S2*.

Fiber Illumination on ETT-curc. In *SI Appendix, Fig. S7*, we show the way that ETT-curc is illuminated via a cylindrical diffuser fiber, placed inside the tube. To demonstrate that the minimum antimicrobial threshold dose is reached inside and outside the ETT-curc, diffused light intensities from inner-out were measured (*SI Appendix, Fig. S8*).

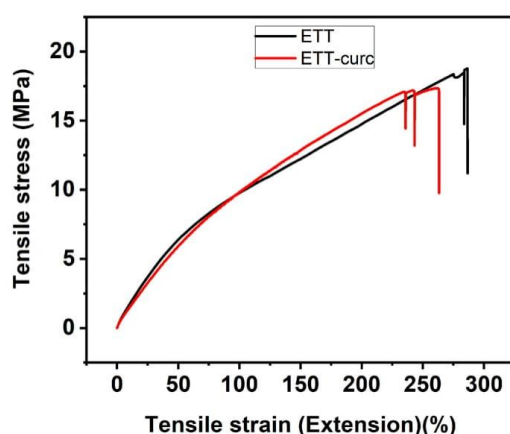


Fig. 6. Stress-strain curves for PVC-based ETT (black) and ETT-curc (red).

Discussion

The main goal of this work was to functionalize a clinically approved ETT with a curcumin photosensitizer. We deliberately avoided changing EETs to make them more amenable to surface functionalization. The procedure developed can be applied to existing ETTs made of PVC. The light can penetrate the microbial biofilm considering its thickness, and the PVC does not absorb at 450 nm. We first address the reaction conditions to optimize the functionalization process regarding the solvent used, temperature, and reaction time.

The nucleophilic substitution reaction of the PVC-chlorine atom by the hydroxyl group of curcumin was strongly dependent on the reaction conditions: solvent, base, temperature, and reaction time. All of the other tested reaction conditions led to a significant physical variation of the ETT that was attributed to the removal of the plasticizers and ink dyes. The solid Cs_2CO_3 revealed to be the most appropriate and easily removed inorganic base, capable of generating the curcumin anion nucleophile necessary to promote the chlorine atom substitution reaction to generate the desired covalently linked curcumin to the ETT tube.

Different types of antimicrobials coatings on endotracheal tube surface to avoid VAP have been reported, e.g., gentidine (10), silver sulfadiazine (12), silver (13–16), silver sulfadiazine/chlorhexidine (17), gentamicin (18), silver-palladium-gold (19), rose Bengal (11), and methylene blue. Most of them presented some antibacterial effect, but showed limitations such as: 1) lack of detailed and precise toxicity information of silver for human treatment; 2) risk of accumulation of silver in the body leading to heavy metal toxicity; 3) possibility of bacteria resistance formation along the time; 4) some results reported with silver as coating did not show decrease of bacterial colonization when compared to commercial ETT (silver free). Gentidine (a combination of chlorhexidine and gentian violet) was applied as an antimicrobial coating (10), but the authors did not present any physical and chemical characterization, leaching, and stability evaluation. Regarding the PDT systems used, studies reported the application of rose Bengal (11) and methylene blue as photosensitizers. When methylene blue was reported, the authors described a different PDT protocol compared to us since they delivered the photosensitizer by spray into the lumen of the ETT, which may occur leaching. A bacterial photoinactivation was observed for the study that rose Bengal was applied (11), but a lack of experimental details (light dose used, physical and chemical characterization, coating procedure) was also observed.

Herein, we described a stable functionalization of a commercial PVC-based endotracheal tube with curcumin, a natural and nontoxic photosensitizer. From the analysis of Fig. 7, we can conclude that the ETT-curc having the surface modified with covalently linked curcumin, under dark conditions, clearly decrease the bacterial adhesion and biofilm formation on surface ETT. These results are in agreement with the literature (45), where it has been demonstrated that biofilm architectures

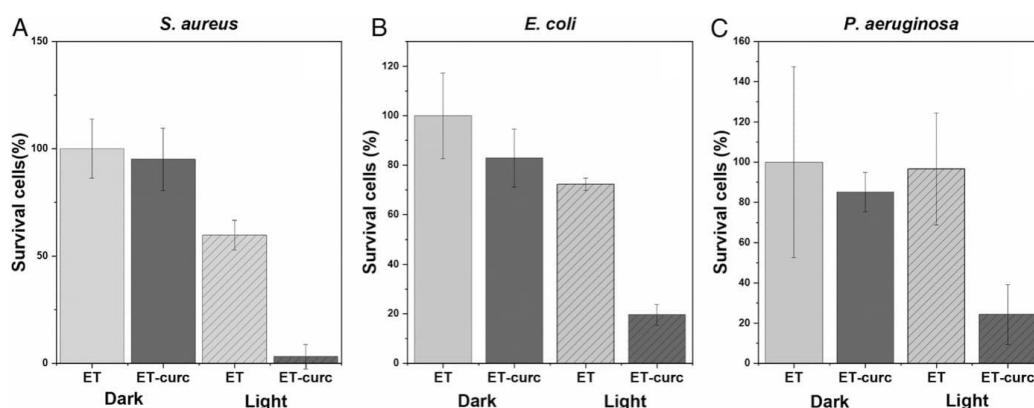


Fig. 7. Photodynamic inactivation of bacterial species *S. aureus* (A), *E. coli* (B) and *P. aeruginosa* (C) in biofilms contained in ETT and ETT-curc, before and after being submitted to total light dose of 50 J/cm^2 ($n = 9$, error bar = SD and $P < 0.05$).

determine the relative strength of the mechanical cell-cell attraction and repulsion forces. In this study, the presence of curcumin photosensitizer attached to the ETT may produce an alteration in the mechanical cell-cell forces, with consequent modifications and reduction of biofilm formation.

These results point out that typical ROS formation by curcumin in the planktonic medium is also observed in this *S. aureus* bacteria biofilm destruction, using the ETT-curc device. Based on these results, we conclude that electrostatic repulsions between photosensitizer molecules and the biofilm polysaccharides structure might contribute to biofilm restructuring and cell death. Furthermore, based on these results, we hypothesize that biofilm architectures are primarily determined by the relative strength of the active mechanical cell-cell attraction and repulsion forces. To apply this principle in clinical cases, a balance between the rate of biofilm formation versus the rate of bacterial

inactivation by PDT action should be considered. The data obtained in this work provide an essential tool to rationalize the ideal conditions for the optimization of such balance. If we imagine that the inhibition rate by constant illumination exceeds the biofilm formation rate, it is possible that the system does not accumulate colonies and have no chance of deleterious biofilm formation. However, when no lighting is used, that balance will be destroyed, allowing the film's growth to surpass the rate of destruction (Fig. 9).

This type of bio-based material may have many applications in the future. We demonstrate that the nucleophilic substitution of chlorine functionalized PVC with curcumin is an efficient approach to prepare photosensitizer-functionalized endotracheal tubes. The curcumin-functionalized endotracheal tube characterization by infrared spectroscopy, fluorescence spectroscopy, SEM, and tensile tests corroborated the effective functionalization of the curcumin onto the PVC-based endotracheal tube.

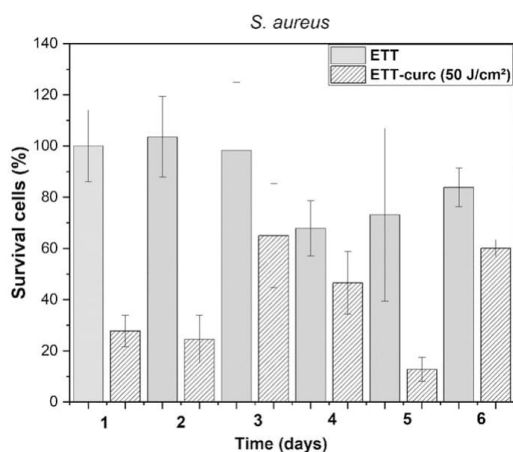


Fig. 8. Evaluation of PDT sessions along 6 d for ETT (solid columns) and ETT-curc (diagonally striped columns). The total light dose of each group is 50 J/cm^2 multiplying by the number of days ($n = 9$, error bar = SD and $P < 0.05$).

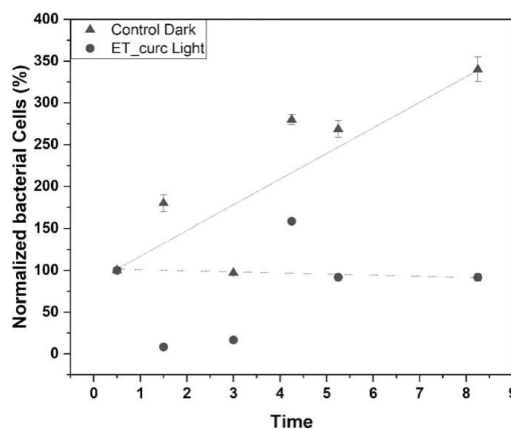


Fig. 9. Number of cells in the ETT and ETT-curc groups illuminated over time. The lines are merely visual references to observe the tendency of the points ($n = 7$, error bar = SD and $P < 0.05$).

ETT-curc shows a robust photodynamic inactivation under blue light activation (at 450 nm) against *E. coli* (72%), *S. aureus* (95%), and *P. aeruginosa* (73%). Furthermore, no degradation and leaching were observed for curcumin-functionalized endotracheal tube under a range of pH (2.0, 4.5, 7.0, 8.0, and 10.0). The findings described herein allow us to foresee the significance of this type of photosensitizer-functionalized materials in many applications. It can significantly reduce the number of deaths from hospital-acquired infections caused by multidrug-resistant bacteria.

Materials and Methods

Preparation of ETT-curc. A handmade reactor (SI Appendix, Fig. S1), with an appropriate size, was designed to perform the complete ETT homogeneous functionalization. The ETT was placed inside the reactor, and several cycles of vacuum/N₂ gas were performed. Curcumin (4.95 mg/mL) and C₂S₂CO₃ (24.8 mg/mL) solution was introduced into the reactor via cannula, for 4 h, at 30 °C, under an inert atmosphere after the tube was washed and tested (SI Appendix, Experimental Procedures).

Biofilm Photodynamic Inactivation. In vitro tests with inhibition of biofilm formation of the functionalized ETT-curc in absence and presence of illumination were performed using the ETT as a control experiment. A pre-inoculum of *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* strains was prepared with brain heart infusion (BHI) along 15 h. After this period, the bacterial cells were washed twice with phosphate buffer, and 100 µL of each inoculum solution was added to a 24-well plate containing 900 µL of BHI medium and pieces (1 cm) of the ETT and ETT-curc. To allow the bacterial biofilm

formation around the ETT, they were incubated for 24 h at 37 °C. After removing the planktonic cells by washing all of the ETT with PBS, the ETT was separated into four groups. First, the biofilms formed in the surface of the control (ETT) and functionalized ETT-curc without illumination were removed with PBS from the ETT surface via mechanical stirring. Then, each solution diluted with PBS and the colony formation unity method performed, and the corresponding colony number in Fig. 7 for *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. The groups' control ETT and functionalized ETT-curc were irradiated inside and outside, with 450-nm light-emitting diode light under a total light dose of 50–350 J/cm² on each side (SI Appendix, Table S2). After the illumination, the biofilms were removed using PBS from the ETT surface under conditions described above, and each solution was diluted again with PBS, and the corresponding colony number presented in Fig. 7 with controls and tests presented in orange and red, respectively. Bacterial biofilm formation and statistical analysis details are presented in SI Appendix, Experimental Procedures.

Data Availability. All study data are included in the article and SI Appendix.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant CEPOF 2013/07276-1, INCT "Basic Optics and Applied to Life Sciences" Grant FAPESP 2014/50857-8, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grant 465360/2014-9, Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), and QREN/FEDER Grants UID/QUI/00313/2019 and POCI-01-0145-FEDER-027996. We thank FAPESP, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CNPq, and FCT for scholarships namely CNPq (to A.C.Z.), FAPESP 2019/13569-8 (to L.D.D.), FAPESP 2019/12694-3 (to K.C.B.), and FCT PD/BD/128317/2017 (to C.S.V.).

1. A. W. Friedrich, Control of hospital acquired infections and antimicrobial resistance in Europe: The way to go. *Wien. Med. Wochenschr.* **169** (suppl. 1), 25–30 (2019).
2. J. A. Al-Tawfiq, P. A. Tambyah, Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *J. Infect. Public Health* **7**, 339–344 (2014).
3. H. Arefian *et al.*, Estimating extra length of stay due to healthcare-associated infections before and after implementation of a hospital-wide infection control program. *PLoS One* **14**, e0217159 (2019).
4. F. Barbier, A. Andreumont, M. Wolff, L. Bouadma, Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Recent advances in epidemiology and management. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **19**, 216–228 (2013).
5. M. Cavalcanti *et al.*, Risk and prognostic factors of ventilator-associated pneumonia in trauma patients. *Crit. Care Med.* **34**, 1067–1072 (2006).
6. R. Pinciroli, C. Mietto, L. Berra, Respiratory therapy device modifications to prevent ventilator-associated pneumonia. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **26**, 175–183 (2013).
7. C. Sarda, F. Fazal, J. Rello, Management of ventilator-associated pneumonia (VAP) caused by resistant gram-negative bacteria: Which is the best strategy to treat? *Expert Rev. Respir. Med.* **13**, 787–798 (2019).
8. X. Xie, J. Lyu, T. Hussain, M. Li, Drug prevention and control of ventilator-associated pneumonia. *Front. Pharmacol.* **10**, 298 (2019).
9. L. A. Mandell, M. S. Niederman, Aspiration Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **380**, 651–663 (2019).
10. G. Chaiban, H. Hanna, T. Dvorak, I. Raad, A rapid method of impregnating endotracheal tubes and urinary catheters with gentamicin: A novel antiseptic agent. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 51–56 (2005).
11. L. Berra *et al.*, Antimicrobial-coated endotracheal tubes: An experimental study. *Intensive Care Med.* **34**, 1020–1029 (2008).
12. L. Berra *et al.*, Internally coated endotracheal tubes with silver sulfadiazine in polyurethane to prevent bacterial colonization: A clinical trial. *Intensive Care Med.* **34**, 1030–1037 (2008).
13. J. Rello *et al.*, Reduced burden of bacterial airway colonization with a novel silver-coated endotracheal tube in a randomized multiple-center feasibility study. *Crit. Care Med.* **34**, 2766–2772 (2006).
14. P. Kalfon *et al.*, Comparison of silver-impregnated with standard multi-lumen central venous catheters in critically ill patients. *Crit. Care Med.* **35**, 1032–1039 (2007).
15. L. Berra *et al.*, Antibacterial-coated tracheal tubes cleaned with the Mucus Shaver: A novel method to retain long-term bactericidal activity of coated tracheal tubes. *Intensive Care Med.* **32**, 888–893 (2006).
16. M. H. Kollef *et al.*, NASCENT Investigation Group, Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: The NASCENT randomized trial. *J. Am. Med. Assoc.* **300**, 805–813 (2008).
17. L. Berra *et al.*, Endotracheal tubes coated with antiseptics decrease bacterial colonization of the ventilator circuits, lungs, and endotracheal tube. *Anesthesiology* **100**, 1446–1456 (2004).
18. C. G. Adair *et al.*, Eradication of endotracheal tube biofilm by nebulized gentamicin. *Intensive Care Med.* **28**, 426–431 (2002).
19. G. Björling *et al.*, Tolerability and performance of BIP endotracheal tubes with noble metal alloy coating—A randomized clinical evaluation study. *BMC Anesthesiol.* **15**, 174–184 (2015).
20. G. Sivieri-Araujo *et al.*, Rat tissue reaction and cytokine production induced by antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **18**, 315–318 (2017).
21. E. T. Carrera *et al.*, The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: A critical review. *Laser Phys.* **26**, 123001–123024 (2016).
22. C. C. C. Quishida *et al.*, Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med. Sci.* **31**, 997–1009 (2016).
23. C. C. C. Quishida *et al.*, Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine(®) and LED light after one and three successive applications. *Lasers Med. Sci.* **30**, 2303–2312 (2015).
24. H. Vögeling *et al.*, Synergistic effects of ultrasound and photodynamic therapy leading to biofilm eradication on polyurethane catheter surfaces modified with hypericin nanoformulations. *Mater. Sci. Eng. C* **103**, 109749 (2019).
25. J. Tan, Z. Liu, Y. Sun, L. Yang, L. Gao, Inhibitory effects of photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida auris*. *Mycopathologia* **184**, 525–531 (2019).
26. C.-T. Chien *et al.*, The antimicrobial photodynamic inactivation resistance of *Candida albicans* is modulated by the Hog1 pathway and the Cap1 transcription factor. *Med. Mycol.* **57**, 618–627 (2018).
27. Q. Jia, Q. Song, P. Li, W. Huang, Rejuvenated photodynamic therapy for bacterial infections. *Adv. Healthc. Mater.* **8**, e1900608 (2019).
28. Y.-Y. Wang, Y.-C. Liu, H. Sun, D.-S. Guo, Type I photodynamic therapy by organic-inorganic hybrid materials: From strategies to applications. *Coord. Chem. Rev.* **395**, 46–62 (2019).
29. L. Sobotta, P. Skupin-Mrugalska, J. Piskorz, J. Mielcarek, Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **175**, 72–106 (2019).
30. J. M. Dąbrowski, "Chapter nine—Reactive oxygen species in photodynamic therapy: Mechanisms of their generation and potentiation" in *Advances in Inorganic Chemistry*, R. van Eldik, C. D. Hubbard, Eds. (Academic Press, 2017), Vol. vol. 70, pp. 343–394.
31. J.-O. Yoo, K.-S. Ha, "Chapter four—New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death" in *International Review of Cell and Molecular Biology*, K. W. Jeon, Ed. (Academic Press, 2012), Vol. vol. 295, pp. 139–174.
32. G. Valduga, G. Bertoloni, E. Reddi, G. Jori, Effect of extracellularly generated singlet oxygen on gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B* **21**, 81–86 (1993).
33. A. Tavares *et al.*, Antimicrobial photodynamic therapy: Study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar. Drugs* **8**, 91–105 (2010).

34. L. Costa *et al.*, Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. *Antiviral Res.* **91**, 278–282 (2011).
35. J. L. Wardlaw, T. J. Sullivan, C. N. Lux, F. W. Austin, Photodynamic therapy against common bacteria causing wound and skin infections. *Vet. J.* **192**, 374–377 (2012).
36. S. Songca, O. Oluwafemi, Photodynamic therapy: A new light for the developing world. *Afr. J. Biotechnol.* **12**, 3590–3599 (2013).
37. M. Barnes, C. Feit, T.-A. Grant, E. J. Brisbois, Antimicrobial polymer modifications to reduce microbial bioburden on endotracheal tubes and ventilator associated pneumonia. *Acta Biomater.* **91**, 220–234 (2019).
38. A. Punjataewakupt, S. Napavichayanun, P. Aramwit, The downside of antimicrobial agents for wound healing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **38**, 39–54 (2019).
39. A. Reshma, V. Brindha Priyadarisini, K. Amutha, Sustainable antimicrobial finishing of fabrics using natural bioactive agents- a review. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.* **8**, 10–20 (2018).
40. C. Santezi, B. D. Reina, L. N. Dovigo, Curcumin-mediated photodynamic therapy for the treatment of oral infections-A review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **21**, 409–415 (2018).
41. P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, B. B. Aggarwal, Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol. Pharm.* **4**, 807–818 (2007).
42. Y. Jiang, A. W. Leung, H. Hua, X. Rao, C. Xu, Photodynamic action of LED-activated curcumin against *Staphylococcus aureus* involving intracellular ROS increase and membrane damage. *Int. J. Photoenergy* **2014**, 1–8 (2014).
43. M. H. Le *et al.*, The dual effect of curcumin nanoparticles encapsulated by 1-3/1-6 β -glucan from medicinal mushrooms *Hericium erinaceus* and *Ganoderma lucidum*. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **7**, 045019 (2016).
44. A. De Campos, "Blendas de PVC/PCL foto/termo e biotratadas com fungos de solo (*Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus fumigatus*)," Master thesis, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho," Rio Claro, Brazil (2004).
45. R. Hartmann *et al.*, Emergence of three-dimensional order and structure in growing biofilms. *Nat. Phys.* **15**, 251–256 (2019).

MICROBIOLOGY

APPLIED PHYSICAL
SCIENCES

4 – OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE FUNCIONALIZAÇÃO EM MATERIAIS POLIMÉRICOS

4.1 Tubo Endotraqueal

Neste capítulo serão descritos e discutidos os estudos sobre a estabilidade e degradação do novo material funcionalizado em diferentes meios como soluções com diferentes pHs, temperaturas e foto exposição (12h por dia) ao longo de 115 dias. Medidas de absorvância foram realizadas para visualizar o comportamento do novo material nas diversas condições. Análises multivariadas utilizando PCA foram realizadas a fim de comparar os resultados entre os grupos. Estudos de citotoxicidade do TEc em células de mamíferos foram realizados para verificar a segurança da utilização do tubo para encaminhar os ensaios para estudos pré-clínicos.

4.2 Objetivos do capítulo:

Geral:

- Avaliar e otimizar a reação de funcionalização em diferentes condições e avaliar segurança do uso do TEc em células de mamíferos;

Específico:

- Realizar testes de estabilidade do TEc;
- Realizar testes de degradação do TEc;
- Otimização da reação de funcionalização pela variação da concentração de curcumina e da base;
- Verificar tempo de vida útil do material;
- Realizar testes de citotoxicidade para verificar segurança em células HDFn (linhagem de células de fibroblastos humano);

4.3 Abstract

Introduction: The significant increase in the number of patients intubated due to respiratory failure, a characteristic symptom of several underlying diseases such as SARS-CoV-2, in the latter, often leads to Ventilator-Associated Pneumonia (VAP). VAP is a Hospital Infection

(HAI) caused by the detachment of microbial biofilm cells adhered to the surface of the endotracheal tube (ET), which migrate to the lung increasing the risk of respiratory complications and leading to the death of bedridden patients. The functionalization of medical equipment surfaces with metals, peptides, antibiotics, and photosensitizers (PS) has been used as a strategy to prevent the formation, as well as to eliminate biofilms formed on them. In this scenario, photodynamic therapy emerges as a powerful tool for the inactivation of bacterial biofilms, as it has a local effect, few side effects, and can be associated with other techniques such as antibiotic therapy. **Objective:** This study aims to optimize functionalization reaction at ET applying curcumin, and performing stabilization and degradation tests and evidence the non-toxicity of the ET-curc in cytotoxicity assays in human cells. **Results:** The functionalized ET showed high stability under different conditions of pH and temperature and proved to be non-toxic to human fibroblast cells cultured even under ideal conditions of high photoinactivation of *S. aureus* biofilms. This stability and toxicity study gives us the scientific basis for translating the study to preclinical testing.

Keywords: immobilization, endotracheal tube, curcumin, stability tests, cytotoxicity tests.

4.3.1 Introduction

The pandemic of SARS-COV 2 has been increasing the studies about respiratory infections because of the warm in the global health community. Severe covid 19 prompt to increase in the number of patients in Intensive Unit Care (UCI) mainly due to respiratory insufficiency (1). The disease increases intubation time and consequently, these patients are more inclined to be infected by Hospital Acquired Infections (HAI). The HAI can be prevented, but it remains a global threat, because they significantly compromise patients' immune system (1) and the probability of a efficient treatment is very low. HAI are acquired mainly by medical devices placed in the patient for assistance, such as catheters and they can expose patient's internal environment to external microorganisms and allow the opposite too. Ventilator-Associated Pneumonia (VAP), Catheter-Associated Urinary Tract Infection (CAUTI), Surgical Site Infection (SSI), and Central Line-Associated Bloodstream (CLABSI) are the most common acquired infections associated with the use of medical devices (2). VAP is infection on the pulmonar parênquima and it is associated to the mechanical ventilation (MV), with the

endotracheal tube (ET) placement into the patient's trachea after 48h of MV (3). ET facilitates gas exchange in critically ill patients (1) and it is an opportunity for bacterial attach the surface, develop an extra polymeric matrix composed of carbohydrates (alginate or cellulose), proteins, and acid nucleic (4) and the bounds between cells and surface became stronger and the attachment became irreversible and colonies became 10 to 10000100,000 times more resistant to antibiotic agents than planktonic cells. Studies of bacterial genomics showed that 70% of the DNA isolated from bacterial colonies found in ET had matching DNA material to species colonizing lungs (8).

Efforts to avoid or reduce biofilm development in medical devices include polymer modification by adding metal coatings and releasing antimicrobial molecules such as antibiotics, peptides (AMP), and photosensitizers. ET is mainly composed of polyvinyl chloride (PVC) and plasticizers, which allows a more flexible polymer structure and at the same time thermal instability at medium and higher temperatures (9). For more than 30 years, silver coating has been studied for its bactericidal potential effect, however, its use is widespread in hospitals (10). The antibiotic coating is an attractive therapy, but the controlled release, temperature dependence, and bacterial resistance are some challenges for an ideal application (5). Functionalizing medical devices using photosensitizers is promising because photodynamic therapy (PDT) is powerful against biofilms and because its acts locally (13) and there is no study revealed bacterial resistance against it. Also, PDT can be associated with other techniques such as antibiotics (12) and chemotherapy, revealing a synergic effect that results in low collateral effects. Reactive oxygen species are produced by this therapy mechanisms resulting in a cell structure destruction, leading to cell death (14).

Curcumin is a natural molecule extract from the rhizome of *Curcuma longa* with strategic properties such as physical-chemical properties like antioxidant, bactericidal, anti-inflammatory, anti-HIV and antimutagenic (15). Curcumin is also a tautomeric molecule and can be found as keto and enol-curcumin. Optimize the curcumin functionalizing at ET, according to previous studies, was the strategy applied in this present study resolving the stability and degradation of curcumin and maintaining the molecule active for long periods. Also, cytotoxicity trials in cultured cells were performed to demonstrate the non-toxicity of the new material in human fibroblasts (HDFn) for evidence safety for pre-clinical assays.

4.3.2 Material and Methods

4.3.2.1 Functionalized ET

Reagents

Cesium carbonate, dimethyl sulfoxide (DMSO) and all the solvents were acquired by Sigma-Aldrich, FluoroChem, or Kasvi and used without more purification. Curcumin ((1E,6E)-1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) with 95% of purity was provided by PDT Pharma® (Brazil). Endotracheal tube (made by PVC) (ET) (Solidor®) is commercially available.

Stability and degradation tests

ET functionalized (ET-curc) tubes were cut into a piece of 1x0,02 cm for both tests, and submerged in solution with five different pHs: 2; 4,5; 7; 8 and 10, maintained at 27°C and in the dark. Control group was maintained in the dark at 27°C. On each experiment day, submerged tubes were weighed, and the solution absorbance was measured by UV-Vis spectrophotometer for 14 days.

Degradations tests were performed in pHs: 2, 4, 6, 7, 8, 9 and 10; temperatures: 4, 27, 37 and 60°C; and one group was exposed to a photoperiod of 12h per day. Control group was maintained in dark and at 27°C. On each experimental day, tubes of each group were submerged in a solution of 3mL of DMSO for 5 minutes and each solution absorbance was measured by UV-VIS spectrophotometer (Cary UV-VIS 50 Varian) for 115 days. The spectra absorbance groups were analyzed by Principal Component Analysis (PCA) using the software Statistica2018 licensed by the University of Sao Paulo (USP).

Optimization of reactions functionalization along the ET

According to initial conditionals tested in previous studies(20), the functionalized reaction was optimized for the entire ET testing four conditions described in Table 1. All reaction were performed for 4h at 32°C.

According to initial conditionals tested in previous studies(60) in 1cm ET pieces, the functionalized reaction was optimized for the entire ET. Therefore, four curcumin concentration were tested and described in Table 4.1. All reaction were performed for 4h at 32°C.

Table 4.1 - Concentration of the reagents of functionalized reaction in 250 mL of DMSO.

Group	ET (PVC) (g)	Curcumin (g/mL)	Cs₂CO₃ (g/mL)
1R	11,7	0,0125	0,0034
2R	11,7	0,006256	0,0017
3R	11,7	0,001044	0,000568
4R	11,7	0,002504	0,00068

Fonte: Elaborada pela autora.

After drying the tubes, Fourier-Transformed Infrared (FT-IR) and a spectrofluorometer were both performed to verify and analyze the presence of curcumin and the bond between the molecule and the polymer.

Microorganism

Pre inoculum

The inoculum was prepared with one milliliter of a frozen cryotube of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925) and added in a falcon with 9 mL of liquid medium culture Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi®, Brazil). The solution was stored in a shaker for 17h at 1500 rpm at 37°C.

Biofilm formed on in parts of the tube

According to bacterial growth in pre inoculum, the solution was centrifuged and washed twice with a buffer solution of *Phosphate Buffered Saline* (PBS) using 4400 rpm for 10 minutes. ET and ETc were cut into 1 cm and added in a 24-well plate with 900 µL of BHI and 100 µL of Scott bottle with 200 mL of liquid BHI and 3mL of *S. aureus* inoculum (10⁸ CFU/mL). The

previously prepared, solution in each well was homogenized. All procedures have been made in a sterile environment, inside the microbiology flux (Airstream, Escoclass II bsc). The plate was stored in an incubator in the dark for 24h at 37°C.

Biofilm formed on the entire tube

The same inoculum solution was centrifuged and washed twice with PBS at 4400 rpm for 10 minutes. ET and ETc were added inside a Scott flask with 250 mL of BHI liquid and 28 mL of inoculum due to the 9:1 proportion of BHI (90%) and inoculum (10%). The solution was homogenized and stored in an incubator for 24h at 37°C. The initial bacterial concentration was 1×10^8 CFU/mL.

Biofilm Photodynamic Inactivation

ET-curec pieces

Tube pieces were washed twice with PBS after 24h from incubation, for removing planktonic cells and then, they were irradiated by a set of 24 Leds at 40W/cm² and irradiated inside the ET-curec with a light source (Tip - 70 mW/cm²), both achieving 50 J/cm² at 450 nm. Both sources built by Support Laboratory (IFSC-USP). After irradiation, tubes were stirred in 10 mL PBS solution for biofilm removal, diluted, plated, and stored at 37°C for 24h in an incubator device (Eletrolab®). for quantify the colonies (CFU/mL).

The counting formed units were calculated by equation 01:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\text{coloniescounted} \times \text{dilutionnumber}}{\text{DropVolum}} \quad (01)$$

Entire ET-curec

After 24h ET-curec were washed twice and irradiated by a cylinder diffuse fiber coupled to a laser with an irradiance of 140 mW/cm² at 450 nm placed inside and outside ET-curec. Each light dose was 100J/cm². After that, tubes were cut into 2 cm, added in a Falcon with 20 mL of PBS solution and stirred for 1 minute; solutions were diluted, plated, and stored at the incubator for 24h. Control groups (ET and ET-curec) (0J/cm²) followed the same procedure expecting the

irradiation time. Figure 4.1 illustrates the methodology used in the experiments using the entire tube.

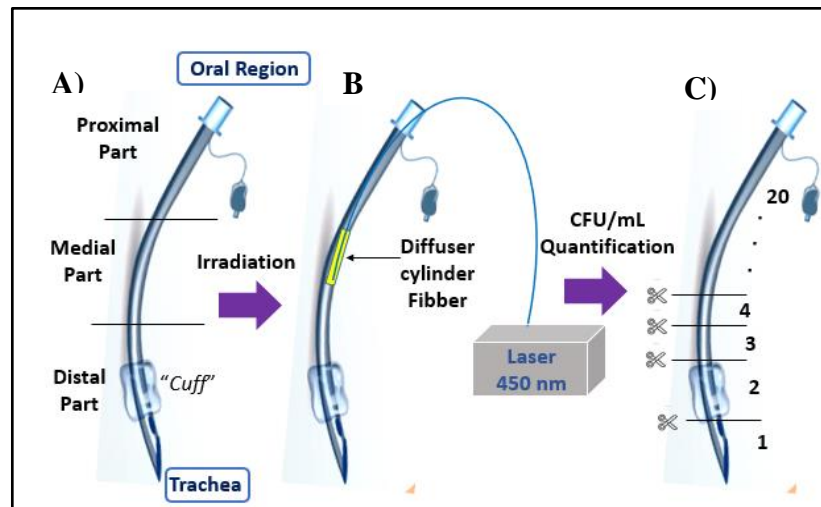


Figure 4.1 - A) Entire tube with the three main regions: proximal (nearest of oral region), medial (intermediate region) and distal part (where cuff is designed); B) The diffuser cylinder fiber with 450 nm placed inside the tube; C) Tube cuts of 1cm made along the tube for biofilm quantification.

Fonte: Elaborada pela autora.

Source of light

A set of 24 led emitting at 450 nm with 40 mW/cm^2 (Biotable) built by Technological Support Laboratory (LAT/IFSC/USP), was applied in photodynamic tests when pieces of 1 cm of ETC were tested (high light doses and material lifetime and cytotoxicity tests).

A diffuse cylinder fiber coupled to a laser emitting at 450 nm (LAT/IFSC/USP), was applied in photodynamic experiments when the entire tube was tested. The irradiance of the laser was 140 mW/cm and it was 2 cm of light diffusion. The fiber was placed inside and outside of the tube to eliminate biofilm cells.

Cytotoxicity *in vitro* assay

In vitro cytotoxicity tests were performed using human fibroblast cells lineage HDFn according to ISO 10993-5A, a methodology that guides experimental evaluation of material toxicity in cell culture.

Non-functionalized ET (control) and ET-cure were sterilized by UVC irradiation before incubation in cell culture medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) without phenol and supplemented with 5% of fetal bovine serum. The cell media that was used to soak the tubes was named extract-media. The material was kept under a humid and controlled atmosphere at 37 °C and 5% CO₂ for 24h or 168h.

Human fibroblasts HDFn were cultured in DMEM supplemented with 5% of fetal bovine serum and the cells were plated in a 96-well plate with a density of 2×10^4 cells per well. The cells were incubated at a controlled temperature (37 °C) and atmosphere (5% CO₂) before having the cell media replaced by the 24h or 168h extract-media.

After 24h of plating HDFn cells, the cell media was replaced by the extract-media and the cells were incubated with the formed extract for 4 hours, washed with PBS, and then replaced with DMEM media, before being exposed to a 50J/cm² at 450 nm. After light exposure, plates were maintained in controlled temperature and atmosphere for 16h before the MTT cell viability test analyzed at an absorbance of 470 nm.

In this experiment, three control groups were tested, to check whether any toxicity response could be related to the tube material itself with or without light exposure: (I) Non-illuminated/ non-functionalized ET extract-media; (II) non-illuminated / functionalized-ET; (III) illuminated/ non-functionalized-ET. The experimental procedure for the control groups was the same used to test the experimental group. All the parameters and times were performed such as the protocol from ISO was designed to.

Statistical data analysis

Data analyses were executed first with the Shapiro-Wilk normality test and followed by the Tukey Test one-way Variance test (ANOVA) using the software Origin[®], licensed by the University of São Paulo (USP). Stability and degradation tests were analyzed by Principal Component Analyses (PCA) using the software Statistica2018 version 13.5.0.17, also licensed by USP.

4.3.3 Results

4.3.3.1 Stability and degradation tests of ETc applying PCA

Stability tests evaluated three parameters: tube weight, pH variation and absorbance measure of each pH solution where each tube was maintained for 15 days. Figure 4.2 describes the results of each parameter chosen for 15 days. Each line from Figures 4.2B and C are average of each condition tested for 15 days. PCA was performed to evaluate statistical differences among the groups tested (Figures 4.2D, E and F).

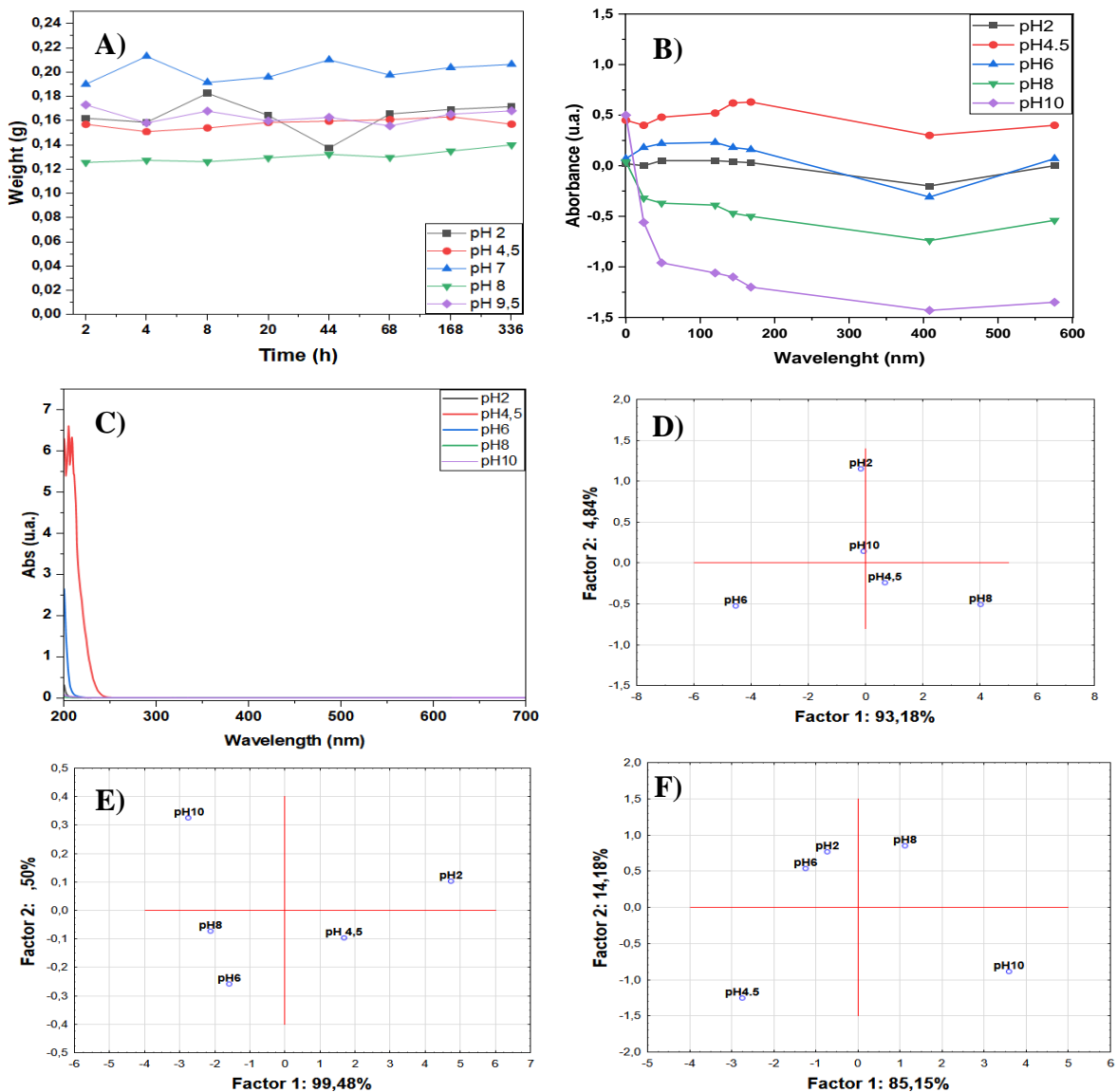


Figure 4.2 - Stability in pH. A) functionalized tube weight immersed in each pH solution for 15 days; B) pH measures results from each solution for 15 days; C) absorbance averages measured in an interval to 200 to 800 nm, from each pH solution with the tubes remaining immersed for 15 days; Score graphs of D) Results analysis from tube weight (g) x Time(h) (Fig. 4.2A); E) pH measures of each solution (Fig. 4.2B) and F) Absorbance for a time in each pH solution (Fig. 4.2C). *Analysis using Origin® and Statistics® software.

Fonte: Elaborada pela autora.

Although the PCA results (Fig. 4.2C) showed no statistically significant difference for tubes of different pH solutions. The weight of the tubes was the parameter that changed the most over time. A small difference was observed in ETcs at pH 6 and 8 (PC1 and PC2 explaining 83.11% and 12.90% of the results, respectively). This small difference could be due to the instability of curcumin in an alkaline solution. Similar results to those observed here with pH 8 were observed in the literature (4.2A) with pH 10. Curcumin immersed in a solution with pH 10 showed similar effects to those immersed in acidic pH (4). According to the Tukey test with $p < 0,05$ and PCA, there was no significative difference among pH values measured for 15 days, and even the absorbance was measured. The high similarity between tested groups 4.2E and F (Figure) was explained by PC1 with 99% and 100% of the results, respectively. The TE-functionalized curcumin was very stable, with no PS molecules released into the solution.

