

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

**Paulo Júnior Tadayoshi Nakada**

**Estratégias de inativação fotodinâmica no controle do biofilme de  
*Pseudomonas aeruginosa***

**São Carlos  
2023**



**Paulo Júnior Tadayoshi Nakada**

**Estratégias de inativação fotodinâmica no controle do biofilme de  
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada  
Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Kurachi  
Coorientadora: Dra. Fernanda Alves

**Versão Corrigida**

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

**São Carlos  
2023**

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.

Nakada, Paulo Júnior Tadayoshi  
Estratégias de inativação fotodinâmica no controle do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* / Paulo Júnior Tadayoshi Nakada; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2023.  
79 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Erradicação. 2. Azul de metileno. 3. Iodeto de potássio. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de começar agradecendo aos meus pais Paulo Nakada e Wilma Y Y Nakada, por todo amor, dedicação e esforço que tiveram pela minha criação e construção da pessoa que sou hoje. Não menos importante, dedico esse trabalho para minha irmãzinha Priscila T Nakada que esteve junto comigo em todas as situações boas ou ruins durante todo esse percurso. Aos parentes que se manteve presentes e aos amigos que de alguma forma puderem contribuir para construção desse trabalho.

Agradeço de coração aos anos de aprendizado a Profa. Cristina Kurachi que pôde compartilhar um pouco de sua sabedoria e humanidade comigo e com todo o Grupo de Óptica. Falando nesse grupo, agradeço a todos que se fizeram presentes no dia a dia contribuindo com ensinamentos e descontrações na hora do café. Este grupo não seria o mesmo sem a liderança do Prof. Vanderlei Bagnato que coordena de maneira magistral todas as linhas de pesquisa e consegue compartilhar também seus anos de experiência com cada um que cruza seu caminho, além de ser um ser humano exímio. Com todas as características desses dois pesquisadores sumarizada tive o prazer de conhecer e dividir os dias de experimentos e análises com a Ph.D. Fernanda Alves, que tornou possível o desenvolvimento e conclusão desse estudo.

E, por fim, gostaria de agradecer imensamente o apoio das Agências de Fomento: Fundação de Apoio à Física e à Química (FAFQ) – Projeto EMBRAP II – DTI; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2013/07276-1 (CEPOF); 2014/50857-8 (INCT).



*“A constant search for knowledge and profound awareness of the universe  
that triggers feelings too deep and mysterious for words.”*

*Yūgen* 幽玄



## RESUMO

NAKADA, P.J.T. **Estratégias de inativação fotodinâmica no controle do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa***. 2023. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é frequentemente associada a infecções em humanos e é conhecida por formar biofilmes espessos, resistentes e difíceis de serem tratados, cerca de 65 % das infecções humanas estão presentes na forma de biofilmes bacterianos. Para se combater esses biofilmes foram utilizadas estratégias terapêuticas visando a melhor efetividade de tratamento, cada estratégia estava direcionada para um determinado alvo. No caso do tratamento enzimático, o foco era os polissacarídeos presentes na matriz extracelular devido a utilizando de Hidrolases de Glicosídeos que clivam ligações glicosídicas. A inativação fotodinâmica (IFD) focava na destruição das células bacterianas presentes no biofilme e poderia ser utilizada após um pré-tratamento enzimático ou durante a dissociação do iodeto de potássio (KI) devido a interação desse sal com os produtos da IFD. Para o protocolo padrão de crescimento do biofilme foi utilizado  $2 \times 10^8$  UFC/mL de bactéria em placa de 96 poços com agitação de 75 rpm e 37 °C por 48h, em seguida, as amostras foram submetidas aos tratamentos. Avaliando o tratamento enzimático contra os biofilmes, os melhores resultados obtidos foram utilizando a CTEC (coquetel enzimático comercial) que obteve cerca de 50 % de redução percentual da biomassa do biofilme utilizando uma concentração de 0,3 mg/mL dessa enzima. Para a IFD, utilizou-se um dispositivo LED (660 nm, 50 mW/cm<sup>2</sup>) com dose final de 60 J/cm<sup>2</sup>, os melhores resultados obtidos foram separados em planctônicas (com 7,17 logs de redução) e biofilmes (com 1 log de redução) utilizando azul de metileno (AM) a 20 µM. Associando as técnicas, começando com um pré-tratamento enzimático e posterior IFD, os resultados não são satisfatórios e não houve reduções efetivas. Por fim, utilizando a IFD com adição de KI ocorre uma potencialização dos efeitos fotodinâmicos devido a produção de espécies reativas de iodo de longa duração que são capazes de erradicar os biofilmes de *P. aeruginosa* utilizando apenas 20 µM de AM, 100 mM de KI, 2 h de incubação e dose final de 60 J/cm<sup>2</sup>.

Palavras-chave: Erradicação. Azul de metileno. Iodeto de potássio.



## ABSTRACT

NAKADA, P.J.T. **Photodynamic inactivation strategies to control *Pseudomonas aeruginosa* biofilm.** 2023. 79 p. Dissertation (Master of Science) – Institute of Physics of Sao Carlos, University of Sao Paulo, São Carlos, 2023.

*Pseudomonas aeruginosa* is often associated with infections in humans and is known for forming thick, resistant, and challenging-to-treat biofilms. Approximately 65 % of human infections are present in the form of bacterial biofilms. Various therapeutic strategies have been employed to combat these biofilms, each targeting a specific aspect of their biology. In the case of enzymatic treatment, the focus was on the polysaccharides present in the extracellular matrix, utilizing Glycoside Hydrolases that catalyze the hydrolytic cleavage of the glycosidic bond. Photodynamic Inactivation (PDI) aimed at destroying the bacterial cells within the biofilm and could be used after enzymatic pretreatment or during the dissociation of potassium iodide (KI) due to its interaction with PDI products. For the standard biofilm growth protocol, a bacterial concentration of  $2 \times 10^8$  CFU/mL was used in a 96-well plate with agitation at 75 rpm and incubation at 37 °C for 48 hours, followed by the application of the treatments. When evaluating enzymatic treatment against *P. aeruginosa* biofilms, the most favorable results were achieved using a CTEC (commercial enzymatic cocktail) at a concentration of 0.3 mg/mL, resulting in approximately a 50 % reduction in biofilm biomass. For PDI, a LED device (660 nm, 50 mW/cm<sup>2</sup>) with a final dose of 60 J/cm<sup>2</sup> was employed, and the best results were distinguished between planktonic cells (with a 7.17 log reduction) and biofilms (with a 1 log reduction) using 20 µM of Methylene Blue (MB). Combining these techniques, starting with enzymatic pretreatment followed by PDI, did not yield satisfactory results, and there were no effective reductions. Finally, using PDI with the addition of KI led to an enhancement of photodynamic effects due to the production of long-lived iodine reactive species, which were capable of eradicating *P. aeruginosa* biofilms using only 20 µM of MB, 100 mM of KI, 2 hours of incubation, and a final dose of 60 J/cm<sup>2</sup>.

Keywords: Eradication. Methylene Blue. Potassium Iodide.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Formação do biofilme de *P. aeruginosa*. **Legenda:** QS (*Quorum Sensing*): comunicação célula-célula. .... 24
- Figura 2** – Ilustração esquemática do diagrama de Jablonski mostrando o mecanismo de ação da IFD contra as biomoléculas e os microrganismos em geral.(73) ..... 29
- Figura 3** - Protocolo padrão de crescimento do biofilme de *P. aeruginosa*..... 39
- Figura 4** – Protocolo de tratamento enzimático para quantificação da porcentagem de biomassa do biofilme e viabilidade celular das bactérias de *P. aeruginosa*. .... 39
- Figura 5** – Ação enzimática contra o biofilme de *P. aeruginosa*. a) Quantificação da biomassa total após tratamento enzimático por meio do cristal violeta. b) Teste de viabilidade celular por meio da contagem de colônias após o tratamento enzimático. Colunas representam a média de triplicatas feitas em dois experimentos distintos (n = 6) e as barras de erro são os desvios padrões. Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05. ns: não significante. **Legenda:** GH: hidrolase de glicosídeo; CTEC: coquetel enzimático; Endo: endoglucanase. .... 41
- Figura 6** - Estruturas químicas dos fotossensibilizadores. a) Curcumina. b) Photodithazine. c) NewPS. (d) Azul de Metileno. .... 46
- Figura 7** – Protocolo combinado de pré-tratamento enzimático e terapia fotodinâmica. .... 48
- Figura 8** – Teste de viabilidade celular após tratamento fotodinâmico utilizando PDZ, NPS, Curc e AM contra bactérias planctônicas de *P. aeruginosa*. a) IFD mediada por PDZ e NPS em duas concentrações diferentes. b) IFD mediada por Curc e AM em concentrações de 5 a 100 uM. Colunas representam a média de triplicatas feitas em dois experimentos distintos (n = 6) e as barras de erro são os desvios padrões. Nível de significância estatística equivalente a  $\alpha = 0,05$ . ns: não significante. **Legenda:** PDZ: Photodithazine; NPS: NewPS; Curc: Curcumina; AM: Azul de metileno..... 51
- Figura 9** – Teste de viabilidade celular após ação fotodinâmica utilizando Curc, PDZ, NPS e AM contra biofilmes de *P. aeruginosa*. Colunas representam a média de triplicatas feitas em dois experimentos distintos (n = 6) e as barras de erro são os desvios padrões. Nível de significância estatística equivalente a  $p = 0,05$ . **Legenda:** Curc: Curcumina; PDZ: Photodithazine; AM: Azul de metileno..... 53
- Figura 10** – Pré-tratamento enzimático seguido da ação fotodinâmica contra biofilme de *P. aeruginosa*. (a) Teste de viabilidade celular do biofilme bacteriano de *P. aeruginosa* após ação enzimática combinada com a ação fotodinâmica. (b) Teste de viabilidade celular do biofilme de *P. aeruginosa* após ação combinada com CTEC como enzimas e Curc, AM e MBne como fotossensibilizadores. Colunas representam a média de triplicatas feitas em dois experimentos distintos (n = 6) e as barras de erro são os desvios

padrões. Nível de significância estatística equivalente a  $\alpha = 0,05$ . Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05. **Legenda:** Endo: endoglucanase; CTEC: coquetel enzimático; Curc: Curcumina; E: Enzima; AM: azul de metileno; MBne: nanoemulsão de azul de metileno; ns: não significante..... 59

**Figura 11** – Fotoinativação do biofilme de *P. aeruginosa* utilizando AM a 20  $\mu\text{M}$  com ou sem KI a 100 mM. Todos os grupos IFD foram irradiados por um dispositivo LED (*Biotable*) de 660 nm ( $50 \text{ mW/cm}^2$ ) durante 20 min e dose final de  $60 \text{ J/cm}^2$ . Colunas representam a média de triplicatas feitas em três experimentos distintos ( $n = 9$ ) e as barras de erro são os desvios padrões. Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05. **Legenda:** IFD: inativação fotodinâmica; AM: azul de metileno; SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*; KI: iodeto de potássio; S: SDS+KI; E: Enzima; LED: *Light Emitting Diode*;..... 64

**Figura 12** – Fotoinativação do biofilme de *P. aeruginosa* utilizando MBne a 20  $\mu\text{M}$  com ou sem KI a 100 mM. Todos os grupos IFD foram irradiados por um dispositivo LED (*Biotable*) de 660 nm ( $50 \text{ mW/cm}^2$ ) durante 20 min e dose final de  $60 \text{ J/cm}^2$ . Colunas representam a média de triplicatas feitas em três experimentos distintos ( $n = 9$ ) e as barras de erro são os desvios padrões. Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05. **Legenda:** IFD: inativação fotodinâmica; MBne: nanoemulsão de azul de metileno; SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*; KI: iodeto de potássio; S: SDS+KI; E: Enzima; LED: *Light Emitting Diode*; ..... 65

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Componentes e funções da EPS em biofilme de P. aeruginosa.</i> .....	26
<i>Tabela 2 - Classes enzimáticas e suas funções.</i> .....	31
<i>Tabela 3 - Proteases.</i> .....	32
<i>Tabela 4 - DNase.</i> .....	32
<i>Tabela 5 - Hidrolases de glicosídeos.</i> .....	33
<i>Tabela 6 - Enzimas utilizadas e suas propriedades.</i> .....	38
<i>Tabela 7 - Fotossensibilizadores e parâmetros nas bactérias planctônicas de P. aeruginosa.</i> .....	47
<i>Tabela 8 - Fotossensibilizadores utilizadas e seus parâmetros para biofilmes.</i> .....	49
<i>Tabela 9 - Grupos amostrais utilizados para ambos os fotossensibilizadores AM e MBne. ...</i>	61



## SUMÁRIO

<b><u>1</u></b>	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b>	<b>17</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>CONCEITOS FUNDAMENTAIS</u></b>	<b>23</b>
2.1	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	23
2.2	BIOFILMES BACTERIANOS E OS DESAFIOS ENVOLVIDOS	23
2.3	INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA (IFD)	28
2.4	ENZIMAS	30
2.5	SAIS INORGÂNICOS	33
<b><u>3</u></b>	<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b>35</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3.2.1	PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO	35
3.2.2	INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA (IFD)	35
3.2.3	IFD COM ADIÇÃO DE IODETO DE POTÁSSIO (KI)	35
<b><u>4</u></b>	<b><u>ENZIMAS</u></b>	<b>37</b>
4.1	METODOLOGIA	37
4.1.1	MICROORGANISMO	37
4.1.2	SELEÇÃO ENZIMÁTICA	37
4.1.3	CRESCIMENTO DO BIOFILME	38
4.1.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ENZIMÁTICOS SOBRE O BIOFILME DE <i>P. AERUGINOSA</i>	39
4.1.4.1	Quantificação da biomassa total	39
4.1.4.2	Viabilidade celular	40
4.1.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.3	CONCLUSÃO PARCIAL	44
<b><u>5</u></b>	<b><u>TERAPIA FOTODINÂMICA</u></b>	<b>45</b>
5.1	METODOLOGIA	45
5.1.1	SELEÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES	45
5.1.2	BACTÉRIAS PLANCTÔNICAS	47

5.1.2.1	Crescimento bacteriano	47
5.1.2.2	Inativação Fotodinâmica	47
5.1.3	BIOFILME BACTERIANO	48
5.1.3.1	Crescimento do biofilme	48
5.1.3.2	Inativação Fotodinâmica (IFD) em biofilme	48
5.1.4	VIABILIDADE CELULAR	49
5.1.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
<b>5.2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
5.2.1	SELEÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES - BACTÉRIAS PLANCTÔNICAS	50
5.2.2	SELEÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES - BIOFILME MADURO	52
<b>5.3</b>	<b>CONCLUSÃO PARCIAL</b>	<b>55</b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO E TRATAMENTO COM IFD</u></b>	<b><u>57</u></b>
<b>6.1</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>57</b>
6.1.1	CRESCIMENTO E TRATAMENTO DO BIOFILME	57
6.1.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
<b>6.2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>6.3</b>	<b>CONCLUSÃO PARCIAL</b>	<b>60</b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>IFD COM ADIÇÃO DE IODETO DE POTÁSSIO</u></b>	<b><u>61</u></b>
<b>7.1</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>61</b>
7.1.1	CRESCIMENTO E TRATAMENTO DO BIOFILME	61
7.1.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
<b>7.2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
7.2.1	ESTRATÉGIAS COMBINADAS UTILIZANDO O AZUL DE METILENO (AM) E SUA CONSTRUÇÃO EM UMA NANOEMULSÃO DE AZUL DE METILENO (MBNE)	62
7.2.2	MECANISMO DE DISSOCIAÇÃO DO KI EM CONJUNTO COM A IFD	66
<b>7.3</b>	<b>CONCLUSÃO PARCIAL</b>	<b>69</b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>		<b><u>73</u></b>

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias são microrganismos unicelulares que podem ser encontradas em praticamente todo habitat. Elas coexistem com animais e plantas mantendo uma relação simbiótica e parasitária. (1) Apesar de a maioria das bactérias serem benéficas aos indivíduos, outra porção são patógenos oportunistas que podem causar infecções ou doenças. (2) As bactérias podem ser encontradas de forma livre no meio chamadas de planctônicas; ou aderidas a uma superfície e vivendo em comunidade chamadas de biofilme. (3-4) Apesar do tipo de organização, ambas possuem a capacidade de desenvolver infecções ou doenças nos seres humanos, animais ou plantas. Em cerca de 65% das infecções humanas, os microrganismos causadores estão presentes na forma de biofilme.

Infecções bacterianas são causadas por uma porção de patógenos que invadem os tecidos de um organismo e podem causar doenças infecciosas no hospedeiro, caso o sistema imunológico não seja capaz de combater essa invasão. Nos Estados Unidos, anualmente, cerca de 6,5 milhões de feridas crônicas custam ao sistema de saúde mais de US\$ 50 bilhões, sendo que cerca de 9-12 milhões de americanos são acometidos por essa condição. (5) Um levantamento na Europa mostrou que cerca de 7 bilhões de Euros são destinados para infecções bacterianas por ano. (6) Já no Brasil, o custo diário de pacientes com Infecção Relacionada à Assistência a Saúde (IRAS) foi 55% superior ao de um paciente sem IRAS, o que sugere que anualmente o sistema de saúde gasta pelo menos o dobro do valor em relação aos pacientes que não possuem infecções bacterianas. (7) Os fatores cruciais para o desenvolvimento de infecções e doenças bacterianas são: infectividade de um microrganismo, que está relacionado com a quantidade de indivíduos infectados comparados com a quantidade de indivíduos que foram sujeitos ou expostos; patogenicidade que é o potencial de um microrganismo causar doenças; e, por fim, a virulência que são os fatores expressos pelos microrganismos que os auxiliam na invasão e crescimento no hospedeiro e, conseqüentemente, o estabelecimento e desenvolvimento da infecção. (2-3) Bactérias patogênicas correspondem a uma parcela bem pequena em relação ao montante de bactérias existentes. (2) Algumas delas listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como patógenos prioritários para pesquisar e desenvolver novos antibióticos ou formas de se combater essas bactérias, são elas: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* (prioridade crítica); *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonellae*, *Neisseria gonorrhoeae* (prioridade alta); e, com prioridade média, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella spp.* (8)

Com base no nível de prioridade expresso pela OMS, uma bactéria que frequentemente causa infecções em humanos é a bactéria *P. aeruginosa* que possui uma alta capacidade adaptativa de seu genoma, complexos mecanismos de resistência antimicrobiano e elevados custos para os tratamentos, tornando-se um grave problema de saúde pública global. (8) A resistência antimicrobiana ocorre naturalmente, no entanto o uso indevido de antibióticos pode acelerar esse processo. A resistência é a característica dos microrganismos de resistir aos efeitos destrutivos dos medicamentos, essa característica pode ser adquirida de forma natural devido aos processos de seleção natural ou acelerado pelo uso indevido e exacerbado dos antimicrobianos descobertos. Uma outra característica bastante comum entre as bactérias é a tolerância que esses microrganismos possuem, o que significa que um determinado microrganismo é mais tolerante que outro, devido a sua pouca resposta quando submetidos a um determinado medicamento. (9) Além disso, a formação e estabelecimento de biofilmes bacterianos, um poderoso fator de virulência, aumenta a tolerância aos diversos tratamentos, impulsionando em mais de 1000 vezes a resistência antimicrobiana da bactéria quando em biofilme em comparação à forma planctônica. (10)

Os biofilmes são comunidades microbianas sésseis que crescem aderidos a uma superfície envolvida por uma matriz extracelular auto-secretada que possibilita os microrganismos sobreviverem em condições adversas (11-12) Uma vez que os microrganismos estão inseridos em uma matriz extracelular, esta dificulta a permeabilidade dos agentes antimicrobianos, como antibióticos e toxinas, gerando um enorme desafio para o controle bacteriano. (11,13-16) Estima-se que a formação de biofilmes tenha uma influência em mais de 90% das infecções crônicas. (17) A bactéria *P. aeruginosa* é conhecida por formar biofilmes espessos e de difícil controle o que a torna um excelente modelo para estudar formas de tratamentos alternativos relevantes para atuar em paralelo ou ser alternativa à antibioticoterapia. (17-18) A bactéria *P. aeruginosa* coloniza efetivamente uma variedade de superfícies, como materiais médicos, cateteres urinários, implantes, lentes de contato, equipamentos da indústria alimentícia (tanques de mistura, cubas e tubos). (17) Portanto, entender a maquinaria por trás dos processos que envolvem a formação de biofilmes é fundamental para se desenvolver estratégias terapêuticas eficazes para erradicar as infecções associadas aos biofilmes.

Desde a descoberta da penicilina e o desenvolvimento de diversas moléculas com ação antimicrobiana, o tratamento com antibióticos é a principal opção terapêutica para as doenças infecciosas. No entanto, em decorrência do mecanismo de ação dos antibióticos ser baseado em alta especificidade para um sítio biológico ou reação metabólica, a seleção de bactérias resistentes e o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (AMR, do inglês *Antimicrobial*

*Resistance*) são respostas decorrentes da antibioticoterapia. As infecções causadas por microrganismos resistentes constituem um grande problema de saúde mundial, associado a altos números de mortes e de perdas econômicas. Em um relatório de 2017, a Organização das Nações Unidas, apresentou uma alarmante previsão de cerca de 10 milhões de mortes anuais decorrentes de consequências da AMR até 2050, caso medidas urgentes não sejam tomadas. (19) Com a pandemia de COVID-19 e o amplo uso de antibióticos que vivenciamos desde 2020, o cenário previsto foi antecipado em uma década, tornando ainda mais urgente as ações indicadas no relatório.

A Inativação Fotodinâmica (IFD) é uma técnica bastante conhecida e largamente estudada há mais de um século. (20) Desde a sua descoberta em 1900 por Oskar Raab and Hermann von Tappeiner, que observou a inativação de certos tipos de *Paramecium spp.* - espécies de protozoários ciliados - por meio da ação do laranja de acridina que, após iluminação, apresenta fatores antimicrobianos. (20-22) Outros experimentos foram surgindo combinando diferentes reagentes e luz para diversas aplicações, tais reagentes são chamados de fotossensibilizadores (FS) nos tempos atuais, os quais são excitados por um comprimento de onda específico e na presença do oxigênio molecular produz espécies reativas de oxigênio (EROs) que degradam as diversas biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, são portanto tóxicas para diversos tipos de células como bactérias, vírus, fungos e protozoários. (20,23) Na década de 1940, muitos estudos envolvendo IFD foram esquecidos após a descoberta da penicilina, no entanto, estudos posteriores observados por Lipson e colaboradores (25) mostraram que o uso de um derivado de hematoporfirina (HPD, do inglês *haematoporphyrin derivative*) acumulava-se em tumores e emitia fluorescência. Por volta de 1990, notou-se uma diferença entre os FS antimicrobianos de amplo espectro e os compostos que eram específicos em matar células cancerígenas. Os FS anticancerígenos são compostos altamente ativos com estruturas neutras ou aniônicas com certo grau de hidrofobicidade, já os FS antimicrobianos também são compostos altamente ativos, porém mais solúveis em água e com estruturas catiônicas mais proeminentes. (31-32) De acordo com todos esses relatos, a IFD se tornou uma nova alternativa terapêutica não-invasiva com alto potencial antimicrobiano.

Apesar da ação fotodinâmica não ter um sítio biológico específico, ela promove a inativação dos diversos tipos de microrganismos. As bactérias Gram-negativas, no geral, tendem a ser mais resistentes à IFD, visto que a estrutura da membrana desse tipo de bactéria é mais complexa e variada, possuindo membrana externa composta por uma bicamada constituída por fosfolipídios e lipopolissacarídeos, carregada negativamente, o que a torna pouco permeável à moléculas pequenas, dificultando a difusão do fotossensibilizador, sendo

apontada como a principal causa da baixa resposta ao processo fotoquímico. (33-34) Já no caso de biofilmes formados por bactérias Gram-negativas, além dos mecanismos intrínsecos de defesa e alta complexidade, a dificuldade para inativar esses microrganismos aumenta de forma drástica devido a produção de uma matriz extracelular composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), dessa forma, a permeabilidade de fármacos como os FSs através da matriz extracelular e das membranas bacterianas é cada vez menor. (35)

Uma alternativa terapêutica bastante estudada para abordar o problema das infecções causadas por biofilme é o uso de enzimas que pode ser utilizado tanto para prevenir a formação de biofilmes, atuando na fase de adesão dos mesmos impossibilitando a formação de qualquer tipo de infecção, quanto para dispersar a matriz extracelular de biofilmes maduros que protege e confere resistência a esses microrganismos, por meio da hidrólise das ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos. (36-40) Para cada fase de crescimento do biofilme, é possível utilizar certas classes de enzimas apropriadas para atuar naquele estágio de desenvolvimento. Por exemplo, algumas delas possuem maior efeito nas fases iniciais de adesão do biofilme, como é o caso das DNases e hidrolases de glicosídeos (GHs). (3) Adicionalmente, para os biofilmes maduros com a finalidade de erradicar uma infecção, pode-se utilizar as proteases, como a desoxirribonuclease e outras classes de hidrolases de glicosídeos (GHs), para comprometer a matriz extracelular e dispersar as bactérias susceptíveis às terapias convencionais no meio, ou seja, tornando-as planctônicas e não aderidas e protegidas. (13,41) Esta abordagem sobre os biofilmes maduros é comumente associada com antibióticos, uma vez que, após a dispersão das células, seja aplicado um agente antimicrobiano capaz de inativar as células planctônicas. (42) No entanto, o uso desenfreado e indevido de antibióticos necessita de formas alternativas de tratamento para minimizar a seletividade de bactérias resistentes. (18, 43-45) Uma alternativa ao uso de antibióticos bastante estudada e que não há relatos de desenvolvimento de resistência antimicrobiana é a terapia fotodinâmica. (46-47) Dessa forma, uma possibilidade de tratamento combinado seria utilizar um pré-tratamento enzimático seguido da ação fotodinâmica que, em teoria, irá comprometer a matriz extracelular e permitir que os fotossensibilizadores penetrem nos biofilmes, para então, alcançar as células bacterianas e inativá-las, eliminando a infecção e impossibilitando também outras formas de (re)colonização. (23,33-34,48)

Além da utilização de enzimas que podem auxiliar no aumento da efetividade fotodinâmica, outra estratégia utilizada é a adição de sais inorgânicos ao fotossensibilizador. Daniela Vecchio e colaboradores publicaram um estudo relevante utilizando IFD com adição de um sal inorgânico chamado iodeto de potássio (KI) e mostrou um efeito sinérgico dessa

combinação tanto em testes *in vitro*, quanto *in vivo* na morte de culturas bacterianas após adição desse sal. (49) Michael Hamblin investigou o efeito de outros sais inorgânicos (azida de sódio, iodeto de potássio, brometo de potássio, tiocianato) associados à IFD e observou que há um aumento significativo da morte celular bacteriana na presença desses aditivos, no entanto, alguns possuem certas limitações como toxicidade, menor oxidação, eficiência moderada e, por fim, concluiu que dentre os sais avaliados, o iodeto de potássio apresentou maior eficiência e nenhuma toxicidade com células de mamíferos. (31) Com base nos relatos apresentados, uma possível alternativa para tratamento de biofilmes bacterianos seria adicionar iodeto de potássio juntamente com os FSs para potencializar o efeito da IFD, além disso há a possibilidade da utilização de um pré-tratamento enzimático para facilitar o processo de penetração do FSs.

Para melhor compreensão os tratamentos utilizados foram divididos em Capítulos, sendo eles: Capítulo 4 - ENZIMAS; Capítulo 5 - TERAPIA FOTODINÂMICA; Capítulo 6 e 7 – TRATAMENTOS COMBINADOS. Todos os Capítulos possuem informações únicas e respectivas de cada Capítulo e, conseqüentemente, as contribuições finais visa interligar e finalizar as conclusões parciais obtidas dos Capítulos anteriores.