To complement stability tests and explore curcumin functionalization, degradation analysis of PS bound to the tube was performed for 115 days. The objective of the study was to evaluate the action of the material under different conditions of pH, temperature, and photo exposure. To identify curcumin degradation and its photoproducts, samples were obtained on each study day by immersing tubes in a 3 mL DMSO solution for 5 minutes (Figure 4.3).

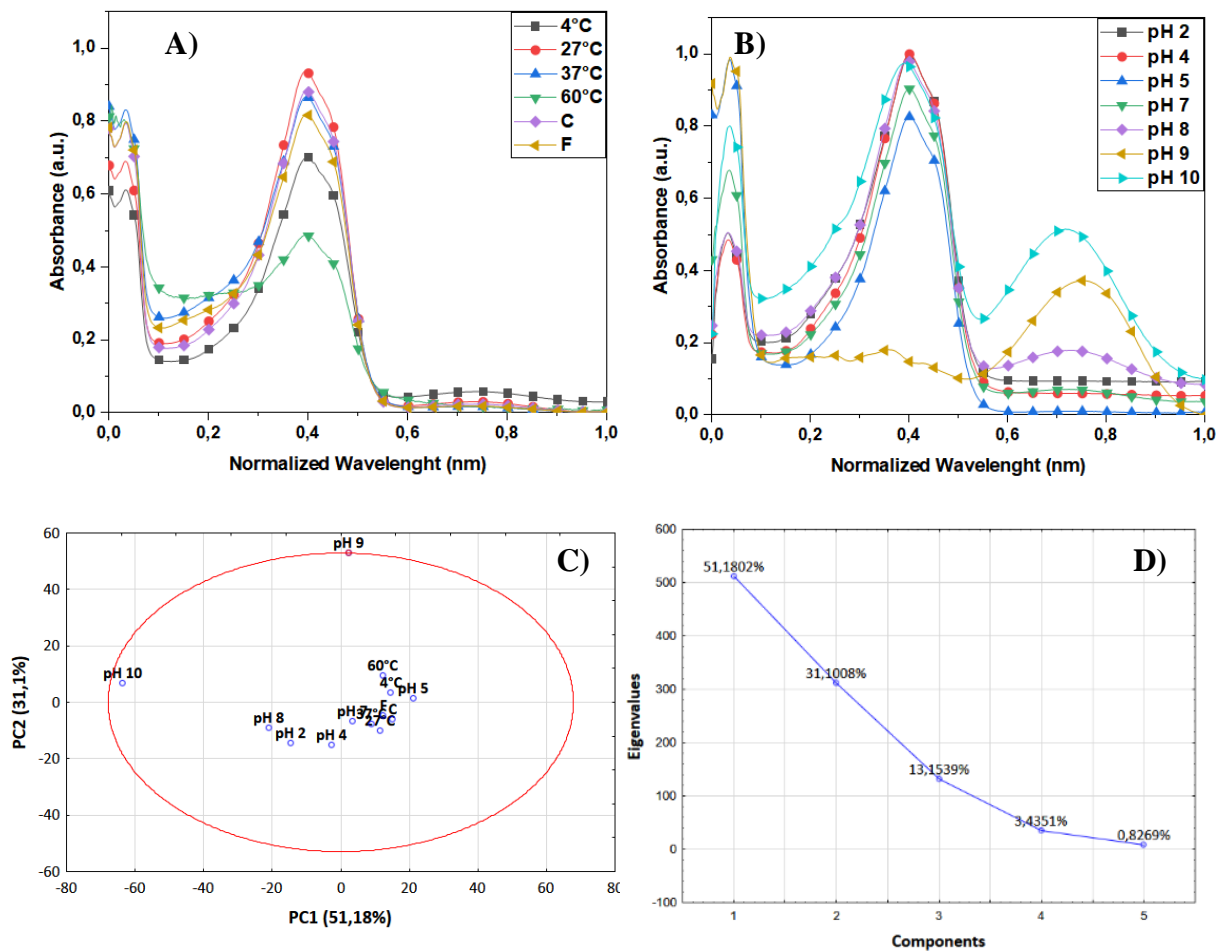


Figure 4.3 - ETcs' UV-vis normalized spectra submitted under various environmental circumstances, including A) temperature, B) pH, and light exposure; Spectra results have produced three primary significant spikes: 270, 432, and 570nm; C) Score graph highlighting variables positions according to the similarity among them by PC1 (x-axis) and PC2 (y-axis); D) Autovectors x components graph describing the contribution of each PC according to the results analyzed: PC1 have explained 51%, PC2 31%, and PC3 13% of the results; the following components have not been statistical as significant as the third ones for explaining the data.

Fonte: Elaborada pela autora.

Thirteen conditions were tested and analyzed by PCA over 115 days. A control group was maintained at dark room temperature for comparison between groups. PCA from all the spectra resulted in three main components to explain the data: PC1 with 51%, PC2 with 31%, and PC3 with 13%, (Fig. S2) revealing differences among conditions. Three main peaks are represented: 270, 432, and 570 nm. The main peak at 430 nm (Fig. 3A) (referred to curcumin) decays as the temperature rises, in spite of the pike at 270 nm (referred to curcumin photoproducts) which rises by the temperature increases. Besides that, PCA from temperatures spectra demonstrates a high similarity among data, with no statistical difference when ET-curc was placed in low (4° C) or medium temperatures (37°C). The ET-curc became darker and with

subtle physical changes at the temperatures of 60°C studied. One important observation here it is that ET is composed mainly of PVC, a stable polymer even at high temperatures (100°C), and of plasticizers to form blends which turn the material thermostable, even at middle temperatures (50°C). The peak in an interval to 560 to 570 nm may be related to curcumin or even to ET degradation (21).

The second analysis represented by Fig 3B revealed a similar behavior when tubes were immersed in acidic and neutral pH (pH2 to pH7). The peak at 430 nm decreased as well as the pH values increased (referred to curcumin). In the opposite occurred in 270 nm, which increased as well the pH value increased. Literature has been proving that the peak at 270 nm refers to curcumin degradation products (16). Even though the peak is present in all pHs examined, alkaline solutions and high-temperature conditions caused a high absorbance intensity in 270nm, which may be directly attributed to a higher degradation products production.

Over the years, the literature has studied curcumin in different environments, associating it with other molecules and carriers, demonstrating its instability in alkaline solutions from the early stages of interaction (22). Molecular structure of curcumin is composed of an aliphatic chain with two aromatic rings, resulting in amphiphilic properties and turning the molecule highly sensitive to environmental changes, from solvents, pH and temperature variation (23). Besides that, curcumin is a tautomeric molecule, with keto and enol forms, highly influenced by external factors such as temperature, solvent polarity, and aromatic ring substitution (24). Enolic form exhibits more stability due to its planar structure and it is the most form when curcumin is exposed to acid pHs. Because of keto form doesn't exhibit a planar structure reveals a less stable structure when compared to the enol form. For example, curcumin solubilized in water presents 30% of enol structure and 70% of keto form, however, in ethanol curcumin presents 85% of enol form and 15% of keto form (25). Therefore, keto form is predominant in alkaline solutions, explaining curcumin instability in these solutions with a tendency to occur oxidative and hydrolytic reactions and consecutively molecule degradation in ferulic acid, feruloyl methane, vanillin and bicyclopentadione (26).

An unusual peak at 570 nm appeared at pH8 to pH10 differing from other pHs. The peak at 570 nm was observed only in alkaline solutions and can be explained by curcumin or ET instability at these pHs values, producing degradation products from both species (16,21).

One observation was the color change of ET-curc when tubes were immersed in pH with higher values (8, 9 and 10). Alkaline solution can alter ET-curc color to a darker reddish

brown. Moreover, acid pHs (pH 2, and 4) change the tube's color to orange. Studies compared the change of color to the production of condensate products such as feruloyl methane (27). Only the temperature at 60°C changed the tubes' color to a darkest color, which may be an oxidative process.

In summary, the new material proved high stability in different conditions of pH, without releasing PS molecules in the solution and without significant changes in weight or pH variation. Furthermore, ET-curc has demonstrated high stability at acid, neutral solutions and with temperatures until 37°C, without light exposure. Curcumin and PVC revealed instability in alkaline solution and temperatures such as 60°C, with light exposure. Visual analyzes haven't shown any changes in the structure of the tubes for 115 days, except in 60°C conditions.

4.3.3.2 Optimized Reaction at entire ET

The optimization of ET functionalization was performed in Figure 4.4 illustrate the color details of each reaction. The same proportions first proposed were maintained related to the number of mols among PVC, curcumin, and Cs_2CO_3 , only by a proportional decay in each reaction tested (Table 4.1).

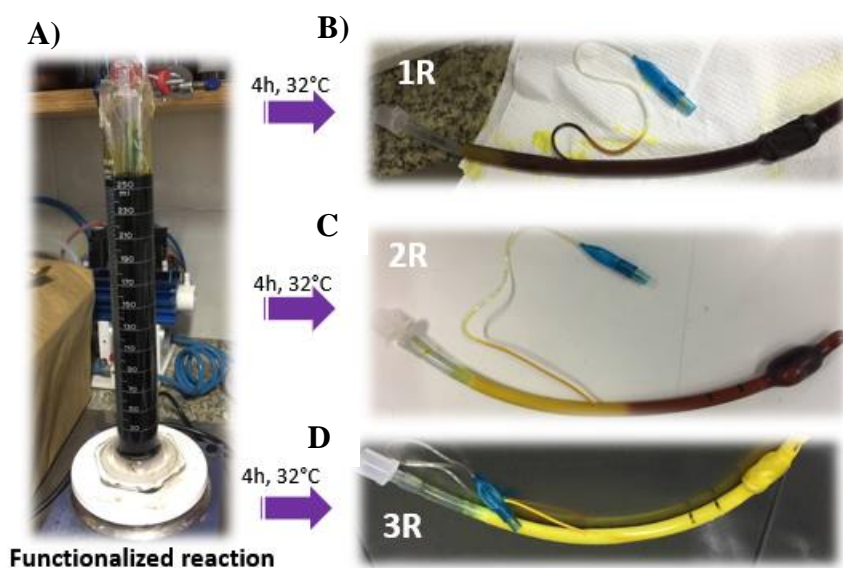


Figure 4.4 - A) Reactor Image where the reactions were performed for 4h at 32°C in conditions of B) 1R; C) 2R and D) 3R.

Fonte: Elaborada pela autora.

ETc 1R was synthesized with a higher concentration (1/2 of the initial condition), which resulted in a reddish-brown color, mainly due to the solvent being DMSO and curcumin concentration. ETc 2R was synthesized with half 1R concentration (1/4 of initial condition) and resulted in a dual color tube. Although the magnetic stirring was constant during the reaction, the reaction performed in a vertical position and the concentration of the reagent may be the cause of the color difference dual in both extremities. ETc 3R and 4R maintained the same yellow color as result.

4.3.3.3 Physical-chemical characterization of ETc

Physicochemical characterizations were performed after the synthesis to confirm the presence of curcumin in the tube and the amount and homogeneity of the synthesis at both ends and internal and external surfaces of the ETcs. In addition to the characterizations, the effectiveness of photodynamic inactivation for bacterial biofilm removal was evaluated. Figure 4.5 describes these characterizations performed with fluorescence analysis (Fig. 4.5A and B) and in FTIR (Fig. 4.5C and D); PCA was performed to describe the differences between the reactions tested (Fig. 4.5E and F).

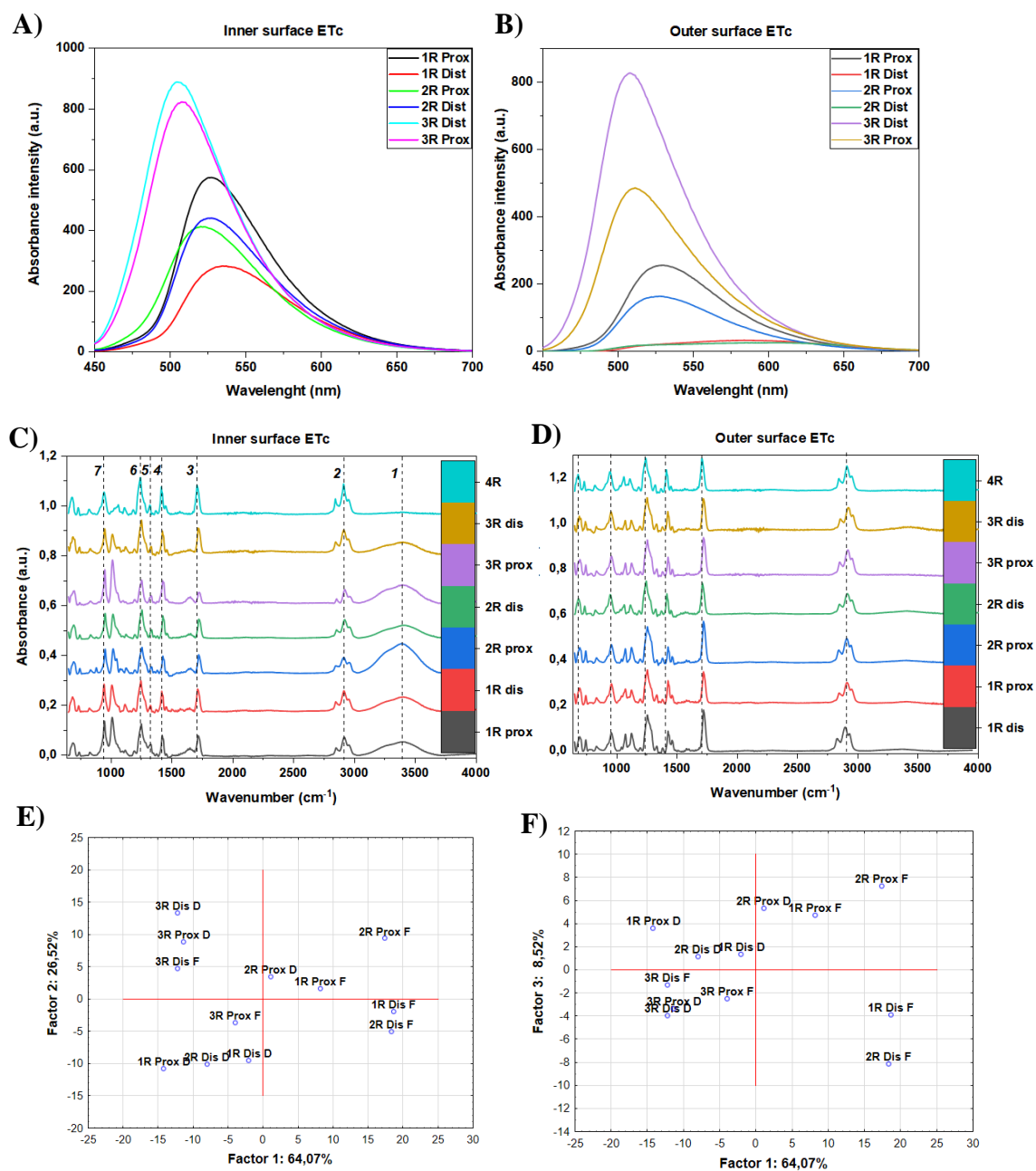


Figure 4.5 - Physical-chemical characterization from each condition applied in functionalization: A) Fluorescence spectra of inner and B) outer surface of ETC and at both extremities (proximal and distal); FTIR at C) inner surface and D) outer surface of each condition; PCA* fluorescence spectra analyses with three significant components to explain data: E) PC1(64%) x PC2(26,5%) and F) PC1(64%) x PC3(8,5%). *PCA performed by Statistica®.

Source: By the author.

Lower curcumin concentrations in reaction resulted in an higher fluorescence intensity on both surfaces and in a more homogeneous reaction demonstrated by PCA, which there is similarities in the spectra from both ends on the inner surface. Furthermore, there was also a blue shift in the spectra (10-20 nm) which can be due to DMSO, responsible for a in curcumin

spectra shift in previous studies. Also, this shift occurs when curcumin is more soluble, creating fewer aggregations and more bioavailable to interact with the environment. (63) Meanwhile ET-curc 1R and 2R, there was a little less difference among the groups at the outer surface, PCA from ET-curc 3R and 4R revealed statistical similarities among the groups. Therefore, with less curcumin concentration, less aggregated, and more availability the molecules may be to interact with the environment and act against bacterial biofilm to remove them.

To analyze FTIR spectra, table 4.2 was described highlighting the main characteristic peaks of curcumin and PVC in FTIR. An important result in infrared spectra was the non-appearance of the characteristic bound peak between C-Cl, concluding that the functionalized reaction occurred as well as planned, even when the reagents' concentration was reduced, demonstrating the component's efficiency in functionalization and integrity. Although there is a little difference at 3250 cm^{-1} (-OH stretch bound, curcumin characteristic peak) among inner and outer surface, PCA analyses resulted in 99% of similarity among FTIR of all reactions and the extremities. This subtle difference may be explained by a less exposure of the inner surface during the reaction. Consequently, the difference at 3250 cm^{-1} peak wasn't relevant statistically in the samples.

Table 4.2 - Characterizing the main peaks of curcumin and PVC in the spectra of each reaction tested.

Samples	Peaks (cm^{-1})	PVC	Curcumin
1	3200-3500	-	-OH Stretch bound
2	2911	Stretch bounds between C-H	-
3	1630	-	Stretch vibrations between alkenes C=C and carbonyl C=O
4	1420	-	Stretch vibrations between C=C aromatics
5	1333	Deformation between CH_2 groups	-
6	12540	Out of plane of angular deformation (ρCH)	-
7	943	Out of deformation trans plane trans (ωCH)	-

Source: By the author.

Concluding, fluorescence analyses revealed greater curcumin availability in lower concentrations and FTIR spectra prove that lower concentrations are as well as functionalized as higher concentrations, without losing effectiveness.

4.3.3.4 Photodynamic inactivation at ETc

The next step was to evaluate the conditions performed in photodynamic inactivation applying ETc and blue light to remove *S. aureus* biofilms. Microbiological tests were performed to develop *S. aureus* biofilm at ET and ETc of each reaction tested for 24h incubated at 37°C (Figure 4.6). All PDT groups were irradiated with the fiber coupled to the laser, receiving 100J/cm² at the inner and outer surfaces.

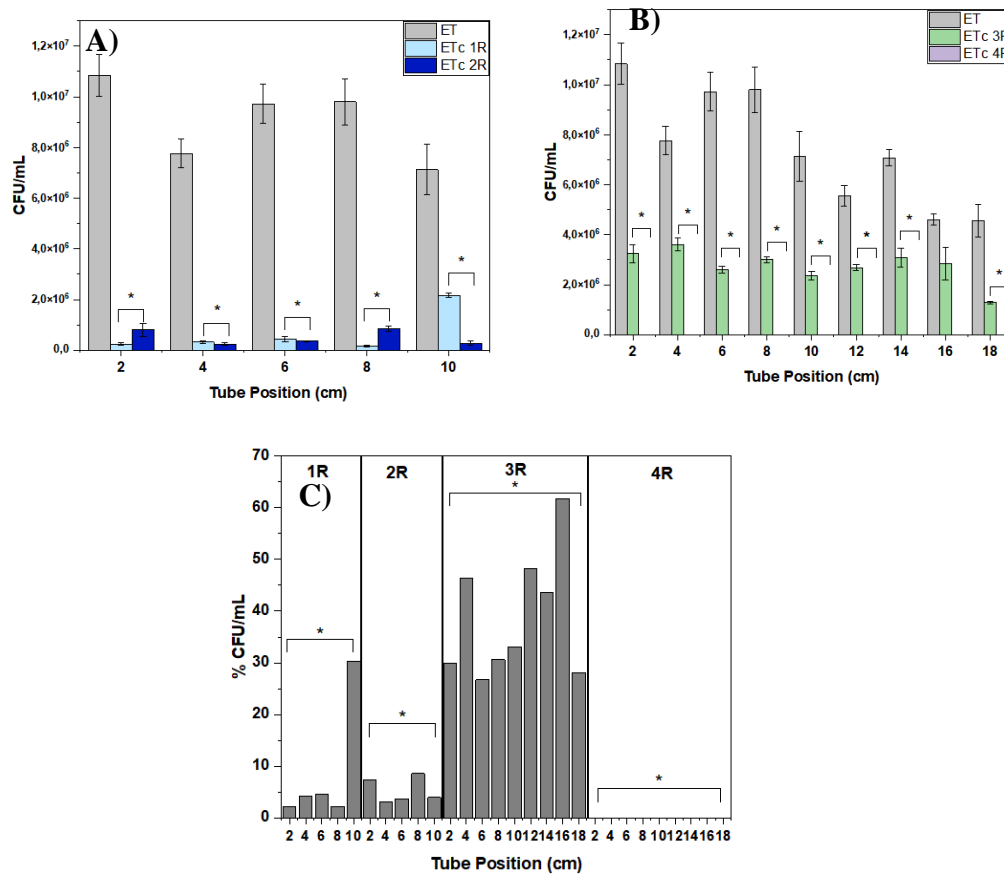


Figure 4.6 - Photodynamic inactivation in microbiological tests in *S. aureus* biofilm developed for 24h at A) ET and ETc 1R and 2R; B) ET and ETc 3R and 4R and C) Reduction of CFU/mL of biofilm in the four reactions tested. All ETc groups were irradiated internally and externally with cylindrical diffuse fiber with 100J/cm². Groups (*) were statistically different from the control group by Tukey Test Anova one way with p-value < 0,05.

Source: By the author

As seen in fluorescence spectra that lower curcumin concentration resulted in a greater fluorescence intensity, here, lower curcumin concentration resulted in a more efficient photodynamic inactivation in biofilm. Meanwhile, there was a limit to reducing curcumin concentration to 1/5 of the initial one. The tubes functionalized with 1R and 2R conditions could inactivate two CFU logs; ET-curc 3R inactivated one CFU log and the 4R condition could inactivate 7 CFU logs. Thus, 3R condition resulted in a lower inactivation and 4R with the best photodynamic inactivation. Therefore, higher curcumin concentration may result in molecular aggregation, limiting molecular interaction, meanwhile reducing curcumin concentration reduce molecular aggregation and increases bioavailability to interact with the environment as well.

4.3.3.5 Validation tests.

Here two tests were performed in order to validate the ET-curc in higher irradiation doses and along long periods of time and how these both parameters would affect biofilm inactivation.

Effect of high pre-irradiation on ET-curc before biofilm development

Tubes were functionalized and irradiated with three high-light doses on both surfaces before biofilm formation: 200, 300 and 400 J/cm². After irradiation, tubes were placed in a 24-well plate with BHI liquid and *S. aureus* inoculum (10⁸ CFU/mL of initial concentration) for biofilm development for 24h. Thus, the tubes were irradiated again with 50J/cm² and Figure 4.7 demonstrates the results.

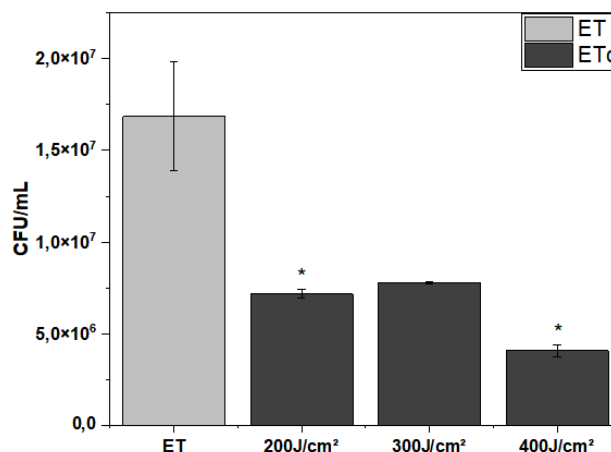


Figure 4.7 - Photodynamic action at *S. aureus* biofilm formed in 24h after the ETc had been irradiated with three light doses: 200, 300 and 400 J/cm². (*) Groups statistically different from control by the Tukey Test Anova one-way with p-value <0,05.

Source: By the author.

Regardless light dose given in each group, photokinetic results revealed a similar photodynamic answer in PDT groups. A pre-irradiation at ETc can limit photodynamic action, but, when doses such as 200, 300 and 400 J/cm² were irradiated before to tubes encountering the inoculum, there was no difference in how these doses affected biofilm inactivation. Because curcumin can quickly decay when exposed to high light intensities like those tested, this result indicates that a pre-irradiation at ETc diminishes the tubes' ability to suppress biofilm growth.

Material lifetime

To validate material lifetime, tests with different functionalization times and with two bacterial species were performed. So, tubes were functionalized and maintained in dark at room temperature for 6, 34, 46 and 455 days. Then, ETc was placed in a 24-well plate with 900 µL of BHI liquid and 100 µL of *S. aureus* or *E. coli* inoculum (10⁸ CFU/mL of initial concentration) for biofilm development. After 24h, tubes were washed twice, and next they were irradiated with 50 and 80 J/cm². Figure 4.8 illustrates PDT results from both bacteria species.

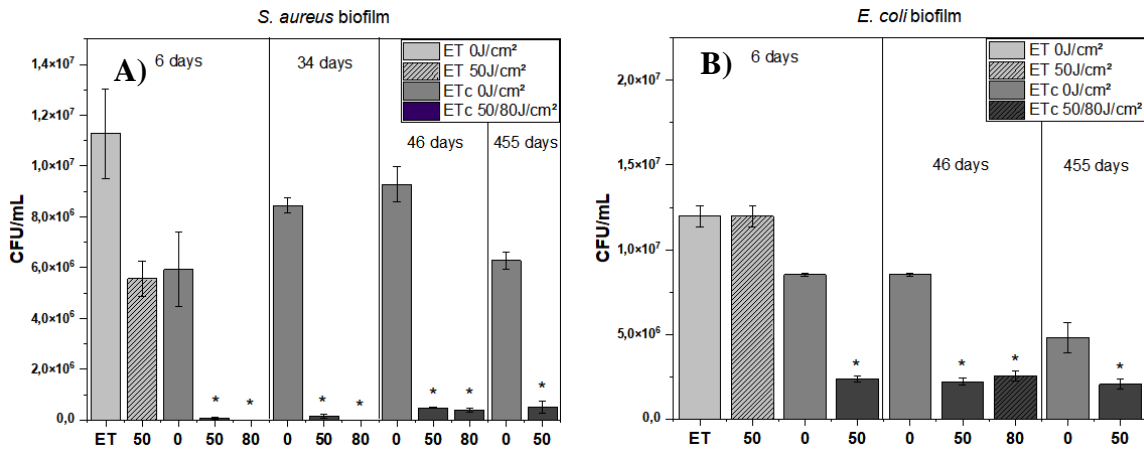


Figure 4.8 - Photodynamic inactivation of *S. aureus* biofilm (A) and *E. coli* (B) developed during 24h to the shelf life of functionalized tube test. The period of functionalized tubes tested was 6, 34, 46 and 455 days postreaction. Groups with (*) are statistically different compared to the control group by the Tukey test Anova one way with p-value <0,05.

Source: By the author.

Regardless of time tested, PDT groups of *S. aureus* revealed almost a complete biofilm inhibition after applying 50 or 80 J/cm² at both surfaces. *E. coli* biofilm was inhibited by more than 1 log CFU and maintained a constant PDT inhibition. Therefore, the tube's photodynamic action can be maintained for at least 455 days if it is stored at normal temperature and in the dark.

4.3.3.6 Cytotoxicity in culture cells (HDFn)

To evaluate a potential cell cytotoxicity of the functionalized tubes, six groups of HDFn cells were tested: control (not incubated with extract-media) illuminated with 0 and 50J/cm², ET extract-media and HDFn cells illuminated with 0 and 50 J/cm²; and finally, ETC extract-media and HDFn cells with 0 and 50 J/cm². Each replicate had five experimental repetitions and there were three experimental triplicates in total. Results in Figure 4.9 show the results of the cytotoxicity assay in control with and without irradiation (C, ET, Etc) for 24h (A, C and E) and experiments for one week (168h; B, D and F) in irradiated and no-irradiated groups.

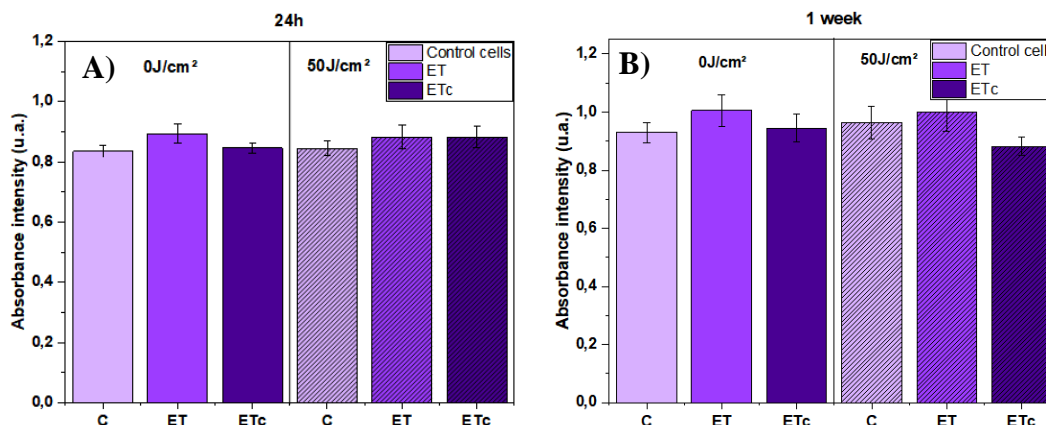


Figure 4.9 - *In vitro* cell toxicity trials in control and tested groups with and without irradiation (C, ET and ETc) for 24h (A) and one week (B). Irradiation groups received 50 J/cm² of light dose. Groups with (*) are statistically different from the control group by the Tukey Test Anova oneway with p-value <0,05.

Source: By the author.

In both trials, it was possible to observe no statistical difference when comparing control groups (C and ET with and without irradiation and ET-curc without irradiation) to the tested group-ET-curc 50J/cm². Even after keeping the ET-curc tubes soaked in cell media for one week, no difference in growth and cell behavior were observed by the MTT assay. These analyses corroborate with the stability tests results, in which there were no components released in solutions regardless of the pH value, showing no interference of ET-curc in cell growth. Therefore, the results combined show a great potential and safety for using the functionalized endotracheal tubes for pre-clinical trials.

4.3.4 Partial Conclusion

The functionalized ET with curcumin demonstrates to be stable in different pH conditions, and non-fast degradation in acid and neutral pH and when the tube is exposed at low and medium temperatures (4-37°C). High curcumin concentration for functionalization can result in a tube with more molecules aggregated and less available to interact with the environment. Fewer curcumin concentration results in more availability of curcumin exposed in the fluorescence spectra. *In vitro* experiments have corroborated with fluorescence intensity, where lower curcumin functionalized can reduce 100% of *S. aureus* biofilm developed for 24h. also, ET-curc maintain its photodynamic action for at least 455 days after functionalization with kept in dark and at room temperature. Cytotoxicity tests revealed a non-toxicity of the ET-curc when in contact with HDFn cells to 1 to 7 days of exposure. Therefore, the material is efficient

to avoid and eliminate bacterial biofilm at the same time has not shown any toxic effects in mammal cells. These results are encouraging for using the ET-curc in preclinical trials.

Este capítulo é referente ao artigo submetido a revista *Bioactive Materials* as referências referentes a este capítulo estão em anexo 1.

5 OTIMIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

Neste capítulo serão discutidos os estudos sobre a otimização da terapia fotodinâmica realizada no tubo endotraqueal funcionalizado para inativação de biofilmes bacterianos. Parâmetros como de concentração de curcumina e base funcionalizadas e dose de luz foram otimizados. Além disso, o tubo funcionalizado foi submetido a diferentes condições externas a fim de testar a sua eficiência (alteração do pH do meio), e em contato com diferentes espécies microbianas para avaliar a efetividade da inativação fotodinâmica em biofilmes com espécies únicas de gram positivas e negativas e biofilmes multi-espécies, juntando as duas grams. A otimização da fonte de luz que foi realizada com uma fibra difusora óptica foi realizada, a fim de encontrar os melhores parâmetros para uma total redução bacteriana no tubo funcionalizado e irradiado.

5.1 Objetivos do capítulo:

Geral:

- Avaliar e otimizar os parâmetros da terapia fotodinâmica.

Específicos:

- Otimização da terapia fotodinâmica;
- Inativação fotodinâmica em biofilmes única e multi-espécie;
- Efeito pH em gram positiva e negativa;
- Inativação Fotodinâmica em cepas resistentes;
- Estudo da cinética de biofilmes;
- Estudo funcionalização de curcumina em cateter urinário.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Reagentes

Carbonato de céσιο, dimetil sulfóxido (DMSO) e todos os solventes foram adquiridos pela Sigma-Aldrich, FluoroChem ou Kasvi e usados sem mais purificações. O fotossensibilizador curcumina ((1E,6E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-methoxyphenil)-1,6-heptadiene-

3,5-diona) com 95% de pureza foi cedida pela PDT Pharma® (Brasil). O tubo endotraqueal de PVC (TE) (Solidor®) está disponível comercialmente.

5.2.2 Reação de funcionalização no tubo inteiro

A funcionalização do tubo foi desenhada primeiramente para pedaços de 1 centímetro. Para a realização dos testes com o tubo inteiro fez-se necessária a otimização da reação para redução dos reagentes utilizados. Portanto, quatro reações foram desenhadas com uma redução inicial proposta dos reagentes. Em cada reação foi testada uma concentração diferente da base e da curcumina em relação a concentração inicial proposta: metade das concentrações iniciais (1R); um quarto das concentrações iniciais (2R); um quinto das concentrações iniciais (4R); um sexto das concentrações iniciais (3R). O tempo de reação inicialmente proposto de 4h não foi alterado.

5.2.3 Micro-organismos

Pré-inóculo

A mesma metodologia descrita no capítulo 4 em materiais e métodos foi repetida (Material and methods 4.1.3).

Formação do Biofilme em pedaços de 1cm e no tubo inteiro

A mesma metodologia descrita no capítulo 4 (Material and methods 4.1.3) para formação do biofilme em pedaços de 1cm de TE e TEc foram repetidas aqui.

5.2.4 Inativação fotodinâmica

A metodologia utilizada para biofilme formado em fragmentos do tubo e no tubo inteiro foram:

1. Todos os grupos (controles e testes) foram lavados duas vezes em Tampão Fosfato-Salino (PBS);
2. Os grupos que não receberam irradiação (controle TE e TEc) foram cortados em fragmentos de 1 cm;
3. Cada pedaço foi adicionado em um tubo Falcon contendo 10mL de PBS;

4. Os tubos foram agitados por um minuto em vórtex, diluídos em séries e semeados em placas de Petri;
5. Os grupos que receberam irradiação foram iluminados de acordo com a dose de energia de cada experimento testado;
6. Após a iluminação, os tubos foram cortados em pedaços de 1 cm;
7. Cada pedaço foi adicionado em um Falcon com 10mL de PBS;
8. Cada Falcon foi agitado por 1 minuto em vórtex, diluídos em séries e plaqueados;

5.2.4.1 Fontes de Luz

Quatro tipos de fontes de luz foram utilizados no estudo. Dois conjuntos de 24 Leds, chamado Biotable, foram utilizados para iluminação na superfície externa do tubo, com emissão em 450 nm e 40 mW/cm² e outra Biotable emitindo no espectro da luz branca, com 30mW/cm². Duas fontes foram utilizadas para iluminação na superfície interna do tubo, uma ponteira (protótipo) com Led difusor de irradiação à 70 mW/cm². A quarta fonte foi um laser com uma fibra cilíndrica difusora acoplada emitindo em 450 nm construída pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT/IFSC-USP). O protótipo foi construído e ao longo dos estudos foi otimizado mais duas versões com intuito de aumentar a potência do laser para uma resposta de inativação mais efetiva contra os biofilmes. A Tabela 5.1 descreve os parâmetros que foram alterados nas 3 versões do equipamento.

Tabela 5.1 - Descrição dos parâmetros otimizados nas três versões da emissão da fibra difusora acoplada ao laser com emissão em 450 nm.

Protótipos	1° Versão	2° Versão	3° Versão
Irradiância (mW/cm)	18	100	140
Tamanho Difusão (cm)	4,5	4,5	2

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.4.2 Caracterização da fibra óptica suspensa ao ar

A caracterização da fibra difusora foi realizada por uma esfera integradora para o cálculo da potência total da fibra ao longo de seu comprimento. Portanto, uma curva de calibração foi realizada entre a medida da potência conhecida de um Led, emitindo em 450 nm, por um medidor de potência e este mesmo Led com sua potência medida pela esfera integradora. A potência da fibra cilíndrica difusora também foi caracterizada de acordo com as distâncias, no eixo “x-y” (Figura 5.1B), de acordo com as medidas realizadas pelo medidor de potência. A Figura 5.1A tem imagem da fibra acoplada e Figura 5.1B a imagem de como as medidas de caracterização foram realizadas.

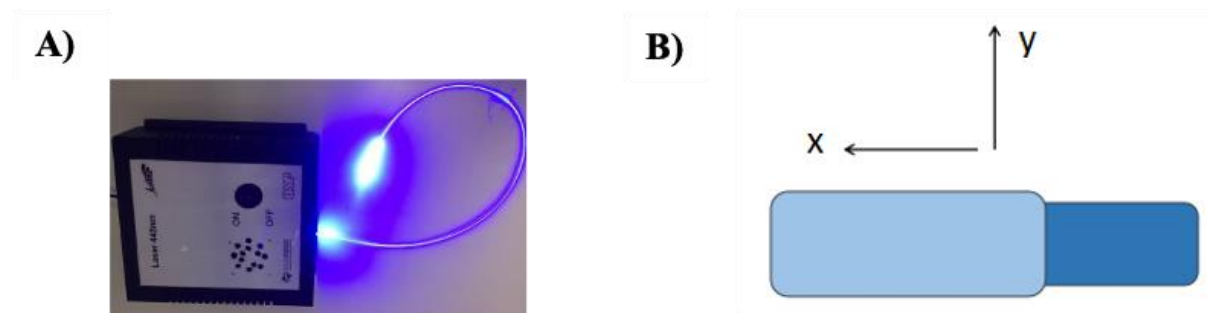


Figura 5.1 - A) Foto da fibra cilíndrica difusora emitindo em 450 nm, construída pelo LAT; B) Imagem da fibra cilíndrica com as medidas realizadas de acordo com os eixos “x-y” utilizados para a caracterização da fibra cilíndrica difusora.

Fonte: Elaborada pela autora

5.2.4.3 Planejamento experimental fatorial completo 2^3 com ponto central e axial

Um planejamento experimental fatorial completo 2^3 com composto central foi realizado com auxílio do software Statistica2018 versão 13.5.0.17 licenciado pela USP para montagem das matrizes e análise dos resultados. O refinamento do experimento também foi realizado com pontos axiais. O planejamento foi proposto como parte importante e complementar dos estudos de estabilidade do FS funcionalizado no TE. Os parâmetros variados e testados foram as soluções com diferentes pHs, o tempo de incubação e a dose de luz irradiada para verificar a influência da ação da luz nos tubos incubados em soluções com diferentes pHs. A tabela 5.2 abaixo descreve os intervalos utilizados para cada parâmetro. O planejamento experimental permiti encontrar as variáveis que mais influenciam na resposta (morte bacteriana), além de delinear a equação da regressão para a otimização das variáveis, atingindo a melhor resposta

(menor quantidade de colônias). No experimento delineado, o fator resposta foi a quantidade de colônias (UFC/mL) após cada tratamento.

Tabela 5.2 - Tabela com os intervalos escolhidos de cada um dos 3 parâmetros analisados, com dois níveis superiores (+ α e +1) e dois níveis inferiores (- α e -1) e com ponto central.