## 2 CONCEITOS FUNDAMENTAIS

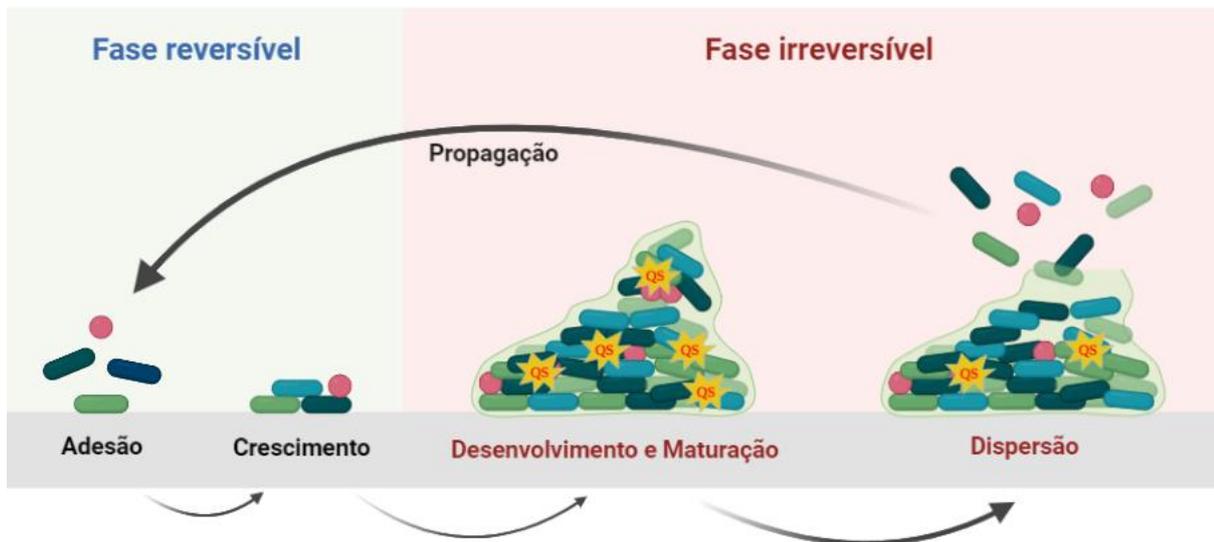
### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *P. aeruginosa* pode ser encontrada comumente no ambiente, como no solo e na água. É uma bactéria Gram-negativa, patógeno oportunista que pode causar infecções nosocomiais, nas vias aéreas, trato urinário, feridas e queimaduras, no sangue (sepse) e nos pulmões (pneumonia associada à ventilação). (17) Apresenta-se em forma de bastonete, possui mecanismos de resistência avançados e podem causar doenças em plantas, animais e principalmente, em humanos. Em 2017, esta bactéria foi reconhecida pela OMS como um dos patógenos prioritários para se pesquisar e desenvolver novos antibióticos, pois além de desenvolverem resistência aos agentes antimicrobianos, são capazes de formar biofilmes. (8, 17,50)

### 2.2 Biofilmes bacterianos e os desafios envolvidos

O processo de formação do biofilme bacteriano é um processo de múltiplos estágios e dinâmico que está intimamente associado à sobrevivência desses microrganismos. Na natureza a maioria das bactérias pode aderir a uma superfície e formar biofilmes, sendo que esse processo se inicia com a adesão de bactérias a uma superfície (biótica ou abiótica), seguido pelo seu crescimento, acúmulo de matriz extracelular, maturação e, finalizando o ciclo, com a dispersão de células para a colonização de superfícies vizinhas (*Figura 1*). (43) Esta matriz extracelular polimérica produzida é altamente complexa e organizada, que confere proteção e resistência físico-química, impedindo a permeabilidade de agentes antimicrobianos dentro deste microambiente. (48,51-52) A composição e características da matriz variam de acordo com as espécies microbianas que compõem o biofilme, entretanto, no geral, a matriz é formada por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), na qual é composta de biomoléculas, exopolissacarídeos, polipeptídeos, eDNA e proteínas. (51,53–55) A matriz extracelular atua basicamente como uma barreira física dificultando a permeabilização e a circulação de agentes antimicrobianos por causa da presença de polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (eDNA). (51) Adicionalmente, condições críticas de baixo nível de oxigênio e escassez de nutrientes no interior do biofilme reduzem o metabolismo das células microbianas, conduzindo-as para o crescimento estacionário, condição que restringe a ação antimicrobiana. (56) E, por

fim, a presença de DNA extracelular e a presença de enzimas como beta-lactamases também são fatores que contribuem para a tolerância e sobrevivência dos biofilmes contra os agentes antimicrobianos. (57) Adicionalmente, há a desprendimento de uma parcela dos microrganismos desta comunidade, que possibilita a adesão de células em superfícies vizinhas, ocasionando assim, o estabelecimento da infecção em outros locais (41,54,58)



**Figura 1** – Formação do biofilme de *P. aeruginosa*. **Legenda:** QS (*Quorum Sensing*): comunicação célula-célula.

**Fonte:** Elaborada pelo autor utilizando o software *Biorender*.

Além da presença da matriz extracelular, outra característica dos biofilmes bacterianos é o mecanismo de *Quorum Sensing* (QS), que é a capacidade de comunicação entre as células, presente em muitas bactérias. As bactérias do biofilme, ao detectarem o aumento da densidade populacional local, respondem a este estímulo ativando a expressão gênica que coordena uma série de fatores de virulência, motilidade e formação de biofilmes. (55,59) As moléculas de QS são diferentes entre as bactérias Gram-negativas e positivas, além de ativarem processos específicos para cada bactéria.

A maioria das bactérias Gram-negativas obedecem ao mecanismo já caracterizado da bactéria *Vibrio fischeri*, no qual possuem cinco genes estruturais da luciferase (*luxCDABE*) e dois genes reguladores (*LuxI* e *LuxR*) que coordenam o circuito de QS necessário para emissão de luz. *LuxI* produz a molécula sinalizadora lactona homoserina (HSLs) que atua como autoindutora. *LuxR* se liga aos autoindutores que atingiram uma concentração limite crítica devido ao aumento da densidade populacional, e o complexo *LuxR*-autoindutor se liga ao promotor e ativa a transcrição de *luxCDABE* ou de outros genes alvos. O complexo *LuxR*-

autoindutor também se liga ao promotor luxR para reprimir a transcrição de luxR. Com esse mecanismo de QS as bactérias Gram-negativas conseguem expressar os genes de interesse devido às flutuações na densidade da população bacteriana. Algumas das bactérias que utilizam o sistema de QS do tipo LuxI/LuxR, mas com suas particularidades são: *Vibrio fischeri*, *P. aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, entre outras. (59-60)

No caso da bactéria *P. aeruginosa* existem dois mecanismos principais de QS que controlam a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilmes que são os sistemas LasI/LasR e RhII/RhlR, homólogos aos pares LuxI/LuxR já descritos e presentes na maioria das bactérias Gram-negativas. Neste caso, LasI e RhII são os autoindutores que catalisam a formação das moléculas de sinalização homoserina lactona N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona e N-(butiril)-homoserina lactona, respectivamente. Já as proteínas LasR e RhlR se ligam aos autoindutores dependentes de LasI e RhII após um limiar crítico da concentração de moléculas sinalizadoras (alta densidade celular). O complexo LasR-autoindutor se liga a uma variedade de promotores do fator de virulência e estimula a transcrição, além de induzir a transcrição de RhlR, para iniciar o segundo circuito de QS. A formação do complexo RhlR-autoindutor ativa a transcrição de um subconjunto de genes de virulência, assim como vários genes alvos que não são regulados pelo primeiro circuito (formação do complexo LasR-autoindutor). O primeiro circuito induz a expressão de RhlR dando início a segunda cascata de sinalização. Além disso a ativação de RhlR é regulada pelo aumento da expressão do autoindutor LasI, controlando que o primeiro circuito seja mais frequente que o segundo circuito de detecção de quorum da *P. aeruginosa*. (59-60) Baixas concentrações de oxigênio e escassez de nutrientes no interior do biofilme reduzem a atividade metabólica das células bacterianas, conduzindo-as ao crescimento estacionário o que pode restringir a atividade antibacteriana de certos fármacos. Além disso, a penetração limitada de certos antibióticos, a ação de componentes da matriz extracelular e a presença de enzimas como  $\beta$ -lactamase dentro do biofilme também são apontados como fatores que contribuem para a resiliência de biofilmes frente à ação de antimicrobianos. (44) Devido a esse complexo sistema presente nas bactérias, torna-se um grande desafio a busca e o desenvolvimento de terapias alternativas para combater os biofilmes bacterianos.

Uma das barreiras principais para ser enfrentada é a composição e estrutura do EPS que pode variar bastante dependendo dos microrganismos, tensão de cisalhamento local, disponibilidade de nutrientes/substratos e ambiente do hospedeiro. (61) A síntese de EPS e a organização espacial também diferem entre comunidades microbianas monoespécies e

multiespécies. No caso da *P. aeruginosa*, algumas características importantes podem ser visualizadas na *Tabela 1*.

**Tabela 1** - Componentes e funções da EPS em biofilme de *P. aeruginosa*.

Biomoléculas	Componentes	Localização	Função
Polissacarídeos	Psl	Extracelular / associado a célula	Adesão, estruturação, estabilidade, proteção contra resposta imune, interação célula-célula
	Pel	Extracelular / associado a célula	Adesão, estruturação, estabilidade, interação célula-célula, proteção contra antibióticos
	Alginato	Extracelular	Adesão, estruturação, retenção de nutrientes/água, proteção contra adversidades do ambiente/resposta imune/ antimicrobianos
Proteínas	Pilinas Tipo 4	Extracelular / associado a célula	Adesão, estruturação, contração de motilidade, sensoriamento mecânico
	Lectinas (LecA/LecB)	Extracelular	Adesão, interação célula-célula, estabilidade, citotoxina
Ácidos Nucleicos	eDNA	Extracelular	Adesão, estruturação, coesão, fonte de nutrientes, reparação de danos no DNA, transferência de genes, interação com outros componentes da matriz
Lipopolissacarídeos	LPS (endotoxina)	Extracelular / associado a célula	Adesão, colonização e invasão de hospedeiros, ativação de resposta imune

**Fonte:** Adaptada de KARYGIANNI. (61)

Sendo que todos estes componentes podem ser encontrados associados à superfície celular quanto secretados extracelularmente. Todos os componentes presentes na EPS auxiliam na adesão e estruturação do biofilme em superfícies adversas, onde alguns componentes contribuem para funções específicas dentro do biofilme, como por exemplo os exopolissacarídeos bacterianos secretados (proteínas, eDNA e eRNA) auxiliam na estruturação e funcionalidade da matriz. Já as proteínas e glicoproteínas do hospedeiro contribuem para a estrutura da matriz e auxiliam na fixação microbiana enquanto servem de fonte de nutrientes microbianos. Além disso, a matriz extracelular confere resistência, proteção contra agentes externos, retenção de nutrientes, interação célula-célula, entre outras funções para o biofilme bacteriano. (61)

Para cada estágio de formação do biofilme há diferentes métodos para se combater este tipo de infecção. Durante os estágios iniciais de adesão e crescimento de biofilmes bacterianos as células se encontram em formas planctônicas que são mais sensíveis aos diversos antimicrobianos, caso elas sejam sensíveis a ação deles. Já para as formas sésseis que estão

aderidas, possuem uma comunidade complexa e alta densidade populacional, algumas abordagens de tratamentos já não são mais viáveis, necessitando de novas estratégias anti-biofilmes. Seguindo os estágios de crescimento de biofilmes bacterianos, o método mais comumente utilizado para se combater as formas planctônicas e sensíveis são os antibióticos de diversas classes, sejam eles específicos ou de amplo espectro. No entanto, existem limitações no uso desses inúmeros antibióticos para bactérias resistentes e biofilmes bacterianos. Para se combater essas limitações, uma estratégia atrativa e que vem ganhando relevância é o uso de enzimas capazes de atuar tanto nas membranas celulares quanto na matriz extracelular do biofilme comprometendo essas estruturas ou dispersando as células presentes no biofilme. (37-38,45,62-63) Há estudos que se concentram na digestão direta da matriz extracelular sem tratamentos conjuntos, como é o caso da utilização da desoxirribonuclease (DNase) para digestão enzimática de eDNA que é um importante componente da matriz. (64) Assim como há estudos que se concentram em tratamentos combinados envolvendo coquetéis enzimáticos, associados a ação de antibióticos contra co-culturas de biofilmes reportado por Fanaei e colaboradores. (39-40)

Segundo Tosato e colaboradores, o uso de azul de metileno (2,5, 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) associado ao Cap (100  $\mu\text{M}$ ) contra biofilmes maduros de *K. pneumoniae* ( $\sim 10^6$  UFC/mL) após uma dose final de irradiação de 14,88 J/cm<sup>2</sup> resultou em reduções gradualmente aumentadas conforme aumenta as concentrações do FS. Ou seja, utilizando uma concentração de 10  $\mu\text{M}$  de azul de metileno e 100  $\mu\text{M}$  de Cap observou-se uma erradicação total dos biofilmes de *K. pneumoniae*. (65)

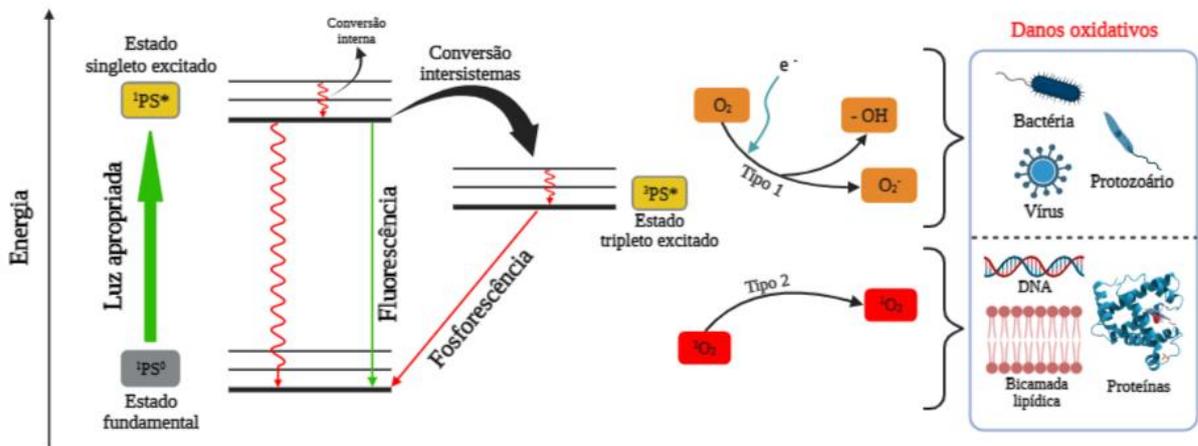
Conforme Han e colaboradores que investigaram a ação de enzimas encapsuladas em copolímeros sintéticos contra biofilmes de *P. aeruginosa* utilizando 125  $\mu\text{M}$  de nanopartículas de um copolímero sintético poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) carregadas com rodamina 6G (Rho-PLGA) para visualização da interação entre as nanopartículas com os biofilmes. As imagens, bem como a excitação e emissão de luz foram feitas através do microscópio de varredura a laser confocal e as contagens e determinação da dispersão e não-dispersão dos biofilmes foram avaliados utilizando o software Leica TCS SP5 confocal. De acordo com esse estudo, a utilização de enzimas (pyruvate dehydrogenase) nano-encapsuladas em diferentes concentrações promoveram a dispersão de 66 % dos biofilmes totais nas melhores condições. (66) Essas combinações citadas vem sendo bastante estudadas e contribuem para a associação de enzimas e terapia fotodinâmica (40,65-66), como alternativa terapêutica para o uso exacerbado dos antibióticos e superar o grave problema de seleção das bactérias resistentes que esses fármacos trazem consigo. (46-47,67)

Outros estudos se concentram em tratamentos profiláticos, que previnem e inibem a formação de biofilmes antes do processo de maturação. (22,37,60,68-69) No entanto, o tratamento de biofilme já estabelecido é um desafio para os profissionais da saúde, uma vez que as estratégias terapêuticas disponíveis atualmente mostram-se incapazes de inativar completamente os biofilmes, sendo o biofilme uma condição clínica mais relevante. Desta forma, torna-se necessária a busca e o desenvolvimento de novas estratégias anti-biofilmes para os diversos estágios de desenvolvimento. Poucos são os agentes antimicrobianos que conseguem exercer um papel adequado para prevenir e/ou interromper biofilmes maduros, sendo que a concentração bactericida mínima eficaz de antibióticos para a erradicação do biofilme maduro *in vitro* é impossível de alcançar sem causar efeitos adversos e alterações renais ou hepáticas, além de apresentarem algumas desvantagens, como tempo de incubação longo, baixa especificidade para as estruturas do biofilme e efetividade variada entre os microrganismos. (15,70-72) Os biofilmes podem se estabelecer em diversos locais e gerar complicações, e um dos problemas atuais é a sua formação em ambientes industriais e dispositivos médicos. (11) Esses locais susceptíveis ao crescimento e proliferação de biofilmes são possíveis alvos de estudos para erradicação e dispersão dessa formação microbiana.