	Variáveis	- α	-1	0	+1	+ α
1	pH	0,95	3	6	9	11,00
2	Tempo (h)	1,27	4	8	12	14,70
3	Dose luz (J/cm ²)	29,77	50	65	80	90,22

Fonte: Elaborada pela autora

5.2.4.4 Estudo da cinética dos biofilmes desenvolvidos no TE e no TEc ao longo do tempo

Um estudo para avaliação da cinética de formação do biofilme na superfície dos tubos TE e TEc foi planejado e executado. O intuito do experimento, além de avaliar o comportamento do biofilme de *S. aureus* ao longo de 7 dias, foi analisar através de meios macroscópicos, os danos causados pela TFD nas células, considerando a sobrevivência após as sessões de TFD. Para testar a hipótese, quatorze tubos funcionalizados foram separados em sete grupos (para cada dia de experimento). Inicialmente, todos os grupos (controle e teste) foram colocados para crescer biofilme em placas de 24 poços com meio de cultura (900 μ L) e inóculo (100 μ L a 1×10^8 UFC/mL). Após 24h, os TEc foram lavados 2x, iluminados e, o grupo número 1 foi separado, diluído e plaqueado, enquanto o restante voltou para um novo meio de cultura líquido no poço da placa de 24 poços e estes foram armazenados na estufa à 37° C. Após um tempo de 2 (48h), todos os grupos (exceção do 1, que já foi plaqueado) foram iluminados e o grupo 2 foi separado, diluído e plaqueado. Assim sucessivamente, os tubos foram iluminados e plaqueados, para que todas as UFC/mL fossem contabilizadas. A Iluminação realizada foi interna (ponteira, 70 mW/cm²) e externa (Biotable, com 40 mW/cm² e emissão em 450 nm), com dose de energia 50 J/cm² (resultado na figura 5.20). A Figura 5.2 esquematiza a metodologia empregada neste teste.

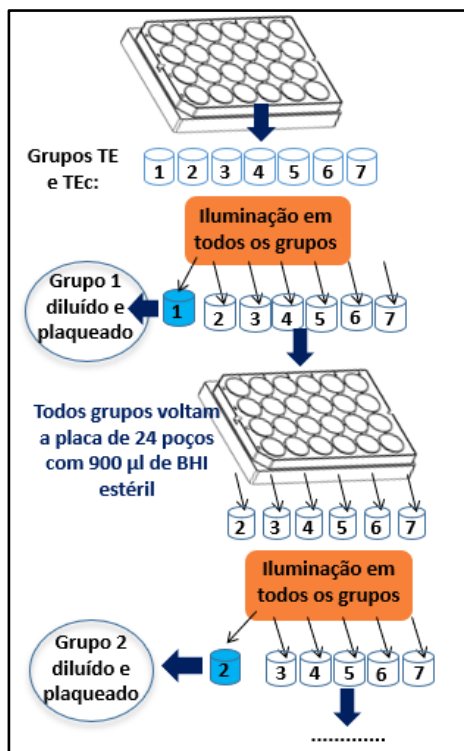


Figura 5.2 - Metodologia dos estudos de cinética da formação do biofilme de *S. aureus* desenvolvido no TE e no TEc ao longo de 24h na placa de 24 poços.

Fonte: Elaborada pela autora

5.2.4.5 Teste Força Biofilme pós Inativação Fotodinâmica em MSSA e MRSA

De acordo com a literatura, cepas resistentes a algumas classes de antibióticos possuem genes de resistência que pode conferir a formação de um biofilme mais forte, com maior adesão das células nas superfícies. Logo, grupos de ambas as cepas, MSSA e MRSA, foram separados em 3 grupos:

- Grupo do TEc com biofilme formado e TFD aplicada após 24h e suas colônias contabilizadas (P24h);
- Grupo TEc com biofilme formado e TFD aplicada após 24h e recolocado para na placa de 24 poços com BHI líquido (900 µL) (Pr48h);
- Grupo TEc com biofilme formado e TFD aplicada após 48h (P48h).

Biofilmes foram desenvolvidos em tubos TE e TEc 5R por 24h ou 48h a 37°C. Após o tempo determinado, os tubos com biofilme foram lavados duas vezes com PBS para remoção das células planctônicas e os TEcs foram irradiados nas superfícies internas e externas com a fibra difusora com dose de 50 J/cm². Em seguida, os tubos foram agitados por 1 minuto, diluídos em série, plaqueados e armazenadas em estufa por 24h à 37°C para contagem (UFC/mL).

5.2.4.6 Estudo da Cinética MRSA e MSSA

Uma segunda análise para identificar se há uma diferença de cinética entre as cepas de *S. aureus* sensível e resistente a meticilina (MRSA) após IF (50 ou 80J/cm²). Então, os biofilmes foram desenvolvidos por 24h, a TFD foi aplicada, as células foram recolocadas em placa de 96 poços com BHI líquido (250 µL) e, leituras de absorvância na região de 600nm pelo leitor de placas foi realizada ao longo de 30h.

5.2.4.7 Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL)

A medida de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi realizada para quantificar o número de células bacterianas presentes durante os testes antimicrobianos em uma solução a partir da realização do experimento com a incubação das bactérias à 37°C durante 24 h. A média de cada grupo foi calculada através da equação (01) para o cálculo de UFC/mL:

$$\frac{ufc}{mL} = \frac{n^{\circ}decolônias \times n^{\circ}dediluições}{Volume} \quad (01)$$

Os valores de UFC/mL dos estudos realizados foram altos por se tratar de biofilmes bacterianos.

5.3 Resultados

5.3.1 Tubo Endotraqueal

5.3.1.1 Caracterização da fibra óptica

A caracterização da fonte de luz é fundamental para os experimentos de IF. Como a fonte de luz foi otimizada duas vezes para otimização dos experimentos de TFD, a caracterização da fibra foi realizada apenas para o 3º protótipo. Logo, para caracterização

primeiramente foram realizadas medidas da potência da fibra dentro e fora dos tubos com e sem curcumina e variando a distância do potenciômetro em relação a fibra. Os resultados da potência da fibra emitida dentro dos tubos revelam o quanto cada tubo absorve de luz emitida pela fonte. Os resultados estão descritos na Figura 5.3 com as três posições testadas da fibra em relação ao tubo com medidas em 5 distâncias diferentes.

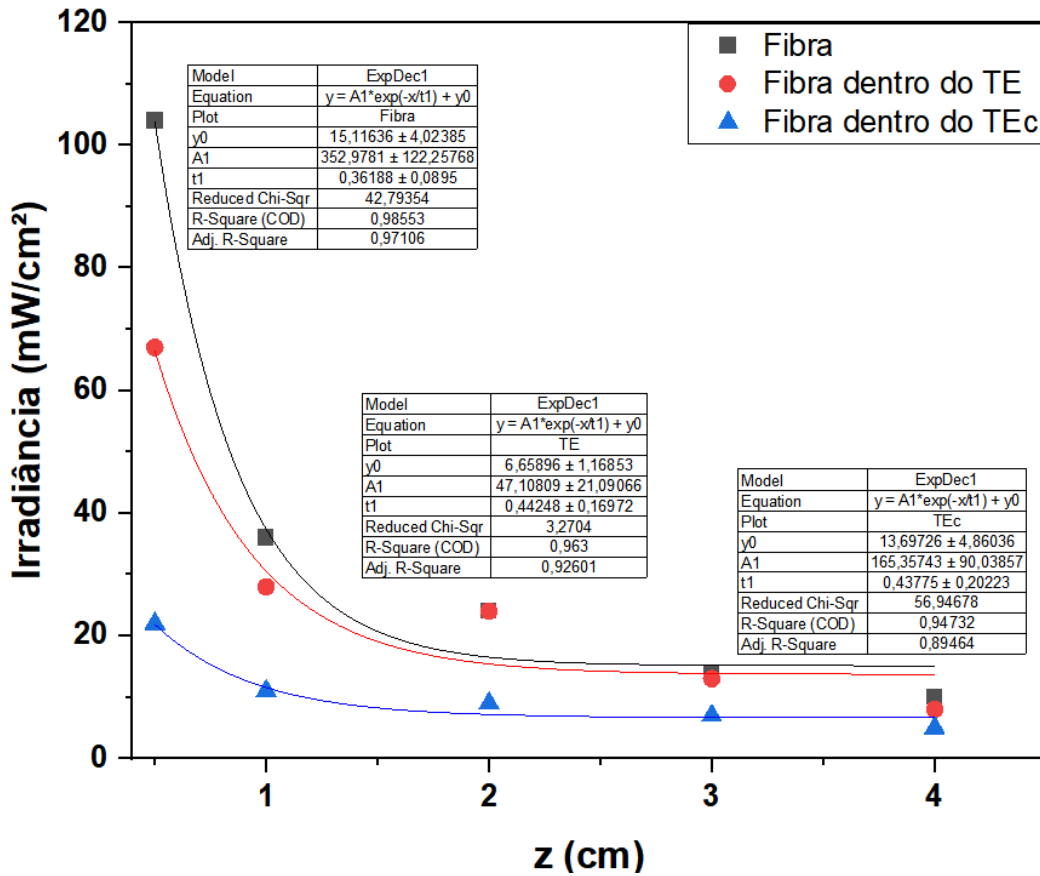


Figura 5.3 - Caracterização da potência da fibra difusora medida com diferentes distâncias (z) em relação ao detector do medidor de potência, com a fibra dentro e fora dos tubos.

Fonte: Elaborada pela autora

Foram plotadas a curva do decaimento exponencial de cada condição testada, com a fibra irradiada ou não dentro dos tubos. Cada condição foi equacionada, seguindo o mesmo padrão da equação exponencial decrescente:

$$y = y_0 + A_1 e^{x/t_1} \tag{02}$$

A partir das análises pode se observar o rápido decaimento da irradiância medida ao longo da distância e com a introdução do TE e do TEc. A irradiância da fibra com distância de 0 cm do potenciômetro é de 140mW/cm. Embora o TE seja transparente, o espalhamento do material pode ser grande causa da diminuição da luz emitida, além de existir pequenas

marcações na sua superfície do tubo que poderiam absorver a luz. Já o TEc é um material mais opaco e com uma coloração vermelho alaranjada, absorvendo e espalhando esta luz emitida pela fibra, resultando em uma baixa transmissão da luz através da parede do tubo, sem grandes alterações na irradiância medida com o aumento da distância.

5.3.1.2 Fotodegradação do FS funcionalizado

Com o intuito de estudar a fotodegradação do FS no tubo, os tubos funcionalizados foram pré-irradiados com uma dose de 50 J/cm^2 , em ambas as superfícies, antes de ser colocado em contato com o meio de cultura e pré-inóculo para formação do biofilme, em poços da placa de 24 poços a 37°C . Após 24h, os tubos foram lavados 2x e separados em quatro grupos irradiados com doses de 100, 200, 300 e 400 J/cm^2 com a Biotable e a ponteira em ambas irradiações. A figura 5.4 descreve os resultados de UFC/mL contabilizados dos grupos.

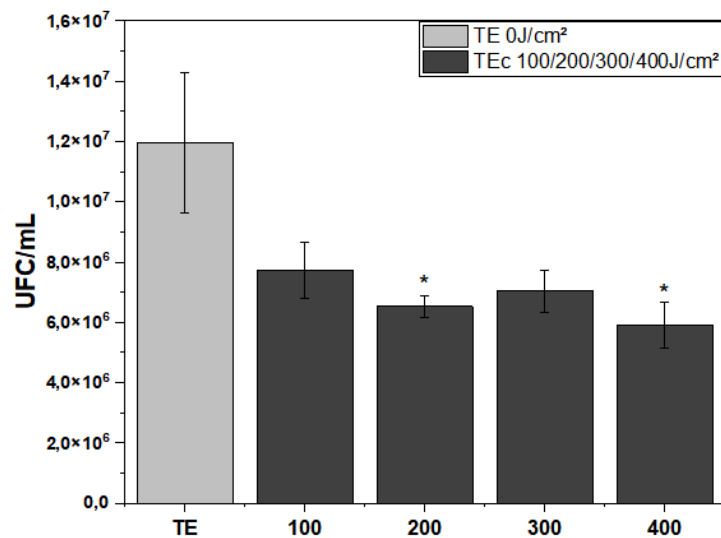


Figura 5.4 - Inativação fotodinâmica em biofilmes de *S. aureus* formados por 24h em TE (barra cinza clara) e TEc (barra cinza escura) com irradiações variando de 100 a 400 J/cm^2 . Grupos TEc foram pré-irradiados com 50 J/cm^2 em ambas as superfícies. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor $<0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora

Os grupos TEcs irradiados não tiveram diferenças estatísticas entre si, porém os grupos 200 e 400 J/cm^2 foram diferentes estatisticamente do controle. Logo, uma pré-irradiação no TEc pode diminuir a ação fotodinâmica das moléculas de curcumina funcionalizada.

Acompanhando a ideia do estudo da luz nos TEcs, um próximo experimento foi realizado recorrendo a altas doses energéticas, de 100 a 600 J/cm², irradiadas no TEc após 24h de biofilme formado em ambas superfícies. As fontes de luz utilizadas também foram as mesmas acima (ponteira e a Biotable). A Figura 5.5 descreve os resultados de UFC/mL de cada grupo iluminado de 42 a 250 minutos.

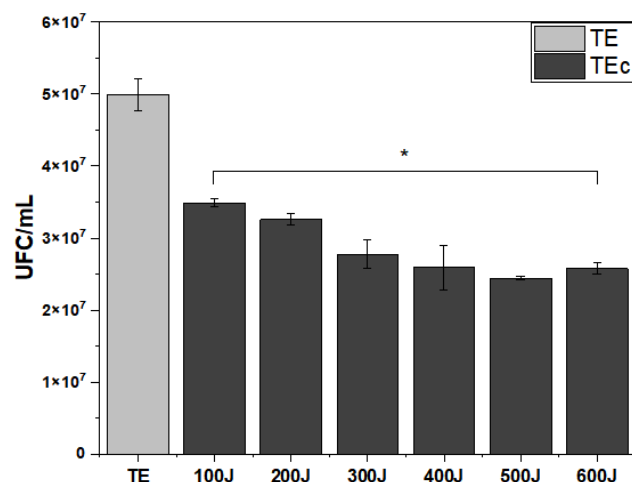


Figura 5.5 - Inativação fotodinâmica nos TEc com aumento nas doses de luz utilizadas, 100 a 600J/cm² com duas fontes de luz, totalizando 34min50s. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Altas doses de luz não tiveram um aumento significativo na morte bacteriana. Embora o grupo que foi irradiado com 600J/cm² tenha uma menor quantidade de CFU/mL quando comparado com o grupo irradiado com 100J/cm², estes grupos não são diferentes estatisticamente entre si. Uma possível explicação pode estar relacionada ao fato que embora as doses totais tenham sido elevadas, elas foram dadas de maneira moderada ao longo do tempo (entre 40 e 70 mW/cm²), logo, esta longa exposição dos biofilmes e da curcumina funcionalizada poderia não ser efetiva para a redução bacteriana, causando um possível dano no material e prejudicando sua ação fotodinâmica. `

5.3.1.3 Otimização da fonte de luz

A partir de uma nova fonte de luz construída, um desenho experimental foi esquematizado para verificar, além da eficácia da fonte com diferentes doses de luz, também a forma de iluminação em relação ao tubo, comparada com fontes com uma maior irradiância e a homogeneidade da nova fonte testando a irradiação ao longo de pedaços maiores de tubo de 3 cm. As fontes utilizadas foram 3 modelos da fibra cilíndrica acoplada ao laser: um primeiro protótipo com 18mW/cm, um segundo com 100, um terceiro protótipo com 140 mW/cm² e uma ponteira difusora (70mW/cm²). As formas de iluminação no tubo foram três diferentes posicionamentos da fibra em relação ao tubo: fibra posicionada apenas interna (In), apenas externa (Ex) ou interna e externamente (In+Ex). A ação fotodinâmica foi testada em biofilme de *S. aureus* desenvolvidos durante 24h.

Primeiramente, o primeiro protótipo da fibra (18mW/cm) foi testado em pedaços de 1 cm de TEc sob biofilme de *S. aureus* nos grupos controle (TE) e teste (TEc). Os grupos teste foram irradiados com duas doses: 50 e 65 J/cm², totalizando 46 min e 60 min, respectivamente. Grupos iluminados apenas interna (In) ou apenas externamente (Ex) receberam apenas uma dose de 50 ou 65J/cm². Grupos iluminados interna e externamente foram irradiados duas vezes em cada superfície com a mesma dose de energia indicada. Os resultados estão descritos na Figura 5.6. O grupo indicado com uma irradiância de 70 mW/cm² foi irradiado também com 50J/cm² por uma ponteira difusora durante 12min30s.

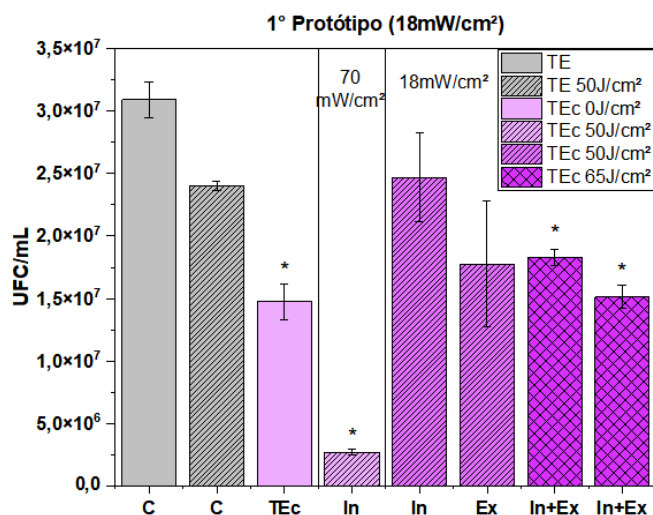


Figura 5.6 - Resultado de IF em biofilmes de *S. aureus* desenvolvidos por 24h aplicando o 1° protótipo da fibra difusora com potência de 18 mW/cm e três posicionamentos da fibra em relação ao TEc: apenas interna (In) (coluna roxa hachurada), apenas externa (Ex) (coluna roxa hachurada) e interna e externa (In+Ex) (coluna roxa em xadrez) ao tubo. Grupos controle 0J/cm² (coluna cinza lisa), iluminado 50J/cm² (coluna cinza hachurada) e TEc 0J/cm² (coluna roxa lisa) e TEc irradiado com 70mW/cm² (coluna lilás hachurada) iluminação com ponteira apenas interna ao tubo durante 12min30s. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado do experimento com 3 diferentes posicionamentos da fibra revelou que quando a fibra é posicionada apenas interna ou externa ocorre uma menor redução do biofilme e uma maior variabilidade dos dados se comparada com a irradiação interna e externa ao tubo. Entretanto, mesmo a irradiação em ambas as superfícies não houve uma considerável eficiência de eliminação bacteriana. O grupo irradiado pela ponteira (70mW/cm²) resultou com uma diferença estatística aos controles e dos grupos irradiados. Portanto, pode-se presumir que mesmo totalizando as mesmas doses de luz, a potência da fonte de luz se mostra relevante para a inativação de biofilmes de *S. aureus*. Logo, quanto maior for a irradiância da fonte, melhor poderia ser a resposta de morte microbiana neste tipo de material.

5.3.1.4 Teste de Homogeneidade do 1° protótipo da fibra difusora de iluminação

A homogeneidade de iluminação do 1° protótipo foi testada na segunda etapa dos estudos. Logo, o biofilme de *S. aureus* foi desenvolvido em pedaços maiores de 6 cm de TE e no TE funcionalizado. Logo, as mesmas proporções para pedaços de 1cm, 1:9 de inóculo e BHI líquido, em um frasco Scott de 250mL. Logo, para um volume total de 50 mL foi adicionado

44,44 mL de BHI líquido e 5,56mL de inóculo. A iluminação foi realizada interna e externamente pela fibra durante 46min totalizando 50J/cm² (18mW/cm) e o UFC/mL foi contabilizada para cada porção do tubo. Figura 5.7 mostra os resultados com o primeiro protótipo da fibra.

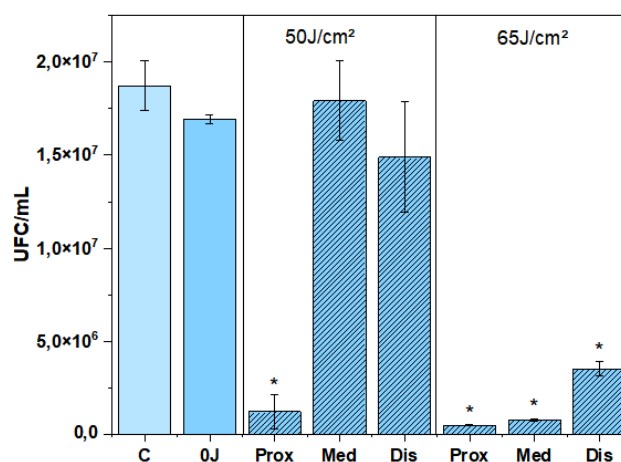


Figura 5.7 - Resultado de foto inativação do teste de homogeneidade do primeiro protótipo da fibra difusora iluminando o tubo interna e externamente durante 46 minutos, totalizando 50 J/cm² ou por 60 minutos, totalizando 65 J/cm² para inativação de biofilme de *S. aureus* formado durante 24h. Grupos controle (barra azul lisa), TEc 0J/cm² (barra azul mais escura), TEc 50 ou 65J/cm² (barras azuis hachuradas). Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado ilustrado no gráfico da figura 5.7 revelou uma fonte de luz não homogênea. Ambos os grupos irradiados destacaram esta diferença de irradiação, com a extremidade distal com menor redução bacteriana. Os grupos TEc que receberam uma dose de 50J/cm² resultaram em respostas de inativações mais heterogêneas, com a porção proximal a de maior redução do biofilme. Grupos irradiados com uma dose maior de 65 J/cm², resultou em uma heterogeneidade menor, também com o grupo proximal com a menor redução bacteriana. Devido a homogeneidade e irradiância da fonte, serem fatores fundamentais para a ação fotodinâmica, foram necessários ajustes no sistema da fibra para a melhoria do equipamento. Longos tempos de iluminação não mostraram ser efetivos para uma redução significativa nos biofilmes.

Um estudo foi delineado para avaliar o comportamento de redução bacteriana utilizando uma iluminação de modo intervalar. Logo, o experimento foi realizado com os TEcs mantidos sob irradiação por cinco minutos e mantidos por cinco minutos no escuro, com a fibra (1° protótipo) posicionada internamente ao TEc. O estudo teve um total de 50 minutos,

totalizando 25 J/cm² ao TEC com biofilme de *S. aureus* formado por 24h a 37°C. Os resultados estão ilustrados na figura 5.8.

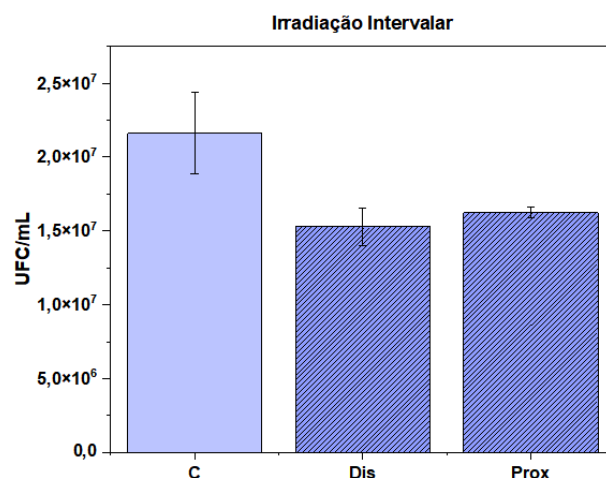


Figura 5.8 - Resultado de IF em biofilmes de *S. aureus* formados por 24h em pedaços de 2 cm de TEC e irradiados de maneira intervalar a cada 5 minutos. Cada grupo irradiado recebeu 25 J/cm².

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma irradiação intercalar aplicada com uma baixa irradiância não se mostrou efetividade na foto inativação em células de biofilme de *S. aureus*, o que pode ser atribuído a baixa potência do laser e uma baixa dose de luz cedida ao sistema.

Testes aplicando 2° protótipo da fibra difusora de iluminação

O segundo protótipo da fibra (100 mW/cm e 3cm de difusão) foi avaliado em relação a sua homogeneidade e a sua potência. Então, os dois parâmetros foram analisados: doses de luz (50 e 80J/cm²) e homogeneidade da fonte. Logo, foram utilizados tubos cortados com tamanho de 3 cm e para formação do biofilme com as mesmas proporções de 1:9 de inóculo e BHI líquido, foram mantidas e adicionadas. Logo, para um volume total de 25 mL foi adicionado 22,22 mL de BHI líquido e 2,78mL de inóculo em um frasco Scott de 250mL armazenado na estufa por 24h no escuro e a 37°C. A figura 5.9 descreve os resultados.

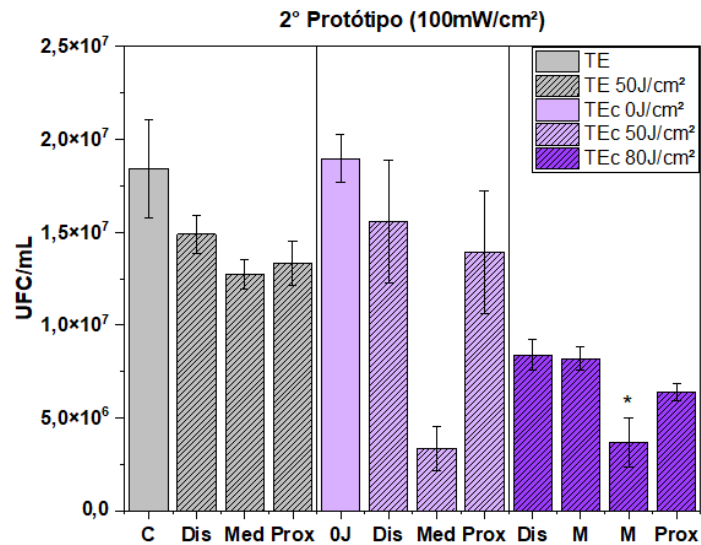


Figura 5.9 - Resultado de foto inativação do teste de homogeneidade do segundo protótipo da fibra difusora iluminando o tubo interna e externamente durante 8min30s, totalizando 50 J/cm² e por 13min30s, totalizando 80 J/cm² para inativação de biofilme de *S. aureus* formado durante 24h. Grupos controle sem iluminação (barra cinza lisa), controle 50J/cm² (barra cinza hachurada), TEc 0J/cm² (barra lilás lisa), TEc 50 ou 80J/cm² (barras lilás e roxa hachuradas, respectivamente). Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

O segundo protótipo revelou uma ligeira melhora na homogeneidade de emissão de luz em relação ao primeiro, com resultados de inativação no biofilme mais semelhante ao longo do tubo. Embora a irradiância da emissão da fibra tenha aumentado consideravelmente, a fonte ainda não se mostrou eficaz o suficiente para que os grupos iluminados fossem todos estatisticamente diferentes do controle, com apenas a parte medial do TEc iluminada por 13 minutos se diferenciando estatisticamente do controle. Portanto, uma nova otimização na fonte se mostrou necessária para gerar uma resposta de inativação mais potente e homogênea para reduções totais de biofilmes bacterianos.

Testes aplicando o 3° protótipo da fibra difusora de iluminação

De acordo com os padrões dos testes anteriores, um experimento foi realizado com o 3° protótipo da fibra (140 mW/cm e 2cm de difusão) para avaliação da sua homogeneidade e eficiência da irradiância em diferentes posicionamentos da fibra em relação ao tubo. A figura 5.10 ilustra os resultados obtidos desta 3ª fonte utilizando 4 doses diferentes de luz: 50, 80, 100

e 160 J/cm². Grupos que receberam 100 e 160 J/cm² foram os grupos irradiados nas superfícies interna e externa do tubo.

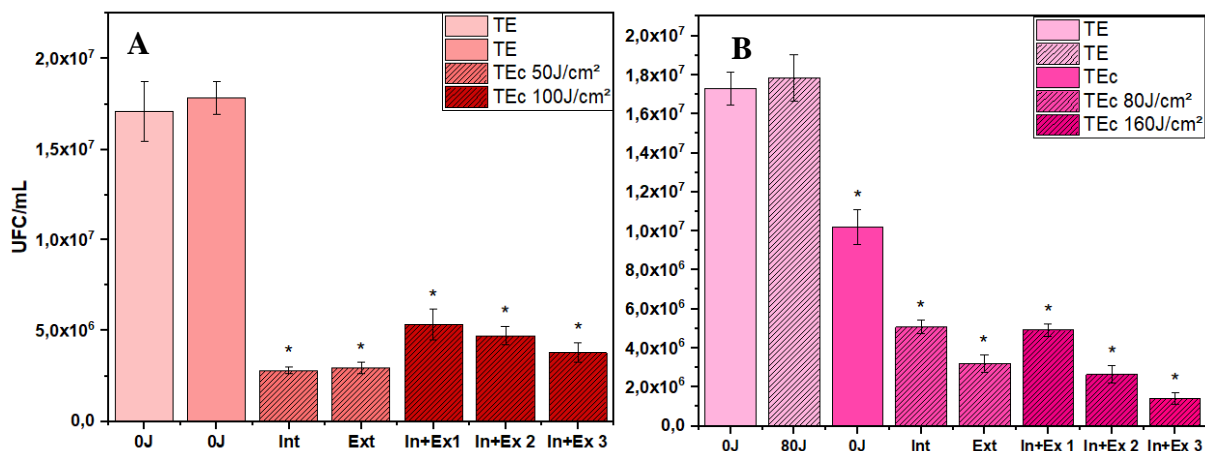


Figura 5.10 - Resultados de inativação fotodinâmica nos experimentos aplicando o 3^o protótipo da fibra difusora, realizada em um pedaço com tamanhos 1 e 3 cm do tubo. Tubo de 3 cm foi cortado em 3 pedaços de 1cm para UFC/mL. Grupos TFD foram irradiados variando dois parâmetros: diferentes doses de luz (50, 80, 100 e 160 J/cm²) e a posição de iluminação da fibra em relação ao tubo: apenas interna (In), apenas externa (Ex) e/ou ambas as iluminações, interna e externa (1, 2 e 3) no pedaço de 3cm de TEc (dependentes da região). A dose de luz foi de 50 J/cm² (A) totalizando 6min30s de irradiação e 80 J/cm², totalizando 9min30s de irradiação (B). Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados do teste com aplicação do 3^o protótipo da fibra revelou uma fonte homogênea e eficaz para a continuidade dos estudos. Todos os grupos TEc irradiados se diferiram estatisticamente do controle, revelando uma eficácia na redução bacteriana. Entre si, independentemente da forma de irradiação ou da dose de luz do grupo irradiado, não houve diferença estatística entre eles. O melhor resultado foi o TEc proximal irradiado interna e externamente recebendo uma dose total de 160 J/cm². Os resultados mostram que quando a fibra é posicionada para iluminar apenas em uma superfície do tubo, grande parte do biofilme é inativado, mostrando uma eficiente fonte de iluminação e uma notória biodisponibilidade das moléculas de curcumina para interagirem com as células do biofilme e realizar a TFD.

A fim de uma ilustração para comparar os três protótipos construídos e testados, a Figura 5.11 destaca a média de redução do biofilme de *S. aureus* entre os grupos irradiados apenas interna ou externamente (I/E) ou em ambas as superfícies (I+E) com 50 e 80 J/cm².

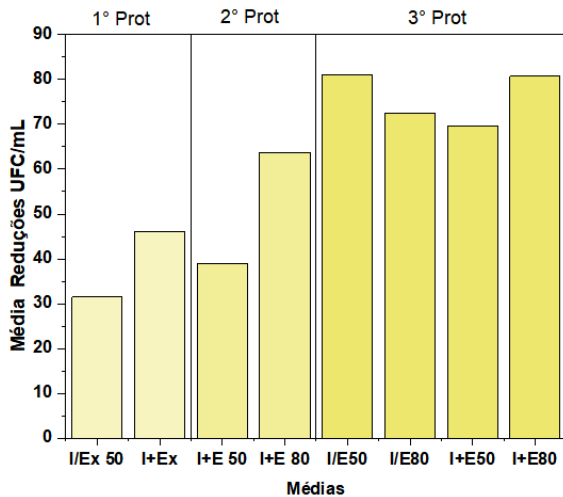


Figura 5.11 - Resultados das médias de redução de UFC/mL de cada protótipo testado em relação a cada grupo irradiado apenas internamente (I) ou externamente (E) ou em ambas as superfícies (I/E) com duas doses de luz 50 e 80 J/cm².

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, a partir de uma otimização da fonte de luz, com maior homogeneidade e irradiância foi possível delinear novos experimentos para atingir a melhor resposta fotodinâmica para inativação de biofilmes de *S. aureus* no TEC. Então, estudos focados em avaliar diferentes tempos de iluminação: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de iluminação foram executados. Figura 5.12 descreve os resultados das doses aplicadas.

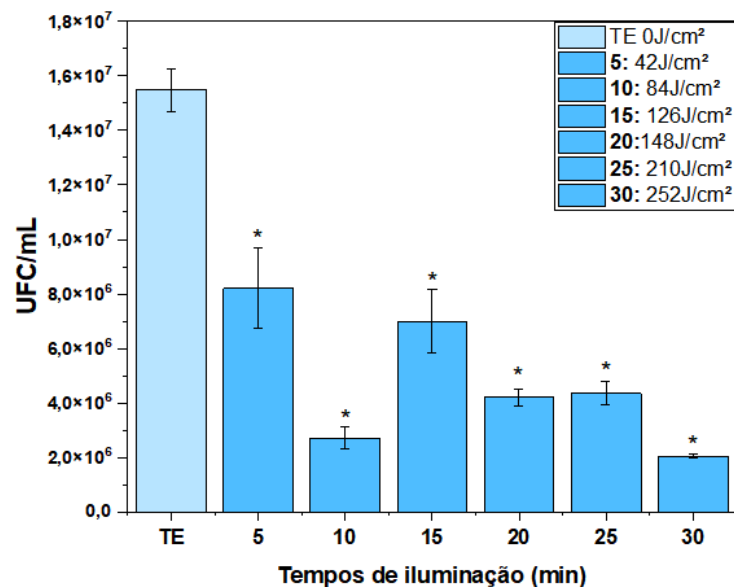


Figura 5.12 - Ação fotodinâmica realizada testando diferentes tempos de irradiação pela fibra óptica difusora com 140mW/cm². Tempos testados de irradiação foram de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os grupos irradiados tiveram uma resposta estatisticamente diferente do controle, grupos irradiados durante 10 e 30 minutos são diferentes dos grupos irradiados por 5 e 15 minutos pela ANOVA. O melhor resultado foi a redução de 1 log pelo grupo irradiado por 30 minutos, recebendo uma dose total de 252 J/cm².

Estudo de uma iluminação constante ao longo do tempo

Um estudo para analisar o efeito fotodinâmico de uma iluminação de modo constante foi realizado. A iluminação foi cedida pela fibra difusora (2° protótipo-100mW/cm) durante 6h e 6h30 posicionada internamente ao TEc ao longo de 6h e 6h30. Três concentrações iniciais do inóculo foram testadas:

[1] = 1:9 BHI;

[2] = 0,13:9 BHI;

[3] = 0,18:9 BHI.

Os tubos controles e testes de cada concentração foram submetidos as mesmas condições de volume e temperatura, 300mL e 37°C, armazenados dentro da estufa durante o procedimento. A figura 5.13 descreve os resultados obtidos de cada concentração testada em cada controle e teste.

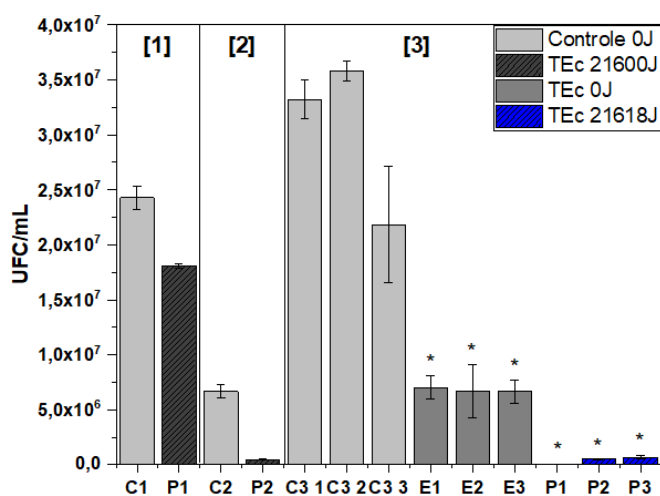


Figura 5.13 - Inativação Fotodinâmica em biofilme de *S. aureus* com iluminação constante pelo segundo protótipo da fibra difusora com 100mW/cm² (2° Protótipo) por 6h e 6h30 em TEc.

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante os experimentos foi notado uma alta variabilidade nos resultados de acordo com a manipulação dos tubos de todos os grupos. Para que a terapia fosse eficiente para inibir o crescimento do biofilme nos tubos imobilizados foi necessário diminuir 80% da concentração do inóculo inicial (10^8 UFC/mL) para que após 6h30 de irradiação, cedendo um total de $21618\text{J}/\text{cm}^2$ na superfície interna do tubo fosse possível uma inibição de aproximadamente 100%. A TFD associada a uma iluminação constante ao longo de 6h foi eficiente para inibir o início do desenvolvimento do biofilme na primeira condição testada (redução de 95% do biofilme). Já a segunda e a terceira concentrações resultou em uma redução de 93 e 99% do desenvolvimento do biofilme nas superfícies internas e externas dos TEcs.

Os próximos testes avaliaram a efetividade da IF em pedaços maiores do tubo funcionalizado.

Estudo da irradiação pela fibra difusora em fragmentos em todo tubo

Os resultados de redução bacteriana no tubo todo estão apresentados nas Figuras 5.14-A (grupo controle) e Figura 5.14-B (grupo teste) com biofilme formado de 1-23 cm. As posições de 1-12 cm são referentes a parte proximal do tubo (região oral) e a região de 13-24 cm é referente a parte distal onde localiza-se o *cuff*.

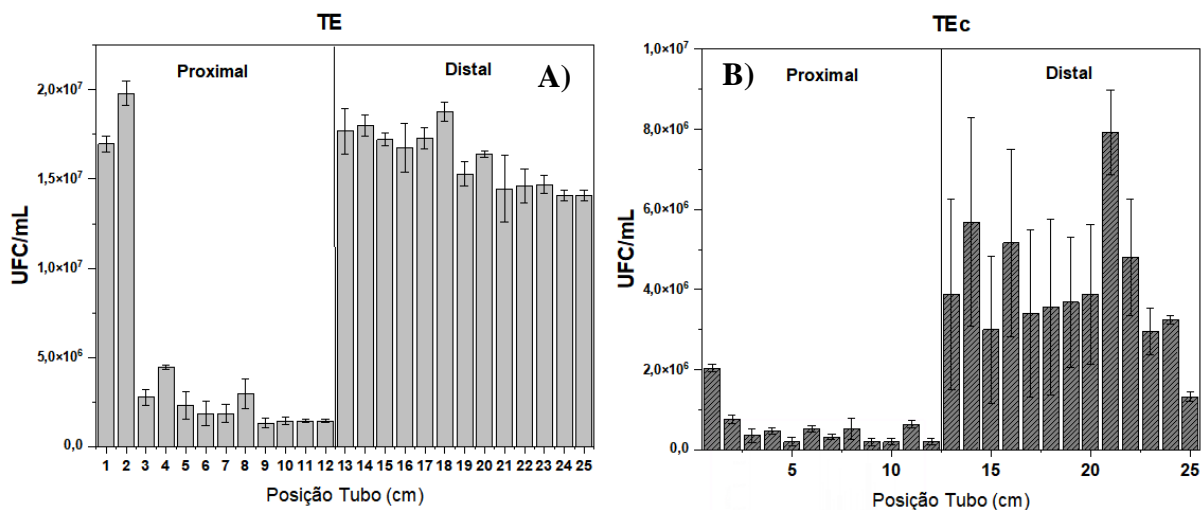


Figura 5.14 - Resultados de formação de biofilme de *S. aureus* formado durante 24h no TE inteiro (A) e no TEc (B). Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor $<0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para uma análise otimizada sobre a inativação dos grupos, um gráfico com as reduções microbianas foi construído (Figura 5.15) destacando a porcentagem de redução bacteriana em cada parte do tubo TEc em relação ao controle.