### **2.3 Inativação Fotodinâmica (IFD)**

O princípio fundamental da terapia fotodinâmica (TFD) se baseia na combinação de três componentes: uma molécula fotossensível que não seja tóxica para o microambiente a ser inserida e não cause interferência no metabolismo celular dependendo tanto da concentração quanto do tempo de incubação desses FSs; luz no comprimento de onda adequado para excitação do FS; e oxigênio molecular para transferência de elétrons e/ou energia, como podemos ver no diagrama de Jablonski (*Figura 2*). Há dois tipos de mecanismo gerados da reação fotodinâmica, sendo que a fase inicial é similar entre elas. Começando com o FS no estado singlete fundamental ( $S_0$ ), após essa molécula estar alojada no interior das células bacterianas há irradiação de luz no comprimento de onda adequado para entregar energia suficiente ao FS e atingir o estado singlete excitado ( $S_1$ ) que pode passar por um processo de relaxamento decaindo em cada nível vibracional da molécula e sofrer dois tipos de conversões: o primeiro seria emitir fluorescência ou calor via conversão interna e retornar para o  $S_0$ ; e o segundo seria sofrer uma mudança entre estados quânticos fazendo um cruzamento inter-sistemas e passar para o estado tripleto excitado ( $T_1$ ). O FS no estado tripleto pode transferir energia e elétrons para biomoléculas ao seu entorno. Como o oxigênio presente no interior das

células está no mesmo estado tripleto na sua forma molecular a interação entre essas duas moléculas gera dois tipos de reações: por meio da transferência de elétrons (Tipo 1) e/ou por meio da transferência de energia (Tipo 2). A reação do Tipo 1 gera radicais livres e radicais aniônicos que interagem com o oxigênio e produzem EROs, tais espécies são responsáveis por produzir estresse oxidativo no ambiente celular e resultar na morte de células bacterianas e cancerígenas. A reação do Tipo 2 é caracterizada pela transferência de energia entre o FS e o oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), ambos no mesmo estado quântico, que produz majoritariamente uma espécie altamente tóxica chamada de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), capaz de destruir biomoléculas fundamentais para sobrevivência celular como DNA, lipídeos e proteínas. (23,73)



**Figura 2** – Ilustração esquemática do diagrama de Jablonski mostrando o mecanismo de ação da IFD contra as biomoléculas e os microrganismos em geral.(73)

**Fonte:** Elaborada pelo autor utilizando o software *Biorender*.

O acúmulo dos FSs é um dos fatores cruciais para a eficiência da IFD, no entanto, para cada tipo de bactéria seja Gram-negativa ou Gram-positiva esse acúmulo no interior celular é variado, devido a complexidade de cada tipo celular. Basicamente o acúmulo dos FSs podem ocorrer em três regiões celulares: ação externa, ação intracelular e transporte ativo. Entretanto, esses três caminhos são capazes de romper a membrana e causar inativação celular. A interação dos FSs com as membranas está relacionada com a permeabilidade que cada membrana possui, sendo que para as bactérias Gram-positivas, há uma maior quantidade de peptídeoglicano, baixa quantidade de lipopolissacarídeos e sua complexidade não é tão alta quanto as bactérias Gram-negativas, além dessa expressiva quantidade de lipopolissacarídeos há uma quantidade grande de proteínas transmembranas que podem atuar como bombas de efluxo expulsando os FSs que conseguiram adentrar no meio intracelular. No entanto, alguns FSs são desenvolvidos para

penetrar esses obstáculos presentes nas bactérias Gram-negativas e se manter no meio intracelular, que seria a região que mais sofreria danos oxidativos devido a IFD devido a produção de EROs e, principalmente, dos oxigênios singletos. (74)

Atualmente, a curcumina, que é um componente ativo da *Curcuma longa*, um rizoma pertencente à família das Zingiberaceae e conhecida popularmente por açafrão-da-Índia, tem sido utilizada com sucesso como fotossensibilizador em IFD. Composto polifenólico em pó de pigmento amarelo-alaranjado que ao ser solubilizado é capaz de absorver luz azul na faixa espectral de 405 - 435 nm, cuja interação com a luz, ocorre em um curto intervalo de tempo, propiciando um rápido efeito fototóxico às biomoléculas de células-alvo. O Photodithazine (PDZ) é produzido a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*, cuja estrutura foi modificada através da adição de N-metil-D-glicosamina 0,5 % como agente solubilizante e estabilizante, tem o custo baixo pois é encontrado em grandes quantidades. As propriedades fototóxicas do PDZ são bastante eficazes e podem estar relacionadas com a sua alta capacidade de penetrar nas células através das membranas biológicas. O azul de metileno (AM) é um composto pertencente à família das fenotiazinas que possui, em solução aquosa, duas bandas principais de absorção na região visível do espectro eletromagnético, uma banda referente ao componente monomérico (660 nm) e outra da sua forma dimerizada (610 nm). (75) Dentre as duas formas citadas, sabe-se que os monômeros de AM são mais efetivos, quando aplicados em tratamentos médicos, em relação a seu dímero. Esse corante apresenta diversas características favoráveis ao efeito fotodinâmico, considerado seguro para as aplicações da IFD *in vitro* e *in vivo*, visto que sua utilização é consagrada em diversos procedimentos na área médica. É importante salientar também que a fotoinativação de bactérias, parasitas e fungos com o AM pode ser realizada de forma seletiva quando comparada às células epiteliais. (75)

## 2.4 Enzimas

Todas as enzimas são proteínas, com exceção de algumas moléculas de RNA catalítico, sua atividade depende de sua conformação nativa. As enzimas são classificadas de acordo com as reações que elas catalisam (Tabela 2) além de possuírem um número de identificação de acordo com a Comissão de Enzimas (EC, do inglês *Enzyme Commission*). As enzimas atuam acelerando a velocidade das reações biológicas, geralmente atuam em pH neutro, temperaturas amenas e ambiente aquoso. Para que o substrato seja convertido em produto é necessária uma quantidade de energia e, as moléculas ao atingirem este nível de energia mais elevado (estado de transição), é formado um complexo instável que não pode ser detectado, e é neste estágio

que ocorrem quebras e formações de ligações químicas. A diferença de energia entre o estado fundamental e o estado de transição é denominada energia de ativação [70]. Para que haja o aumento da velocidade da reação pode-se aumentar a temperatura, concentração do substrato ou pH, alternativamente pode-se diminuir a energia de ativação com adição de um catalisador, uma enzima pode ser vista como um catalisador biológico.

**Tabela 2** - Classes enzimáticas e suas funções.

<b>Classes</b>	<b>Função</b>
Oxirredutases	Realizam transferência de elétrons
Transferases	Reações de transferência de grupos químicos
Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
Liases	Clivagem de C-C, C-O e C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis ou adição de grupos às ligações duplas
Isomerases	Transferência de grupos funcionais dentro de uma mesma molécula, produzindo seus diferentes isômeros
Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas a hidrólise de ATP ou cofatores similares

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Um ponto importante entre as funções enzimáticas é a capacidade de quebra de ligações químicas que podem ser utilizadas para degradar a matriz extracelular presente nos biofilmes bacterianos. Algumas classes enzimáticas vêm sendo testadas contra uma gama de microrganismos, a fim de encontrar um tratamento clínico efetivo e irreversível. No entanto, as classes de enzimas mais utilizadas contra *P. aeruginosa* para os tratamentos são as proteases, DNases e hidrolases de glicosídeos. (13) De acordo com a *Tabela 3*, as proteases mais empregadas em biofilmes bacterianos são as LapG, Proteinase K e Tripsina que atuam nas ligações peptídicas distribuídas em diversas regiões da matriz extracelular. Outra classe enzimática apresentada pela *Tabela 4* são as DNases que são enzimas capazes de degradar a molécula de DNA via hidrólise, além de atuar em biofilmes de diversos microrganismos. Mais uma classe enzimática capaz de atuar em biofilmes são as Hidrolases de Glicosídeos (*Tabela 5*) que clivam ligações glicosídicas presentes nos polissacarídeos e são capazes de dispersar uma ampla gama microrganismos. Dentre as classes mais empregadas, as hidrolases de glicosídeos foram selecionadas para os estudos preliminares.

**Tabela 3 - Proteases.**

<b>Proteases</b>	<b>Descrição</b>
LapG	Uma protease produzida pela <i>Pseudomonas putida</i> que atua na proteína de ligação a exopolissacarídeos presentes na membrana externa, LapA, liberando a interação presente nos biofilmes.
Proteinase K	Uma serina protease altamente reativa e estável que possui ampla clivagem de ligações peptídicas adjacentes ao grupo carboxílico de aminoácidos alifáticos e aromáticos. Atua contra os biofilmes produzidos por uma variedade de bactérias, incluindo <i>S. aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> , <i>Staphylococcus hemolyticus</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> e <i>E. coli</i> , <i>Haemophilus influenza</i> e <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> .
Tripsina	Uma serina protease pancreática que cliva peptídeos no lado carboxílico da lisina ou arginina. Atua contra biofilmes produzidos por várias espécies bacterianas, incluindo <i>P. aeruginosa</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Actinomyces radicidentis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Gardnerella vaginalis</i> .

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Tabela 4 - DNase.**

<b>DNase</b>	<b>Descrição</b>
DNase I	Uma DNase pancreática que atua no biofilme de uma ampla gama de microrganismos, incluindo <i>P. aeruginosa</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Shewanella oneidensis</i> , <i>S. hemolyticus</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>H. influenza</i> , <i>B. bacteriovorus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>C. albicans</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> .
DNase 1L2	Uma DNase humana encontrada em queratinócitos que atua nos biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> .
NucB	Uma DNase bacteriana produzida pela bactéria marinha, <i>Bacillus licheniformis</i> , que atua em biofilmes de várias espécies bacterianas, incluindo <i>B. licheniformis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Staphylococcus salivarius</i> , <i>Staphylococcus constellatus</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> , <i>Staphylococcus anginosus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Bacillus subtilis</i> .
Dornase alpha	Uma forma altamente purificada de DNase I humana recombinante (rhDNase I) atua contra os biofilmes maduros de <i>S. aureus</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Streptodornase	Uma DNase estreptocócica que atua contra os biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i> .

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Tabela 5** - Hidrolases de glicosídeos.

Hidrolases de Glicosídeos	Descrição
Alginato liase	Uma hidrolase de glicosídeo que degrada o exopolissacarídeo alginato, comum em biofilmes mucóides de <i>P. aeruginosa</i> , causando dispersão de células bacterianas e aumentando a eficácia antibiótica e fagocitose.
$\alpha$ -amilase	Uma hidrolase de glicosídeo que hidrolisa ligações glicosídicas $\alpha$ -1,4 e é derivada de múltiplas fontes, como certos microrganismos e o pâncreas de mamíferos. Causa dispersão de biofilmes maduros formados por <i>V. cholerae</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .
$\alpha$ -manosidase	Uma hidrolase ácida que rompe os biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .
$\beta$ -manosidase	Uma hidrolase de glicosídeo que tem como alvo resíduos de manose terminais com ligação $\beta$ -1,4 e rompe os biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .
Celulase	Uma hidrolase de glicosídeo produzida por múltiplos microrganismo que hidrolisa a ligação glicosídica $\beta$ -1,4. Foi demonstrado que causa a dispersão de biofilmes de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .
Dispersina- $\beta$	Uma hidrolase de glicosídeo produzida pela bactéria <i>A. actinomycetemcomitans</i> , que degrada o polissacarídeo poli(1,6)-N-acetil-D-glucosamina (PNAG), por meio da hidrólise das ligações glicosídicas $\beta$ -1,6. Esta enzima tem sido eficaz contra os biofilmes produzidos por múltiplas bactérias, incluindo <i>S. aureus</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Burkholderia spp.</i> , <i>A. pleuropneumoniae</i> , <i>Yersinia pestis</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> .
PelAh	Uma hidrolase de glicosídeo que rompe o polissacarídeo da <i>P. aeruginosa</i> , Pel, causando a dispersão de biofilmes maduros.
PslGH	Uma hidrolase de glicosídeo que rompe o polissacarídeo <i>P. aeruginosa</i> , Psl, causando a dispersão de biofilmes maduros.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

## 2.5 Sais inorgânicos

Um sal é definido como um composto iônico neutro formado pela combinação química de ácido e base ou por neutralização. Os sais inorgânicos são compostos químicos que não contém ligações CH, ao contrário de sais orgânicos. Na natureza, a presença de sais é essencial para a sobrevivência dos seres vivos. Em humanos, alguns dos sais inorgânicos importantes para diversas funções corporais são cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), cloreto de potássio (KCl), sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e fosfato de cálcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>). Em soluções, os sais inorgânicos dissociam-se e formam íons (ou eletrólitos). Esses íons são essenciais em

diferentes atividades metabólicas da célula. O NaCl, por exemplo, dissocia-se em íons sódio e cloreto. Os íons sódio, em particular, são essenciais durante a despolarização de neurônios e células musculares e, portanto, essenciais para a retransmissão de impulsos e contração muscular.