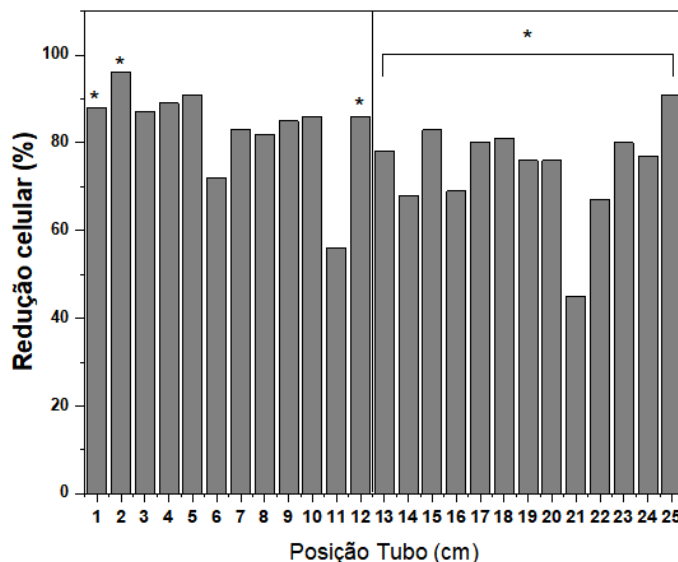


Figura 5.15 - Resultados sobre a redução celular bacteriana de biofilme de *S. aureus* desenvolvido ao longo do TEc e iluminado com 100 J/cm² com fibra óptica difusora, interna e externamente ao tubo. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos resultados dos gráficos das figuras 5.14 e 5.15, obteve-se uma diferença significativa entre ambas as extremidades do tubo. Embora a parte distal tenha tido um crescimento maior bacteriano, também foi a região de maior redução bacteriana pós-tratamento, com uma redução em média de 80%. Uma explicação para este maior crescimento de biofilme na porção distal do tubo pode estar relacionada a geometria do tubo. A parte distal é a região onde se encontra o *cuff*, um balão inflável que monitora e auxilia a manutenção da pressão, mantendo o tubo na posição adequada na traqueia do paciente, além de evitar que contaminações e secreções migrem para o ambiente mais interno do paciente (1). Uma frequente preocupação no ambiente hospitalar é devido ao *cuff* poder ser um possível reservatório para micro-organismos se estabelecem e desenvolverem um biofilme bem estruturado nesta região.

Estudos de avaliação da TFD em tubos incubados em diferentes soluções de pH

A fim de avaliar o efeito do pH sobre a ação fotodinâmica do material funcionalizado, foi esquematizado um teste piloto com 2 variáveis: valor de pH (2 e 10) e o tempo de intubação do TEc em cada solução com determinado pH (4, 7 e 12h). Os gráficos ilustrados na figura 5.16 demonstram a inativação fotodinâmica nos grupos onde o TEc foi incubado em cada solução com valor de pH diferente e o tempo de incubação permanecido.

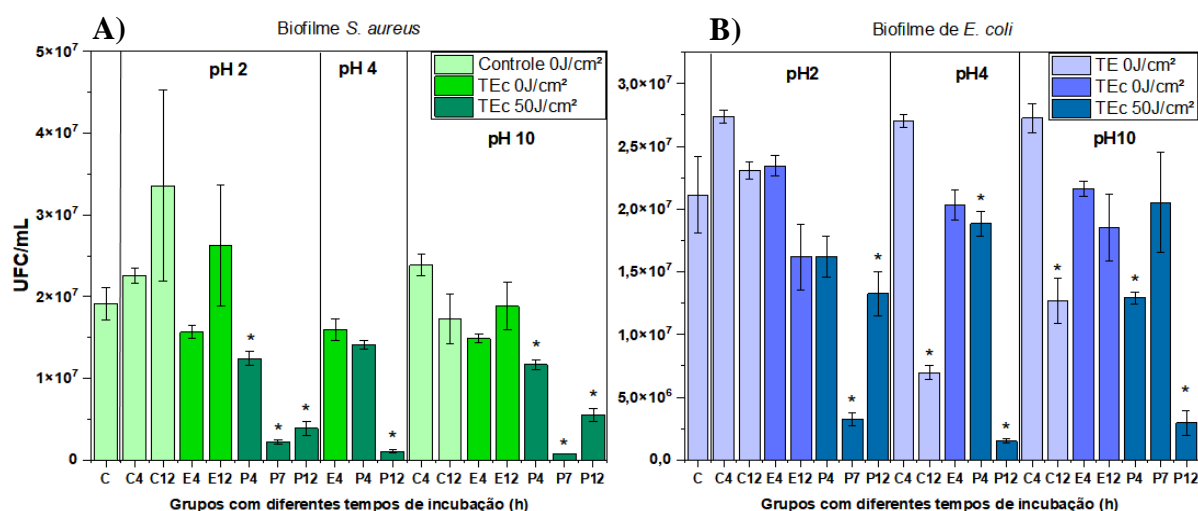


Figura 5.16 - Inativação fotodinâmica em biofilme bacterianos após o TEc ser incubado por tempos de 4, 7 e 12h em soluções com pH de 2, 4 e 10, sendo que A) resultados da inativação de biofilme de *S. aureus* e B) Inativação em biofilme de *E. coli*, ambos biofilmes formado por 24h em poços das placas de 24 poços a 37°C. Iluminação gerada por Biotable a 40 mW/cm² e ponteira a 70 mW/cm², totalizando 50J/cm² em ambas superfícies. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p-valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5.3 abaixo foi esquematizada para melhor explicar os resultados de inativação de ambos os micro-organismos.

Tabela 5.3 - Reduções (%) de biofilme de *S. aureus* e *E. coli* pós TFD de cada grupo testado em diferentes condições de TEc incubados em soluções com diferentes pH por diferentes tempos:

<i>S. aureus</i>	P4h	P7h	P12h	<i>E. coli</i>	P4h	P7h	P12h
pH 2	35%	88,3%	79,7%	pH 2	23,3%	85%	37,3%
pH 4	26,15%	-	94,6%	pH 4	11%	-	93%
pH 10	39%	96%	71%	pH 10	39%	3%	86%

Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os grupos TEc com biofilme de *S. aureus* irradiados nas diferentes condições de pH, com exceção do grupo intubado por 4h no pH 2, 4 e 10, são estatisticamente iguais entre si e diferentes do TE controle incubado por 12h em pH 2. Já os grupos TEc com biofilme de *E. coli* e irradiados apresentaram resultados de inativação iguais estatisticamente, com exceção dos grupos incubados por 7h em pH 2 em relação ao pH 10 e os grupos intubados por 12h em pH 2 e no pH 4. As maiores reduções bacterianas foram em biofilmes de *S. aureus* com redução de em média 98%. Reduções no biofilme de *E. coli* foram aproximadamente de 60%. Embora exista esta diferença na redução do biofilme entre ambas as bactérias, de acordo com a ANOVA, os grupos TFD correspondentes entre ambas as espécies foram similares (ex: TEc intubado por 2h em pH 2 testado em biofilme de *S. aureus* tem redução celular similar ao mesmo grupo testado em *E. coli*). Assim, do mesmo modo ocorreu com os grupos controle das respectivas colônias foram similares estatisticamente.

De acordo com a literatura, um estudo avaliou o efeito da inativação fotodinâmica aplicando curcumina em diferentes pHs (5, 7 e 9) e demonstrou como melhor efeito bactericida quando a curcumina é colocada na presença de soluções com pH menores, resultando em uma maior liberação das moléculas e maior redução bacteriana de *S. aureus* (35). Este resultado concorda com os testes de degradação analisados neste presente trabalho, sendo que as moléculas de curcumina mostraram uma maior estabilidade e menor taxa de degradação em pH mais baixos como pH 2 e 4. Nos resultados apresentados na figura 5.16, embora nos grupos onde o TEc tenha permanecido em tempos de 7 e 12h em pH menores tenham uma redução de 89 e 80% respectivamente, o melhor efeito foi com adição do TEc em pH alcalinos, com redução de 96% no grupo TEc incubado por 7h em pH10. Além disso, o maior crescimento do grupo controle em pH menor pode ter sido devido ao efeito de pH menores no TE.

Assim como a gram positiva, *E. coli* teve uma maior inativação em pH4 quando o TEc foi incubado por 12h. Este resultado está de acordo com estudos relatados na literatura, onde esta espécie foi testada com diferentes concentrações de curcumina em 5 soluções com diferentes pH, sendo as maiores reduções de UFC em pHs de 2,5; 3; 4.(36) Um estudo focado no efeito da curcumina na membrana bacteriana teve resultados similares para *S. aureus* e *E. coli*. A curcumina demonstrou uma atividade na membrana celular, elevando a permeabilidade da membrana. Através da microscopia confocal foi visualizado um elevado sinal de fluorescência das moléculas de curcumina na parte interna na células, podendo resultar em uma lise celular, o que foi uma hipótese levantada para os resultados das células de *E. coli* devido

ao elevado sinal de fluorescência, porém após 2h houve um decréscimo neste sinal, podendo significar a lise celular. (37)

Estudos sobre mecanismos de resistência microbiana tem demonstrado mecanismos de resistência como reguladores gênicos, como fator sigma σ^B , regulador de uma resposta ao stress gerado pelo ambiente externo, como pH baixo, presença de etanol ou de sais(38), presente também em espécies de *S. aureus*. Algumas cepas quando postas em situações de stress como fome, pH ácidos ou básicos, ativam, quando presentes, os genes de resistência como *sarA* e *agr* durante as fases pós exponenciais ou estacionárias. (39)

Planejamento experimental fatorial completo 2^3 com ponto central e axial

A matriz XY do planejamento está na Tabela 5.4, descrevendo as variáveis reais e as codificadas.

Tabela 5.4 - Matriz XY onde descreve o número dos experimentos, as 3 variáveis (pH, Tempo incubação e dose de energia) reais e codificadas. A última coluna representa a resposta de cada experimento realizado.

Experimentos	1- pH (variável real)	Variável Codificada	2 -Tempo (h) (variável real)	Variável Codificada	3 - Dose (J/cm ²) (variável real)	Variável Codificada	Resposta (% UFC/mL)
1	3	-1	4	-1	50	-1	96,52
2	3	-1	4	-1	80	1	0,21
3	3	-1	12	1	50	-1	7,79
4	3	-1	12	1	80	1	1
5	9	1	4	-1	50	-1	68,65
6	9	1	4	-1	80	1	0,82
7	9	1	12	1	50	-1	4,5
8	9	1	12	1	80	1	0,62
9	0,95	-1,68	8	0	65	0	2,1
10	11	1,68	8	0	65	0	3,5
11	6	0	1,3	-1,68	65	0	6,2
12	6	0	14,7	1,68	65	0	0
13	6	0	8	0	29,77	-1,68	11,1
14	6	0	8	0	90,22	1,68	0
15	6	0	8	0	65	0	1
16	6	0	8	0	65	0	0
17	6	0	8	0	65	0	1,6
18	6	0	8	0	65	0	2,3
19	6	0	8	0	65	0	4,9

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da matriz descrita na Tabela 5.4, foram construídos os gráficos: de Pareto, os valores preditos vs. valores observados e as superfícies de resposta. A primeira análise estatística foi sobre as variáveis que mais influenciam no fator resposta. Os resultados otimizados revelaram que as variáveis 2 e 3 são mais importantes, assim como a interação entre ambas, enquanto a variável 1 (pH) não mostra ser significativa neste teste. O gráfico de Pareto (Figura 5.17A) quantifica o efeito de cada variável e da interação entre elas na resposta. O gráfico descrito na Figura 5.17B, mostra os valores preditos vs. valores observados, revelando uma correlação significativa entre o modelo previsto e o observado.

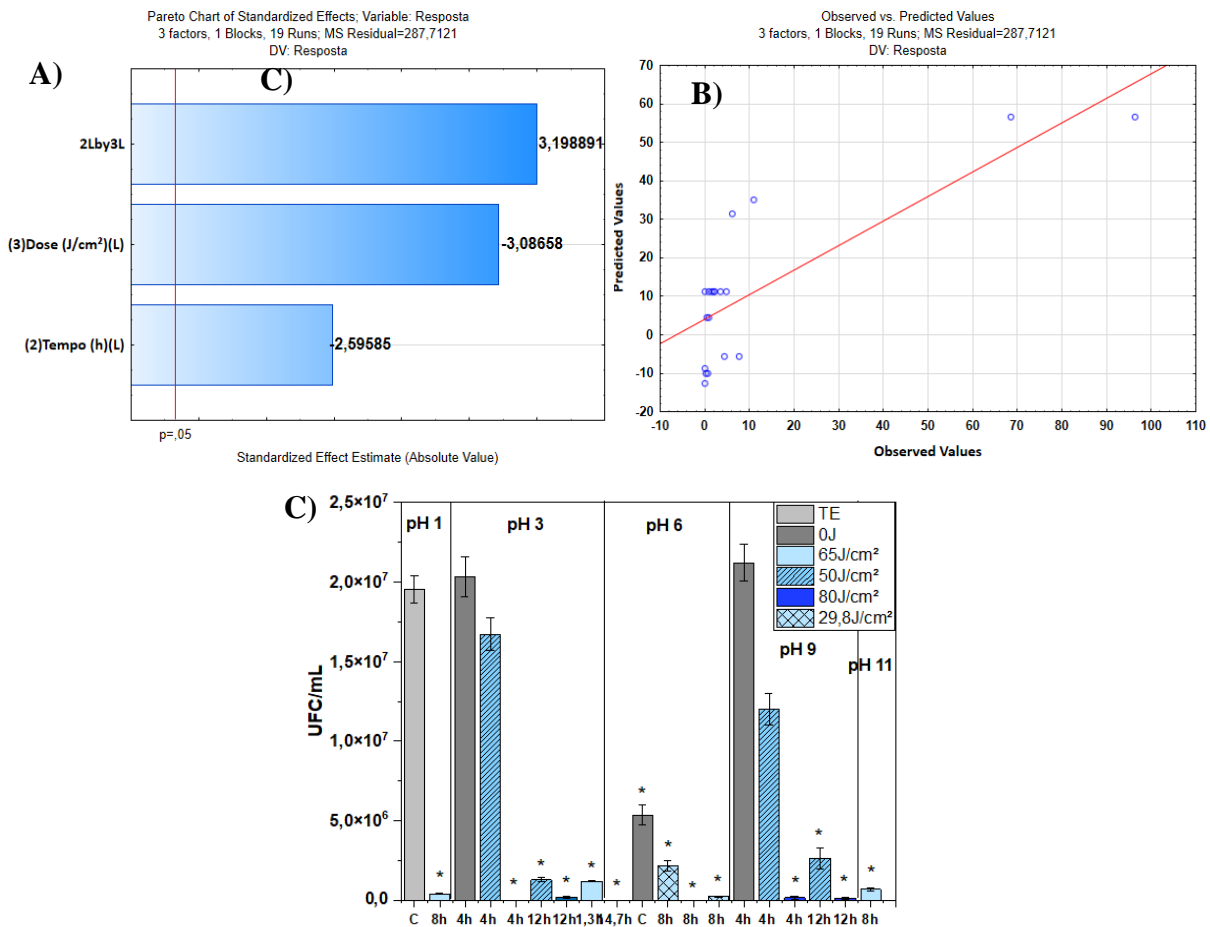


Figura 5.17 - A) Resultados da inativação fotodinâmica em biofilme de *S. aureus* formado por 24h em todos os experimentos delineados pelo DoE; B) Gráfico de Pareto indicando variáveis significativas no DoE; C) Gráfico sobre os valores preditos vs valores observados.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir das análises otimizadas foi descrita a equação da regressão:

$$z = 262,68 - 23,76x_2 - 3,5x_3 + 0,32 \quad (03)$$

Através da equação da regressão é possível plotar a superfície de resposta (Figura 5.18A) e o gráfico de contorno (Figura 5.18B). Com a equação da regressão é possível encontrar

a região ótima aumentando o tempo e a dose de luz para reduzir ao máximo a quantidade de colônias formadas sobre a superfície do TEc.

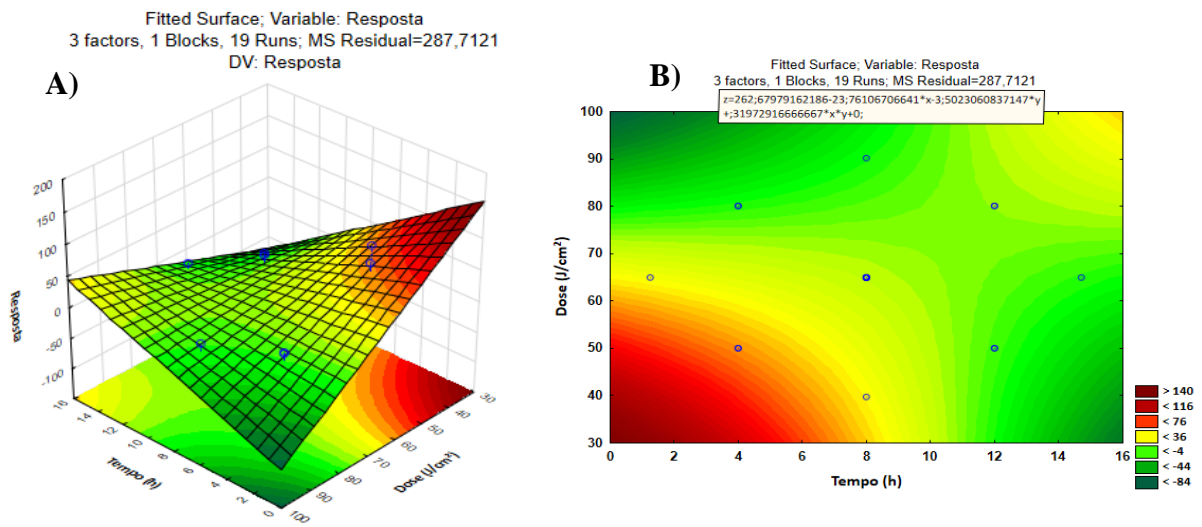


Figura 5.18 - A) Superfície de resposta entre as variáveis tempo de incubação e dose de luz com o fator resposta pós-tratamento IF; B) Gráfico de contorno entre as duas variáveis tempo de incubação e dose de luz. Quanto mais intensa o vermelho, maior a quantidade bacteriana, que ocorre em menores tempos e quantidade de dose dada. Gráficos plotados pelo DoE realizado pelo software Statistica®.
Fonte: Elaborada pela autora.

A superfície de resposta e o gráfico de contorno revelam que, para diminuir a quantidade de células bacterianas, pode-se utilizar duas estratégias: diminuir a dose de energia e aumentar o tempo de incubação ou aumentar a dose de luz e diminuir o tempo de incubação, pelas variáveis se mostrarem inversamente proporcionais. Houve uma complementariedade entre os resultados do planejamento experimental e os estudos de caracterização de estabilidade e degradação do FS no TEc. Enquanto os resultados de caracterização mostram estabilidade do FS funcionalizado em diferentes pHs (com exceção dos pH 9 e 10) e temperatura, os resultados do planejamento experimental também indicaram que o efeito do pH na IF não teve efeito significativo reducional quando aplicado a biofilmes de *S. aureus* na superfície do material.

5.3.1.5 Biofilmes microbianos

A segunda etapa foi a avaliação da ação fotodinâmica nos TEc em biofilmes de diferentes espécies bacterianas, biofilme de única ou multi-espécie; tempos de biofilme

desenvolvido; outro FS funcionalizado no tubo; e dose de luz irradiadas. Para os materiais funcionalizados com curcumina, a fonte de luz foi de 450 nm. Para os materiais funcionalizados com porfirina a emissão de luz foi por uma fonte de luz branca.

Única espécie

Inicialmente, os resultados da IF em biofilme de 24h nos tubos funcionalizados com a hidroxiporfirina e com a curcumina foram descritos na figura 5.19 abaixo. Os parâmetros utilizados nas reações de funcionalização foram iguais para ambas as moléculas: mantida no escuro sob agitação magnética por 4h a 32°C.

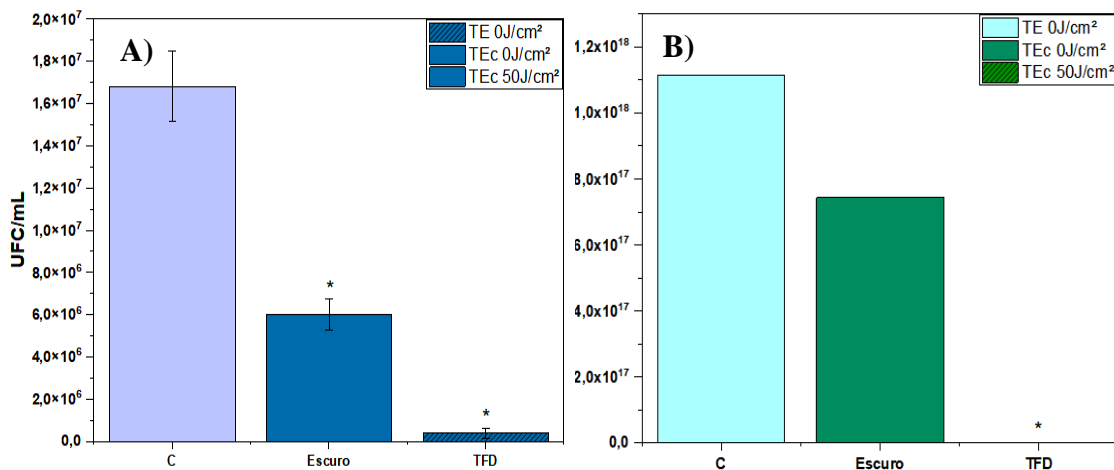


Figura 5.19 - Resultado da inativação fotodinâmica de biofilme de *S. aureus* formado durante 24h realizada em tubo funcionalizado com curcumina (A) e porfirina (B). Irradiação no tubo funcionalizado com curcumina com biotable em 450 nm e no tubo funcionalizado com porfirina com biotable branca, ambas gerando uma dose de energia total de 50 J/cm². Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora

A inativação do biofilme pelo tubo funcionalizado com curcumina foi de 98%, enquanto o tubo funcionalizado com porfirina reduziu 99,7%. Portanto, pode-se dizer que a o poder de inativação bacteriana pelo material funcionalizado foi comprovado. Devido ao fato da curcumina ser aprovada pelo FDA, os experimentos foram continuados utilizando apenas o tubo com curcumina.

Resultados do estudo da cinética dos biofilmes desenvolvidos no TE e no TEc ao longo do tempo

A figura 5.20 descreve os resultados da IF realizada mais de uma vez nos grupos (2-6) para a avaliação da viabilidade das colônias bacterianas remanescentes de recolonizar o tubo após a IF. Os tempos analisados foram biofilmes formados de 1 a 6 dias.

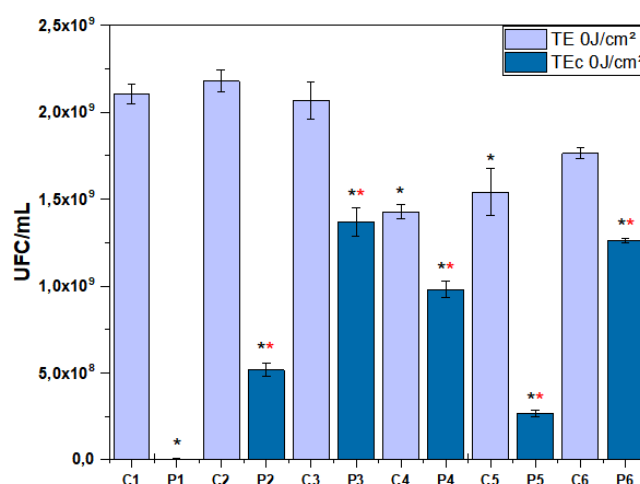


Figura 5.20 - Inativação fotodinâmica de biofilme de *S. aureus* formado nas superfícies do TE e do TE funcionalizado de 1 a 6 dias. Cada grupo recebeu uma dose total de luz equivalente ao tempo de formação de biofilme. O grupo com biofilme formado em 24h recebeu 100J/cm² (50J na superfície interna e 50J na superfície externa), o grupo com formação de biofilme em 48h recebeu 200J/cm² e assim consecutivamente com os outros. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle (C_i) e a marcação (**) são os grupos diferentes estatisticamente com seu respectivo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos resultados acima, pode-se evidenciar que mesmo após o tubo ser irradiado 4x, a curcumina se manteve ativa para que a IF tivesse um efeito redutor significativo no biofilme. Embora algumas colônias não tenham sido inativadas, elas não apresentaram uma força necessária para um significativo crescimento e proliferação celular ao longo dos 6 dias de teste. Os dias 3 e 6 apresentaram uma maior quantidade de formação de colônias, similar ao visto na literatura, onde as infecções se mostram com maior desenvolvimento após 3 dias de contaminação, apresentando uma queda no 5º dia e um aumento no 6º dia.

Resultado do estudo da cinética dos biofilmes

O próximo estudo teve como objetivo analisar a formação do biofilme em tempos maiores de desenvolvimento de biofilme (1-7 dias). A figura 5.21 descreve os resultados de UFC/mL, com a figura 5.21A descrevendo os 4 grupos testados (controles escuro e iluminados e grupos teste escuro e iluminados) e figura 5.21B representando um gráfico em barras destacando a diferença entre os grupos controle e TEc iluminados.

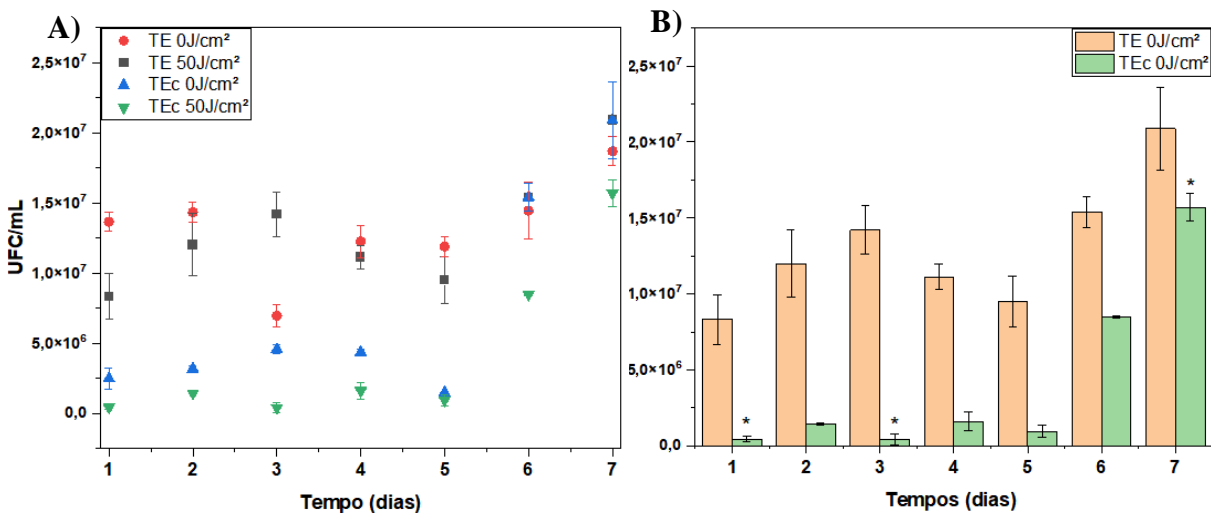


Figura 5.21 - Resultado sobre o ensaio de cinética do biofilme de *S. aureus* formado sobre os 4 tipos de tubo (TE, e TEc e iluminados e não iluminados); A) Gráfico da fração celular dos 4 grupos testados ao longo do tempo; B) gráfico em barras dos grupos controle sem luz (barra azul clara) e grupos IF (barra azul escura) dos 7 tempos testados. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

As 4 curvas de crescimento do biofilme tiveram o mesmo comportamento exponencial crescente como esperado. O TEc irradiado teve um crescimento menor em relação aos grupos controle sem iluminação e sem FS.

O objetivo deste teste foi estudar o comportamento da cinética de formação dos biofilmes de *S. aureus* desenvolvidos por um tempo maior com a realização da TFD apenas uma vez em cada tubo de cada grupo, com os resultados dos tubos irradiados mais de uma vez como no experimento anterior. A diferença entre os gráficos da figura 5.20 e 5.21 é que todos os grupos TFD da figura 5.21 foram irradiados apenas uma vez. A iluminação foi feita da mesma forma que o experimento acima, interna e externamente com ponteira e com a Biotable.

Ação fotodinâmica em biofilmes de *S. aureus*

Foi realizado uma investigação sobre a eficácia da ação da base, Ce_2CO_3 , na reação. Portanto, seguindo o mesmo protocolo para crescimento de biofilme em pedaços de 1cm do tubo, foi realizado um experimento comparando os mesmos grupos irradiados com 50, 80 e 100J/cm² no tubo funcionalizado com a base e grupos irradiados por 50 e 100J/cm² em tubo funcionalizados apenas com curcumina, sem adição da base. A figura 5.22 ilustra os resultados da IF nas condições apresentadas.

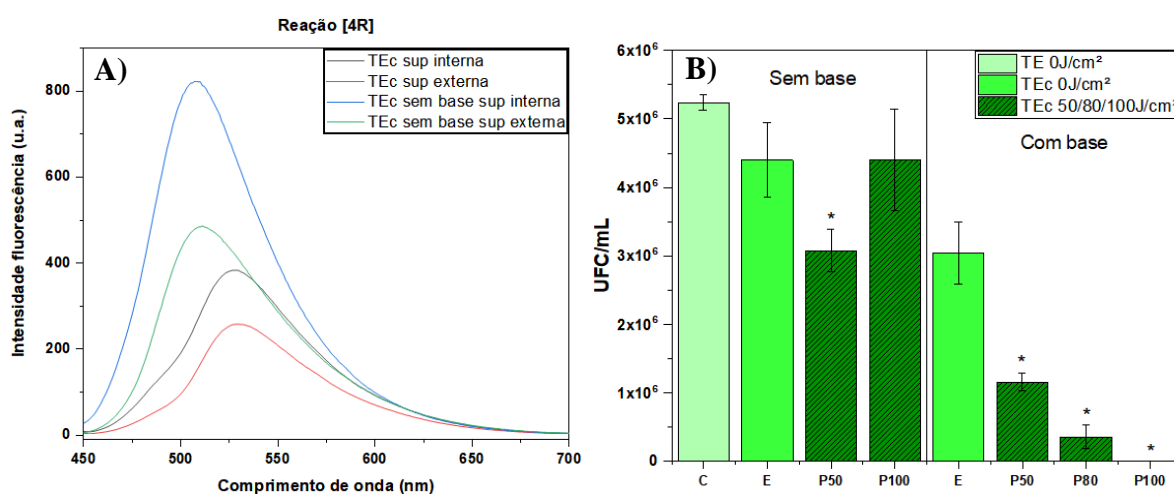


Figura 5.22 - A) Caracterização do espectro de fluorescência realizado nos tubos funcionalizados com e sem a base nas superfícies internas e externas dos tubos; B) IF em biofilme de *S. aureus* formados por 24h na superfície de tubos funcionalizados com e sem base mais a curcumina. Tubo sem adição da base foram irradiados com 50 e 100J/cm², enquanto TEc com a base foram irradiados com 50, 80 e 100J/cm². A iluminação foi realizada com a Biotable e a ponteira de irradiação. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como desenhado a priori, o papel da base é fundamental para que a ligação covalente entre a curcumina e o PVC seja possível. Como analisado, grupos dos tubos funcionalizados sem a base quando irradiados não tiveram o mesmo desempenho dos TEc com a base. O espectro de emissão de fluorescência confirma os resultados de inativação, a emissão do tubo sem a base emitiu um maior sinal de fluorescência, o que pode estar relacionada ao fato na curcumina estar interagindo menos com o tubo, interagindo mais facilmente com o meio externo e também sendo mais facilmente degradável sob ação da luz.

Ação fotodinâmica em biofilmes de outras espécies

A IF foi estendida a outras espécies bacterianas para comprovar a ação do novo tubo contra espécies diversas. Portanto, espécies como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e a cepa MRSA foram escolhidas por serem as principais bactérias isoladas do TE na UTI e serem causas de preocupação médica devido a resistência a agentes bactericidas. Logo, os biofilmes também foram crescidos durante 24h e mantidos no escuro a 37°C: *K. pneumoniae* (Fig. 5.23A), *P. aeruginosa* (Fig 5.23B) e a cepa *S. aureus* resistente a meticilina (Fig. 5.23C) em TEs: 0R, 3R, 4R e 5R. As doses de luz testadas foram de 50, 65, 80 e 100J/cm² irradiadas dentro e fora com a fibra.

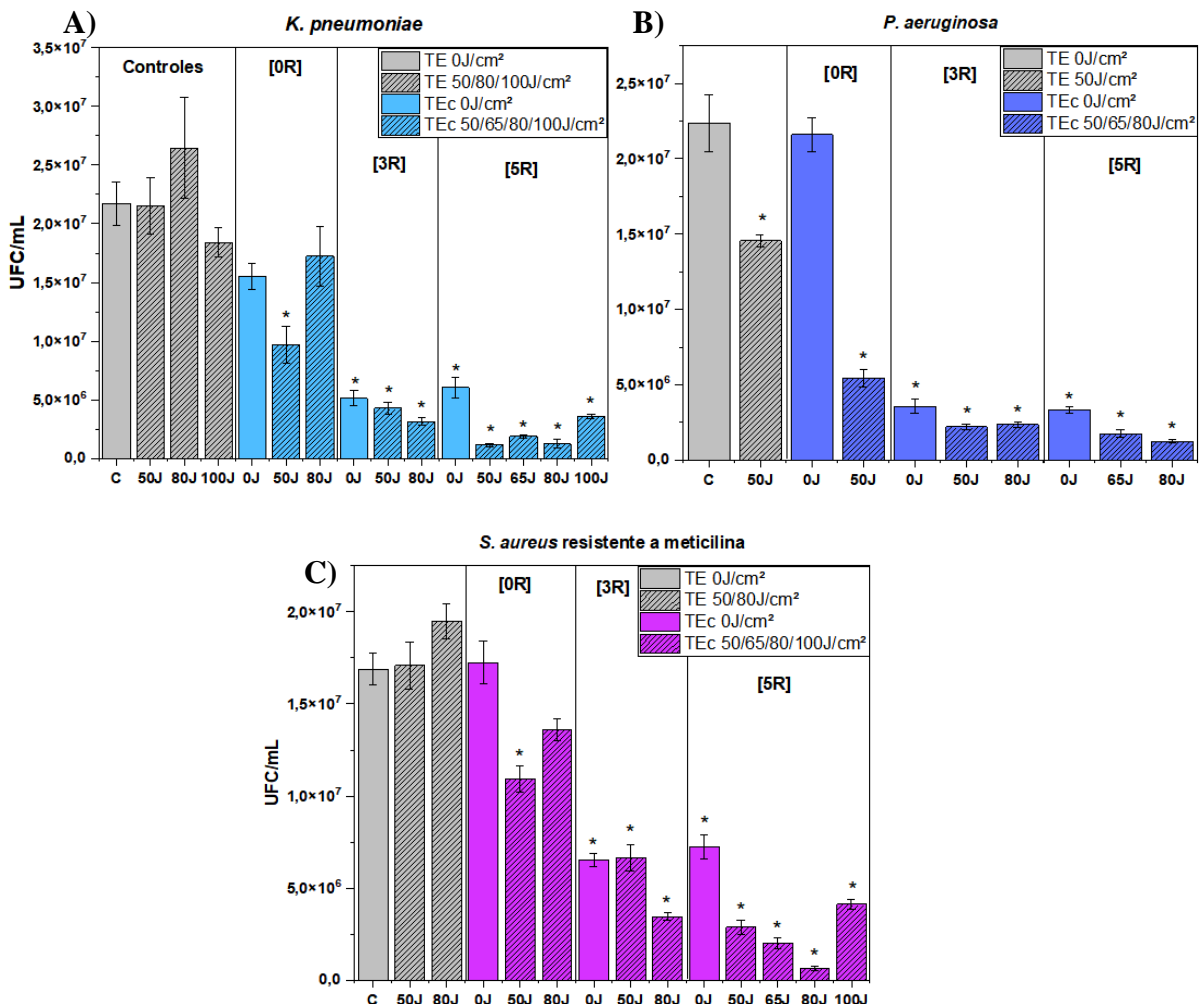


Figura 5.23 - Inativação fotodinâmica me biofilme desenvolvido por (A) *K. pneumoniae*; B) *P. aeruginosa* e C) cepa MRSA formada na superfície do TE e TEc durante 24h. As iluminações irradiadas nos grupos TFD foram de 50, 65, 80 e 100J/cm². Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de auxiliar na visualização dos dados de inativação, a tabela 5.5 foi esquematizada com a % de redução do biofilme de cada espécie de acordo com os parâmetros utilizados.

Tabela 5.5 - Resultados da % de redução do biofilme em cada espécie testada de acordo com a concentração da curcumina funcionalizada e a dose de luz dada a cada grupo.

[Curc func]	[1R]		[3R]			[5R]		
Dose Luz (J/cm ²)	50	80	50	80	50	65	80	100
Red KP (%)	55	21	80	85	95	91	94	83
Red PA (%)	76	-	89	90	-	92	94	-
Red MRSA (%)	35	19	61	80	83	88	96	76

Fonte: Elaborada pela autora

Independentemente da espécie e cepa testada, todos os grupos TFD tiveram maiores inativações com a menor concentração de curcumina funcionalizada no tubo ([5R]), com irradiações de 80J/cm², com uma pequena exceção da espécie *K. pneumoniae* com maior redução em 50J/cm² na mesma concentração. Embora não tenha tido diferença estatística entre as diferentes doses dadas entre os grupos irradiados, a dose de 80J/cm² foi a melhor dose de luz com maiores resultados de inativação dos biofilmes. A dose de 100J/cm² irradiada no biofilme de *K. pneumoniae* e MRSA resultou em uma menor redução celular nas colônias bacterianas. Logo, os resultados se mostraram coerentes com as caracterizações realizadas nos tubos funcionalizados com diferentes concentrações de curcumina: tubos funcionalizados com menores concentrações resultaram em uma maior fluorescência, e nos resultados microbiológicos comprova esta maior biodisponibilidade da curcumina nestas concentrações menores com menor agregação de moléculas e maior disponibilidade para que a IF seja realizada com sucesso.

A *P. aeruginosa* é uma das espécies oportunistas alarmantes por ocasionar infecções crônicas e agudas como as nosocomiais e no rato urinário, participando como uma das espécies presentes em infecções adquiridas em hospitais (HAI). Devido a sua hábil capacidade de formação de biofilme e ser considerada uma multi resistente a antibióticos (MDR-Multi Drug Resitance) é uma das causas de morte em pacientes e aumento no tempo de internação (8). Os resultados apresentados estão de acordo com estudos de biofilme de *P. aeruginosa* formado por 24h, revelando uma alta efetividade da TFD associando curcumina em solução com 10J/cm² com redução de 70% de biofilme.

A espécie *K. pneumoniae* é uma das espécies alarmantes também por ser resistente aos carbapenemos e estar associada a infecções nosocomiais e no trato urinário também. Estudos

de inativação da espécie associando curcumina conseguiram uma redução de 50% de biofilme em cepas isoladas clinicamente (9). Os resultados acima revelam uma maior inativação da espécie, podendo estar relacionada a uma maior disponibilidade das moléculas de curcumina no tubo e, conseqüentemente, uma maior efetividade para evitar a anexação de células bacterianas.

Existe uma vasta literatura de estudos sobre inativação de *S. aureus* e sua cepa resistente a metilina, por ser uma espécie oportunista e a mais comum no ambiente hospitalar. Estudos relacionando esta linhagem resistente a terapia fotodinâmica também atingiu resultados próximos da inativação total das colônias em 24h (40).

Teste Força Biofilme pós Inativação Fotodinâmica em MSSA e MRSA

Os resultados sobre a análise da força do biofilme estão descritos na Figura 5.24.

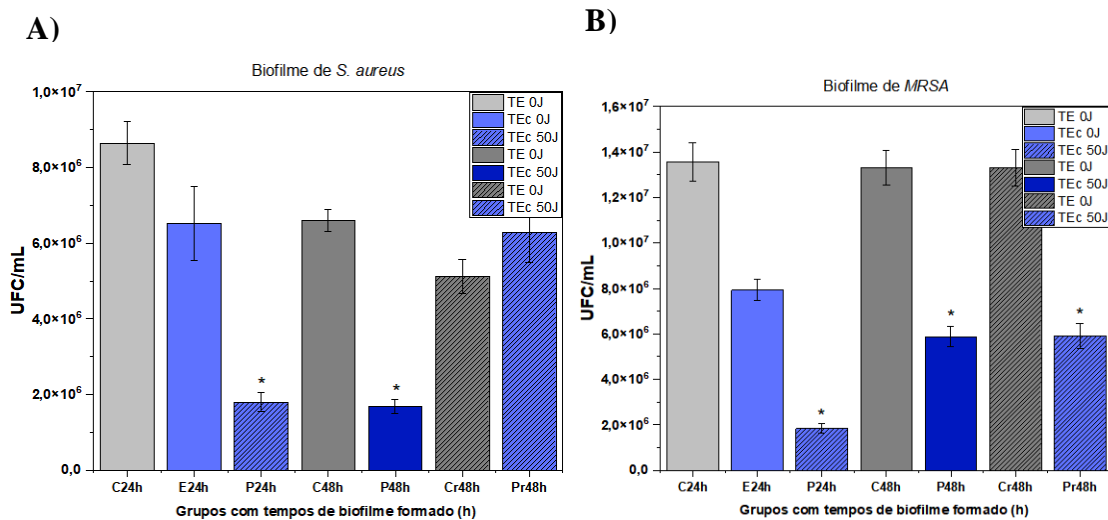


Figura 5.24 - Experimento para análise da força do biofilme pós TFD em A) MSSA e B) MRSA. Barras cinzas são controles 24h, barras azuis claras são biofilmes em TEC 0J/cm²; barra cinza média controle 48h, barras azuis escuras são TEC 48h 50J/cm²; barra cinza média hachurada controle 24h que foi recolocado para crescer; barra azuis médias hachuradas são as células que foram recolocadas para crescer mais 24h pós TFD. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora

O gráfico contido na figura acima descreve os grupos C24h e C48h são controles e Cr48h é o grupo controle crescido por 24h, as células bacterianas foram retiradas por agitação e foram recolocadas para crescer em um novo tubo. Assim como o grupo Pr48h, onde foi um

grupo teste onde o biofilme crescido em TEc por 24h foi irradiado com 50J/cm², as células bacterianas foram retiradas por agitação e recolocadas para crescer em um novo TEc por mais 24h, resultando um total de 48h. Logo, os resultados da figura 5.24 revelam que as células da cepa MRSA pós TFD tiveram uma força menor para uma nova colonização e formação de biofilme no TEc comparada a *S. aureus*. Estudos revelam que a molécula de curcumina possui a habilidade de inativar fatores de virulência (41), podendo ter neste caso com estes parâmetros utilizados tendo um maior efeito nas colônias de MRSA em comparação com as colônias MSSA.

A figura 5.25 descreve os resultados dos experimentos de cinética realizados.

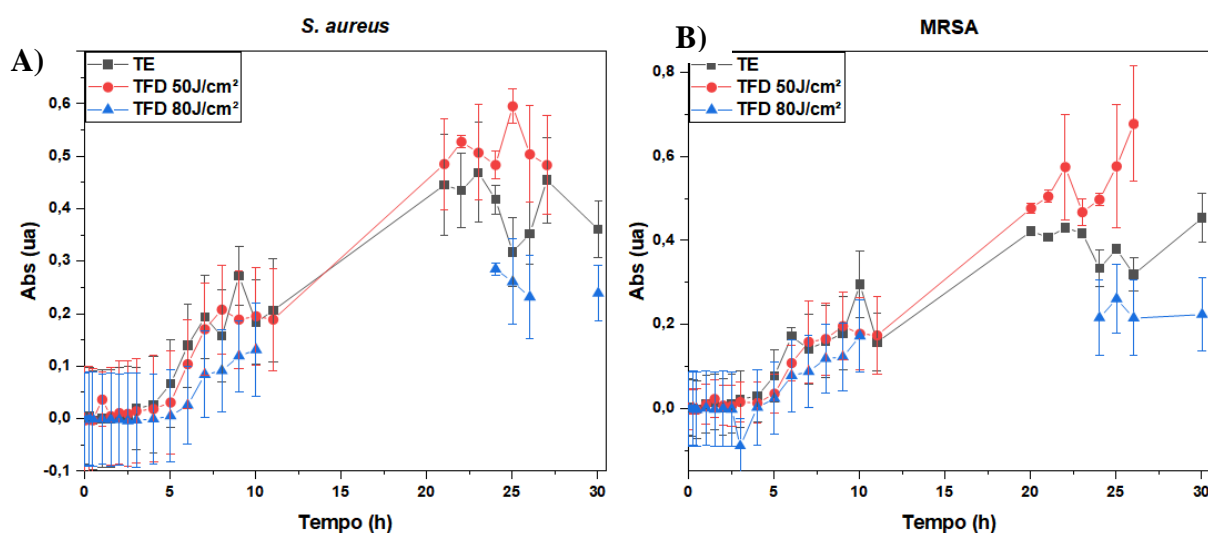


Figura 5.25 - Curvas de cinética de crescimento pela absorbância em 600nm de biofilme pós TFD utilizando TEc [5R] e 50 ou 80J/cm² em A) *S. aureus* e B) MRSA.

Fonte: Elaborada pela autora

Ambos os gráficos, independente da dose irradiada e do micro-organismo utilizado, mostraram um mesmo comportamento pós TFD. As espécies tiveram uma diminuição na absorbância, revelando um decréscimo na concentração celular, porém mantendo o mesmo comportamento de crescimento com um crescimento até aproximadamente 24h seguido por um decréscimo pós 25h, característico da curva de crescimento bacteriana.

Multi-espécie

Biofilmes multi-espécies foram testados no TE e no TEc por 24h e 48h para verificar a ação fotodinâmica da curcumina nestes tipos de biofilme heterogêneos. Foram testados 6 tipos de biofilmes heterogêneos: *S. aureus* + *K. pneumoniae* (Figura 5.26A), *S. aureus* + *P.*

aeruginosa (Figura 5.26B), *K. pneumoniae* + *P. aeruginosa* (Figura 5.26C), *S. aureus* + MRSA (Figura 5.27A), *K. pneumoniae* + MRSA (Figura 5.27B) e *P. aeruginosa* + MRSA (Figura 5.27C). O tempo de biofilme de 24 e 48h com o TEc [1R] e para [3R] e [5R] de 48h. O mesmo protocolo utilizado para crescimento de biofilme em pedaços de 1cm do tubo foi repetido nesta etapa dos estudos. Logo, em cada poço da placa de 24 foram adicionados 900 uL de meio BHI líquido + 50 uL do pré inóculo da espécie 1 e 50 uL do pré inóculo da espécie bacteriana 2, seguido pela incubação a 37°C. A iluminação foi realizada pela Biotable e ponteira, com 50, 80, 100 e 120J/cm² cada uma. As figuras 5.26 e 5.27 descrevem os resultados dos ensaios dos biofilmes multi-espécies.

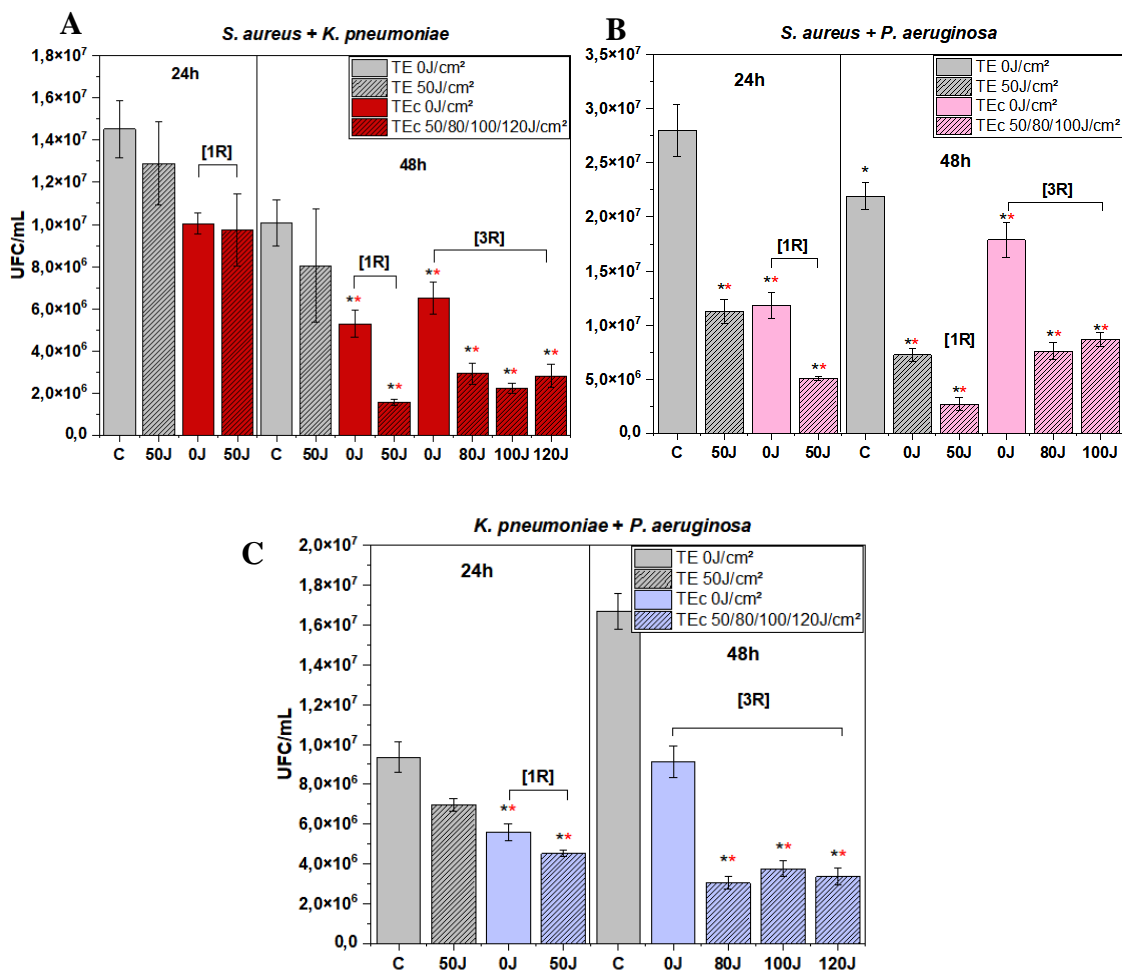


Figura 5.26 - Resultados de IF com biofilmes multi espécies formadas durante 24h e 48h nos tubos TE (0 e 50J/cm²) e TEc (0 e 50J/cm²) de A) *S. aureus*+*K. pneumoniae*; B) *S. aureus*+*P. aeruginosa*; C) *K. pneumoniae*+*P. aeruginosa*. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle marcação (*) são os grupos diferentes estatisticamente com seu respectivo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora

Os biofilmes multi-espécie formados por *S. aureus*+*K. pneumoniae* (SA+KP) e *S. aureus*+*P. aeruginosa* (SA+PA), tiveram os melhores resultados de inativação nas condições do TEc com 1R e irradiados com 50J/cm² após 48h de crescimento de biofilme, embora não exista diferença estatística entre os grupos TFD iluminados nas diferentes condições. Já o biofilme de *K. pneumoniae* + *P. aeruginosa* (KP+PA) manteve resultados de redução bacteriana bem similares nas duas concentrações de curcumina testada e entre as doses de luz irradiadas.

De acordo com a literatura (5), biofilmes com maiores valores de densidade celular foram biofilmes multi-espécie com *S. aureus* + *P. aeruginosa*. Interações entre dual espécies por ser antagonista ou sinérgica, dependendo das respostas bactericidas ou bacteriostáticas de cada espécie como secreção de produtos metabólicos como ácidos orgânicos, enzimas inibitórias ou mudanças físico-químicas, depleção de nutrientes ou uma combinação destes fatores. A *P. aeruginosa* é uma espécie conhecida por ser uma forte competidora por oxigênio e ferro, além de apresentar fatores de virulência como quatro sistemas de quórum sensing (*las*, *rhl*, *Pseudomonas quinolone* (*pgs*), e *iqs*) (8); e alterar o ambiente físico-quimicamente quando em contato com *S. aureus*. Embora a *S. aureus* também possua mecanismos de defesa, como a propriedade de formação de variantes de pequenas colônias (SCVs) que diminuem a superfície de contato com a *P. aeruginosa* (15), estudos recentes relatam a aniquilação da gram positiva em poucas horas de contato com a gram-negativa através de mecanismos como secreção de fatores como anti-Staphylo-coccal 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline N-Oxide (HQNO), Piocianina e LasA protease negativa. Estes fatores atacam as colônias, dispersando-as. Nos resultados apresentados na figura 5.26, a maior redução celular foi do biofilme entre SA e PA, com inativação de 90%. Este resultado pode ter sido alcançado devido além da competição entre ambas espécies o efeito da curcumina no quórum sensing (41) da PA e da anexação das colônias para um crescimento efetivo do biofilme, afetando o crescimento de ambas espécies.

O biofilme de KP + PA foi o com menor redução (68%). Este menor resultado pode ser relacionado ao fato de ambas as espécies possuírem fatores de virulência efetivos para a anexação e desenvolvimento do biofilme. A espécie KP possui uma capsula polissacarídea, sideróforos e pili, além de possuir a capacidade de formar colônias hiper mucoides. (9) A cápsula polissacarídea é considerada o principal fator de virulência por conferir proteção contra o reconhecimento a fagocitose das colônias pelo sistema imunológico do organismo. (16) Portanto, este biofilme dual pode ser considerado um biofilme mais resistente contra agentes externos como a luz e a ação da curcumina devido aos fatores de virulência e proteção da matriz EPS.

Seguindo o mesmo protocolo acima para experimentos de biofilmes multiespécie, agora associando a cepa resistente MRSA. Então, os biofilmes foram desenvolvidos nos mesmos tempos de 24h e 48h a 37°C em pedaços de 1cm do tubo incubados na estufa. A figura 5.27 descreve os resultados da IF.

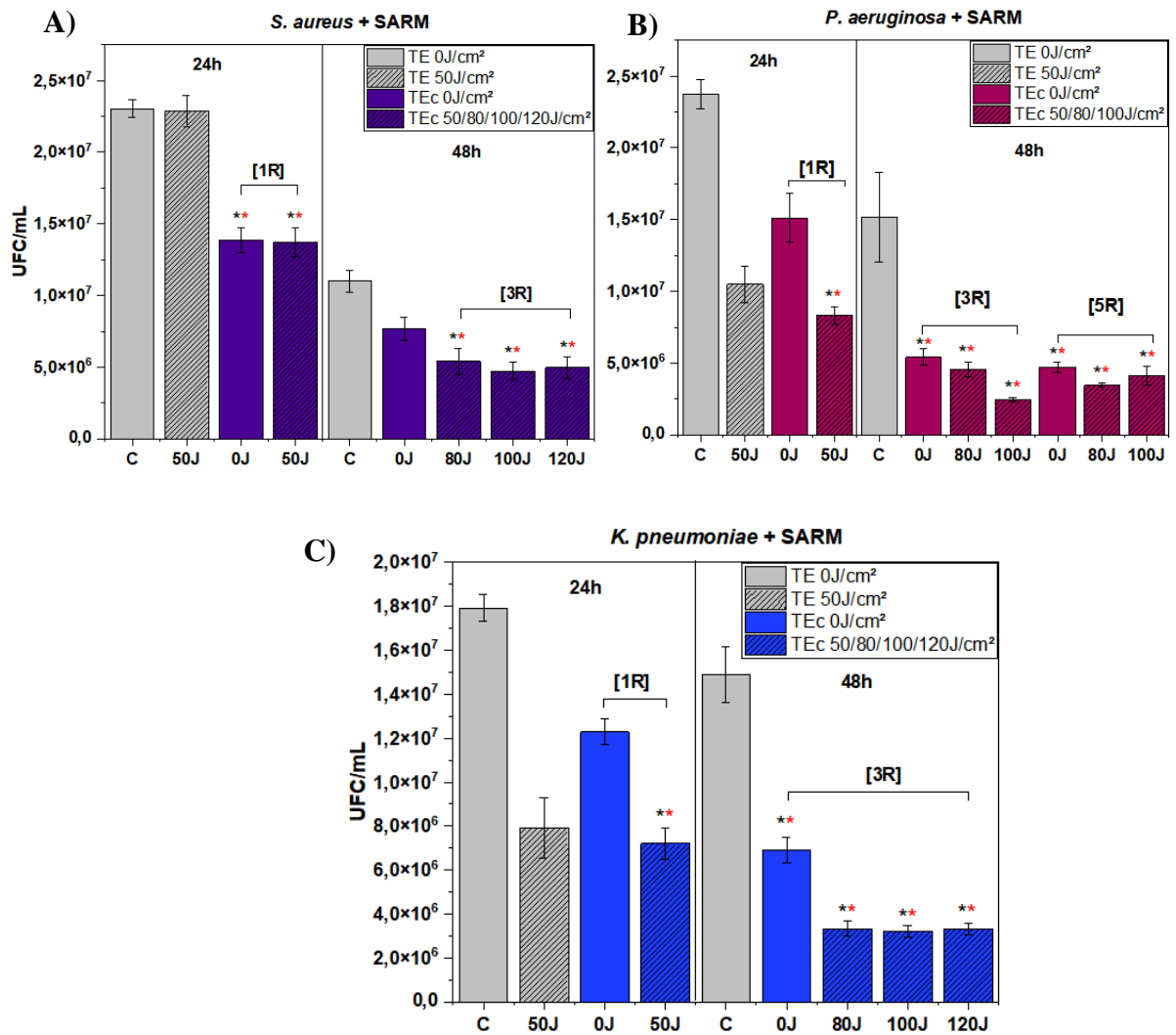


Figura 5.27 - Resultados de IF com biofilmes multi-espécies formados durante 24h e 48h nos tubos TE (0 e 50J/cm²) e TEc (0 e 50J/cm²) de A) *S. aureus*+MRSA, B) *P. aeruginosa*+MRSA; C) *K. pneumoniae*+MRSA. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle e a marcação (**) são os grupos diferentes estatisticamente com seu respectivo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora

A tabela 5.6 foi esquematizada para facilitar a análise dos dados de inativação dos biofilmes multi-espécie.

Tabela 5. 6 - Resultados da % de redução do biofilme multi-espécie testado de acordo com a concentração da curcumina funcionalizada e a dose de luz dada a cada grupo.

[Curc func]	[1R]		[3R]			[5R]	
Tempo biof	24h	48h	48h			48h	
Dose Luz (J/cm ²)	50	50	80	100	120	80	100
Red SA+KP (%)	33	89	80	85	81	-	-
Red SA+PA (%)	82	90	31	69	-	-	-
Red KP+PA (%)	51	-	68	60	64	-	-
Red SA+MRSA(%)	41	-	77	80	80	-	-
Red MRSA+KP (%)	60	-	82	82	82	-	-
Red MRSA+PA (%)	65	-	81	90	-	86	83

Fonte: Elaborada pela autora

Assim como os resultados apresentados na figura 5.26, o efeito do aumento da dose de luz não afetou significativamente a inativação fotodinâmica, independente das espécies testadas. A maior redução celular foi alcançada a partir dos parâmetros com concentração do TEc de [3R] e 100J/cm². Nos biofilmes MSSA+MRSA e MRSA+KP, as doses de 100 e 120 geraram o mesmo valor de redução. Esta observação pode ser devido ao tipo de biofilme desenvolvido. *S. aureus* por ser uma espécie oportunista, é uma das mais comuns e frequentes em seres humanos, além de ser agente etiológicos de diferentes infecções como pneumonia, meningite, síndrome do choque tóxico, endocardite, bacteremia. (40) Assim como o operon *ica*, a MSSA possui outros fatores de virulência como *coa* e *spa*, que permitem uma aderência das colônias e é considerada um primeiro passo para a invasão em doenças crônicas.(12) MRSA é uma MDR resistente contra macrolidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicol e fluoroquinolonas e por possuir o operon *ica*, codifica a adesina intracelular polissacarídea, a qual implica na anexação e crescimento do biofilme. (12) Portanto, a forma resistente da *S. aureus* pode levar a formação de um biofilme mais forte quando em mono ou dual espécie, podendo ser necessário a associação da TFD com outros agentes como metais (prata) ou antibióticos para um sinergismo entre terapias e eliminar as colônias restantes.

5.3.2 Sonda Uretral

5.3.2.1 Caracterizações Físico-químicas

A sonda foi submetida a caracterizações para observar se ocorreu a interação entre a curcumina e o material polimérico da sonda uretral. Logo, a análise pelo infravermelho e por fluorescência foram realizadas e estão demonstradas na Figura 5.28 abaixo.

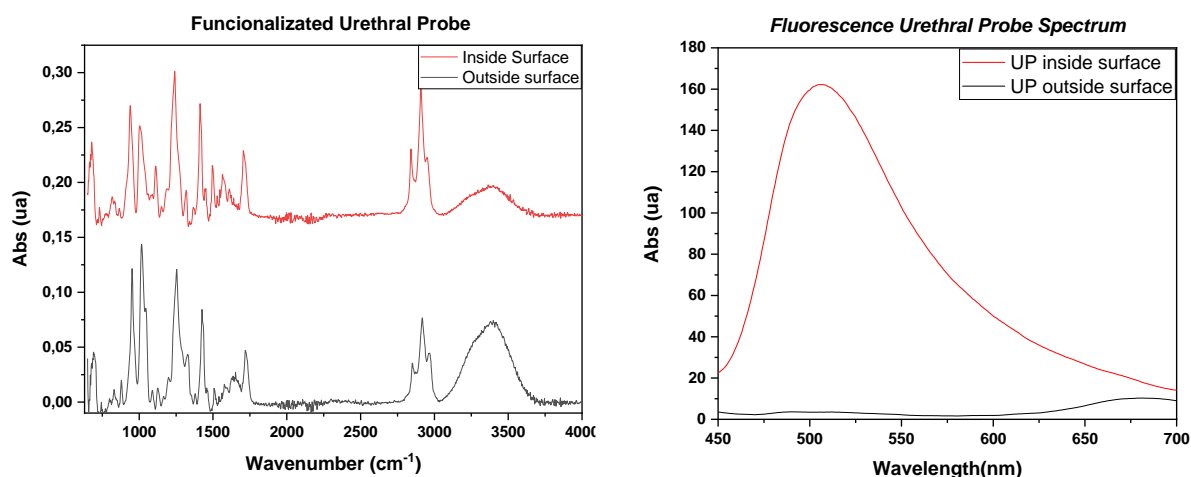


Figura 5.28 – Caracterização A) FTIR realizada na superfície interna (linha vermelha) e na superfície externa (linha preta); B) Intensidade de Fluorescência na superfície interna (linha vermelha) e na superfície externa (linha preta).

Fonte: Elaborada pela autora

A partir dos espectros de infravermelho, pode-se observar que a presença da curcumina se mantém através do pico em 3250 cm^{-1} , pico característico do radical hidroxila, onde no espectro apenas do cateter não apresenta este pico. Os picos em 2920 e 2850 cm^{-1} são picos característicos da sonda uretral, característicos das ligações alifáticas C-H. O pico em 1700 cm^{-1} presente é característico da ligação C=O, pico em 1240 cm^{-1} e característico da ligação C-N(42).

Já os espectros de fluorescência revelaram uma fluorescência interna muito mais significativa que a externa, provavelmente devido ao diâmetro da sonda ser muito pequena, principalmente em relação ao TE. Uma explicação poderia ser que durante a reação de funcionalização, devido ao pequeno diâmetro do material, a curcumina poderia acumular e se manter por mais tempo dentro da superfície interna da sonda.

Além disso, análise por Microscopia de Força Atômica (AFM) foi realizada para verificação da topologia do material e está descrita na Figura 5.29.

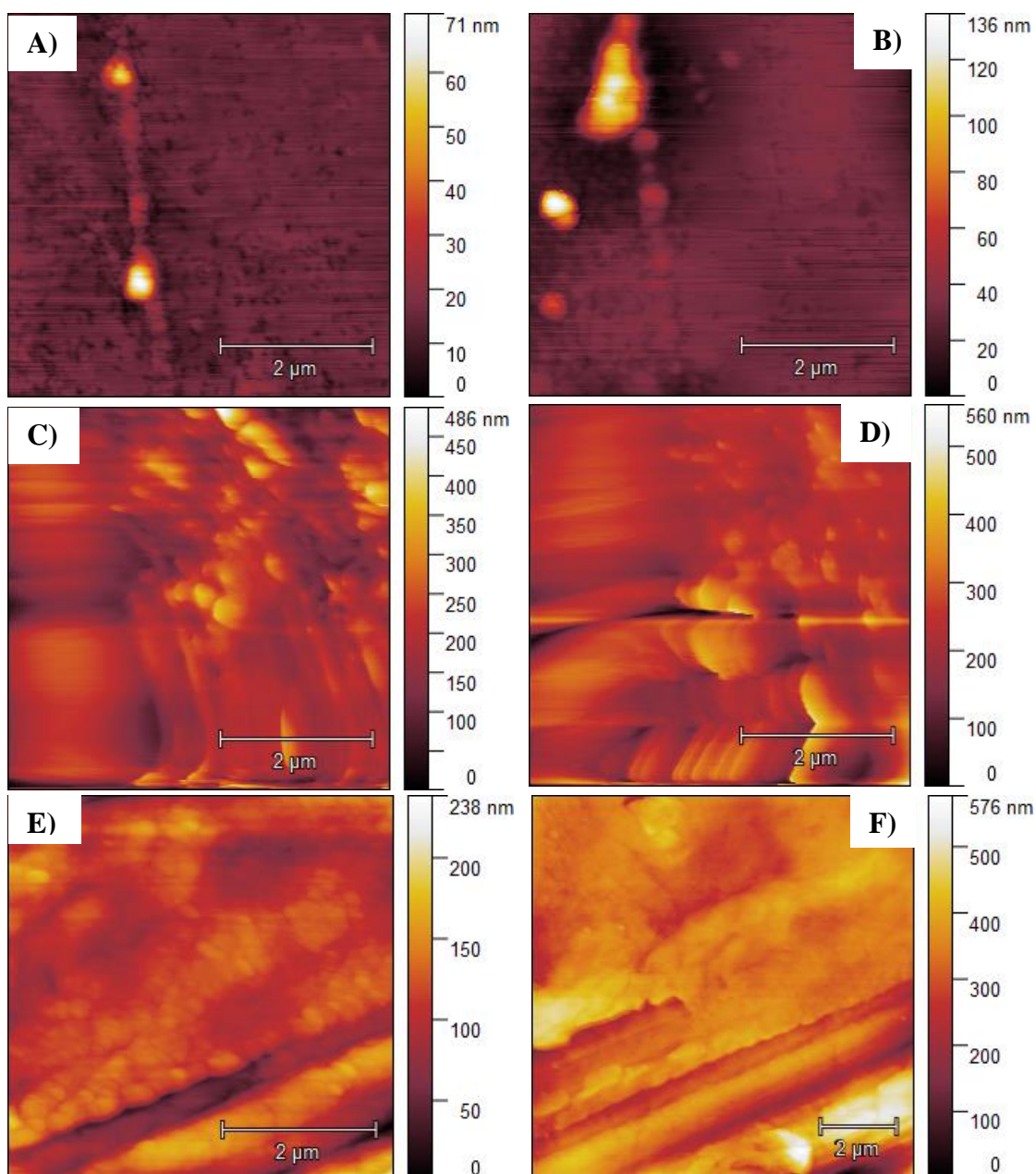


Figura 5.29 - Imagens por AFM dos grupos: A e B) SU sem funcionalização; C e D) SU funcionalizada e analisada na superfície interna; E e F) SU funcionalizada e analisada na superfície externa.
 Fonte: Elaborada pela autora

De acordo com as análises de AFM, as superfícies modificadas interna e externamente se tornam mais rugosas, aumento a área de superfície. Superfícies rugosas proporcionam uma maior anexação bacteriana, entretanto, de acordo com os resultados obtidos de IF, este aumento na área de superfície proporciona uma maior interação com as moléculas de curcumina, o que reduz a anexação celular e as células que aderiram ao tubo foram inativadas.

5.3.2.2 Inativação Fotodinâmica

A IF em SUC foi realizada sob biofilmes de *E. coli* formado por 24h utilizando as quatro concentrações diferentes de base e de curcumina, com iluminação realizada com a fibra difusora em pedaços de 1 cm da sonda. As doses de luz cedidas foram de 50, 75, 80 e 100J/cm². A figura 5.30 contém os resultados de inativação obtidos.

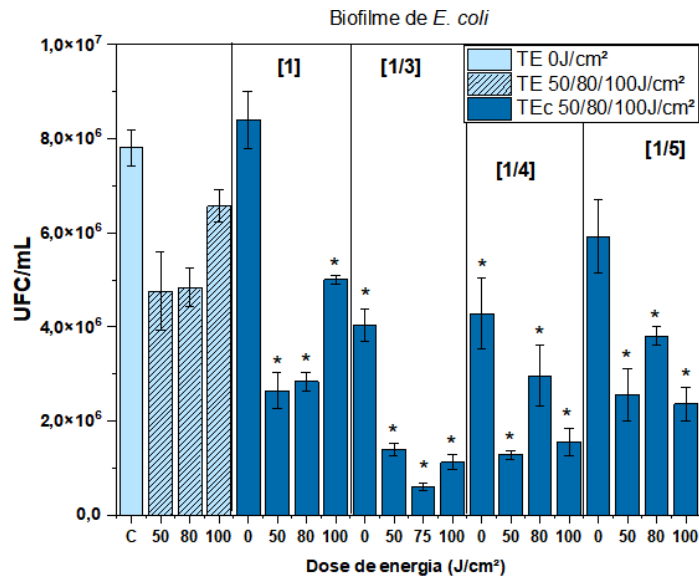


Figura 5.30 - Inativação fotodinâmica em biofilme de *E. coli* formado por 24h em SUC em 4 condições de concentração de curcumina diferentes. Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

A melhor condição para inativação de biofilmes de *E. coli* foram utilizando a concentração de 3R iluminando 75J/cm², embora não tenha diferença estatística entre os três grupos irradiados nesta concentração. A espécie gram negativa, devido a parede celular possuir 3 camadas de proteção e ter fatores de virulência como flagelo, que auxilia na locomoção celular influência nos resultados de inativação do biofilme. Além disso. Membros da família Enterobacteriaceae são capazes de codificar beta-lactamases e estes genes de resistência podem ser transmitidas por plasmídeos.(43) Portanto, comparado com a espécie *S. aureus* que foi possível obter uma inativação total na concentração [5R], o biofilme de *E. coli* foi reduzido 92% com uma concentração maior de curcumina (3R). A espécie gram negativa foi escolhida por ser uma das bactérias mais frequentemente isoladas destes cateteres na clínica (cerca de 80%).(43)

De acordo com os parâmetros com maior inativação ([3R] e 100J/cm²) foram escolhidos para realizar um experimento de cinética do biofilme de *E. coli* de 1 a 11 dias na sonda. Os resultados estão descritos na Figura 5.31.

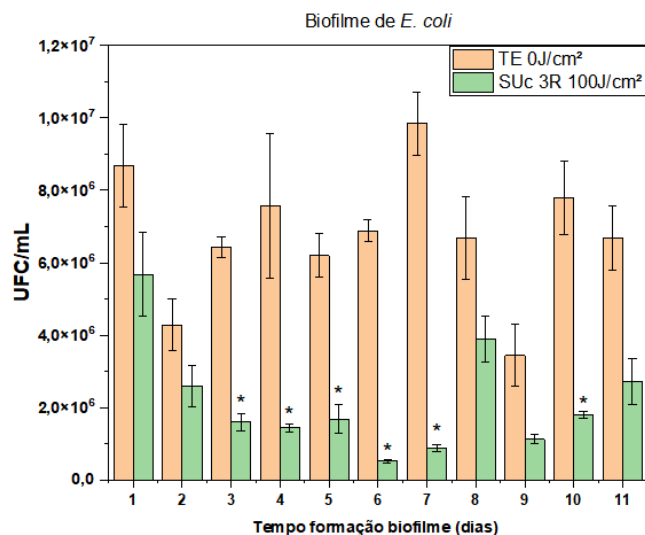


Figura 5.31 - Inativação fotodinâmica em biofilme de *E. coli* formado de 1 a 11 dias em SU e SUC [3R] e iluminadas por 100J/cm². Grupos com a marcação (*) são estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste pela análise de variância (Anova) oneway com p valor <0,05.

Fonte: Elaborada pela autora

A partir das análises foi possível observar que a SUC conseguiu manter uma inativação no biofilme ao longo de 10 dias. O biofilme de *E. coli* se manteve constante ao longo do tempo, enquanto os biofilmes sob as SUC mantiveram um baixo crescimento. Portanto, pode-se dizer que a SUC é efetiva contra biofilmes de *E. coli* ao longo de 10 dias, com redução máxima de 95% no sexto dia.

5.4 Conclusão Parcial

Foi possível otimizar os parâmetros para funcionalização no tubo todo e a otimização na fonte de luz, atingindo reduções totais de biofilme de *S. aureus* de 1 a 7 dias com irradiação de 100J/cm² e concentrações de 5R de curcumina funcionalizada. Foi possível realizar um DoE alterando pH, dose de luz e tempo de incubação, sendo o pH uma variável de baixa relevância quando comparado a variável dose de luz para uma redução total de biofilmes formados. Foi possível realizar a inativação em biofilmes multi-espécie, com reduções significativas, sendo o biofilme de SA+PA com maior resultado de inativação. A funcionalização na sonda uretral foi possível, além da realização da caracterização da fibra revelou a presença da curcumina a sonda. Uma otimização da concentração da curcumina funcionalizada na sonda foi possível, além da

otimização da dose de luz irradiada para uma inativação significativa em *in vitro* em biofilme de *E. coli* de 1 a 7 dias de formação.

A aplicação da TFD revelou uma eficácia tão significativa em espécies resistentes como MRSA quanto em *S. aureus*. A curcumina sob luz mostrou que pode afetar significativamente fatores de virulência em biofilmes de MRSA, porém sem afetar a cinética da curva de crescimento bacteriano em espécies MSSA e MRSA.

6 – PREVENTION OF VENTILATION-ASSOCIATED PNEUMONIA APPLYING A FUNCTIONALIZED ENDOTRACHEAL TUBE AND PHOTODYNAMIC THERAPY: A PROOF OF PRINCIPLE WITH AN ARTIFICIAL INTUBATION MODEL

6.1 Simulação do Sistema Respiratório de uma pessoa intubada

Neste capítulo serão apresentados os estudos sobre a elaboração e construção de um sistema respiratório simulando um paciente intubado. Primeiramente, o sistema foi montado e caracterizado em relação a formação do biofilme no tubo sem curcumina ao longo de 7 dias. Em seguida duas concentrações de curcumina funcionalizada foi testada, encontrada a melhor condição e otimizada a quantidade de doses de luz irradiadas ao longo de 24h. Por fim, os resultados otimizados foram aplicados em um ensaio de circulação do sistema por 7 dias: 5R de concentração de curcumina funcionalizada, 100J/cm² irradiadas quatro vezes ao longo de 24h. Experimentos com a cepa *S. aureus* resistente a metilicina também foram realizados, com resultados similares a cepa não resistente de *S. aureus*.

6.2 Objetivos do capítulo:

Geral:

- Otimizar parâmetros da TFD para aplicação nos ensaios pré-clínicos;

Específicos:

- Caracterização da cinética de contaminação;
- TFD com duas concentrações de curcumina funcionalizada no tubo;
 - TFD com diferentes doses de luz;
 - TFD aplicada em cepa resistente no sistema;
 - Acoplamento do ventilador mecânico.

6.2.1 Abstract

A respiratory system model was built containing three components representing oropharynx, trachea, and lungs. ET-curc was inserted into the system's trachea followed by biofilm formation. Microbial migration from *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) biofilms to the left and right lungs were evaluated with and without mechanical ventilation. PDT was applied to ET-curc using a laser at 450 nm, and antimicrobial effects on the respiratory system were evaluated. **Results:** The results showed that the respiratory system allowed an evaluation of the antimicrobial behavior of PDT using ET-curc with a total inactivation, considering microbial flow relationships from the upper to the lower air system. **Conclusion:** The effects indicated high effectiveness in the inactivation of biofilm bacteria cells and consequently in the prevention of their colonization of the lungs. The results indicated that PDT can be an excellent alternative to prevent the spread of infectious lung diseases by multidrug-resistant microorganisms in intubated individuals under mechanical ventilation and provide conditions for starting animal model experiments.

Keywords: Respiratory system model, Photodynamic therapy, Curcumin, Mechanical Respirator, MRSA, Bacterial Biofilm.

6.2.2 Introduction

Lung (LG) related infections have increased in importance and cost in recent years. The prolonged hospitalization times have amplified the problem [1-3]. The reported mortality is 26-74% higher than other nosocomial infections in Intensive Care Units ICU [4]. Anti-pathogen exposure methods are widely described to prevent LG infections. However, most organisms found in clinical isolates of LG infections are genetically different to environmental isolates [3]. Patients using mechanical ventilators have increased 7 to 47% chances of developing Ventilator-associated pneumonia (VAP) [4], which occurs from 2 to 5 days after endotracheal intubation and mechanical ventilation [1,2]. The intubation procedure is usually necessary in cases of surgery or emergency, such as respiratory failure, cardiorespiratory arrest, hypoventilation, and respiratory diseases [5,6].

Routine cleaning in mechanical ventilation is difficult to perform, and only broncho-aspiration is feasible, which increases the possibility of contamination of the lower airways. The recommended preventive measures for the development of VAP are elevation of 45° the headboard, closed endotracheal suction, subglottic drainage, and decontamination of the oropharynx (ORO) and digestive tract. However, studies have shown that this procedure may not be as efficient against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) [7,8]. *Staphylococcus aureus* is a gram-positive opportunistic bacterium and one of the most frequently isolated species from intubated patients diagnosed with VAP [4].

Medical devices introduced in patients such as endotracheal tubes (ETs) increase the chances of contamination. ETs can contribute to the fixation, colonization, and development of pathogenic bacteria on their surfaces, creating favorable conditions for developing microbial biofilms, which were reported in 84% of ETs removed from intubated patients [8]. Biofilm is a strategic way for microorganisms to protect themselves against external factors such as temperature, pH and antimicrobial agents [9]. The extracellular matrix is formed and reaches 90% of the biofilm biomass, providing protection and nutrition for microbial cells (5), making it up to 100,000 times more resistant to antibiotic agents than planktonic cells [10]. Furthermore, the mechanical ventilator connected to the patient will also assist in microbial transport by gas flow, which facilitates the formation and maintenance of biofilms in ETs. The respirator is considered a renewable source of oropharyngeal bacteria and water droplets on the tube [11] and LG.

Proof of principles studies on biofilms colonizing ETs under mechanical ventilation are hard to perform and realistic simulations of ET environments are rare. In this study, we constructed an artificial respiratory system to provide proof of principles that the inhibition of infection demonstrated in a previous publication [12] is relevant for clinical settings. Here we describe the development of an artificial model for testing the functionalized ETs with curcumin molecules (ET-curc), to demonstrate that the photodynamic action prevent both biofilm formation in the tube and bacterial migration to the lower part of the ventilated respiratory system. This proof of principle is a fundamental and necessary step to progress from *in vitro* tests and to animal models and, finally, to clinical studies.

6.2.3 Material and methods

6.2.3.1 Reagents.

Cesium carbonate and all the solvents were acquired from Sigma-Aldrich, FluoroChem or Kasvi and used without further purifications. The photosensitizer curcumin ((1E,6E)-1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) with 95% purity was supplied by PDT Pharma® (Brazil). The PVC-based endotracheal tube (ET) (Solidor®) is commercially available. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was acquired from Sigma-Andrich.

6.2.3.2 Functionalization of ET

Following our methodology [12], the immobilization of curcumin onto ET surface to produce ET-curc was performed by reacting curcumin with the ET surface in the presence of a base. The ET (11,8 g) was placed inside a container (A) filled with a solution of curcumin and Cs_2CO_3 in DMSO with the desired concentration, see Table 2. For each experimental condition, two ETs were immersed for 1 and 4 hours at 25 °C, respectively. After each reaction time, the resulting tube (ET-curc) was removed from container A to container B and extensively washed with DMSO (ca. 500 mL) to remove molecules of curcumin that weren't bound to the tube. After that, the ET-curc was washed with ethanol in container C (ca. 500 mL) (Figure S1 A-C respectively). The solvent samples, both used in the washing process, were analyzed through UV-Vis spectroscopy and the process followed until the complete disappearance of the absorption band at 421 nm (Abs_{max} of curcumin), considered criterium for removing all excess molecules. Finally, the tubes were dried and kept in the dark at room temperature.