Um estudo de revisão feito por Michael Hamblin investiga o uso de alguns sais inorgânicos em conjunto com a IFD contra culturas de bactérias planctônicas utilizando quatro sais inorgânicos. (31) As espécies de todas as classes de microrganismo, incluindo bactérias, fungos, parasitas e vírus podem ser destruídas pelas presenças de EROs. O primeiro sal inorgânico mencionado é a azida de sódio que quando adicionada em conjunto com AM, tem uma eficiência aumentada de 1-2 logs de morte bacteriana tanto para gram-negativas (*E. coli*) quanto para gram-positivas *S. aureus* Resistente à Meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-Resistant S. aureus*) utilizando apenas 10 mM do sal. No entanto, um dos problemas verificados foi que o ânion azida é tóxico para células de mamíferos, inviabilizando a sua aplicação em humanos. Outro sal analisado foi o brometo de potássio que possui eficiência adicional de 3 logs para MRSA e 4 logs para *E. coli*. O brometo de potássio, ao contrário da azida de sódio, não é tóxico. Entretanto, o íon brometo é mais difícil de oxidar, aproximadamente, 50 % a menos do que o íon iodeto. Logo, o sal inorgânico que possui os melhores parâmetros para se utilizar é o iodeto de potássio, com elevada eficiência de morte celular (6 logs para gram-negativas; 3 logs para gram-positivas), não tóxico e alta produção de radicais de iodeto reativos. Um ponto importante citado no artigo é que o KI pode ser usado de maneira efetiva e segura aprovada pela "*Food and Drug Administration (FDA)*" em 2001. (77)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a efetividade da inativação fotodinâmica contra biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em associação com duas estratégias para aumentar a efetividade do tratamento, sendo elas: aplicação de enzima previamente à IFD (pré-tratamento enzimático) e adição de iodeto de potássio à solução do fotossensibilizador.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

##### *3.2.1 Pré-tratamento enzimático*

- Determinação dos parâmetros enzimáticos (concentração, tempo de incubação e efetividade na redução) e seleção da melhor enzima capaz de degradar a matriz extracelular do biofilme de *P. aeruginosa*.
- Avaliação do pré-tratamento enzimático (com a enzima que apresentar o melhor resultado) em associação com a IFD contra biofilme de *P. aeruginosa*.

##### *3.2.2 Inativação Fotodinâmica (IFD)*

- Avaliação da IFD variando os parâmetros do protocolo, sendo: tipo e concentração do fotossensibilizador, tempo de incubação e fluência (dose de luz).

##### *3.2.3 IFD com adição de iodeto de potássio (KI)*

- Avaliar a IFD utilizando diferentes fotossensibilizadores com adição de KI.
- Avaliar a associação do pré-tratamento enzimático e da IFD com adição de KI.



## 4 ENZIMAS

### 4.1 Metodologia

#### 4.1.1 *Microrganismo*

O protocolo padrão para os ensaios utilizando enzimas começa com a reativação da *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) adquirida do banco de microrganismos *American Type Culture Collection* e armazenada em freezer (- 20 °C). Este microrganismo foi cultivado em placas de Petri contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) pela técnica do esgotamento e incubados na estufa a 37 °C por 24 h. Após a formação das colônias, foi realizado o preparo do pré-inóculo usando 10 colônias em 10 mL de meio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB) durante o período de 18 h (*overnight*). Em seguida, foi feito o inóculo ( $2 \times 10^8$  UFC/mL final) contendo 1 mL do pré-inóculo em 19 mL de meio TSB, o qual foi incubado por 3 h a 37 °C até que a bactéria atingisse a fase "*mid-log*" ou meio da fase exponencial de crescimento.

#### 4.1.2 *Seleção enzimática*

Como a composição da matriz do biofilme é bastante complexa e variada foi realizado um "*screening*" com algumas enzimas que atuam em polissacarídeos. (37) As enzimas testadas foram sintetizadas e caracterizadas pelo Grupo de Biotecnologia Molecular – IFSC/USP coordenado pelo Prof Igor Polikarpov. Suas propriedades enzimáticas estão listadas e descritas na *Tabela 6*. Após a seleção da enzima mais eficaz em degradar a matriz dos biofilmes, analisado pela quantificação da biomassa total, foram realizados os testes em associação com a IFD para inativar os microrganismos.

Os parâmetros utilizados para todos os testes com enzimas foram: concentração enzimática variando de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL e tempo de incubação de 4 h, cujos valores são baseados em artigos que utilizaram enzimas para testes em biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. (37,63,71,78) E como parâmetro de comparação foi utilizado o reagente comercial CTEC com os mesmos parâmetros enzimáticos de teste.

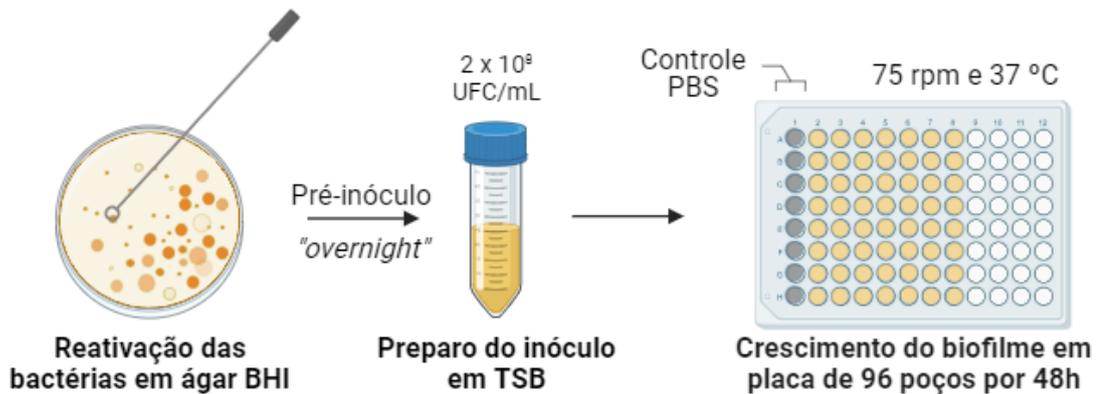
**Tabela 6** - Enzimas utilizadas e suas propriedades.

<b>Enzimas</b>	<b>Propriedades enzimáticas e sítios de clivagem</b>	<b>Referências</b>
GH13	Membro do grupo da glucosidase e cliva as ligações $\alpha$ -1,6 glicosídicas presentes nos polissacarídeos	[73]
GH16	Membro do grupo das laminarinase que cliva as ligações glicosídicas $\beta$ -1,3 e $\beta$ -1,4	[74]
GH20	Membro do grupo acetilglucosaminidase e cliva as ligações $\beta$ -1,6-N-acetilglucosamina presentes nos polissacarídeos	[75]
Esterase	Enzima que cliva preferencialmente o substrato 4-nitrofenil octanoato que é um peptídeo, além disso, as esterases têm propriedades emulsificantes	[76]
Endoglucanase	Enzima que cliva ligações glicosídicas $\beta$ -1,4 em sítios aleatórios não cristalinos da cadeia de celulose	[77]
CTEC	Celulase que é membro da família das hidrolases de glicosídeos (GHs) e é produzida por vários micróbios celulolíticos, este coquetel enzimático comercial contém celulases, $\beta$ -glucosidases e hemicelulase para a aplicação da degradação da celulose a açúcares fermentáveis	Coquetel Comercial (Sigma-Aldrich)

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

#### 4.1.3 Crescimento do Biofilme

O crescimento do biofilme foi realizado em placas de 96 poços conforme a *Figura 3*. A suspensão bacteriana de *P. aeruginosa* foi ajustada na concentração de aproximadamente  $2 \times 10^8$  UFC/mL (densidade óptica entre 0,1 e 0,2), em espectrômetro (*Cary UV-Vis 50, Varian, versão 3.0*), no comprimento de onda de 660 nm, Em seguida, 100  $\mu$ L foram transferidos para a placa de 96 poços que foi mantida em estufa a 37 °C com agitação de 75 rpm por 90 min (fase de adesão). Após esse período, foram feitas duas lavagens com 100  $\mu$ L de solução salina e posterior incubação com 200  $\mu$ L de meio TSB por 48 h para a fase de maturação do biofilme, realizando-se uma troca de meio de cultura na metade desse período. Com o biofilme maduro, foram realizados os tratamentos sugeridos de forma distinta e conjunta.

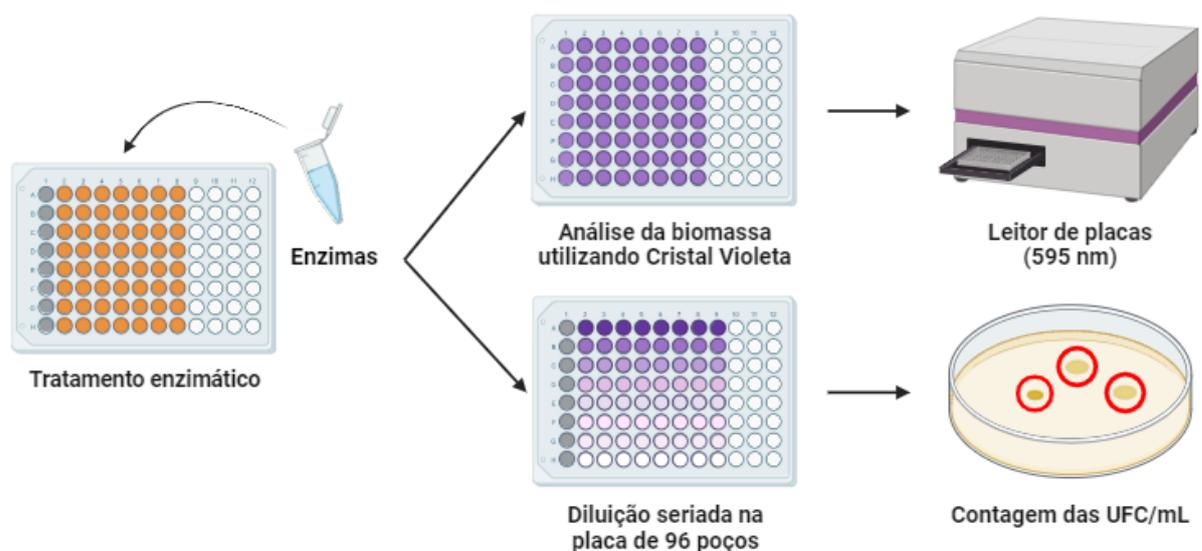


**Figura 3** - Protocolo padrão de crescimento do biofilme de *P. aeruginosa*.

#### 4.1.4 Avaliação dos efeitos enzimáticos sobre o biofilme de *P. aeruginosa*

##### 4.1.4.1 Quantificação da biomassa total

A *Figura 4* ilustra os procedimentos realizados para obter a quantificação da porcentagem de biomassa total após realização do tratamento enzimático utilizando o reagente Cristal Violeta (CV). Para isso, após as 48 h de formação do biofilme, o meio TSB foi removido dos poços e os biofilmes lavados duas vezes com 200  $\mu$ L de solução salina. Em seguida, os biofilmes foram incubados com 100  $\mu$ L de enzimas nas concentrações de 0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL para cada enzima com 4 h de incubação.



**Figura 4** – Protocolo de tratamento enzimático para quantificação da porcentagem de biomassa do biofilme e viabilidade celular das bactérias de *P. aeruginosa*.

**Fonte:** Elaborada pelo autor utilizando o software *Biorender*.

Para análise da biomassa total, tirou-se as enzimas e os biofilmes foram lavados duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de salina. A salina foi removida e os biofilmes foram mantidos na estufa a 37 °C para secagem dos biofilmes por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de CV a 0,4 % e aguardou 30 minutos. Depois, removeu-se o CV e fez duas lavagens com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada. Após as lavagens, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de metanol e aguardou 30 minutos. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de cada poço com mais 50  $\mu\text{L}$  de salina e transferiu para uma placa de 96 poços para leitura. A leitura foi feita em 595 nm e o metanol foi usado como branco.

#### **4.1.4.2 Viabilidade celular**

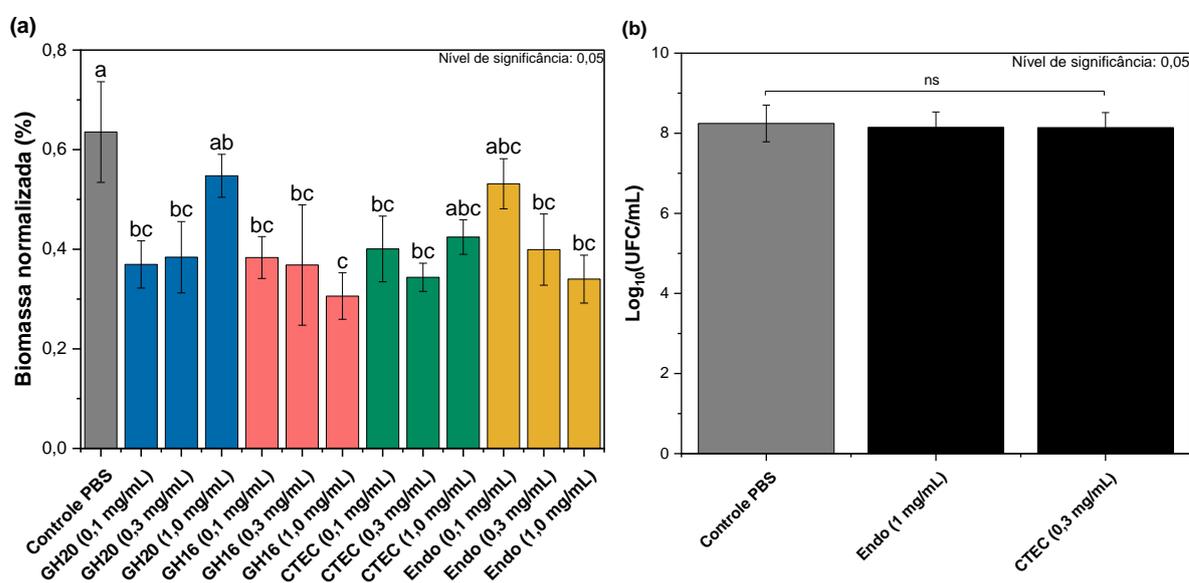
Para análise de viabilidade bacteriana foi realizado o teste UFC/mL (*Figura 4*), onde é possível realizar a quantificação das colônias bacterianas considerando o número de células presentes em 1 mL de meio líquido e, para evidenciar melhor os resultados, as análises dos dados foram feitas na base logarítmica  $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ . Após o tratamento enzimático, os biofilmes foram desprendidos utilizando a ponta da pipeta de 100  $\mu\text{L}$  no fundo do poço em diversos sentidos (horizontais, verticais e circulares) pelo menos três vezes em cada sentido. Em seguida foi realizada a diluição seriada e as amostras plaqueadas em duplicata no meio BHI ágar. Para plaquear, foi usada a técnica da “micro-gota” que utiliza o volume de 10  $\mu\text{L}$  para cada diluição (0 a 5).

#### **4.1.5 Análise estatística**

Os dados estatísticos foram obtidos em triplicatas de pelo menos duas ocasiões distintas ( $n = 6$ ). Cada dado apresentado mostra os valores médios e o desvio padrão de cada amostra. Análise estatística foi feita pelo método de comparação de pares utilizando o teste de Tukey ANOVA "one-way" com o programa *Origin 2020, versão 9.7.0.185 (Academic), OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*, com nível de significância estatística equivalente a  $\alpha = 0,05$ . Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05.

## 4.2 Resultados e Discussão

A Figura 5a ilustra a quantificação da biomassa do biofilme após utilização de enzimas selecionadas contra o biofilme maduro de *P. aeruginosa* utilizando o corante CV. Neste caso, os testes foram feitos variando a concentração enzimática em 0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL para todos os grupos tratados durante o período de 4 h. Cada enzima é específica para a clivagem de certas ligações (Tabela 6). Devido a essa especificidade, quanto maior a concentração, mais comprometida a matriz extracelular estará, caso ela possua ligações específicas em sua composição.



**Figura 5** – Ação enzimática contra o biofilme de *P. aeruginosa*. a) Quantificação da biomassa total após tratamento enzimático por meio do cristal violeta. b) Teste de viabilidade celular por meio da contagem de colônias após o tratamento enzimático. Colunas representam a média de triplicatas feitas em dois experimentos distintos (n = 6) e as barras de erro são os desvios padrões. Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05. ns: não significante. **Legenda:** GH: hidrolase de glicosídeo; CTEC: coquetel enzimático; Endo: endoglucanase.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

A enzima da família GH20 apresentou um comportamento inesperado, em que houve um aumento da biomassa juntamente com o aumento da concentração enzimática. Uma hipótese para este efeito é que a enzima GH20 não cliva as ligações presentes na matriz extracelular do biofilme de *P. aeruginosa*, além de se ligar na estrutura do biofilme aumentando a biomassa do mesmo. Outra possibilidade é a de uma alteração estrutural da matriz extracelular

induzida pela enzima que resulta em uma maior adsorção de componentes do meio, aumentando a biomassa total.

No caso das GH16, observou-se que conforme a concentração da enzima aumentava, havia uma redução maior da biomassa (*Figura 5a*). Sabe-se que enzimas da família GH16 são específicas para clivar ligações glicosídicas  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4, que são ligações típicas de glico-oligossacarídeos (celobiose, celotriose, celotetrose, celopentose), 1,3- $\beta$ -D- celotriosil-glicose (BGB), 1,3- $\beta$ -D-celobiosil-celobiose (BGC) e laminarihexaose (L6) (80), isso sugere que uma porção de ligações presentes no biofilme de *P. aeruginosa* contém ligações glicosídicas, visto que a redução percentual foi em torno de 50 % em comparação com o a amostra controle. No entanto, de acordo com as reduções apresentadas, há outros tipos de ligações presentes no biofilme de *P. aeruginosa* que não são conhecidas que compõem toda essa estrutura complexa formada. Para melhorar a quantidade de biomassa reduzida, seria necessário saber quais ligações ou estruturas precisam ser desfeitas para gerar resultados com maiores reduções percentuais de biomassa. Entretanto, uma desvantagem associada à GH16 é que durante o processo de síntese há gastos excessivos e tempos longos (cerca de 2 meses) para se produzir uma quantidade relativamente pequena dessa enzima, sendo uma grande limitação para a realização dos testes.

Com relação às Endoglucanases, também foi verificada que conforme a concentração da enzima aumentava, havia uma redução maior da biomassa (*Figura 5a*). Para estas enzimas, as ligações específicas também são as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 de sítios aleatórios da cadeia de celulose, produzindo alguns oligossacarídeos apenas até a celohexose (83) e isso pode ser visto pela redução de 50% para a concentração de 1,0 mg/mL, já que as ligações específicas dessa enzima são estatisticamente semelhantes a GH16.

Já a CTEC, coquetel enzimático comercial, possui celulase, xilanase e  $\beta$ -glicosidases dentro da sua composição que podem comprometer a matriz extracelular composta de substâncias poliméricas extracelular (EPS) obteve um resultado parecido com a GH16 em que teve reduções de 50 % para a concentração de 0,3 mg/mL, que foi a melhor redução apresentada.

Alguns estudos utilizam Proteases, DNases e Hidrolases de Glicosídeos (*Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5*) para atuar em sítios de clivagem dentro da matriz extracelular e servem apenas para inibir a formação de biofilme em vez de parar o crescimento bacteriano (71,84), afirmando que os resultados apresentados não possuem a capacidade de inativar os biofilmes de *P. aeruginosa*. Assim como é descrito nos estudos de Saggu e colaboradores (85), que utilizam biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, tratamentos enzimáticos concomitantes com antibióticos resultaram em dispersão dessas células e não na inativação. Para os tratamentos

enzimáticos foram utilizados GHs que induzem a dispersão bacteriana e podem causar septicemia, mas é uma abordagem não bactericida, ou seja, não é capaz de controlar a septicemia. Uma maneira de contornar essa situação seria pela utilização do antibiótico meropenem de uso sistêmico e tópico, no qual essa combinação de técnicas resultou na potencialização da ação do antibiótico e diminuiu significativamente o tempo para eliminar a infecção. Tais resultados mostraram que o uso combinado de enzima e antibiótico representam uma nova abordagem terapêutica de infecções crônicas de biofilmes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para contornar o uso exacerbado de antibióticos, os tratamentos seguintes serão utilizando um tratamento alternativo com uso de terapia fotodinâmica a fim de substituir os antibióticos.

De acordo com Karygianni e colaboradores (61), a composição e funções da matriz extracelular dos biofilmes de *P. aeruginosa* estão intimamente ligadas às propriedades físicas e químicas associadas ao EPS, no qual confere alta tolerância e resistência contra agentes externos, como é o caso de antibióticos, danos mecânicos e tratamentos auxiliares. Além disso, a presença de enzimas digestivas associadas à EPS, auxiliam na resistência contra antibióticos e tratamentos utilizados, apesar do mecanismo exato de resistência mediado pela EPS não ser completamente elucidado. Os autores também notaram que a matriz do biofilme pode atuar como um sistema digestivo externo devido a imobilização de exoenzimas que participam ativamente da remodelação do EPS e metabolismo de diversos substratos. Em biofilmes de *S. mutans*, as enzimas dextranase e frutanasase degradam os componentes da EPS, produzindo glucanos solúveis e frutanos, respectivamente, permitindo a produção de polissacarídeos fermentáveis no local que podem ser utilizados durante a escassez nutricional. Em biofilmes de *P. aeruginosa*, como em outros, suas funções de regulação da expressão gênica local, sinalização intracelular entre células e atividade metabólica estão intimamente associadas ao EPS o que dificulta a ação de certas enzimas.

Adicionalmente, além da quantificação da biomassa utilizando CV, foi realizado o teste de UFC/mL para verificar se as enzimas utilizadas eram capazes de inativar as bactérias presentes no biofilme ou apenas reduzir a porção de matriz presente nessa estrutura. De acordo com a *Figura 5b*, pode-se afirmar, através da contagem de bactérias viáveis, que as enzimas selecionadas não possuem capacidade de matar células bacterianas do biofilme, apresentando apenas a capacidade de desestruturar e reduzir a matriz extracelular. Este resultado revela que a matriz extracelular do biofilme possui diversas biomoléculas funcionais que impedem as enzimas utilizadas de desmontar e inativar a matriz do biofilme de *P. aeruginosa*. A redução da matriz extracelular demonstra que estas enzimas são promissoras para serem utilizadas como

pré-tratamento, apenas com foco na porção que mantém a arquitetura do biofilme e não inativando os organismos presentes nesse arranjo. Estes resultados sugerem que a matriz extracelular dos biofilmes de *P. aeruginosa* é composta em partes por ligações glicosídicas, devido a redução do percentual de biomassa causada por todas essas enzimas. As enzimas da família GHs, Endo e CTEC reduzem a biomassa do biofilme, mas não impedem o crescimento bacteriano, sugerindo que essas enzimas são favoráveis para serem utilizadas como pré-tratamento.

A complexidade dos biofilmes, especialmente da bactéria *P. aeruginosa*, impõe grandes desafios para se combater as doenças envolvendo esses arranjos. É dessa maneira que utilização de várias técnicas para se combater os biofilmes tornam-se apropriadas, já que as abordagens convencionais separadas possuem suas limitações. As enzimas utilizadas com foco nos polissacarídeos presentes na matriz extracelular cumpriram sua função de quebrar as ligações glicosídicas presentes, no entanto, não foram suficientes para desestruturar os outros componentes presentes como proteínas, exoenzimas, eDNA e lipídeos. (61) Dada essa complexidade expressa pelos biofilmes, unir estratégias terapêuticas que possuem alvos distintos dentro do biofilme, mas com um objeto único que é sua inativação parece ser uma abordagem com mais efetividade.

### 4.3 Conclusão parcial

Em suma, observou-se que o tratamento enzimático com GH16 apresentou significativa redução na biomassa quando utilizada na concentração de 1,0 mg/mL. Entretanto uma desvantagem relacionada a esta enzima é o elevado tempo de produção e gastos demandados para sua produção. Já a Endoglucanase, por possuir locais de clivagem parecidos com a GH16, obteve resultados semelhantes utilizando as mesmas concentrações de 1,0 mg/mL. A enzima que apresentou melhores resultados foi a CTEC, no qual obteve cerca de 50 % de redução percentual da biomassa do biofilme de *P. aeruginosa* utilizando uma concentração de apenas 0,3 mg/mL dessa enzima. E, por fim, a enzima GH20 não apresentou ação na biomassa do biofilme, o que levou a exclusão dessa enzima nos próximos testes. Um ponto importante notado nesses experimentos enzimáticos é que o foco de ação dessas enzimas seria apenas no comprometimento da matriz extracelular e não na inativação das bactérias, ou seja, elas não possuem capacidade bactericida, vista pelos testes de viabilidade.

## 5 TERAPIA FOTODINÂMICA

### 5.1 Metodologia

#### 5.1.1 Seleção dos Fotossensibilizadores

Os parâmetros avaliados na IFD foram: concentração do FS, tempo de incubação, tempo de irradiação e dose de luz (fluência). Todas as amostras foram irradiadas utilizando um dispositivo LED chamado *BioTable* desenvolvido no Laboratório de Apoio Técnico (LAT) que emite uma irradiância uniforme em toda a placa de 96 poços, sendo que foi utilizado duas *BioTable* uma de 450 nm (35 mW/cm<sup>2</sup>) e outra de 660 nm (50 mW/cm<sup>2</sup>).

- Curcumina (Curc)

A estrutura química da Curcumina está ilustrada na *Figura 6a*. Para a constituição de uma solução estoque, 0,06 g de curcumina (PDT Pharma, Cravinhos, SP) foi pesada em balança analítica e, em ambiente isento de luz, diluída em 10 mL de DMSO, em seguida, vertidos em tubo Falcon de 15 mL devidamente coberto por papel alumínio, gerando uma concentração da solução estoque de 16 mM. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho para conter o mínimo possível de DMSO (cerca de 1 %) nas soluções de trabalho que variou de 10 a 100 µM e foram diluídas em água destilada.

- Photodithazine (PDZ)

A estrutura química do PDZ está ilustrada na *Figura 6b*. O PDZ (*Veta-Grand*, Moscow, Russia) é uma clorina e6 comercializada na concentração de 5 mg/mL. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho que variou de 10 a 100 µM e foram diluídas em água destilada.

- NewPS (NPS)

NPS é uma nanoemulsão envolvida de porfirina com uma nova nanoplataforma de óleo e água sem a presença de surfactante como é possível visualizar na *Figura 6c* e foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Gang Zheng do *Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, ON (Canada)*, na solução estoque de 4 mM. Este reagente surgiu da automontagem de moléculas de sal de porfirina em torno de um núcleo de óleo, resultando em uma arquitetura simples de dois componentes com multifuncionalidade para imagem e fototerapia. (80) Com

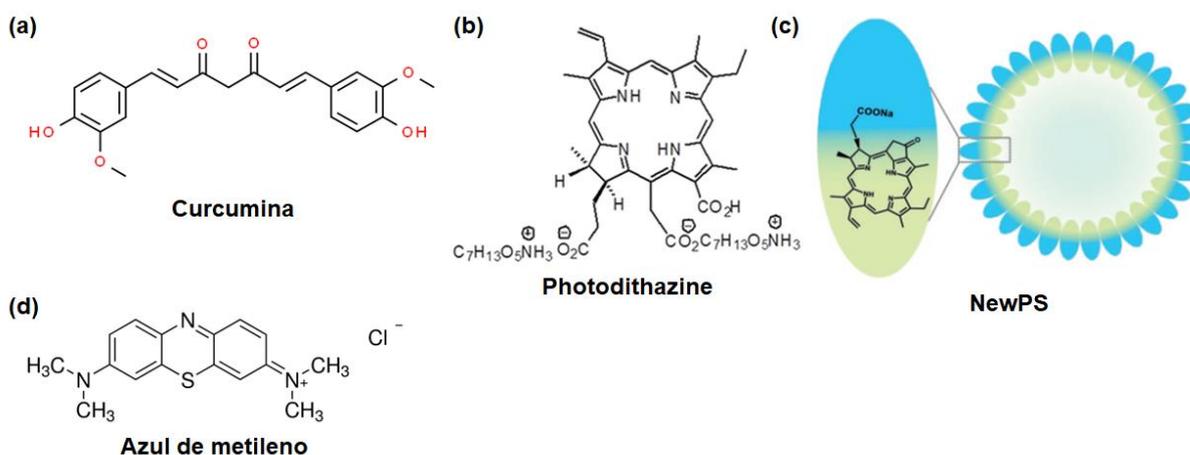
essa solução foram preparadas as soluções de trabalho que variou de 10 a 100  $\mu\text{M}$  e foram diluídas em água destilada.