Quantification of curcumin on ET-curc using UV-Vis

The direct quantification of curcumin bonded to the ET-curc was performed by UV-Vis analysis on a Hitachi U-2010 spectrophotometer with double-stranded quartz cells with 1 cm optical path using tetrahydrofuran (THF) as solvent. For each section of the ET-curc small pieces of the tube were cut, weighted (ca. 100 mg), dissolved in THF (10 mL) and the UV-Vis

spectra were collected. The stock solution was diluted as needed to assure compliance with Beer-Lambert law. The quantity of curcumin (mg) per gram of ET-curc was determined using the curcumin molar absorption coefficient ($59359 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ in THF), obtained through a calibration curve (Figure S2).

Fluorescence confocal microscopy

Inverted laser scanning confocal fluorescence microscopy (Zeiss – LSM780, Zeiss, Jena, Germany) was used to assess the curcumin distribution and penetration on the ET-curc surface. The emission is made by an Argon laser (Ar^+) emitting at 458 nm operating in continuous mode (cw) and the image acquisition interval was fixed through optical filters in the region of 470-700 nm. The samples analyzed were 1 cm long of ET-curc pieces. Three-dimensional images approximately 1 mm depth (on the Z axis) were obtained by 10 slices of 100 μm .

Microorganism Preparation

A pre-inoculum was prepared with *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925) and an isolated clinical MRSA. One mL of frozen bacteria was added to 15 mL of a Falcon with 9 mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth. The solution was kept in a shaker incubator at 150 rpm overnight at 37 °C. The bacterial solution was centrifuged, the supernatant was discarded, and the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.

6.2.3.3 Respiratory system

The respiratory system was built based on previously described work (74)(74) [13]. In brief, the system simulates the natural and forced transport of microorganisms from the oral cavity through the trachea and finally to the lungs. The model constructed (Figure 6.1A and 6.1B) consists of three parts representing the LGs, trachea, and oral cavity (ORO). Two peristaltic pumps below ORO box are used to introduce the bacterial inoculum to ORO, and a

second pump to maintain the liquid circulation in the system during the experiments. ET or ET-curc are introduced in the system through the ORO box, where the proximal end remained in the ORO box, and the distal edge was inside the trachea (simulated by a larger PVC tube), closer to the right lung (RL). From ORO box, microdroplets of a solution carrying microorganisms can migrate through this tube getting to be deposited in the ETs or migrate to the LG. Teflon connectors were customized and designed to be placed in each opening of the boxes from LGs and ORO boxes to connect silicone tubes in the boxes to the pumps. An Arduino system was programmed for controlling the frequency of the contaminated solution and maintaining the temperature of LGs kept by having an extra reservoir surrounding it. LGs were placed into a rectangular glass in a water bath, and the temperature was maintained at 37 °C, monitored by a sensor coupled to a temperature control system. The system was completely sealed to avoid external communication and exchange of contaminants. The three reservoirs (LGs and ORO boxes) have been sterilized with 70% alcohol and irradiated with an ultraviolet lamp placed inside the microbiology flow for 30 minutes. Silicone tubes and connectors were autoclaved before and after the experiments. Peristaltic pumps were cleaned with 70% alcohol circulating for 5 minutes. Excess alcohol was removed with autoclaved water circulating in the pumps. The whole system operates continuously as an independent mode. A mechanical ventilator (also homemade) promotes the forced airflow from ORO to LGs through the ETs.

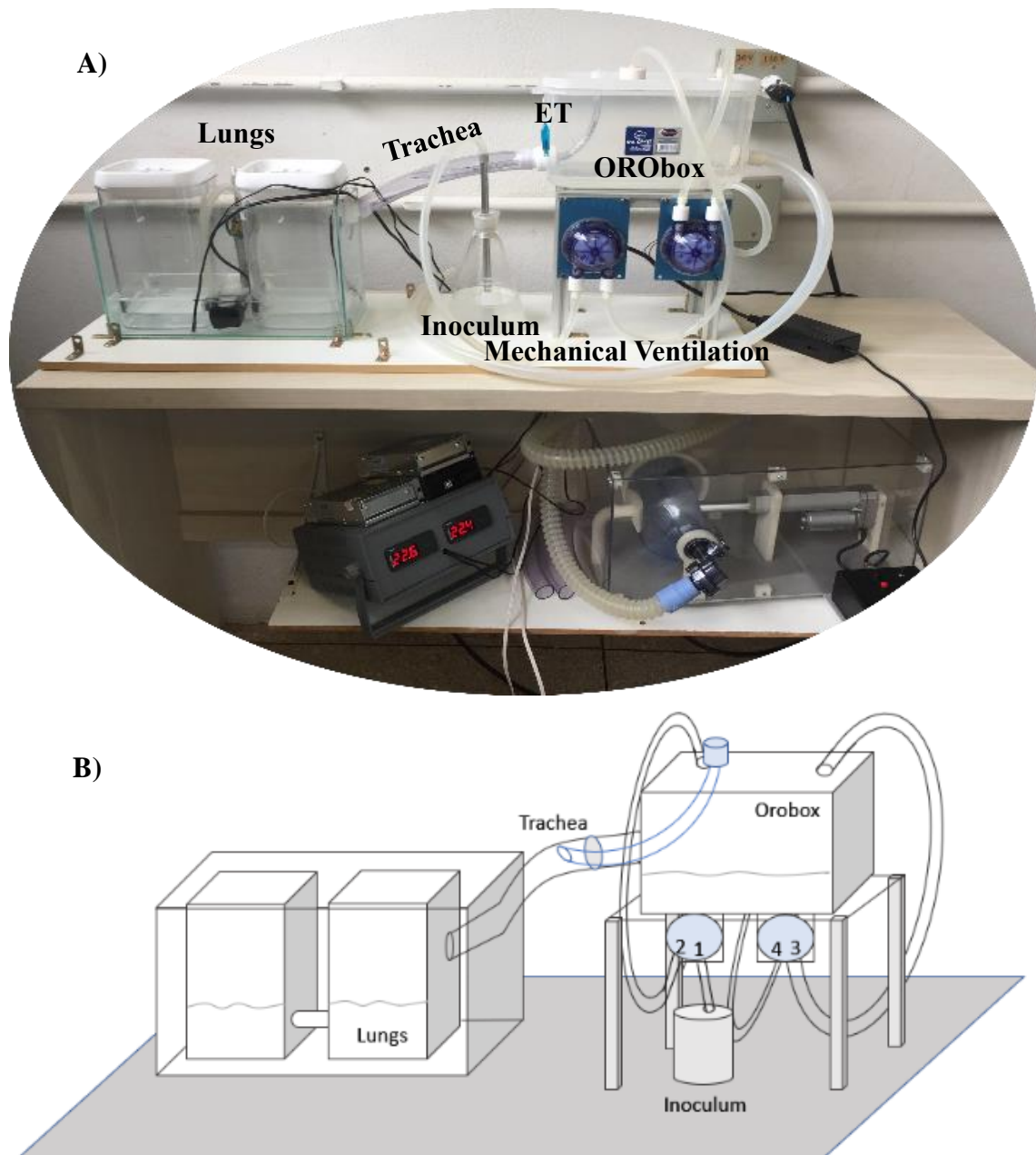


Figure 6.1 - A) Image of the circulating system describing components and their positions in the system; from left to right: LGs, temperature control, trachea, inoculum solution, ET, peristaltic pumps, Orobox and mechanical ventilator; B) A representative figure describing the system.

Source: By the author

Respiratory system contamination

In order to introduce microorganisms into the device, first system components were sterilized as described above. Then, ET or ET-cure were placed inside the PVC tube (Trachea) (Figure 1). The Oropharynx box (ORO box) was contaminated with a solution containing *S. aureus inoculum* in a concentration of 10^7 CFU/mL in 250 mL of PBS in a beaker (Inoculum).

The beaker with the inoculum was connected to a silicone tube in the first peristaltic pump (left). Each LG was filled with 300 mL of PBS, and the ORO box was filled with 200 mL of sterile PBS. After establishing the connections along the whole system, the pumps were activated by an Arduino system programmed to inject the inoculum solution for ten seconds every ten minutes directly to the Oro box. Therefore, within two hours, all the bacteria solution reached the ORO box. During all the procedures, the temperature was maintained at 37 °C in the LGs and the trachea. The temperature produced water vapor around the ET and reached the LGs. The periods tested for biofilm formation in the ET were: 1, 2, 3, and 7 days. Three samples were collected of each LG and the ORO box in each experimental day. Then, these samples were diluted and plated. At the end of each experiment, contaminated PBS from the LGs and ORO box was discarded, silicon tubes and connectors were removed and autoclaved, and ET/ET-cure were separated for dilution and plating. The peristaltic pumps were sterilized by circulating alcohol 70% for 10 minutes. The tubes were cut in 2 cm, and each piece was added to a 50 mL Falcon with 20 mL of PBS to remove biofilm cells developed on both surfaces, internally and externally by one minute stirring. Then, each group was diluted and plated for CFU/mL quantification.

Mechanical ventilation in the circulating system

A mechanical ventilator (MV) operates with a mechanized chamber built in our Support Laboratory. MV was coupled to a proximal edge system and simulated mechanical ventilation, such as in ICU. The studies using MV were performed to compare the effect of the free and mechanical ventilation applied in a contaminating system to analyze the difference in the infection dynamics in control ET and functionalized ET-cure applying PDT and the number of CFU/mL in the three reservoirs: ORO box and LGs.

Photodynamic inactivation in the respiratory system

The system was assembled, sterilized, maintained at 37 °C, ET-cure was added, inoculum with 1×10^7 CFU/ mL was pumped and the system started to circulate. The irradiation system was described in more detail in previous studies and is composed of a cylindrical and

diffuse optical fiber coupled to a laser with a 450 nm wavelength delivering up to 140 mW/cm² on ET's surfaces [12]. Therefore, the fiber was placed inside the tube. Each irradiation period was maintained for two hours. The tube received about 100 J/cm² illumination dose per cycle of illumination. The parameters studied in the photodynamic inactivation were the curcumin concentration and the number of light doses (1-4 doses). Each experimental group was performed in quadruplicate. The mean and standard error of each group were calculated for CFU/mL. Table 6.1 describes the time of each irradiation in the experiment varying the number of light doses. Each dose corresponds to a full delivery of 100 J/cm².

Table 6.1- Description of the time when each group was irradiated according to the number of light doses.

Number of light doses	2h	6h	18h	24h	Total delivered energy (J/cm ²)
1D				X	100
2D		X		X	200
3D		X	X	X	300
4D	X	X	X	X	400

Source: By the author

6.2.3.4 Statistical Analysis

Data were calculated as mean and SD (standard deviation among experiments). Two-group comparisons were performed by Student's t-test and One-way ANOVA followed by Tukey's test. Two-tailed p-values < 0.05 were considered statistically significant. Analyzes were performed using the Origin software[®] academic license granted by the University of São Paulo (USP). Principal Component Analysis (PCA) was performed using the free software GNU Octave[®] version 5.2.0.

6.2.4 Results and Discussion

6.2.4.1 Process optimization for preparation of the photoactive curcumin-endotracheal tube

Regarding the functionalization of ETs, we highlight that most endotracheal tubes used in the clinic are prepared from polyvinyl chloride (PVC). The presence of chlorine atoms in the ET structure allows for its functionalization through nucleophilic substitution reactions. We recently demonstrated that with this synthetic strategy enables covalent binding of curcumin

derivatives to the surface of ETs made of PVC [12]. However, before performing *in vivo* and clinical tests, studies on the scale-up of this process, optimization of functionalization and curcumin quantification on ET-curc surface are needed. This work addresses these issues.

Initial work on the preparation of a photoactive curcumin-endotracheal tubes employed high amounts of curcumin and base (4.9 mg/mL and 24.0 mg/mL of Cs_2CO_3 ; Table 2 entry 6) [12]. Here, we optimized the reaction parameters (curcumin, base concentrations and reaction time) for covalent curcumin binding to the ET surface (Figure 6.2) using milder reaction conditions. The results are presented in Table 6.2.

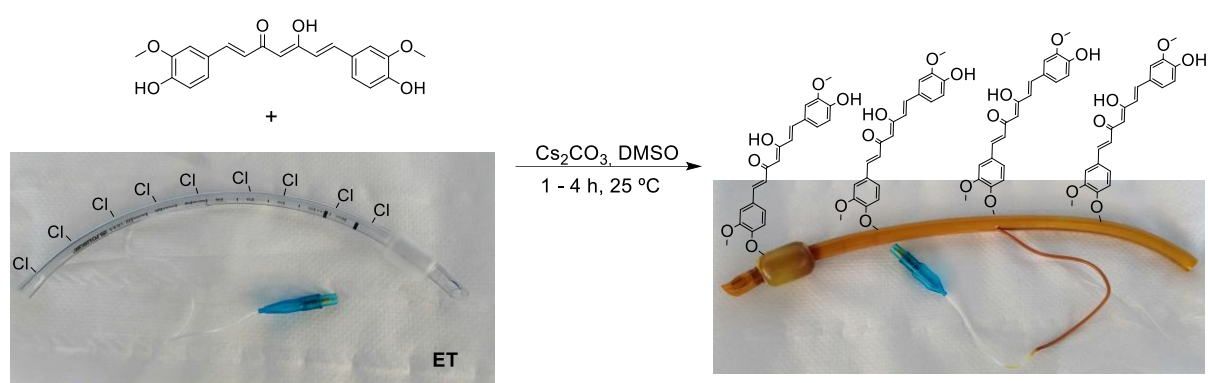


Figure 6.2 - Covalent linkage of curcumin photosensitizer onto PVC-based ET producing the ET-curc device. Source: By the author

First, two ET-curc were prepared using a curcumin concentration of 0.4 g/L and 3.1 g/L of Cs_2CO_3 , one with 1 hour reaction time and the other with 4 hours, ET-curc **1R** and **2R** respectively. After this process, the resulting ET-curcs were dried for 2 days in the dark at room temperature. The studies pursued with the development of a new direct quantification approach using ET-curc **1R**. First, small pieces from ET-curc **1R** upper section were cut and a solid-state UV-Vis spectrum was recorded and compared with the UV-Vis spectrum of the curcumin in a THF solution, Figure 6.3. The spectra clearly shows that covalent binding of curcumin does not compromise the chromophore because curcumin attached to ET-curc preserves its spectral properties. However, this methodology does not allow the quantitative determination of the curcumin due to signal saturation at higher curcumin concentrations and heterogeneity of the ET-curc solid sample.

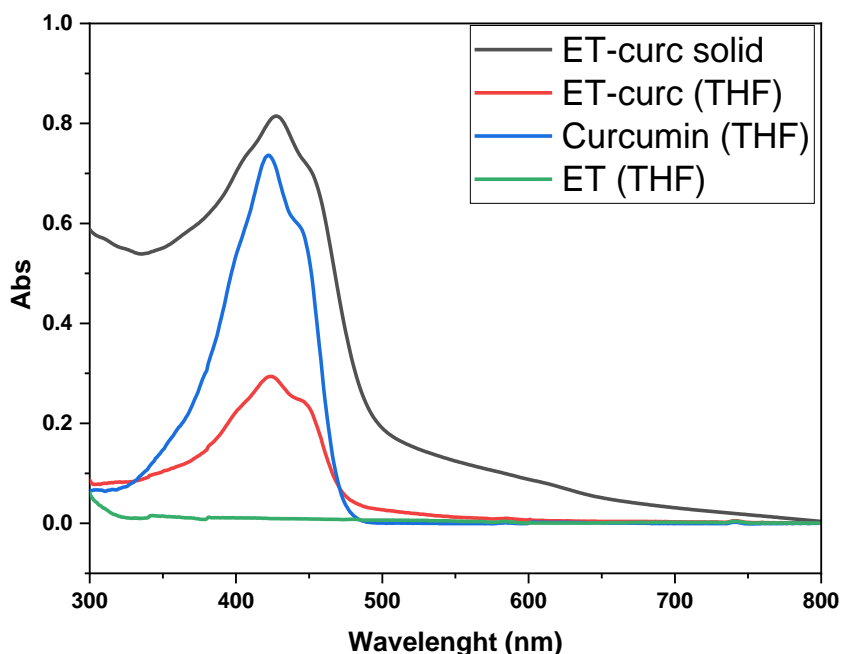


Figure 6.3 - Solid-state UV-Vis spectrum of ET-curc **1R** (black), UV-Vis spectrum of ET-curc **1R** solution (120 mg in 10 mL THF) (red), UV-Vis spectrum of curcumin in THF solution, [Curcumin] = 1.2×10^{-5} M (blue) and UV-Vis spectrum of a THF solution of non-functionalized ET (100 mg in 10 mL THF) (green).

Source: By the author

To overcome this limitation an alternative methodology for curcumin quantification on ET-curc was developed. Small pieces taken from the same ET-curc section (top) were cut, weighted, and dissolved in THF (10 mL). As selected example, the UV-Vis spectrum of ET-curc **1R** was recorded and is presented in Figure 6.3, red line. The quantitative curcumin determination of ET-curc functionalized under different reaction conditions was carried out using a curcumin calibration curve in THF (Figure S2) and the results are presented in Table 6.2.

From this quantification procedure, 0.05 and 0.14 mg of curcumin/g of ET-curc were obtained for 1- and 4-hours reaction time (Table 6.2, ET-curc **1R** and **2R**, respectively). These results indicated that the amount of curcumin bound to ET is critically dependent on the reaction time and consequently the following experiments were carried out over four hours. Then, aiming to find the milder reaction conditions for pilot scale industrial ET functionalization the effect of curcumin (2.5 and 3.1 g/L) and Cs_2CO_3 (0.8 and 3.1 g/L) concentrations was evaluated and tubes **3R**, **4R** and **5R** were prepared. Under these conditions, no significant differences of the amount of immobilized curcumin were obtained (0.22 – 0.25 mg/g). Therefore, we selected the combination of 2.5 g/L of curcumin with 0.8 g/L of Cs_2CO_3 , as the ideal conditions for preparation of the tubes ET-curc **5R** used in the following experiments.

Table 6.2 - Reaction conditions used in the curcumin immobilization process and the final amount of incorporated curcumin in the ET-cure. ^{a)}

<i>ET-cure</i>	Curcumin [g/L]	Cs ₂ CO ₃ [g/L]	Time (h)	[Cure] on ET- cure mg/g
1R	0.4	3.1	1	0.05
2R	0.4	3.1	4	0.14
3R	2.5	3.1	4	0.25
4R	3.1	0.8	4	0.23
5R	2.5	0.8	4	0.22
6 <i>Conditions from [12]</i>	4.9	24.0	4	0.70

^{a)}DMSO solutions, 25 °C.

Source: By the author

It is known that under clinical practice, long-term intubated patients can develop infections resulting from microorganisms that grow in the inner and outer endotracheal tube surfaces, being the cuff area one of the most critical regions (Figure 6.4 detail C).

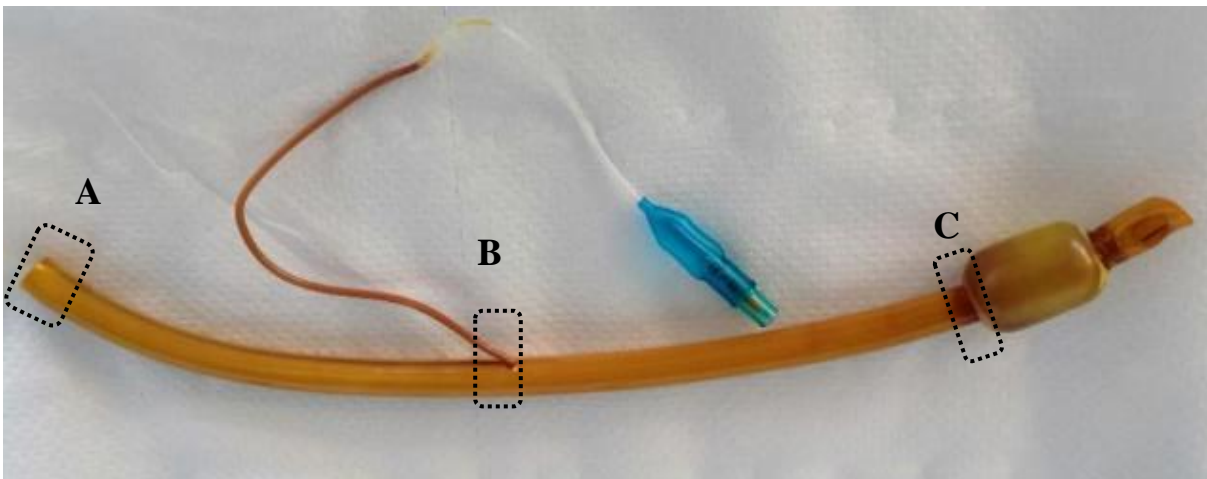


Figure 6.4 - Selected regions (A, B, C) of ET-cure 5R prepared according to the procedure described in Table 2.
Source: By the author

Thus, to evaluate the curcumin homogeneity distribution over the ET-cure **5R**, cross-sectional quantification of curcumin in three longitudinal parts (A, B and C) was carried out and the results are presented in Table 6.3. The values obtained for curcumin immobilized in

each section are approximately the same (*ca.* 0.27 mg/g) which indicates a homogeneous curcumin distribution.

Table 6.3 - Quantification of incorporated curcumin in different ET-curc positions as described in Figure 4.^{a)}

Curcumin	A	B	C
[C]^amg/g	0.30 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.03

a) Quantification by UV-Vis using a transversal section of ET-curc 5R areas. A; B and C.

Source: By the author

Another relevant issue for ET-curc characterization is the quantification of curcumin in the inner and outer tube surfaces. The quantitative curcumin distribution over the outer and inner ET-curc **5R** surfaces was also determined and a mean value of 3.40×10^{-4} mg/mm² of curcumin was obtained for the external surface of the tube (see details in SI, Figure S3). Additionally, the thermal stability of ET-curc **5R** was assessed by thermogravimetric analysis (TG) and no significant differences from the pristine ET were observed. This analysis points out that, under the selected reaction conditions, the immobilization of curcumin onto ET does not affect its thermal stability indicating maintenance of the physical proprieties (Figure S4).

6.2.4.2 Characterization of the respiratory system with ET.

The kinetics of *S. aureus* cell adhesion and biofilm formation on ET surface were initially evaluated at four periods: 1, 2, 3, and 7 days. The tests were performed under the same atmospheric conditions, temperature (37 °C), and frequency of liquid circulation. The microorganisms present in the tube were quantified along the tube position and are presented in Figure 5. Each linear position in each 2 centimeters quantified the number of CFU/mL from the beginning (distal extremity) to the proximal part is represented in Figures 6.5A and B.

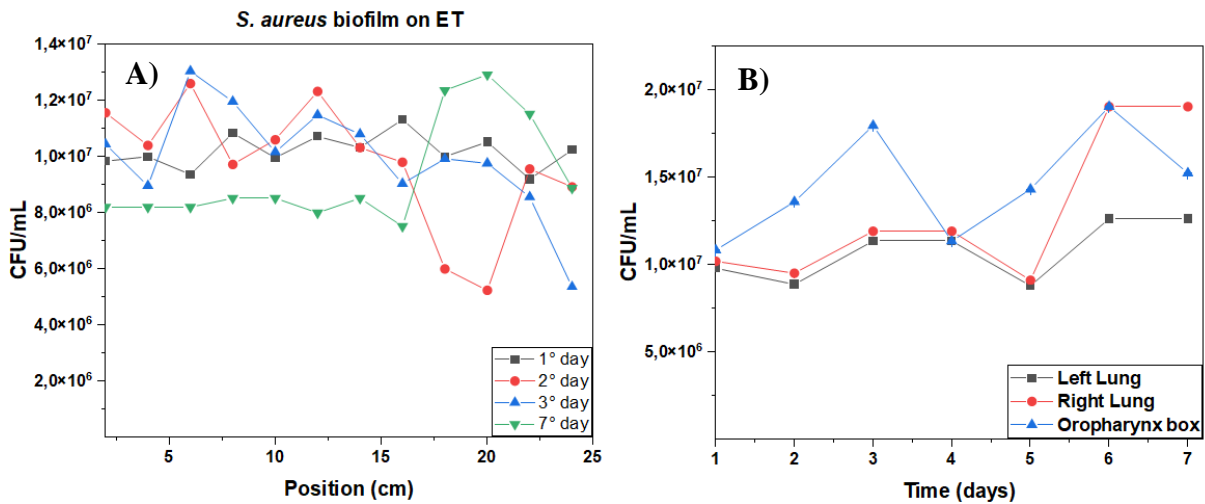


Figure 6.5 - A) Results of *S. aureus* biofilm development along the surface of the ET measured in linear position in the circulating system with four periods tested: one day (black square line), two days (red circle lines), three days (blue triangle line) and seven days (green triangle line); B) Results of CFU/mL quantification in LGs and ORO box at first, second, third and seventh days of circulation system. * Statistical difference between the groups according to the Tukey ANOVA test one-way with p-value < 0.05. (0 days imply the starting point with zero CFU, this point is not shown on the plot).

Source: By the author

The results showed (even though not statistical different) a *S. aureus* cells migration from the upper respiratory system (ORO box) to the distal end of the ET, located in the trachea in the end of the seven days. In 24 h, the bacterial cells reached both LGs and ET's surface, presenting a more homogeneous adhesion of the bacterial cells along the tube compared to the other periods longer tested. Therefore, according to an increase in circulation time, the biofilm developed was more heterogeneous and irregular along the tube, resulting in more adhesion in the proximal part, the one closest to the Orobox. Despite the biofilm heterogeneity, statistical analyses (ANOVA and PCA, supplementary material – Figure S5) have not revealed a statistical difference between both extremities and among the same positions on different training days tested. Equally, the contamination of ORO and LG have been followed throughout seven days of operation as presented in Figure 5B. The system ability to transport infection through the ET is proved by the obtained results (Fig. 5) and the variations observed along the ET are a demonstration of a uniform contamination in fewer days. Nevertheless, in the group circulated for seven days, positions from 16 to 20 cm, positions closer to ORO box, revealed a tendency to increase bacterial load. This is in agreement with observations in the literature showing a more efficient adhesion of bacterial cells in the proximal part of the tube [14]. Analyzing the results, the proximal extremity showed a more significant variability when compared to the distal part. The increment in biofilm cells at the proximal end can be due to the proximity to ORO box, where the contaminant solution circulated throughout the experiment,

as microorganisms enter there. The variability in this part of ET was expected, as the mouth is easily accessible for the microorganism to enter, and there are already many commensal strains on it. Comparing both parts, the lower (lungs) and the upper (ORO box), the ORO box seems to always have slightly higher values of contaminants, but in the same order of colonies concentration as in the lungs. According to the capacity of natural transport of bacteria using the system, the next step of the experiments was to evaluate photodynamic inactivation.

6.2.4.3 Photodynamic inactivation for illuminated ET-curc coupled to the system.

In order to optimize the parameters to obtain an effective photodynamic disinfection in the respiratory system, the tubes tested were prepared according to the conditions described in Table 2: 4R (0.8 g/L Ce_2CO_3 and 3.1 g/L curcumin) and 5R (0.8 g/L Ce_2CO_3 and 2.5 g/L curcumin). The functionalized ET-curc was placed in the tracheal position and several light doses were tested. In the first set of experiments, the mechanical ventilator was off. Figure 6A and B display the results for the measured colonization quantity along the tube position and in Oro box and Lungs applying one light dose of 100 J/cm². Figure 6.6C and D described results from the illumination of ET-curc 5R with four light doses quantifying the bacterial cells present in the tube, Oro box and Lungs. The detected concentration of microorganisms on the artificial trachea and device parts was also assessed over the course of seven days, applying four light doses with the cylinder fiber placed inside to ET-curc (Fig. 6.6E and F).

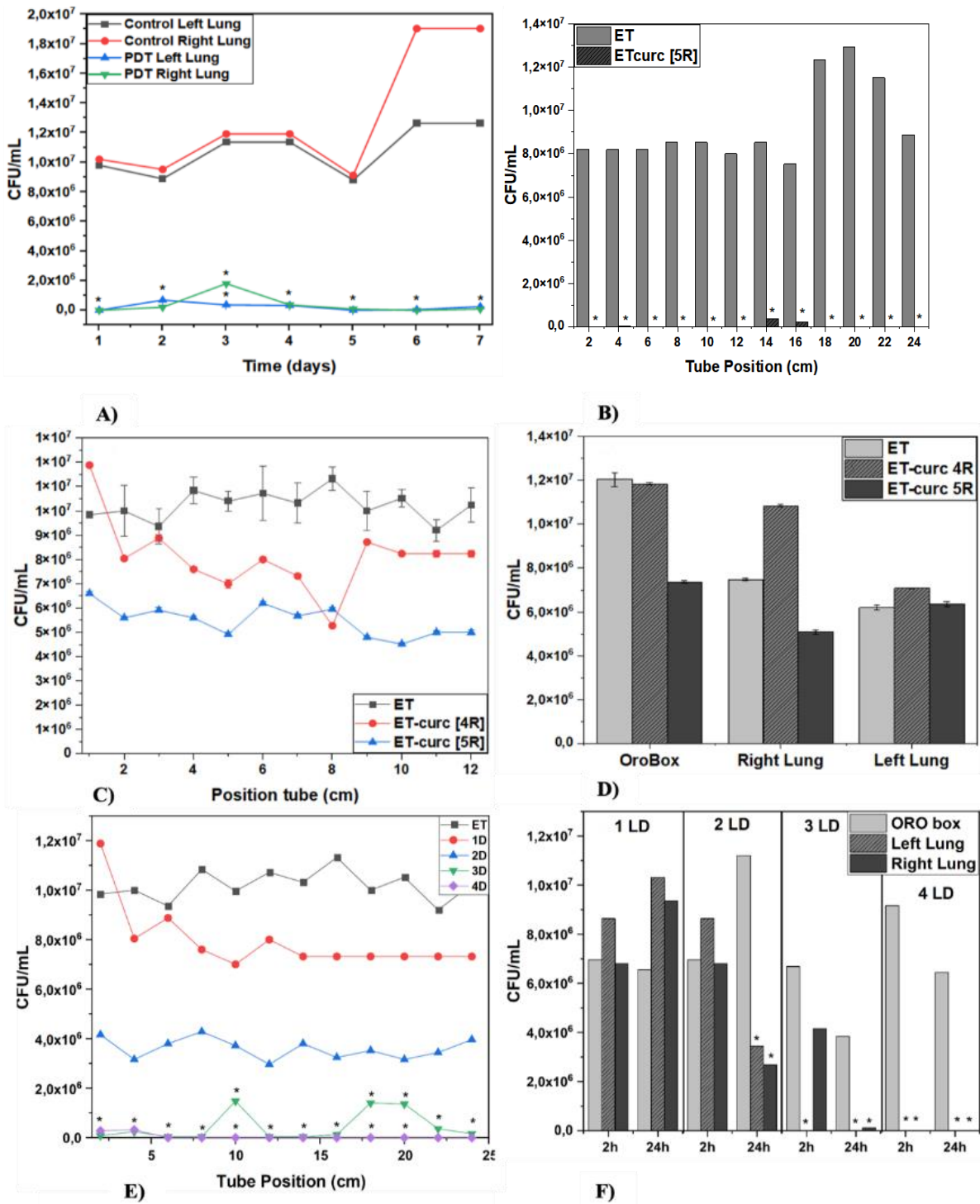


Figure 6.6 - A) Photodynamic disinfection of biofilms developed for 24h in different functionalized tubes 4R and 5R and compared to control (ET) using only one light dose of 100 J/cm². B) Number of *S. aureus* cells from LGs and Oro box: control, ET-curc 4R and 5R; C and D) Photodynamic disinfection of biofilms developed with 24 h exposure of ET-curc 5R for different light doses. C) 1D – one light dose, 2D – two light doses, 3D – three-light doses and 4D – four-light doses. D) *S. aureus* biofilm developed in the control groups (ET- light gray bar) and photo disinfection groups after 24 hours; each light dose corresponded to 100 J/cm²; bacterial cells were counted along each tube. E) Optimized results of 7 days of inhibition of PS-ET biofilm irradiated four times a day with 100 J/cm² compared to the biofilm formed by seven days on the ET-curc surface; F) Number of bacterial cells in the LGs and ORO box in the experiment with four dose lights per day (100 J/cm² each) during seven days of the circulation system. *Statistical difference between groups according to one-way ANOVA, Tukey's test (p<0.05).

Source: By the author

ET-curc applying **4R** condition showed more heterogeneous inactivation along the tube than **5R** concentration, with less significant biofilm inhibition. Figure 6.6C and D confirmed the direct relationship between the number of light doses and inactivation action along the tube. A more effective the photodynamic inactivation of *S. aureus* is achieved when the light dose increases. One light dose decreased 0.2 logs of CFU/mL of a 24 h-biofilm, and two light doses decreased 0.5 log CFU/mL of 2 and 24 hours of biofilm formation. Three light doses increased biofilm inactivation by almost 2 logs of CFU/mL, and four light doses delivered in 24 hours achieved a 7 logs of CFU/mL decrease along all tube. Equivalently, Figure 6D shows the decrease in contamination of the left and right lungs occurred while the contaminations of the ORO box was kept at a high level. Applying 3 or 4 doses of daily illumination resulted in no contamination of the lungs. The prevention of the contamination through the endotracheal tube to the lungs was achieved. This is an important result and a proof of principle that our method for photodynamic inactivation of bacteria can prevent infections from lower respiratory tract during endotracheal intubation. According to these results, four light doses per day, each of 100 J/cm² were chosen to analyze the kinetics and dynamics of the system with the circulation of bacteria for seven days.

Figures 6E and F describe the results for a seven-day period of experiments with 4 illuminations per day using a curcumin-functionalized tube ET-curc **5R**. Comparing the dark experiments (control) with the illuminated ones, the difference is quite remarkable. The complete blockage of infection transmission is observed and maintained over time without deactivation of the ET-curc. Although few colonies were found in the LGs (second and third day), they have not been statistically relevant according to the ANOVA test. ET-curc irradiated four times a day inactivated bacterial biofilms and prevented the colonization of the surface of the tube. The illumination of ET-curc tubes may stop bacteria to spread from ET to the lungs of patients and prevent the development of VAP.

6.2.4.4 Mechanical ventilation coupled to the ET-device.

The results above considered the transport of infection promoted by the natural movement of aerosols and droplets present in the system at 37 °C. To demonstrate the performance of our system under conditions closer to real conditions, where mechanical ventilation promotes a forced motion, a new experiment including mechanical ventilation (MV)

from a homemade system (see Figure 1) and ET-curc 5R was performed. The results obtained with forced air motion conditions are presented in Figures 6.7A and B.

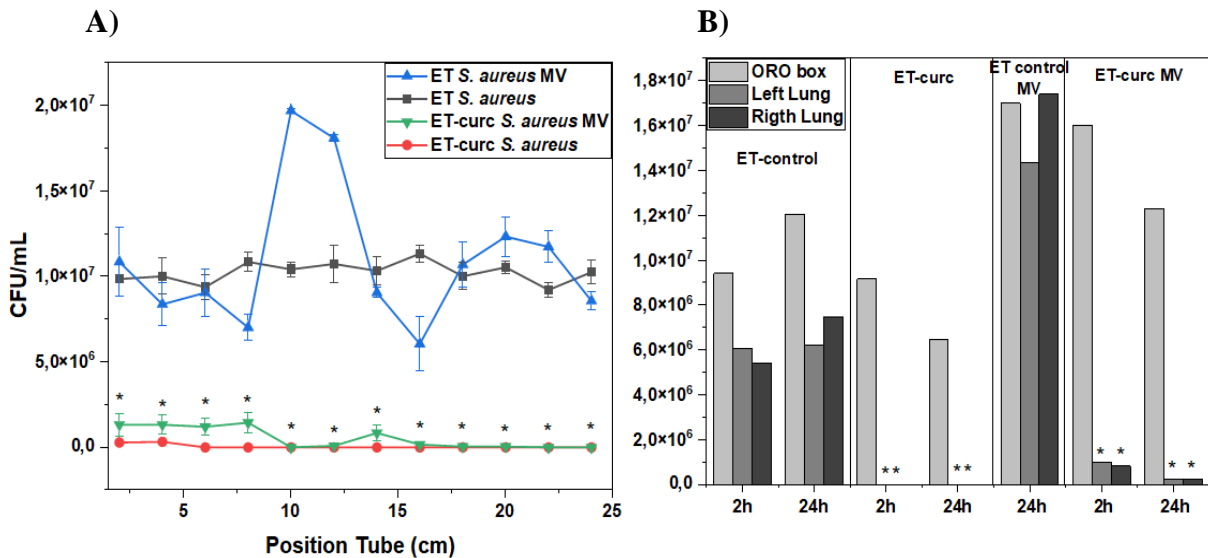


Figure 6.7 - A) CFU/mL of biofilm developed along ET and ET-curc 5R when the system was coupled with MV and *S. aureus*. The control groups were: ET MV (blue triangle line), and ET (black square line); photodynamic inactivation groups: ET-curc MV (green triangle line) and ET-curc (red circle line). B) *S. aureus* CFU/mL in the ORO box (light gray bar), in the Left Lung (medium gray bar) and Right Lung (dark gray bar) in ET and ET MV (controls) and ET-curc and ET-curc-MV (photodynamic inactivation). * Statistical difference between groups according to the ANOVA one test way Tukey ($p < 0.05$).

Source: By the author

These results and the previous ones with natural transport, revealed similarities between the two controls and the two photodynamic inactivation groups, with and without MV. All photodynamic inactivation groups are statistically different from their controls, demonstrating an effective inactivation of the biofilm, even at the highest contamination at the lowest exposure time with the use of the mechanical ventilator. The results indicated a change in the dynamics of biofilm development along the ET when the ventilator was coupled to the system. When the ventilator was not operating, the biofilm developed homogenously along the tube, whereas with MV it shows an increase in the central region. A cuff at the distal end can also contribute to the increase of adherent cells in this part of the tube. To understand the treatment dynamics, a 24-hour kinetic experiment was performed with and without the ventilator in PI groups. Both groups were irradiated four times (100 J/cm² each time) with the fiber placed inside the ET-curc. Analyzing the results of Figure 6.7B, there was more variance in the number of *S. aureus* cells in ORO box, probably due to the circulation of contaminated liquid over time. Both LGs have a similar behavior with or without MV. In addition to the reported results, equivalent experiments were carried out using MRSA. The prevention of

contamination with ET-cure and illumination was similar to that of non-resistant bacteria. Such findings imply that bacterial-resistant species are not an obstacle to our approach to photodynamic disinfection.

6.2.5 Partial Conclusion

Our work using an artificial trachea model shows that photodynamic inactivation associated with curcumin-functionalized ET (ET-cure) can minimize the problem of biofilm formation and lung contamination in patients submitted to mechanically ventilated respiratory support. The functionalization of PVC tubes with curcumin was optimized to work under mild conditions, with much lower concentrations of base, and offer a homogenous functionalization. The reduction of bacterial load most successful conjugating curcumin functionalized ET with sequential delivery of light doses. These results demonstrate the potential of this technique to real-world ventilation-associated pneumonia prevention. The optimization of the photo disinfection conditions in a respiratory system model, such as done here, paves the way to evaluate our approach in intubated animals and minimizes the use of animals in such experiments. Preliminary investigations with animals are already in progress.

Este capítulo foi submetido a revista Intensive Care medicine. As referências estão descritas no anexo 2.

7 – EXPERIMENTOS *IN VIVO*

De acordo com a permissão cedida pelo Comitê de ética do hospital universitário da UNESP, campus Jaboticabal, sob título “Estudo *in vivo* de segurança e eficácia de materiais poliméricos funcionalizado com curcumina”, protocolo nº 2896/21, sob a responsabilidade do prof Andriago Barboza de Nardi. Neste último capítulo serão descritos os estudos *in vivo* realizados em modelo de suínos aplicando os melhores parâmetros otimizados pelos experimentos no sistema de simulação respiratório. Os estudos foram realizados por 24h em animais intubados com TE e Tec e monitorados. Os tubos controle e teste foram retirados dos animais e analisados em relação a formação de biofilme formado, os tecidos da traqueia, mucosa oral, pulmão e brônquio foram retirados para análises histológicas.

7.1 Objetivos do capítulo:

Geral:

- Avaliar segurança da aplicação do TEC com a terapia fotodinâmica em modelos *in vivo*.