- Azul de Metileno (AM)

A estrutura química do AM pode ser visualizada na *Figura 7d*, possui propriedades fotossensíveis atuando na faixa do 660 nm com capacidade de tratar infecções inibindo o crescimento bacteriano, além disso possui propriedades redox atuando como agente redutor em reações químicas e processos de coloração em laboratórios e indústrias. Para a solução estoque de AM, 32 mg de AM foi pesada em balança analítica e, em ambiente isento de luz, diluída em 100 mL de PBS, em seguida, vertidos em garrafa estéril de 100 mL devidamente coberto por papel alumínio, gerando uma concentração da solução estoque de 1 mM. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho que variou de 10 a 100  $\mu\text{M}$  e foram diluídas em PBS.

- Nanoemulsão de Azul de Metileno (MBne, do inglês *Methylene Blue nanoemulsion*)

MBne, também gentilmente fornecida pelo Dr. Zheng, é uma nanoemulsão feita para armazenar o AM e auxiliar na entrega e distribuição do FS pelo biofilme maduro. A formação da nanoemulsão é feita com AM em torno de um núcleo de óleo da mesma maneira que o NPS. A solução estoque da MBne está mantida em 4,5 mM em PBS coberto por papel alumínio. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho que variou de 10 a 100  $\mu\text{M}$  e foram diluídas em PBS.



**Figura 6** – Estruturas químicas dos fotossensibilizadores. a) Curcumina. b) Photodithazine. c) NewPS. (d) Azul de Metileno.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

### 5.1.2 Bactérias planctônicas

#### 5.1.2.1 Crescimento bacteriano

A reativação, cultivo, crescimento e preparo do inóculo da *Pseudomonas aeruginosa* foram realizados conforme a Seção *Microrganismo*.

#### 5.1.2.2 Inativação Fotodinâmica

Após o preparo do pré-inóculo foi feito o tratamento utilizando apenas os FSs selecionados, de acordo com a *Tabela 7*.

**Tabela 7** - Fotossensibilizadores e parâmetros nas bactérias planctônicas de *P. aeruginosa*.

Fotossensibilizadores	Concentração	Comprimento de onda (nm)	Tempo de incubação (h)	Tempo de irradiação (min)	Dose (J/cm <sup>2</sup> )
Curcumina (Curc)	5, 10, 40 e 100 µM	450	1	29	60
Photodithazine (PDZ)	5, 10 µg/mL	660	1	20	60
NewPS (NPS)	5, 10 µM	660	1	20	60
Azul de metileno (AM)	5, 10, 40 e 100 µM	660	1	20	60

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Experimentos preliminares foram feitos contra as bactérias planctônicas da linhagem de *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Para isso, a suspensão bacteriana de *P. aeruginosa* foi ajustada na concentração de aproximadamente  $2 \times 10^8$  UFC/mL (DO entre 0,1 e 0,2). Em seguida, 100 µL foram transferidos para a placa de 96 poços.

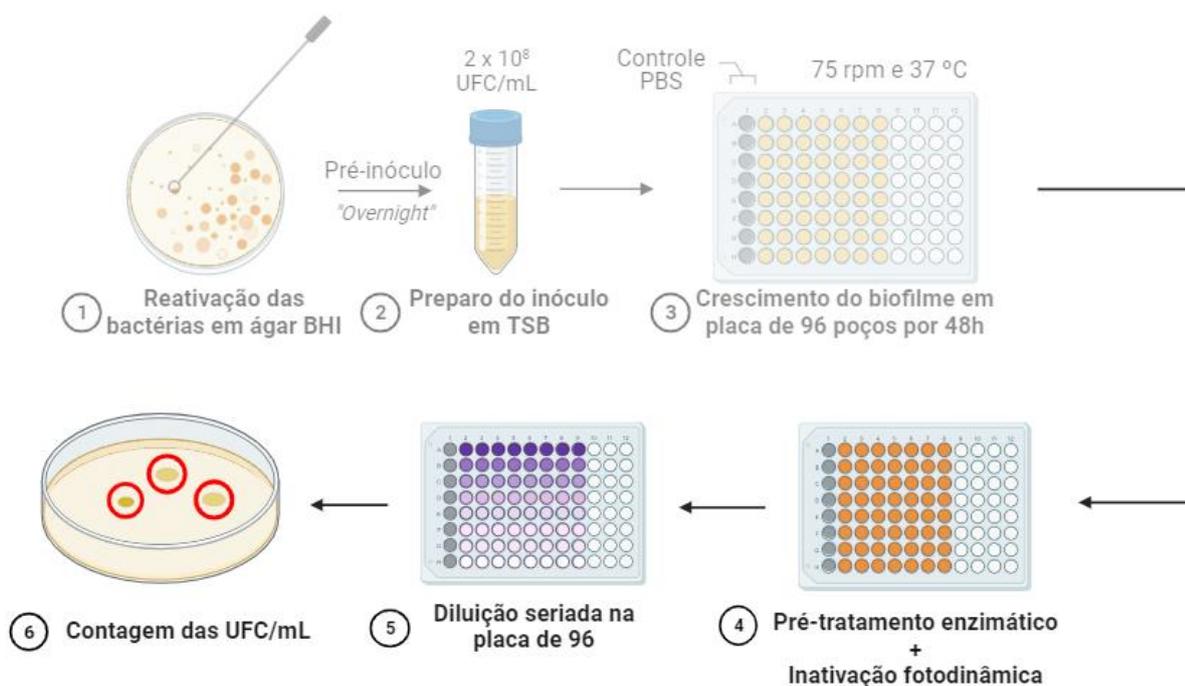
Após a padronização da suspensão nos poços, os grupos foram separados e as amostras bacterianas foram incubadas com a Curc nas concentrações de 5, 10, 40 e 100 µM em um volume de 100 µL e tempo de incubação de 1 h (valores sugeridos da literatura). Em seguida, foi feita iluminação por 29 min com luz LED azul (450 nm – 35 mW/cm<sup>2</sup> de irradiância), atingindo a fluência de 60 J/cm<sup>2</sup>. Para os testes com PDZ foram utilizadas as concentrações de 5 e 10 µg/mL, tempo de incubação de 1h, irradiação de 20 min com LED vermelho (660 nm –

50 mW/cm<sup>2</sup>) e fluência de 60 J/cm<sup>2</sup>. Para os testes com NPS foram utilizadas as concentrações de 5 e 10 µg/mL, tempo de incubação de 1 h, 20 min de irradiação e fluência de 60 J/cm<sup>2</sup>. Para o AM, foram realizados com as concentrações de 5, 10, 40 e 100 µM, tempo de incubação de 1 h, tempo de irradiação de 20 min e fluência de 60 J/cm<sup>2</sup> para identificar se os FSs utilizados eram capazes de inativar a bactéria *P. aeruginosa* em suspensão.

### 5.1.3 Biofilme bacteriano

#### 5.1.3.1 Crescimento do biofilme

A Figura 7 possui resumidamente os procedimentos iniciais de crescimento do biofilme, como citado na seção *Crescimento do Biofilme*.



**Figura 7** – Protocolo combinado de pré-tratamento enzimático e terapia fotodinâmica.

**Fonte:** Elaborada pelo autor utilizando o software *Biorender*.

#### 5.1.3.2 Inativação Fotodinâmica (IFD) em biofilme

Após 48 h de formação do biofilme, lavou-se os poços duas vezes com 200 µL de salina. A salina foi removida e adicionou-se 100 µL de FS (Curcumina, NewPS, PDZ, MBne ou AM) nas concentrações específicas da Tabela 8 e 100 µL de PBS nos grupos controle. A Curcumina

foi avaliada na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , incubada junto com os biofilmes de *P. aeruginosa* por 2 h e irradiados por 29 min (450 nm, 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Para PDZ foi utilizado 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentração, tempo de incubação de 2 h, irradiação de 20 min e fluência de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Para os testes com NPS foram utilizados 100  $\mu\text{M}$  de concentração, tempo de incubação de 2 h, tempo de irradiação de 20 min e fluência de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Para os testes com AM foram utilizadas as concentrações de 20, 40 e 100  $\mu\text{M}$  já que as condições utilizadas para as bactérias planctônicas possuem não possuem eficiência em comparação com os biofilmes bacterianos e por isso algumas condições foram elevadas, o tempo de incubação foi testado em 2 h, tempo de irradiação foi o mesmo de 20 min para manter a dose final de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Já os testes com a MBne foram feitos apenas em biofilme, utilizando a concentração de 20  $\mu\text{M}$ , tempo de incubação de 2 h, irradiação de 20 min e dose final de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Tabela 8 - Fotossensibilizadores utilizadas e seus parâmetros para biofilmes.

<b>Fotossensibilizadores</b>	<b>Concentração</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Tempo de incubação (h)</b>	<b>Tempo de irradiação (min)</b>	<b>Dose (<math>\text{J}/\text{cm}^2</math>)</b>
Curcumina (Curc)	100 $\mu\text{M}$	450	2	29	60
Photodithazine (PDZ)	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	660	2	20	60
NewPS (NPS)	100 $\mu\text{M}$	660	2	20	60
Azul de metileno (AM)	100 $\mu\text{M}$	660	2	20	60

#### 5.1.4 Viabilidade celular

Após a IFD, a contagem celular foi realizada conforme a seção *Viabilidade celular*.

#### 5.1.5 Análise estatística

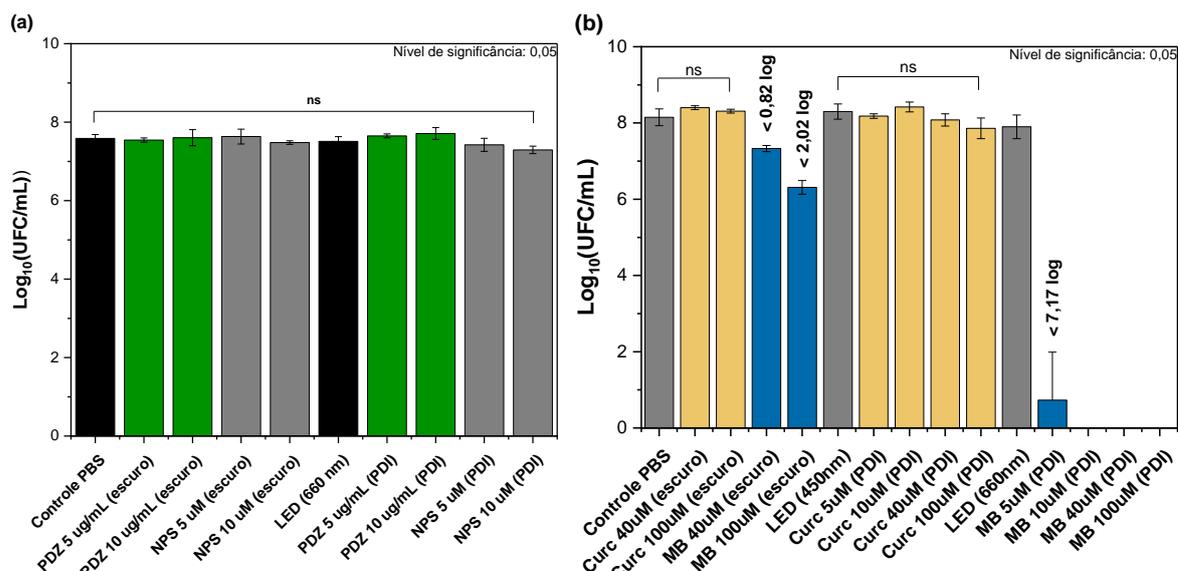
Os dados estatísticos foram obtidos em triplicatas de pelo menos duas ocasiões distintas ( $n = 6$ ). Cada dado apresentado mostra os valores médios e desvio padrão de cada amostra. Análise estatística foi feita pelo método de comparação de pares utilizando o teste de Tukey ANOVA "one-way" com o programa *Origin 2020, versão 9.7.0.185 (Academic)*, *OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*, com nível de significância estatística equivalente a  $\alpha = 0,05$ . Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05.

## 5.2 Resultados e Discussão

### 5.2.1 Seleção dos fotossensibilizadores - Bactérias planctônicas

Alguns testes iniciais contra a bactéria planctônica de *P. aeruginosa* foram realizados utilizando os seguintes fotossensibilizadores: PDZ, NPS, Curc, AM. Todos os parâmetros experimentais para as bactérias planctônicas estão descritos na *Tabela 7*. A *Figura 8* ilustra a ação fotodinâmica de todos os FSs testados para identificar qual FS possui melhor ação antimicrobiana. A *Figura 8a* mostra os resultados obtidos para utilização de PDZ em 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , bem como a utilização do NPS nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$ , com dose final de 60  $\text{J/cm}^2$ . No entanto, nenhum grupo amostral apresentou redução significativa, tanto na presença de irradiação quanto nos grupos mantidos no escuro. Apesar dos FSs utilizados não apresentarem toxicidade no escuro, eles também não possuem ação antimicrobiana contra as bactérias planctônicas de *P. aeruginosa*.

Como é possível visualizar na *Figura 8b*, o único FS capaz de reduzir com eficiência a quantidade de bactérias nos parâmetros testados foi o AM. Este FS na concentração de 5  $\mu\text{M}$  de FS foi capaz de reduzir 7,17  $\log_{10}(\text{UFC/mL})$  a suspensão bacteriana. Para as bactérias planctônicas as reduções apresentadas, utilizando 5  $\mu\text{M}$  de AM é bastante considerável, visto que essas bactérias de *P. aeruginosa* são difíceis de se combater. Com concentrações maiores de AM é possível notar a inativação total desse microrganismo. No entanto, em concentrações maiores que 40  $\mu\text{M}$  o AM apresentou toxicidade mesmo na ausência de irradiação, resultando na redução de 0,82 log (40  $\mu\text{M}$ ) e 2,02 logs (100  $\mu\text{M}$ ). Essa redução é mais acentuada conforme aumenta a concentração do FS, como é possível visualizar na concentração de 100  $\mu\text{M}$  de AM. A redução no escuro apresentada para as amostras de 40 e 100  $\mu\text{M}$  de AM limitou o intervalo de concentrações de 5 a 40  $\mu\text{M}$  para as ocasiões de experimentos utilizadas posteriormente, visto que essa concentração pode estar relacionada a toxicidade no escuro.