Específicos:

- Intubação por 24h com TE;
- Aplicação da TFD;
- Análise dos tecidos biológicos;
- Coleta de amostras nos tecidos;
- Isolamento bacteriano no tubo;

7.2 Resumo

A Pneumonia Associada a Ventilação mecânica (PAV) é uma infecção grave que pode ocorrer quando o tubo é instalado em pacientes que sofreram algum tipo de trauma, pós-cirúrgico ou apresentam dificuldades para respirar. A intubação de um paciente é realizada com a introdução do Tubo Endotraqueal (TE) através da boca e posicionado na traqueia, permanecendo no paciente até 7 dias. Esta infecção é causada pelo desenvolvimento de biofilmes microbianos na superfície do tubo. A espécie *Staphylococcus aureus* é a principal espécie gram positiva causadora neste tipo de infecção, podendo se manifestar entre 48 a 72h após a introdução do TE no paciente. Entretanto, existem outras espécies que podem estar também presentes nestes biofilmes, como as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. O TE foi funcionalizado através de uma reação de funcionalização entre o fotossensibilizador (FS), a curcumina, e as moléculas de PVC presentes no tubo. A partir do material funcionalizado com curcumina, associado a uma fonte de luz, a inativação fotodinâmica foi avaliada e testada na presença do oxigênio celular. A curcumina é um derivado natural, extraída do rizoma da planta *Curcuma longa*. A molécula apresenta propriedades físico-químicas como ação antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana. Além disso, a curcumina é aprovada pela agência federal dos Estados Unidos, Food Drug Administration (FDA), por não apresentar toxicidade em células de mamíferos. A fonte de luz é composta por um laser acoplado a uma fibra óptica cilíndrica difusora emitindo em 450 nm. O TE funcionalizado foi caracterizado e realizados os ensaios *in vitro* para avaliação da eficácia da ação fotodinâmica em biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *MRSA*, com resultados de reduções microbianas de 99%, 76%, 98% e 97%. Testes toxicológicos foram realizados em células de mamíferos (Human dermal fibroblats neonatal), com resultados mostrando uma segurança do uso do tubo quando em contato com células do tipo HDFn. A próxima etapa do estudo é avaliar a segurança e eficácia do TE funcionalizado *in vivo*. A proposta é realizar estudo em animais de grande porte devido ao tamanho do tubo em relação ao comprimento e diâmetro do material. Neste projeto iremos realizar estudo com 4 porcos em cada grupo do estudo para avaliar a interação e o tempo de permanência de contato do tubo com a traqueia do animal.

7.3 Material e Métodos

7.3.1 Preparação e/ou obtenção do TE funcionalizado.

Os tubos foram funcionalizados com curcumina (PDTpharma®) através de uma reação de funcionalização no TE realizada durante 4h a 30°C sob agitação. Após a reação, o tubo foi lavado a primeira vez com dimetil-sulfóxido (DMSO) e na segunda vez com álcool etílico. O material pós reação foi seco e armazenado a temperatura ambiente e na ausência de luz.

7.3.2 Fonte de Luz

Uma fonte de luz composta por uma fibra cilíndrica difusora com comprimento de 2 cm acoplada a um laser de 450 nm, com irradiância de 140 mW/cm foi construída pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT). A fonte caracterizada e testada em experimentos *in vitro* em pedaços de 1 e de 20 cm do TE funcionalizado.

7.3.3 Modelo animal

O modelo animal escolhido foi o suíno, sendo que os animais tinham aproximadamente de 70 a 80 dias com até 25 kg provenientes da granja. para avaliar a segurança da utilização do tubo funcionalizado e da fonte de luz no animal. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em um alojamento separado em baias, localizado no Hospital Universitário na UNESP campus Jaboticabal. Cerca de dois animais ficaram alojados em cada baia forrada com maravalha, água filtrada e ração comercial específica para suínos, ambos *ad libitum*.

7.3.3.1 Anestesia

Os animais foram mantidos em jejum de 12h sólido e 3h líquido. Para que o procedimento para a medicação pré anestésica (MPA) fosse realizado, a contenção do animal foi realizada e, em seguida foram administrados 7 mg/kg de cetamina; 0,3 mg/kg midazolan e 0,05 mg/kg acepronazina. Após 10 minutos, o animal foi deslocado ao centro de cirurgia para imobilização. A indução foi realizada com propofol dose efeito. No centro cirúrgico os

seguintes fármacos foram administrados: 1 mg/kg de lidocaína; 2 mg/kg cetamina e propofol dose efeito (2mL). Logo após 7h foi administrado 1,2 midazolam (0,3 mg/kg).

A manutenção do animal foi realizada seguindo o seguinte protocolo:

- Isoflurano (administrado através do aparelho de anestesia inalatória SAT 500 (marca Takaoka), utilizando a concentração mínima (CAM) para que o animal permanecesse 50% anestesiado;
- Fentanil (1-2ug/h) administrado através da bomba de infusão;
- Oxigênio e ar comprimido (60:40).

Os suínos foram mantidos na ventilação controlada por pressão. O monitoramento da oxigenação, frequência cardíaca, ETCO₂, frequência arterial média, pulso e SPO₂ foram realizados durante 24h, enquanto o animal permaneceu anestesiado e intubado.

7.3.3.2 Intubação Orotraqueal

Tabela 7.1 descreve os grupos realizados utilizando o protocolo de segurança e a quantidade de animais em cada grupo.

Tabela 7.1 - Grupos de estudo e descrição dos protocolos envolvidos nos animais (n=3).

Grupos experimentais	Protocolo de segurança	Número de Porcos
Controle	Animais intubados com TE.	4
Teste Luz	Animais intubados com TE funcionalizado e iluminados com fibra difusora.	4
	TOTAL	8

Fonte: Elaborada pela autora.

7.3.3.3 Avaliação dos resultados de segurança

O tecido da traqueia foi avaliado através de imagens por endoscopia no local onde o tubo foi inserido. A avaliação dos pulmões, brônquios, mucosa oral e traqueia foram realizadas através da análise de lâminas histológicas. Os tecidos da traqueia, mucosa, pulmão e brônquios foram retirados e armazenados em formol a temperatura ambiente. Os tecidos foram corados

com hematoxilina e eosina. Além disso, manifestação de febre, alteração da quantidade e da coloração de secreções na traqueia foram consideradas durante o acompanhamento clínico dos animais saudáveis pós extubação que permaneceram vivos por 4 dias.

7.3.3.4 Avaliação do TE e TE funcionalizado

O TE funcionalizado e não funcionalizado (grupo controle) foram retirados do animal, coletas imagens e realizada a presença de possíveis micro-organismos aderidos aos tubos por meio do processo de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os tubos foram armazenadas a -4°C até o momento da remoção do biofilme do tubo. Dentro do fluxo laminar (Escoscream®), os tubos foram cortados em pedaços de 2cm, adicionados em falcon com 20 mL de PBS. Cada tubo falcon foi agitado por um minuto para retirada do biofilme da superfície do tubo para quantificação das células bacterianas. Em seguida foram realizadas diluições em série e plaqueamento de cada pedaço do tubo para cada grupo de experimento. As placas foram incubadas em estufa à 37°C durante 24h. A média de cada grupo foi calculada através da equação (1) para o cálculo de UFC/mL:

$$\frac{ufc}{mL} = \frac{n^{\circ}decolônias \times n^{\circ}dediluições}{Volume} \quad (01)$$

7.3.3.5 Inativação Fotodinâmica

Após 2h da intubação do animal, a fonte de luz composta pela fibra cilíndrica difusora foi introduzida dentro do tubo instalado no animal durante 2h na inativação fotodinâmica no suíno. Quatro doses de luz foram irradiadas, cada uma gerada por 2h ao longo de todo o tubo, totalizando $100\text{J}/\text{cm}^2$ por dose, logo, $400\text{J}/\text{cm}^2$ totais no fim do procedimento (a cada 24h). O protocolo foi mantido a partir dos experimentos realizados no modelo do sistema respiratório (cap. 04). O monitoramento da temperatura corporal, pressão, glicose, quantidade de CO_2 e O_2 foram realizadas durante todo o tempo de incubação do animal.

Isolamento de colônias dos tecidos biológicos

Coleta de cultura bacteriana para quantificação e colônias na mucosa oral, traqueia, pulmão e brônquios foram realizadas em 8, 16 e 24h de intubação do animal através da passagem de um swab. Os swabs foram armazenadas em 10 mL de PBS estéril a -4°C até a sua diluição e plaqueamento para encontrar a UFC/mL. Pedacos da mucosa oral, a traqueia, os pulmões e bronquios do animal foram retirados para análises por microscopia óptica e análises histológicas para verificação do tecido do animal no local onde o tubo se manteve em contato em relação ao animal intubado apenas com o TE sem curcumina e sem irradiação.

Isolamento das colonias bacterianas TE e TEc

Além disso, foram realizadas isolamento das colonias de cada parte do tubo afim de identificar as espécies que foram inativadas no tubo teste. A coloração de gram foi o método utilizado para primeira identificação bacteriana e análise por microscopia óptica para idetinficar a morfologia das células. Portanto, as colonias retiradas do tubo controle e as retiradas pós tratamento dos tubos testes foram espalhadas em lâminas de vidro e deixadas secar. Em seguida foi adicionada cristal violeta e esperado 1 minuto para lavagem com água. Em seguida, o lugol foi adicionado e esperado 1 minuto para fixação do corante. A lavagem do lugol foi realizada com álcool 95% e esperado 30 segundos, seguida por uma lavagem com água e adicionado o corante fucsina por 30 segundos e por último realizada uma lavagem com água.

7.3.3.6 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por overdose anestésico utilizando fentanil+tiopental. Logo que o animal perdeu as funções respiratórias e cardiovasculares foi aplicado cloreto de potássio. A carcaça do animal foi retirada por uma empresa terceirizada chamada Prevenção.

7.3.4 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados pelo teste para verificação na normalidade. De acordo com a estatística não paramétrica, o teste de kruskal wallis foi escolhido para realização dos gráficos em box-plot. Para a estatística paramétrica com dados normais, a estatística paramétrica foi utilizada com aplicação do Teste Tukey pelo Anova com p valor < 0,05.

7.4 Resultados

7.4.1 Avaliação do TE e TE funcionalizado

Os animais foram mantidos por 24h sob intubação traqueal e através das medidas de monitoramento as saturação dos gases respiratórios, pressão arterial, temperatura e glicose foram mantidos sob valores estáveis. Após 24h dos animais intubados, os tubos controle e TFD foram retirados para recuperação das colonias bacterianas. O gráfico na Figura 7.1 descreve os resultados de UFC/mL dos tubos em diferentes posições senfo que 1 é a região próxima a boca.

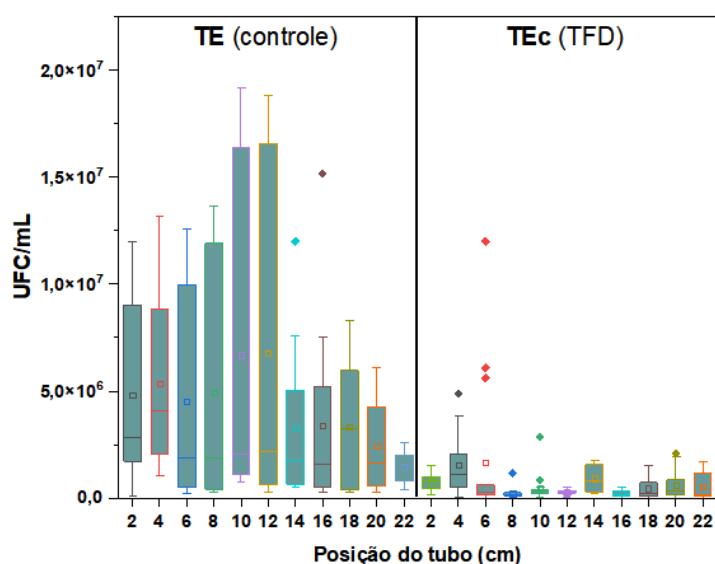


Figura 7.1 - UFC/mL recuperadas de cada cm das superfícies dos TE e TEcs intubados nos animais por 24h. iluminação no TEcs realizada pela fibra difusora com 4 doses de luz em 24h, cada dose gerando 100J/cm². Gráfico por box-plot realizado por estatística não paramétrica pelo software OriginLab®. Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os resultados descritos, foi possível reproduzir os resultados obtidos *in vitro*, isto é, a inativação fotodinâmica agindo como uma barreira no desenvolvimento do

biofilme. Como já discutido, a curcumina mais a associação a fonte de luz azul são capazes de interromper a anexação de células bacterianas e o desenvolvimento do biofilme, e se caso mesmas se anexam, a inativação é eficaz para redução microbiana, como revelado no gráfico acima, onde existe uma IF significativa e ativa.

Para complementar melhor os resultados *in vivo*, foram realizadas coletas de 8, 16 e 24h na mucosa oral (Boca), na parte interna do tubo (TI), na traqueia (TR), nos brônquios (BR) e nos pulmões (PU) após 24h. A figura 7.2 descreve os resultados das coletas realizadas ao longo das 24h.

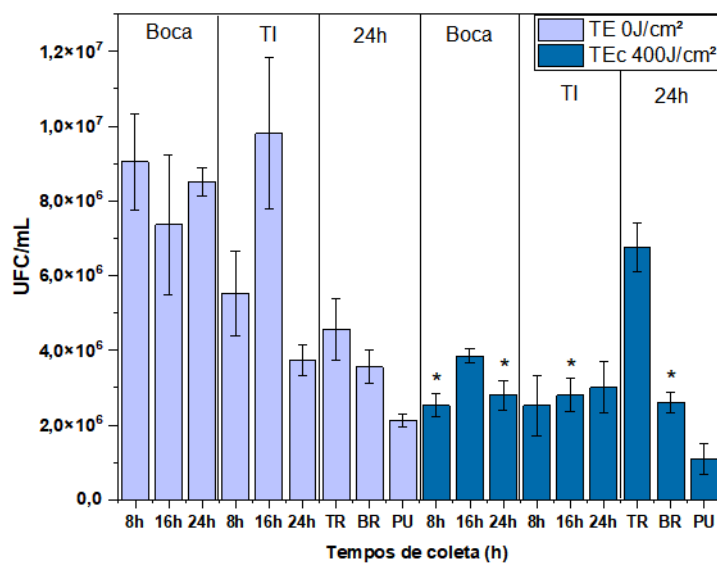


Figura 7.2 - UFC/mL da musoca oral (boca), na superfície interna do tubo (TI) em 8, 16 e 24h e na traqueia (TR), brônquios (BR) e pulmão (PU) em 24h dos grupos controle (TE) e grupos testados (TEc). Iluminação realizada pela fibra difusora com 4 doses por 24h, cada dose com 100J/cm². *Diferença estatística entre grupos TEc com seus respectivos controle de acordo com Teste Tukey one way com p valor < 0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados das coletas ao longo do tempo revelam uma significativa menor colonização bacteriana nos animais intubados com o TEc e irradiados. Os suínos já possuem uma colonização natural principalmente por *Streptococcus suis* (76). Os dados acima reveram que os animais intubados com TEc tiveram uma colonização menor que os animais intubados com TE. A única diferença foi uma colonização similar em ambos os grupos no tecido traqueal após 24h. a curcumina naturalmente age como agente bactericida, atuando na diminuição da anexação bacteriana. Com a associação da TFD, maior a redução bacteriana, como esperado por produzir espécies tóxicas as colonias. Logo, pode ser dizer que a IF age como barreira

biofotônica não apenas no TEc, porém também em tecidos próximos ao tubo que podem se beneficiar dos efeitos bactericidas da terapia.

Foram realizadas isolamento das colônias de cada cm dos grupos controle e TEc e a partir das imagens por microscopia óptica e revisando a literatura, as colônias gram-positivas isoladas nas amostras TE. A tabela abaixo 7,2 sugere os gêneros bacterianos de acordo com a literatura e pela comparação com as imagens reportadas.

Tabela 7.2 - Sugestão dos gêneros bacterianos isolados de cada grupo controle e TFD. Grupos TFD foram isolados após tratamento.

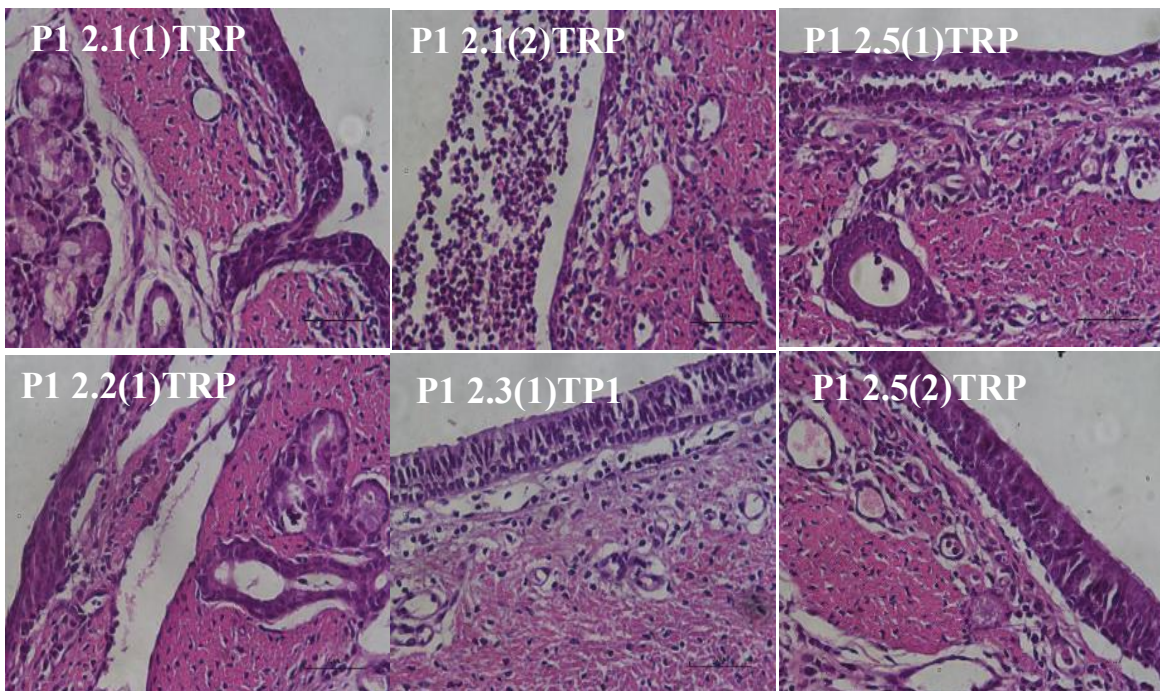
Grupos	1	1	2	2
TE1-2 1 e 2	<i>Streptococcus</i> ou <i>Rothia</i>	<i>Streptococcus</i> ou <i>Rothia</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i> e <i>Rothia</i>
TEc1-2 1 e 2	<i>Moraxella</i> e <i>Rothia</i>		<i>Moraxella</i>	
TE3-4 1 e 2	<i>Actinobacilus</i>	<i>Actinobacilus</i>	<i>Actinobacilus</i>	<i>Actinobacilus</i>
TEc3-4 1 e 2	<i>Actinobacilus</i>		<i>Actinobacilus</i>	
TE5-6 1 e 2	<i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>		
TEc5-6 1 e 2	<i>Actinobacilus</i>		<i>Actinobacilus</i>	
TE7-8 1 e 2	<i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i> e/ou <i>Rothia</i>
TEc7-8 1 e 2	<i>Moraxella</i>		<i>Actinobacilus</i>	
TE9-10 1 e 2	<i>Moraxella</i> e/ou <i>Actinobacilus</i> e <i>Rothia</i> e/ou <i>Streptococcus</i>	<i>Moraxella</i> e/ou <i>Actinobacilus</i> e <i>Rothia</i> e/ou <i>Streptococcus</i>	<i>Actinobacilus</i>	<i>Actinobacilus</i>
TEc9-10 1 e 2	<i>Moraxella</i> e/ou <i>Actinobacilus</i>		<i>Moraxella</i> e/ou <i>Actinobacilus</i>	
TE11-12 1 e 2	<i>Rothia</i>	<i>Actinobacilus</i>	<i>Rothia</i> e <i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>	<i>Rothia</i> e <i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>
TEc11-12 1 e 2	<i>Moraxella</i>		<i>Moraxella</i>	
TE13-14 1 e 2	<i>Rothia</i> e/ou <i>Streptococcus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Rothia</i>	<i>Rothia</i> e/ou <i>Streptococcus</i> e <i>Actinobacilus</i>
TEc13-14 1 e 2	<i>Actinobacilus</i>		<i>Actinobacilus</i>	
TE15-16 1 e 2	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i> e <i>Rothia</i>	<i>Streptococcus</i> e/ou <i>Rothia</i>	<i>Moraxella</i>
TEc15-16 1 e 2	<i>Streptococcus</i>	<i>Moraxella</i>		<i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>
TE17-18 1 e 2	<i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i>
TEc17-18 1 e 2	<i>Streptococcus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i>	
TE19-20 1 e 2	<i>Actinobacilus</i>	<i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i>	
TEc19-20 1 e 2	<i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i>	<i>Moraxella</i>
TE21-22 1 e 2	<i>Moraxella</i>		<i>Rothia</i> e/ou <i>Actinobacilus</i>	<i>Streptococcus</i>
TEc21-22 1 e 2	<i>Moraxella</i>		<i>Actinobacilus</i> e/ou <i>Moraxella</i>	<i>Actinobacilus</i>

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela sugere gêneros bacterianos a partir de um estudo na literatura do isolamento bacteriano da saliva, fezes, vagina, comedoro e bebedor. Na saliva dos porcos os principais gêneros encontrados foram: *Streptococcus*, *Moraxella*, *Actinobacillus* e *Rothia* (76). Além disso, o estudo sugere que a espécie seja *Streptococcus suis*, uma gram positiva que apresenta afinidade pela colonização em suínos e não é uma espécie comensal humana. Esta espécie se encontra presente em 100% dos suínos independente das condições climáticas, métodos de reprodução, higiene e instalações (76).

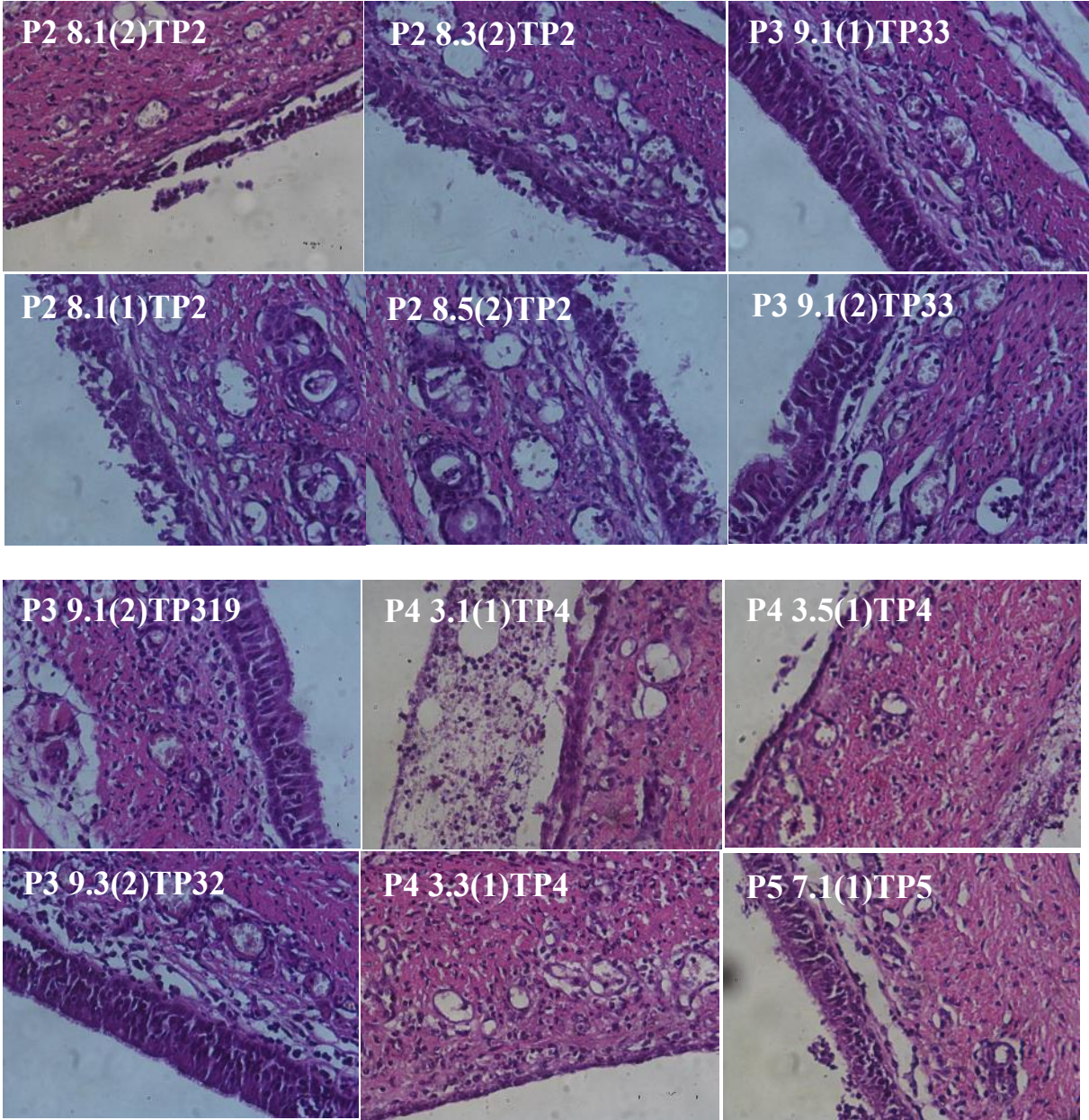
7.4.2 Lâminas Histológicas

As imagens realizadas a partir dos cortes das lâminas histológicas foram analisadas e estão destacadas na Figura abaixo. As siglas P_n é referente a cada animal, sendo os P1 e P2 referentes aos animais intubados com TE e as siglas P3, P4, P5 e P6 referentes aos animais intubados com TEc. A sigla TRP é relacionada ao corte transversal na traqueia no suíno e Pul é referente ao tecido pulmonar. As imagens da figura 7.3 descrevem os resultados das lâminas histológicas do tecido da traqueia:



(continua)

(continuação)



(continua)

(continuação)

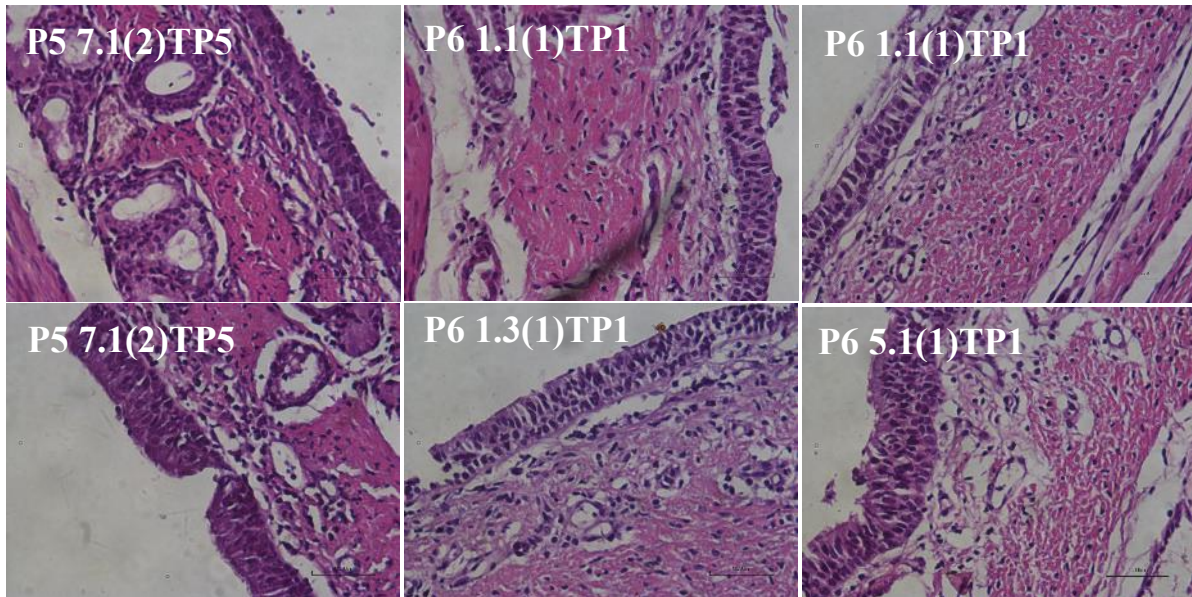
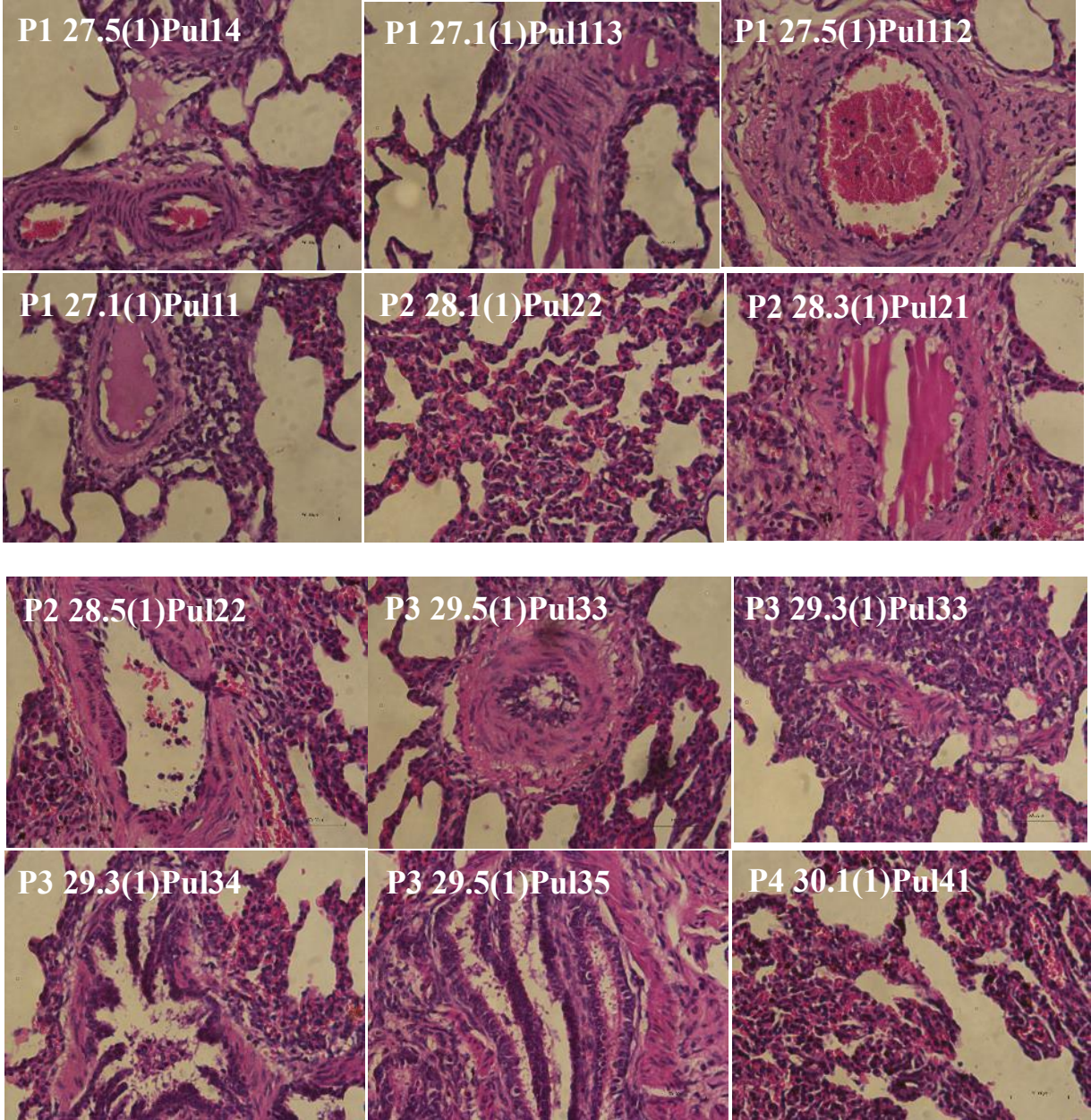


Figura 7.3 - Cortes das lâminas histológicas do tecido traqueal dos animais intubados com TE (P1 e P2) e com TEc (P3, P4, P5 e P6).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir das imagens analisadas da Figura 7.3, as lâminas dos animais intubados com TEc e irradiados com luz não revelaram diferenças histológicas do tecido pseudoestratificado ciliado da da trqueia, sendo o tecido com maior contato do tubo pelo cuff. O tecido s emanteve integro mesmo após 24h de intubação nos grupos; apenas os grupos P2 e P4 revelaram uma pequena diferença no tecido pseudoestratificado.

A Figura 7.4 ilustra as imagens dos cortes histológicos do tecido pulmonar dos suínos.



(continua)

(continuação)

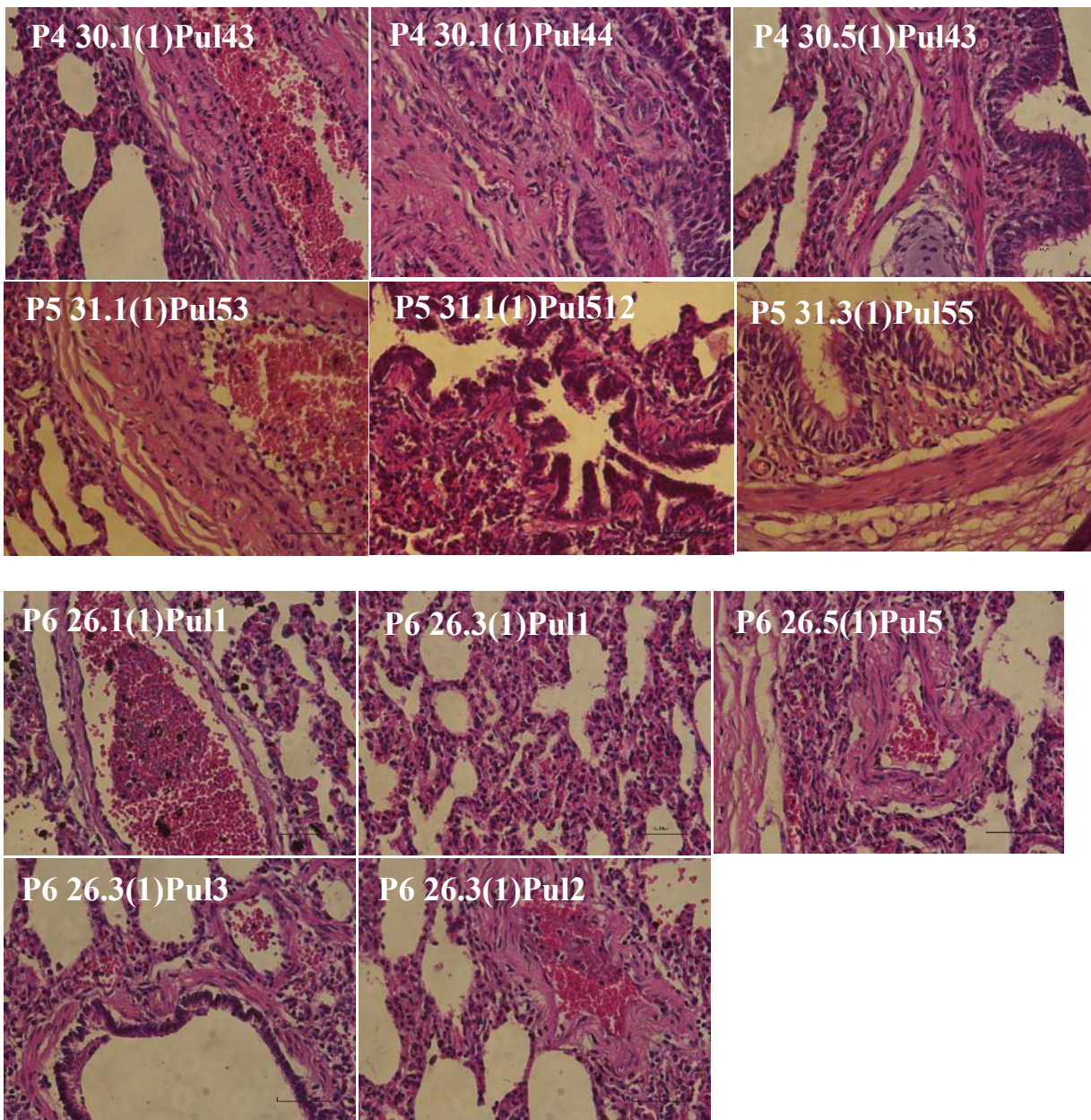


Figura 7.4 – Análises das lâminas histológicas do tecido pulmonar dos suínos intubados com TE (P1 e P2) e dos suínos intubados com TEc (P3, P4, P5 e P6).

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como no tecido traqueal, os animais intubados com TEc revelaram integridade no tecidos pulmonar em ambos os grupos de animais intubados com TE. Portanto, pode-se dizer que o TEc se mostra seguro para a utilização durante 24h de intubação traqueal.

7.4.3 Conclusão Parcial

Através das análises dos animais intubados com TEc e irradiados pela fibra difusora pode-se dizer que a IF se mostra eficiente contra a contaminação bacteriana em suínos, com uma significativa redução de biofilme formado em TEc em relação aos TE. Além disso, o TEc se mostra seguro para utilização em modelos *in vivo*, sendo uma estratégica aplicação na clínica para redução de Pneumonias e outras possíveis contaminações por HAIs.

REFERÊNCIAS

- 1 BARNES, M. *et al.* Antimicrobial polymer modifications to reduce microbial bioburden on endotracheal tubes and ventilator associated pneumonia. *Acta Biomaterialia*, v. 91, p.220-234, 2019. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.04.042
- 2 ZHENG, H. *et al.* Clinical experience with emergency endotracheal intubation in COVID-19 patients in the intensive care units: a single-centered, retrospective, descriptive study. *American Journal of Translational Research*, v. 12, n. 10, p. 6655–6664, 2020.
- 3 VAN CHARANTE, F. *et al.* Microbial diversity and antimicrobial susceptibility in endotracheal tube biofilms recovered from mechanically ventilated COVID-19 patients. *Biofilm*, v. 4, p. 100079, 2022. DOI: 10.1016/j.bioflm.2022.100079.
- 4 HASHEMI, M. M. *et al.* Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v.73, n. 1, p.143-150, 2018.
- 5 SOLIS-VELAZQUEZ, O. A. *et al.* Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. *Journal of Microbiology Immunology Infections*, v. 54, n. 6, p.1038-1047, 2021.
- 6 VENKATACHALAM, V.; HENDLEY, J. O.; WILLSON, D. F. The diagnostic dilemma of ventilator-associated pneumonia in critically ill children. *Pediatric Critical Care Medicine*, v.12, n. 3, p. 286-96, 2011.
- 7 SPAPEN, H. *et al.* An endotracheal tube providing “pressurized sealing” prevents fluid leakage in mechanically ventilated critically ill patients: a pilot study. *Journal Anesthesia*, v. 34, n.1, p.144–148, 2020.
- 8 ABDULRAHMAN, H. *et al.* Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: an approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 30, p.101645, 2020.
- 9 KARAMI-ZARANDI, M.; HEG, G.; RANJBAR, R. Characterization of virulence factors and antibacterial activity of curcumin in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, v. 17, n. 7, p. 29–40, 2022.
- 10 DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, p.881–890, 2002.
- 11 GUZMÁN-SOTO, I. *et al.* Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience*, v.24, n.5, p.102443, 2021.
- 12 PIECHOTA, M. *et al.* Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive staphylococcus aureus strains from hospitalized patients in Poland. *Biomedical Research International*, v. 27, n. 2018, p.465-739, 2018..
- 13 ALLEN, M. J. *et al.* Other heterotrophic plate count bacteria. *International Journal Food Microbiology*, v. 92, n.3, p.265-274, May 2004.
- 14 JUAREZ, G. E.; GALVAN, E. M. Role of nutrient limitation in the competition between uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in mixed biofilms.

Biofouling, v. 34, n. 3, p. 287–298, 2018.

15 GOUNANI, Z. *et al.* Coculture of *P. aeruginosa* and *S. aureus* on cell derived matrix - an in vitro model of biofilms in infected wounds. *Journal Microbiology Methods*, v.175, p.105914, Aug. 2020.

16 EMMERICK, L. S. M. L. *Micobactérias não-tuberculosas isoladas da Mata Atlântica: aspectos genéticos, bioquímicos e identificação de antígenos compartilhados com a vacina BCG*. 2013. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Moléculas) - Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, 2013..

17 LLOBET, E *et. al.* Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infection and Immunity*. v. 79, n. 9, p. 3718–32,2011.

18 YADAV, M. K.; VIDAL, J. E.; SONG, J. J. Microbial biofilms on medical indwelling devices. *In: YADAV, M. K.; SINGH, B. P. (ed.). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Amsterdam: Elsevier, 2020. Cap. 2. p.15–28.

19 GHANDOUR, W. *et al.* The uptake of silver ions by *Escherichia coli* KI2 : toxic effects and interaction with copper ions. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 28, p. 559–565, 1988.

20 WELLS, T.N.C. *et al.* Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose isomerases by silver ions and flomoxone. *Biochemistry*, v. 34, n. 24, p.7896–903,1995.

21 BERRA L. *et al.* Internally coated endotracheal tubes with silver sulfadiazine in polyurethane to prevent bacterial colonization: a clinical trial. *Intensive Care Medical*, v. 34, n. 6, p.1030–7, 2008.

22 RELLO, J. *et al.* Reduced burden of bacterial airway colonization with a novel silver-coated endotracheal tube in a randomized multiple-center feasibility study. *Critical Care Medical*. v.34, n.11,p.2766–7,2006.

23 JONES, D. S. *et al.* Novel semi-interpenetrating hydrogel networks with enhanced mechanical properties and thermoresponsive engineered drug delivery, designed as bioactive endotracheal tube biomaterials. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.82, n. 3, p.563–571, 2012

24 HAMBLIN, M.R.; HASAN. T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemistry and Photobiology Science*, v.3, n.5, p.436–450, 2004.

25 SILVA, A. P. *Novas estratégias para o diagnóstico de oncomicosose e tratamento por terapia fotodinâmica*. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017

26 AGGARWAL, B.;SEERAM, N. P.;BHATTI, I. D. Curcumin: biological and medicinal properties.*In: RAVIDAN, P.N.; BABU, K. N.; SIVARAMAMI, K. (ed.) Tumeric: the genus curcuma*. New York: CRC Press, 2007. Cap.10. p. 298.

27 MOUSSA, Z.; CHEBL M.; PATRA, D. Fluorescence of tautomeric forms of curcumin in different pH and biosurfactant rhamnolipids systems: application towards on-off ratiometric fluorescence temperature sensing. *Journal Photochemistry and Photobiology*, v.173, p. 307-317, 2017.

28 NATARAJAN, C.; BRIGHT, J. J. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking il-12 signaling through janus kinase-stat pathway in T

- lymphocytes. *Journal Immunology*, v.168, n.12, p. 6506–6513, 2002.
- 29 PHAN, T.T.; SEE, P.; LEE, S.T.; CHAN, S.Y. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *Journal of Trauma*, v.1, n.5, p.927–31, 2001
- 30 LI, J. *et al.* Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocoloids*, v. 56, p. 41–49, 2016.
- 31 LUO, N. *et al.* Preparation and characterization of cellulose/curcumin composite films. *RSC Advances*, v. 2, n. 22, p. 8483–8, 2012.
- 32 KUMBAR, V.M. *et al.* Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Odontology*, v.109, n.1, p.18–28, 2021
- 33 PEREIRA, F.M.V.; PEREIRA-FILHO, E.R. Application of free computational program in experimental design: a tutorial. *Quimica Nova*, v. 41, n. 9, p.1061–1071, 2018.
- 34 VICENTINI, F.C. *et al.* Planejamento fatorial e superfície de resposta: otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag(I) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. *Quimica Nova*, v.34, n. 5, p.825–30, 2011.
- 35 CAMPOS, A.D.E. *et al.* *Brendas de PVC/PCL foto termo e biotratadas com fungos de solo: (Phanerochaete chrysosporium e Aspergillus fumigatus)*. 2014. 114 p. Dissertação(Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.
- 36 LOPEZ-LOPEZ, G.; PASCUAL A.; PEREA, E. J. Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *Journal Medicine Microbioogy*, v.34, n.6, p. 349–353,1991
- 37 CARVALHO, C. R. de. Pneumonia associada à ventilação mecânica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.32, n.4, p.15-17, 2006.
- 38 FOULSTON, L.The extracellular matrix of staphylococcus aureus biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. *mBio*, v.5, n.5, p.1-9, 2014.
- 39 BARNES, M.; FEIT, C.; GRANT, T-A; BRISBOIS, E. J. Antimicrobial polymer modifications to reduce microbial bioburden on endotracheal tubes and ventilator associated pneumonia. *Acta Biomaterials*, v. 91, p.220–234, 2019.
40. CHI, S.Y. *et al.* Bacterial pathogens of ventilator associated pneumonia in a tertiary referral hospital. *Tuberculosis & Respiratory Diseases*,v.73, n.1. p.32-37,July 2012.
- 41ESTES, R.J.; MEDURI, G.U. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: I. Mechanisms of bacterial transcolonization and airway inoculation. *Intensive Care Medicine*, v. 21, n. 4, p.365–383, 1995.
- 42 CAMPOS, A. de; FRANCHETTI, M.S. Biotreatment effects in films and blends of PVC / PCL. *Brazilian Archive Biological Tecnology*, v. 48, n.12, p.235-243, Mar.2005.
- 43 HASHEMI, M.M. *et al.* Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n.1, p.143–150, 2018.
- 44 PARASURAMAN, P. *et al.* Synthesis and antimicrobial photodynamic effect of methylene blue conjugated carbon nanotubes on *E. coli* and *S. aureus*. *Photochemistry Photobiology*

Science, v.18, n. 2, p. 563–576, 2019.

45 COSTA MAGACHO, C. *et al.* Comparison of photodynamic therapy with methylene blue associated with ceftriaxone in gram-negative bacteria; an in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2022. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2022.103246;30. *In press*.

46 HEGGE, A.B. *et al.* Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin: effect of selected nanocarrier: studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.47, n. 1, p.65-74, 2012.

47 HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods*. v. 6, n.10, p. 92, 2017.

48 BARNES, M. *et al.* Antimicrobial polymer modifications to reduce microbial bioburden on endotracheal tubes and ventilator associated pneumonia. *Acta Biomaterials*, v. 91.p. 220-234, 2019.

49 CHI, S. Y. *et al.* Bacterial pathogens of ventilator associated pneumonia in a tertiary Referral Hospital. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, v. 3536, p.32–37, 2012.

50 ESTES, R. J.; MEDURI, G. U. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: I. Mechanisms of bacterial transcolonization and airway inoculation. *Intensive Care Medicine*, v. 21, n. 4, p.365–383, 1995.

51 CAMPOS, A. *et. al.* Biotreatment effects in films and blends of PVC / PCL previously treated with heat. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 235–243, 2005.

52 HASHEMI M. M. *et al.* Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 1, p.143–150, 2018.

53 PARASURAMAN, P. *et al.* Synthesis and antimicrobial photodynamic effect of methylene blue conjugated carbon nanotubes on *E. coli* and *S. aureus*. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v.18, n. 2, p. 563–576, 2019.

54 COSTA MAGACHO, C. *et. al.* Comparison of photodynamic therapy with methylene blue associated with ceftriaxone in gram-negative bacteria; an in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.30, p.101691, 2020.

55 HEGGE, A. B. *et. al.* Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin - Effect of selected nanocarrier: Studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n.1, p.65–74, 2012.

56 HEWLINGS S, KALMAN D. Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods*, v. 6, n. 10. p.92, 2017.

57 MONDAL, S; GHOSH, S.; MOULIK, S.P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. *Journal Photochemistry Photobiology B*, v.158, p.12–18, 2016

58 WANG, H. *et al.* Characterization, release, and antioxidant activity of curcumin-loaded sodium alginate/ZnO hydrogel beads. *International Journal Biological Macromolecules*, v.121, p.1118–1125, 2019.

59 TOMINAGA, Y. Comparative study of class data analysis with PCA-LDA, SIMCA, PLS,

- ANNs, and k-NN. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v,49, n.1.p.105–15,1999.
- 60 ZANGIROLAMI, A. C. *et al.* Avoiding ventilator-associated pneumonia: curcumin-functionalized endotracheal tube and photodynamic action. *Proceedings National Academy Science U S A*, v.117, n. 37,p. 22967–22973, 2020.
- 61 CAMPOS, M.; FRANCHETTI, S. M. Biotreatment effects in films and blends of PVC/PCL previously treated with heat. *Brazilian Archives Biological Technology*, v. 48, n. 2, p.235–43, 2005.
- 62 KHARAT, M.; DU, Z.; ZHANG, G.; MCCLEMENTS, D.J. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: impact of ph, temperature, and molecular environment. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.65, n.8, p.1525–1532, 2017.
- 63 PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal Photochemistry Photobiology C*, v.10, n.2, p.81–95, 2009.
- 64 WANG, Y.J. *et al.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.15, n. 12, p.1867–1876, 1997.
- 65 LI, J. *et al.* Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocolloids*, v.56, p.41–49, 2016.
- 66 TENNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids - v. alkaline degradation of curcumin. *Zeitschrift fur Lebensm Unters Forsch*, v.180, n. 2, p.132–134, 1985.
- 67 NANA O, T. *et al.* Additional medical costs associated with ventilator-associated pneumonia in an intensive care unit in Japan. *American Journal of Infection Control*, v.49. n.3, p. 340–344, 2021.
- 68 PRAGMAN, A. A.; BERGER, J. P.; WILLIAMS, B. J. Understanding persistent bacterial lung infections: clinical implications informed by the biology of the microbiota and biofilms. *Clinical Pulmonary Medicine*, v.23, n.2, p. 57, 2016.
- 69 JAMPALA, B. L.; TOLETI, S.; KOLIPAKA, S. R.; MYNENI, R. B. A clinico - microbiological study in patients undergoing mechanical ventilation in a tertiary care hospital. *International Journal of Research in Medical Sciences*, v.4, p.2856–2858, 2016.
- 70 AL-TAWFIQ, J. A.; ABED, M. S. Decreasing ventilator-associated pneumonia in adult intensive care units using the Institute for Healthcare Improvement bundle. *American Journal of Infection Control*, v. 38, n.7, p.552–556, 2010.
- 71 MATSUMOTO, T.; CARVALHO, W. B. Tracheal intubation. *Journal de Pediatria*, v. 83, n.2, p.83-90, 2007
- 72 STULIK, L. *et al.* Low efficacy of antibiotics against staphylococcus aureus airway colonization in ventilated patients. *Clinical Infection Diseases*, v. 64, n. 8.p.1081–1088, 2017.
- 73 INGLIS, T. J.; MILLAR, M. R.; JONES, J.G.; ROBINSON, D. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *Journal Clinical Microbiology*, v.27, n. 9, p. 2014–2018, 1989.
- 74 HARTMANN, M. *et al.* Reduction of the bacterial load by the silver-coated endotracheal tube (SCET), a laboratory investigation. *Technology Health Care*, v.7, n. 5, p.359–370, 1999.

75 MACHADO, M.C.; WEBSTER, T. J. Decreased *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on nanomodified endotracheal tubes: a dynamic lung model. *International Journal Nanomedicine*, v11, p.3825–3831, 2016.

76 MURASE, K. *et al.* Characterization of pig saliva as the major natural habitat of *Streptococcus suis* by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbiota. *PLoS One*, v. 14, n. 4, p.1–17, 2019.

ANEXO A – REFERÊNCIAS CAPÍTULO 5

7.4.4 Photoactivation Of Immobilized Curcumin On The Endotracheal Tube: Cytotoxic Effects And Physical-Chemical Stability

Amanda C. Zangirolami¹, Heloisa Ciol¹, Vanderlei S. Bagnato^{1,2} and Kate C. Blanco^{1,2}

¹ São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, 13566-590, Brazil.

² Biomedical Engineering, Texas A&M University, College Station, TX 77840.

* Correspondence: blancokate@gmail.com: Texas A&M University, Emerging Technologies Building 3120, 101 Bizzell St, College Station, TX 77843.

7.4.5 References

1. Barnes M, Feit C, Grant TA, Brisbois EJ. Antimicrobial polymer modifications to reduce microbial bioburden on endotracheal tubes and ventilator associated pneumonia. *Acta Biomater* [Internet]. 2019;91:220–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.042>
2. Zheng H, Li S, Sun R, Yang H, Chi X, Chen M, et al. Clinical experience with emergency endotracheal intubation in COVID-19 patients in the intensive care units: a single-centered, retrospective, descriptive study. *Am J Transl Res*. 2020;12(10):6655–64.
3. van Charante F, Wieme A, Rigole P, De Canck E, Ostyn L, Grassi L, et al. Microbial diversity and antimicrobial susceptibility in endotracheal tube biofilms recovered from mechanically ventilated COVID-19 patients. *Biofilm*. 2022;4(February).
4. Hashemi MM, Rovig J, Bateman J, Holden BS, Modelzelewski T, Gueorguieva I, et al. Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(1):143–50.
5. Solis-Velazquez OA, Gutiérrez-Lomelí M, Guerrero-Medina PJ, Rosas-García M de L, Iñiguez-Moreno M, Avila-Novoa MG. Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;(xxxx).
6. Venkatachalam V, Hendley JO, Willson DF. The diagnostic dilemma of ventilator-associated pneumonia in critically ill children. *Pediatr Crit Care Med*. 2011;12(3):286–96.
7. Spapen H, Suys E, De Regt J, Troubleyn J, Jonckheer J, De Waele E. An endotracheal tube providing “pressurized sealing” prevents fluid leakage in mechanically ventilated critically ill patients: a pilot study. *J Anesth* [Internet]. 2020;34(1):144–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00540-019-02707-4>
8. Abdulrahman H, Misba L, Ahmad S, Khan AU. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2020;30(November 2019):101645. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101645>
9. Karami-Zarandi M, Ghale HEG, Ranjbar R. Characterization of virulence factors and antibacterial activity of curcumin in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2022;17(7):529–40.
10. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881–90.
11. Guzmán-Soto I, McTiernan C, Gonzalez-Gomez M, Ross A, Gupta K, Suuronen EJ, et al. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience*. 2021;24(5).
12. Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruzewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
13. Percival S, Chalmers R, Embrey M, Hunter P, Sellwood J, Wyn-Jones P. Other heterotrophic plate count bacteria. *Microbiol Waterborne Dis*. 2004;125–43.
14. Juarez GE, Galván EM. Role of nutrient limitation in the competition between uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in mixed biofilms. *Biofouling* [Internet]. 2018;34(3):287–98. Available from: <http://doi.org/10.1080/08927014.2018.1434876>
15. Gounani Z, Şen Karaman D, Venu AP, Cheng F, Rosenholm JM. Coculture of *P. aeruginosa* and *S. aureus* on cell derived matrix - An in vitro model of biofilms in infected wounds. *J Microbiol Methods*.

- 2020;175(June).
16. Emmerick L. S. ML. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. 2012;2012.
 17. Llobet E, Campos MA, Giménez P, Moranta D, Bengoechea JA. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun*. 2011;79(9):3718–32.
 18. Yadav MK, Vidal JE, Song JJ. Microbial biofilms on medical indwelling devices [Internet]. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms Current Research and Future Trends in Microbial Biofilms*. Elsevier B.V.; 2019. 15–28 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64279-0.00002-5>
 19. I WG, Hubbard JA, Deistung J, Hughes MN, Poole RK. Applied Microbiology Biotechnology The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12 : toxic effects and interaction with copper ions. *Cell*. 1988;559–65.
 20. Wells TNC, Scully P, Paravicini G, Proudfoot AEI, Payton MA. Mechanism of Irreversible Inactivation of Phosphomannose Isomerases by Silver Ions and Flamazine. *Biochemistry*. 1995;34(24):7896–903.
 21. Berra L, Kolobow T, Laquerriere P, Pitts B, Bramati S, Pohlmann J, et al. Internally coated endotracheal tubes with silver sulfadiazine in polyurethane to prevent bacterial colonization: A clinical trial. *Intensive Care Med*. 2008;34(6):1030–7.
 22. Rello J, Kollef M, Diaz E, Sandiumenge A, Del Castillo Y, Corbella X, et al. Reduced burden of bacterial airway colonization with a novel silver-coated endotracheal tube in a randomized multiple-center feasibility study. *Crit Care Med*. 2006;34(11):2766–72.
 23. Jones DS, Andrews GP, Caldwell DL, Lorimer C, Gorman SP, McCoy CP. Novel semi-interpenetrating hydrogel networks with enhanced mechanical properties and thermoresponsive engineered drug delivery, designed as bioactive endotracheal tube biomaterials. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2012;82(3):563–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.07.019>
 24. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(5):436–50.
 25. Silva AP. Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica. USP; 2017.
 26. Environment H, Island R. Curcumin - Biological and medicinal properties — Biological and 10 Curcumin Medicinal Properties. 2006;(May 2016).
 27. Moussa Z, Chebl M, Patra D. Fluorescence of tautomeric forms of curcumin in different pH and biosurfactant rhamnolipids systems: Application towards on-off ratiometric fluorescence temperature sensing. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2017;173(January):307–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.011>
 28. Natarajan C, Bright JJ. Curcumin Inhibits Experimental Allergic Encephalomyelitis by Blocking IL-12 Signaling Through Janus Kinase-STAT Pathway in T Lymphocytes. *J Immunol*. 2002;168(12):6506–13.
 29. Phan TT, See P, Lee ST, Chan SY. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *J Trauma*. 2001;51(5):927–31.
 30. Li J, Shin GH, Lee IW, Chen X, Park HJ. Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2016;56:41–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.024>
 31. Luo N, Varaprasad K, Reddy GVS, Rajulu AV, Zhang J. Preparation and characterization of cellulose/curcumin composite films. *RSC Adv*. 2012;2(22):8483–8.
 32. Kumbar VM, Peram MR, Kugaji MS, Shah T, Patil SP, Muddapur UM, et al. Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Odontology* [Internet]. 2021;109(1):18–28. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10266-020-00514-y>
 33. Pereira FMV, Pereira-Filho ER. Application of free computational program in experimental design: A tutorial. *Quim Nova*. 2018;41(9):1061–71.
 34. Vicentini FC, Figueiredo-Filho LCS, Janegitz BC, Santiago A, Pereira-Filho ER, Fatibello-Filho O. Planejamento fatorial e superfície de resposta: Otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag(I) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. *Quim Nova*. 2011;34(5):825–30.
 35. Dias VHC, Malacrida AM, dos Santos AR, Batista AFP, Campanerut-Sá PAZ, Braga G, et al. pH interferes in photoinhibitory activity of curcumin nanoencapsulated with pluronic® P123 against *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2021;33(August 2020):102085. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102085>
 36. de Oliveira EF, Tosati J V., Tikekar R V., Monteiro AR, Nitin N. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation. *Postharvest Biol Technol* [Internet]. 2018;137(November 2017):86–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.014>
 37. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One*. 2015;10(3):1–15.

38. Cotter PD, Hill C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):429–53.
39. Chan PF, Foster SJ, Ingham E, Clements MO. The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor $\sigma(B)$ controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J Bacteriol.* 1998;180(23):6082–9.
40. Mun SH, Joung DK, Kim YS, Kang OH, Kim SB, Seo YS, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine [Internet].* 2013;20(8–9):714–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.006>
41. Ding T, Li T, Wang Z, Li J. Curcumin liposomes interfere with quorum sensing system of *Aeromonas sobria* and in silico analysis. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08986-9>
42. Onas AM, Biru IE, Petca A, Petca RC. The Aging Behavior of Polyurethane-based Ureteral Catheters. *Mater Plast.* 2021;58(4):65–72.
43. Shabani AA, Ravaei S, Anani H, Nasr R, Maroufi MH, Partabi A. Frequency of CTX-M gene isolated from *E. coli* in patients with suspected urinary tract infection in Semnan. *Gene Reports [Internet].* 2021;23(November 2020):101035. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101035>
44. Campos ADE, São E De, Brasil P, Profa O, Sandra D, Martins M. COM FUNGOS DE SOLO (*Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus fumigatus*) COM FUNGOS DE SOLO. 2004;
45. Lopez-Lopez G, Pascual A, Perea EJ. Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *J Med Microbiol.* 1991;34(6):349–53.
46. Pav D. Pneumonia associada à ventilação mecânica. (5).
47. Foulston L, Elsholz AKW, Defrancesco AS, Losick R. The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH. 2014;5(5):1–9.
48. Barnes M, Feit C, Grant T-A, Brisbois EJ. Antimicrobial polymer modifications to reduce microbial bioburden on endotracheal tubes and ventilator associated pneumonia. *Acta Biomater [Internet].* 2019;91:220–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706119302855>
49. Chi SY, Kim TO, Park CW, Yu JY, Lee B, Lee S, et al. Bacterial Pathogens of Ventilator Associated Pneumonia in a Tertiary Referral Hospital. 2012;3536:32–7.
50. Estes RJ, Meduri GU. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: I. Mechanisms of bacterial transcolonization and airway inoculation. *Intensive Care Med.* 1995;21(4):365–83.
51. Campos A De, Mara S, Franchetti M. Biotreatment Effects in Films and Blends of PVC / PCL Previously Treated with Heat. 2005;48(March):235–43.
52. Hashemi MM, Rovig J, Bateman J, Holden BS, Modelzelewski T, Gueorguieva I, et al. Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(1):143–50.
53. Parasuraman P, Anju VT, Sruthil Lal SB, Sharan A, Busi S, Kaviyarasu K, et al. Synthesis and antimicrobial photodynamic effect of methylene blue conjugated carbon nanotubes on *E. coli* and *S. aureus*. *Photochem Photobiol Sci.* 2019;18(2):563–76.
54. Costa Magacho C, Guerra Pinto J, Müller Nunes Souza B, Correia Pereira AH, Ferreira - Strixino J. Comparison of photodynamic therapy with methylene blue associated with ceftriaxone in gram-negative bacteria; an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther [Internet].* 2020;30(January):101691. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101691>
55. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin - Effect of selected nanocarrier: Studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *Eur J Pharm Sci [Internet].* 2012;47(1):65–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.05.002>
56. Hewlings S, Kalman D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods.* 2017;6(10):92.
57. Mondal S, Ghosh S, Moulik SP. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet].* 2016;158:212–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>
58. Wang H, Gong X, Guo X, Liu C, Fan YY, Zhang J, et al. Characterization, release, and antioxidant activity of curcumin-loaded sodium alginate/ZnO hydrogel beads. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2019;121:1118–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.121>
59. Tominaga Y. Comparative study of class data analysis with PCA-LDA, SIMCA, PLS, ANNs, and k-NN. *Chemom Intell Lab Syst.* 1999;49(1):105–15.
60. Zangirolami AC, Dias LD, Blanco KC, Vinagreiro CS, Inada NM, Arnaut LG, et al. Avoiding ventilator-associated pneumonia: Curcumin-functionalized endotracheal tube and photodynamic action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(37):22967–73.
61. De Campos A, Martins Franchetti SM. Biotreatment effects in films and blends of PVC/PCL previously

- treated with heat. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2005;48(2):235–43.
62. Kharat M, Du Z, Zhang G, McClements DJ. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. *J Agric Food Chem.* 2017;65(8):1525–32.
 63. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev.* 2009;10(2):81–95.
 64. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 1997;15(12):1867–76.
 65. Li J, Shin GH, Lee IW, Chen X, Park HJ. Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocoll [Internet].* 2016;56:41–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.024>
 66. Tønnesen HH, Karlsen J. Studies on curcumin and curcuminoids - V. Alkaline Degradation of Curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1985;180(2):132–4.
 67. Nanao T, Nishizawa H, Fujimoto J, Ogawa T. Additional medical costs associated with ventilator-associated pneumonia in an intensive care unit in Japan. *Am J Infect Control [Internet].* 2021;49(3):340–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.07.027>
 68. Pragman AA, Berger JP, Williams BJ. Understanding persistent bacterial lung infections: clinical implications informed by the biology of the microbiota and biofilms. *Clin Pulm Med.* 2016;23(2):57.
 69. Jampala BL, Toleti S, Kolipaka SR, Myneni RB. A clinico - microbiological study in patients undergoing mechanical ventilation in a tertiary care hospital. 2016;4(7):2856–8.
 70. Al-Tawfiq JA, Abed MS. Decreasing ventilator-associated pneumonia in adult intensive care units using the Institute for Healthcare Improvement bundle. *Am J Infect Control [Internet].* 2010;38(7):552–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2010.01.008>
 71. Matsumoto T, Carvalho WB De. Tracheal intubation. 2007;83:83–90.
 72. Stulik L, Hudcova J, Craven DE, Nagy G, Nagy E. Low efficacy of antibiotics against staphylococcus aureus airway colonization in ventilated patients. *Clin Infect Dis.* 2017;64(8):1081–8.
 73. Inglis TJ, Millar MR, Jones JG, Robinson D. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J Clin Microbiol.* 1989;27(9):2014–8.
 74. Hartmann M, Guttman J, Muller B, Hallmann T, Geiger K. Reduction of the bacterial load by the silver-coated endotracheal tube (SCET), A laboratory investigation. *Technol Heal Care.* 1999;7(5):359–70.
 75. Machado MC, Webster TJ. Decreased pseudomonas aeruginosa biofilm formation on nanomodified endotracheal tubes: A dynamic lung model. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:3825–31.
 76. Murase K, Watanabe T, Arai S, Kim H, Tohya M, Ishida-Kuroki K, et al. Characterization of pig saliva as the major natural habitat of *Streptococcus suis* by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbiota. *PLoS One.* 2019;14(4):1–17.

ANEXO B - REFERENCIAS CAPÍTULO 6

Prevention of ventilation-associated pneumonia applying a functionalized endotracheal tube and photodynamic therapy: a proof of principle with an artificial intubation model

Amanda Cristina Zangirolami^a, Leandro Serillo Pinguero^a, Fábio M. S. Rodrigues^b, Luis G. Arnaut^b, Mariette M. Pereira^b, Vanderlei Salvador Bagnato^{a,c}, Kate Cristina Blanco^{a,c}

^aSão Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos - São Paulo 13566-590, Brazil.

^bCoimbra Chemistry Centre, Chemistry Department, University of Coimbra, 3004-535, Coimbra, Portugal

^cTexas A&M University, College Station, Texas, USA

* Correspondence author: Kate C Blanco, blancokate@gmail.com

Av. Trab. São-carlense Av., 400, 13566-590, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Tel.: +55-16-3373-9810.

7.4.6 References

1. Barnes M, Feit C, Grant TA, Brisbois EJ. Antimicrobial polymer modifications to reduce microbial bioburden on endotracheal tubes and ventilator associated pneumonia. *Acta Biomater* [Internet]. 2019;91:220–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.042>
2. Zheng H, Li S, Sun R, Yang H, Chi X, Chen M, et al. Clinical experience with emergency endotracheal intubation in COVID-19 patients in the intensive care units: a single-centered, retrospective, descriptive study. *Am J Transl Res*. 2020;12(10):6655–64.
3. van Charante F, Wieme A, Rigole P, De Canck E, Ostyn L, Grassi L, et al. Microbial diversity and antimicrobial susceptibility in endotracheal tube biofilms recovered from mechanically ventilated COVID-19 patients. *Biofilm*. 2022;4(February).
4. Hashemi MM, Rovig J, Bateman J, Holden BS, Modelzelewski T, Gueorguieva I, et al. Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(1):143–50.
5. Solis-Velazquez OA, Gutiérrez-Lomelí M, Guerreo-Medina PJ, Rosas-García M de L, Iñiguez-Moreno M, Avila-Novoa MG. Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;(xxxx).
6. Venkatachalam V, Hendley JO, Willson DF. The diagnostic dilemma of ventilator-associated pneumonia in critically ill children. *Pediatr Crit Care Med*. 2011;12(3):286–96.
7. Spapen H, Suys E, De Regt J, Troubleyn J, Jonckheer J, De Waele E. An endotracheal tube providing “pressurized sealing” prevents fluid leakage in mechanically ventilated critically ill patients: a pilot study. *J Anesth* [Internet]. 2020;34(1):144–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00540-019-02707-4>
8. Abdulrahman H, Misba L, Ahmad S, Khan AU. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2020;30(November 2019):101645. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101645>
9. Karami-Zarandi M, Ghale HEG, Ranjbar R. Characterization of virulence factors and antibacterial activity

- of curcumin in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2022;17(7):529–40.
10. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881–90.
 11. Guzmán-Soto I, McTiernan C, Gonzalez-Gomez M, Ross A, Gupta K, Suuronen EJ, et al. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience.* 2021;24(5).
 12. Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruzewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
 13. Percival S, Chalmers R, Embrey M, Hunter P, Sellwood J, Wyn-Jones P. Other heterotrophic plate count bacteria. *Microbiol Waterborne Dis.* 2004;125–43.
 14. Juarez GE, Galván EM. Role of nutrient limitation in the competition between uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in mixed biofilms. *Biofouling* [Internet]. 2018;34(3):287–98. Available from: <http://doi.org/10.1080/08927014.2018.1434876>
 15. Gounani Z, Şen Karaman D, Venu AP, Cheng F, Rosenholm JM. Coculture of *P. aeruginosa* and *S. aureus* on cell derived matrix - An in vitro model of biofilms in infected wounds. *J Microbiol Methods.* 2020;175(June).
 16. Emmerick L. S. ML. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. 2012;2012.
 17. Llobet E, Campos MA, Giménez P, Moranta D, Bengoechea JA. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun.* 2011;79(9):3718–32.
 18. Yadav MK, Vidal JE, Song JJ. Microbial biofilms on medical indwelling devices [Internet]. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms Current Research and Future Trends in Microbial Biofilms.* Elsevier B.V.; 2019. 15–28 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64279-0.00002-5>
 19. I WG, Hubbard JA, Deistung J, Hughes MN, Poole RK. Applied Microbiology Biotechnology The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12 : toxic effects and interaction with copper ions. *Cell.* 1988;559–65.
 20. Wells TNC, Scully P, Paravicini G, Proudfoot AEI, Payton MA. Mechanism of Irreversible Inactivation of Phosphomannose Isomerases by Silver Ions and Flamazine. *Biochemistry.* 1995;34(24):7896–903.
 21. Berra L, Kolobow T, Laquerriere P, Pitts B, Bramati S, Pohlmann J, et al. Internally coated endotracheal tubes with silver sulfadiazine in polyurethane to prevent bacterial colonization: A clinical trial. *Intensive Care Med.* 2008;34(6):1030–7.
 22. Rello J, Kollef M, Diaz E, Sandiumenge A, Del Castillo Y, Corbella X, et al. Reduced burden of bacterial airway colonization with a novel silver-coated endotracheal tube in a randomized multiple-center feasibility study. *Crit Care Med.* 2006;34(11):2766–72.
 23. Jones DS, Andrews GP, Caldwell DL, Lorimer C, Gorman SP, McCoy CP. Novel semi-interpenetrating hydrogel networks with enhanced mechanical properties and thermoresponsive engineered drug delivery, designed as bioactive endotracheal tube biomaterials. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2012;82(3):563–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.07.019>
 24. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):436–50.
 25. Silva AP. Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica. USP; 2017.
 26. Environment H, Island R. Curcumin - Biological and medicinal properties — Biological and 10 Curcumin Medicinal Properties. 2006;(May 2016).
 27. Moussa Z, Chebl M, Patra D. Fluorescence of tautomeric forms of curcumin in different pH and biosurfactant rhamnolipids systems: Application towards on-off ratiometric fluorescence temperature sensing. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2017;173(January):307–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.011>
 28. Natarajan C, Bright JJ. Curcumin Inhibits Experimental Allergic Encephalomyelitis by Blocking IL-12 Signaling Through Janus Kinase-STAT Pathway in T Lymphocytes. *J Immunol.* 2002;168(12):6506–13.
 29. Phan TT, See P, Lee ST, Chan SY. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *J Trauma.* 2001;51(5):927–31.
 30. Li J, Shin GH, Lee IW, Chen X, Park HJ. Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2016;56:41–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.024>
 31. Luo N, Varaprasad K, Reddy GVS, Rajulu AV, Zhang J. Preparation and characterization of cellulose/curcumin composite films. *RSC Adv.* 2012;2(22):8483–8.
 32. Kumbar VM, Peram MR, Kugaji MS, Shah T, Patil SP, Muddapur UM, et al. Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Odontology* [Internet]. 2021;109(1):18–28. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10266-020-00514-y>

33. Pereira FMV, Pereira-Filho ER. Application of free computational program in experimental design: A tutorial. *Quim Nova*. 2018;41(9):1061–71.
34. Vicentini FC, Figueiredo-Filho LCS, Janegitz BC, Santiago A, Pereira-Filho ER, Fatibello-Filho O. Planejamento fatorial e superfície de resposta: Otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag(I) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. *Quim Nova*. 2011;34(5):825–30.
35. Dias VHC, Malacrida AM, dos Santos AR, Batista AFP, Campanerut-Sá PAZ, Braga G, et al. pH interferes in photoinhibitory activity of curcumin nanoencapsulated with pluronic® P123 against *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2021;33(August 2020):102085. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102085>
36. de Oliveira EF, Tosati J V., Tikekar R V., Monteiro AR, Nitin N. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation. *Postharvest Biol Technol* [Internet]. 2018;137(November 2017):86–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.014>
37. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One*. 2015;10(3):1–15.
38. Cotter PD, Hill C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(3):429–53.
39. Chan PF, Foster SJ, Ingham E, Clements MO. The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor $\sigma(B)$ controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J Bacteriol*. 1998;180(23):6082–9.
40. Mun SH, Joung DK, Kim YS, Kang OH, Kim SB, Seo YS, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine* [Internet]. 2013;20(8–9):714–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.006>
41. Ding T, Li T, Wang Z, Li J. Curcumin liposomes interfere with quorum sensing system of *Aeromonas sobria* and in silico analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08986-9>
42. Onas AM, Biru IE, Petca A, Petca RC. The Aging Behavior of Polyurethane-based Ureteral Catheters. *Mater Plast*. 2021;58(4):65–72.
43. Shabani AA, Ravaei S, Anani H, Nasr R, Maroufi MH, Partabi A. Frequency of CTX-M gene isolated from *E. coli* in patients with suspected urinary tract infection in Semnan. *Gene Reports* [Internet]. 2021;23(November 2020):101035. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101035>
44. Campos ADE, São E De, Brasil P, Profa O, Sandra D, Martins M. COM FUNGOS DE SOLO (*Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus fumigatus*) COM FUNGOS DE SOLO. 2004;
45. Lopez-Lopez G, Pascual A, Perea EJ. Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *J Med Microbiol*. 1991;34(6):349–53.
46. Pav D. Pneumonia associada à ventilação mecânica. (5).
47. Foulston L, Elsholz AKW, Defrancesco AS, Losick R. The Extracellular Matrix of *Staphylococcus aureus* Biofilms Comprises Cytoplasmic Proteins That Associate with the Cell Surface in Response to Decreasing pH. 2014;5(5):1–9.
48. Barnes M, Feit C, Grant T-A, Brisbois EJ. Antimicrobial polymer modifications to reduce microbial bioburden on endotracheal tubes and ventilator associated pneumonia. *Acta Biomater* [Internet]. 2019;91:220–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706119302855>
49. Chi SY, Kim TO, Park CW, Yu JY, Lee B, Lee S, et al. Bacterial Pathogens of Ventilator Associated Pneumonia in a Tertiary Referral Hospital. 2012;3536:32–7.
50. Estes RJ, Meduri GU. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: I. Mechanisms of bacterial transcolonization and airway inoculation. *Intensive Care Med*. 1995;21(4):365–83.
51. Campos A De, Mara S, Franchetti M. Biotreatment Effects in Films and Blends of PVC / PCL Previously Treated with Heat. 2005;48(March):235–43.
52. Hashemi MM, Rovig J, Bateman J, Holden BS, Modelzelewski T, Gueorguieva I, et al. Preclinical testing of a broad-spectrum antimicrobial endotracheal tube coated with an innate immune synthetic mimic. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(1):143–50.
53. Parasuraman P, Anju VT, Sruthil Lal SB, Sharan A, Busi S, Kaviyarasu K, et al. Synthesis and antimicrobial photodynamic effect of methylene blue conjugated carbon nanotubes on *E. coli* and *S. aureus*. *Photochem Photobiol Sci*. 2019;18(2):563–76.
54. Costa Magacho C, Guerra Pinto J, Müller Nunes Souza B, Correia Pereira AH, Ferreira - Strixino J. Comparison of photodynamic therapy with methylene blue associated with ceftriaxone in gram-negative bacteria; an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2020;30(January):101691. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101691>
55. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin - Effect of selected nanocarrier:

- Studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2012;47(1):65–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.05.002>
56. Hewlings S, Kalman D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods*. 2017;6(10):92.
57. Mondal S, Ghosh S, Moulik SP. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2016;158:212–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>
58. Wang H, Gong X, Guo X, Liu C, Fan YY, Zhang J, et al. Characterization, release, and antioxidant activity of curcumin-loaded sodium alginate/ZnO hydrogel beads. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;121:1118–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.121>
59. Tominaga Y. Comparative study of class data analysis with PCA-LDA, SIMCA, PLS, ANNs, and k-NN. *Chemom Intell Lab Syst*. 1999;49(1):105–15.
60. Zangirolami AC, Dias LD, Blanco KC, Vinagreiro CS, Inada NM, Arnaut LG, et al. Avoiding ventilator-associated pneumonia: Curcumin-functionalized endotracheal tube and photodynamic action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(37):22967–73.
61. De Campos A, Martins Franchetti SM. Biotreatment effects in films and blends of PVC/PCL previously treated with heat. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2005;48(2):235–43.
62. Kharat M, Du Z, Zhang G, McClements DJ. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. *J Agric Food Chem*. 2017;65(8):1525–32.
63. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev*. 2009;10(2):81–95.
64. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;15(12):1867–76.
65. Li J, Shin GH, Lee IW, Chen X, Park HJ. Soluble starch formulated nanocomposite increases water solubility and stability of curcumin. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2016;56:41–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.024>
66. Tønnesen HH, Karlsen J. Studies on curcumin and curcuminoids - V. Alkaline Degradation of Curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1985;180(2):132–4.
67. Nanao T, Nishizawa H, Fujimoto J, Ogawa T. Additional medical costs associated with ventilator-associated pneumonia in an intensive care unit in Japan. *Am J Infect Control* [Internet]. 2021;49(3):340–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.07.027>
68. Pragman AA, Berger JP, Williams BJ. Understanding persistent bacterial lung infections: clinical implications informed by the biology of the microbiota and biofilms. *Clin Pulm Med*. 2016;23(2):57.
69. Jampala BL, Toleti S, Kolipaka SR, Myneni RB. A clinico - microbiological study in patients undergoing mechanical ventilation in a tertiary care hospital. 2016;4(7):2856–8.
70. Al-Tawfiq JA, Abed MS. Decreasing ventilator-associated pneumonia in adult intensive care units using the Institute for Healthcare Improvement bundle. *Am J Infect Control* [Internet]. 2010;38(7):552–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2010.01.008>
71. Matsumoto T, Carvalho WB De. Tracheal intubation. 2007;83:83–90.
72. Stulik L, Hudcova J, Craven DE, Nagy G, Nagy E. Low efficacy of antibiotics against staphylococcus aureus airway colonization in ventilated patients. *Clin Infect Dis*. 2017;64(8):1081–8.
73. Inglis TJ, Millar MR, Jones JG, Robinson D. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J Clin Microbiol*. 1989;27(9):2014–8.
74. Hartmann M, Guttman J, Muller B, Hallmann T, Geiger K. Reduction of the bacterial load by the silver-coated endotracheal tube (SCET), A laboratory investigation. *Technol Heal Care*. 1999;7(5):359–70.
75. Machado MC, Webster TJ. Decreased pseudomonas aeruginosa biofilm formation on nanomodified endotracheal tubes: A dynamic lung model. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:3825–31.
76. Murase K, Watanabe T, Arai S, Kim H, Tohya M, Ishida-Kuroki K, et al. Characterization of pig saliva as the major natural habitat of *Streptococcus suis* by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbiota. *PLoS One*. 2019;14(4):1–17.