**Figura 8** – Teste de viabilidade celular após tratamento fotodinâmico utilizando PDZ, NPS, Curc e AM contra bactérias planctônicas de *P. aeruginosa*. a) IFD mediada por PDZ e NPS em duas concentrações diferentes. b) IFD mediada por Curc e AM em concentrações de 5 a 100 µM. Colunas representam a média de triplicatas feitas em dois experimentos distintos ( $n = 6$ ) e as barras de erro são os desvios padrões. Nível de significância estatística equivalente a  $\alpha = 0,05$ . ns: não significante. **Legenda:** PDZ: Photodithazine; NPS: NewPS; Curc: Curcumina; AM: Azul de metileno.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

A erradicação da suspensão bacteriana de *P. aeruginosa* não é mais um desafio devido a presença de diversos estudos que obtiveram esses resultados favoráveis neutralizando esse organismo em sua forma planctônica, no entanto, para a forma em biofilme as dificuldades devido a tolerância e a resistência aos tratamentos tornam essa comunidade um desafio mais complexo de se combater. Street e colaboradores (42), usando apenas uma formulação de azul de metileno (0,01 % v/v) em PBS com fluência variando entre 1,7 e 20,6 J/cm<sup>2</sup> conseguiram resultados de completa erradicação (> 7 logs de redução) para 15,5 e 20,6 J/cm<sup>2</sup> (com potência de 220 mW e 60 s de irradiação) contra as bactérias planctônicas de *P. aeruginosa*, sendo que não houve toxicidade no escuro referente ao FS testado. Além disso, Banfi e colaboradores testaram 7 FS derivados de porfirinas contra bactérias planctônicas (~ 10<sup>8</sup> UFC/mL) de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* em diferentes concentrações de FS e valores de fluência utilizando IFD. Apesar dos resultados para *E. coli* e *S. aureus* apresentarem reduções de 6 - 7 logs em concentrações de 7,33 µM com irradiação de 60 s sob uma fonte de luz de banda larga de halogênio-tungstênio de 500 W de potência. Os resultados que mais chamaram atenção foram as reduções apresentadas para *P. aeruginosa* no qual o melhor resultado apresentou redução de 7 log com uma concentração de FS de 7,3 µM (60 s de irradiação e 500 W). (87) Apesar dos resultados apresentarem elevadas reduções e ótimas possibilidade de erradicação, os autores

não monitoraram a temperatura da cultura, onde pode existir a chance de aquecimento das amostras e inativação por dano térmico.

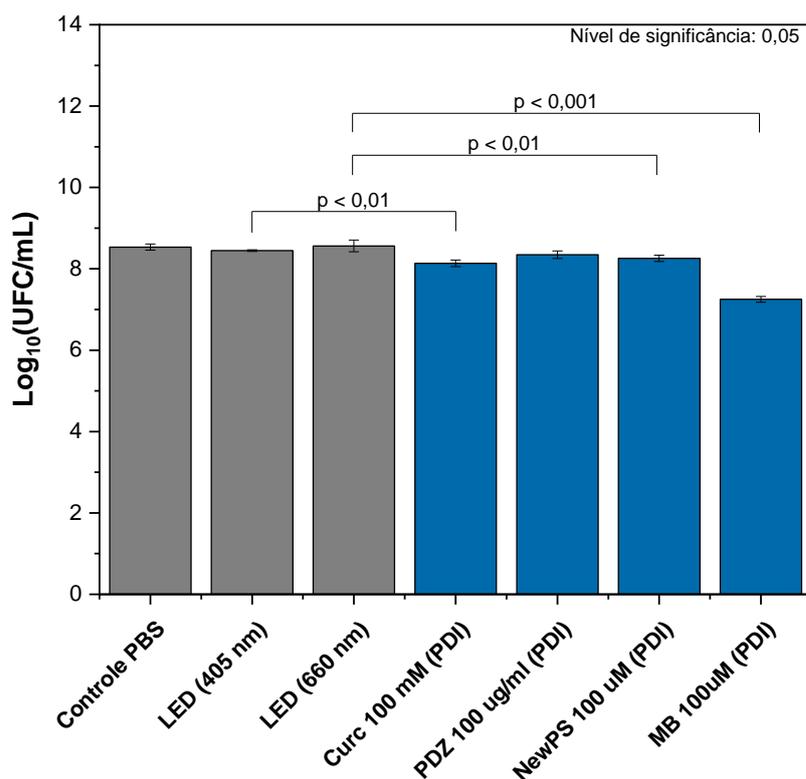
Apesar de alguns estudos apresentarem redução total, outros como é relatado por Donnelly e colaboradores, obtiveram resultados divergentes no qual testaram dois fotossensibilizadores: o azul de toluidina O (TBO) e meso-tetra (N-metil-4-piridil) porfina tetra tosilato (TMP) nas concentrações de 0,025 mg/mL e 2,5 mg/mL, respectivamente, seguido pela irradiação em 635 nm com dose de luz de 100 J/cm<sup>2</sup> contra bactérias planctônicas de *P. aeruginosa* onde obtiveram resultados de 99 % de erradicação para todas as bactérias testadas e algumas com valores maiores de redução. No entanto, a maior redução obtida utilizando essas condições foi 99,999 % para o TMP com 2,5 mg/mL e 100 J/cm<sup>2</sup>. Apesar dessa redução apresentar alta eficiência esses valores representam uma diminuição de ~ 5 logs e não expressam uma erradicação total das células bacterianas, havendo a possibilidade de recrescimento bacteriano. Em comparação com os resultados adquiridos da literatura e os resultados obtidos, há um grau de semelhança para os casos das bactérias planctônicas para a erradicação dessas amostras, por causa da facilidade de inativação dessa suspensão bacteriana.

### 5.2.2 Seleção dos fotossensibilizadores - Biofilme maduro

Também foram realizados testes contra biofilme de *P. aeruginosa*, utilizando os seguintes fotossensibilizadores: PDZ, NPS e Curc (*Figura 9*). Sabe-se pelos conceitos apresentados que as formações e estabelecimento de biofilmes bacterianos, especialmente da *P. aeruginosa*, são arranjos extremamente complexos se comparados com as bactérias planctônicas, podendo aumentar seus fatores de virulência, tolerância e resistência aos diversos tratamentos que elas possam ser submetidas. (10)

Como é possível notar, variando a concentração de PDZ de 5 a 100 µg/mL não há nenhuma diferença significativa da viabilidade celular dos grupos tratados em relação ao controle. Ou seja, o PDZ não possui ação bactericida nessa espécie de biofilme bacteriano. Para o NPS, foram feitas as mesmas variações de concentração (5 a 100 µM) e apenas a concentração de 100 µM observou-se uma redução significativa, entretanto em comparação com o total de células bacterianas presentes no biofilme, essa redução foi ínfima. Testando a Curcumina mesmo em alta concentração de 100 µM, houve uma diferença significativa em relação ao controle, mas da mesma forma que o NPS, essa redução foi muito baixa quando se compara com o total de bactérias presentes no biofilme maduro. Esses dados sugerem que PDZ, NPS e Curc não possuem ação contra o biofilme de *P. aeruginosa*. Por último, o AM contra as

bactérias planctônicas apresentou uma resposta de ~ 7 logs de redução, já contra os biofilmes de *P. aeruginosa* a resposta foi de apenas 1 log<sub>10</sub>(UFC/mL) de redução bacteriana, o que expressa uma enorme diferença entre a resposta frente as duas formas bacterianas. Dentre os parâmetros testados os valores obtidos são extremamente plausíveis, devido as características dos biofilmes e corroboram com valores preliminares obtidos apenas para as bactérias planctônicas, onde o único FS que teve ação antimicrobiana foi o AM.



**Figura 9** – Teste de viabilidade celular após ação fotodinâmica utilizando Curc, PDZ, NPS e AM contra biofilmes de *P. aeruginosa*. Colunas representam a média de triplicatas feitas em dois experimentos distintos (n = 6) e as barras de erro são os desvios padrões. Nível de significância estatística equivalente a p = 0,05. **Legenda:** Curc: Curcumina; PDZ: Photodithazine; AM: Azul de metileno.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Uma hipótese para estes resultados é que a matriz do biofilme e seus compostos trazem inúmeras dificuldades para ação efetiva da IFD como: a permeabilidade e mobilidade do FS na matriz extracelular; interação célula-célula presente nesse complexo arranjo celular; barreira física formada por polissacarídeos, proteínas, eDNA e lipídeos; e, componentes químicos que auxiliam na absorção de nutrientes essenciais do biofilme. (51,61) Um estudo realizado por Mahmoudi e colaboradores descreve outras abordagens parecidas utilizando bactérias planctônicas de *S. aureus*, *E. coli* e *Acinetobacter baumannii* onde obtiveram resultados

bastante eficientes com reduções variando de 1 a 3  $\log_{10}$ (UFC/mL) para todas as bactérias. (67) Além disso, foram relatados alguns valores de redução para biofilmes de *S. aureus* (99,99 % de redução, 40 mM de 5-aminolevulinic acid (ALA), 300 J/cm<sup>2</sup>) (88), *P. gingivalis* e *A. viscosus* (99 % e 99,99 % de redução, 5  $\mu$ M de clorina(e6), 15 J/cm<sup>2</sup>) (89) e *E. faecalis* (99 % de redução, 62,5  $\mu$ g/mL de *Indocianina Verde* (ICG), 15,62 J/cm<sup>2</sup>). (90) Todos esses valores são reduções significativas em bactérias susceptíveis aos tratamentos aplicados, no entanto, algumas formações de biofilme bacteriano como é o caso dos biofilmes de *P. aeruginosa* e certas cepas resistentes de *S. aureus* possuem mecanismos desconhecidos que impedem a inativação ou forma de controle através das técnicas utilizadas. Apesar da técnica utilizada, da variação dos FSs e das concentrações utilizadas, os complexos envolvendo os biofilmes de *P. aeruginosa* não apresentação nenhuma redução significativa capaz de iniciar uma erradicação dessas comunidades.

Um grande problema advindo dos biofilmes maduros é dificuldade de penetração e difusão dos FSs devido a matriz extracelular e seus componentes impeditivos que auxiliam na preservação das células bacterianas interiorizadas. Karygianni e colaboradores (61) descreveram propriedades relacionadas ao EPS, que é o principal componente presente na matriz extracelular dos biofilmes, onde dividiu suas propriedades em físicas e químicas para poder representá-las melhor. Alguns dos obstáculos físicos presentes nos biofilmes caracteriza-se pela dificuldade de penetração e difusão dos agentes antimicrobianos devido a presença do EPS no qual pode conter exopolissacarídeos (alginate, Pel e Psl), proteínas globulares (incluindo enzimas extracelulares), outras proteínas (Pilinas tipo IV (T4P), Lectinas (LecA/LecB)), lipídeos e ácidos nucleicos (eDNA) para constituir a matriz extracelular do biofilme de *P. aeruginosa*. (17,55,61) Além disso, o EPS atua na interação célula-célula para facilitar a agregação e formação dos biofilmes. (43,51) Conforme o biofilme se estabelece, o EPS passa a fornecer estabilidade física e resistência à remoção mecânica, aos antimicrobianos e ao desprendimento. Os obstáculos químicos estão intimamente ligados a arquitetura compacta e coesa formada pelo biofilme devido ao EPS, que permite sequestrar e aprisionar diversas substâncias. Como resultado, o FS pode ter uma limitada penetração no biofilme microbiano, associada ao aprisionamento e/ou interação com componentes da matriz extracelular e consequente ausência de disponibilidade para interação com a célula bacteriana.

Adicionalmente, desses arranjos que são produzidos microambientes altamente heterogêneos com diferentes gradientes nutricionais e químicos que envolvem oxigênio, pH, moléculas sinalizadoras, íons orgânicos, metabólitos e outros solutos presentes nos biofilmes. (91-92) Certas espécies de bactérias são capazes de expandir a matriz do biofilme sem interferir

na sua estabilidade estrutural para aumentar a absorção de nutrientes e melhorar o metabolismo. Há relatos que componentes aniônicos do EPS e do eDNA podem servir como agente quelantes de cátions e gerar microambientes deficientes de cátions para promover resistências antimicrobianas. (93) No caso da terapia fotodinâmica, variações no gradiente de oxigênio disponível resultarão em uma resposta mais ou menos eficiente dependendo da disponibilidade do oxigênio. Assim, os componentes presentes na matriz extracelular, juntamente com os mecanismos físicos e químicos mediados pelos EPS são alguns dos fatores que limitam ou impossibilitam a inativação fotodinâmica.

### 5.3 Conclusão parcial

Para os testes iniciais contra bactérias planctônicas e variando diversos FSs pode-se concluir que o único FS que possui atividade antibacteriana eficiente contra a espécie de *P. aeruginosa* testada foi o AM que obteve uma redução de 7,17  $\log_{10}$ (UFC/mL). Já para os resultados apresentados contra biofilmes de *P. aeruginosa*, nitidamente não há morte bacteriana efetiva quando se utiliza Curc, PDZ e NPS, pois não houve redução significativa da UFC/mL nos testes apresentados, ou seja, mesmo variando os parâmetros não foram capazes de inativar ou mesmo diminuir a população presente nos biofilmes de *P. aeruginosa* de maneira efetiva. O único FS que conseguiu resultar em uma pequena redução de 1  $\log_{10}$ (UFC/mL) no biofilme de *P. aeruginosa*, foi o AM. No entanto, esse resultado não é satisfatório quando se busca uma redução significativa clínica para erradicar uma infecção. Alguns pontos mencionados que valem ressaltar é que a matriz extracelular possui propriedades física e químicas, além de componentes complexos que geram resistência antimicrobianas e impedem a ação fotodinâmica efetiva especialmente por limitar a interação do FS com a célula bacteriana, variação da disponibilidade do oxigênio molecular e por vários alvos biológicos das EROs produzidas.



## 6 PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO E TRATAMENTO COM IFD

### 6.1 Metodologia

#### 6.1.1 Crescimento e tratamento do biofilme

A metodologia descrita nos *Capítulos 4 e 5* possuem os mesmos procedimentos iniciais de crescimento do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, mas os tratamentos são modificados para buscar formas alternativas de combater o biofilme. Neste caso, foi utilizado um pré-tratamento enzimático seguido de um tratamento com IFD para que a combinação dessas técnicas traga resultados satisfatórios, já que são técnicas focadas em alvos diferentes.

A abordagem inicial seria utilizar as enzimas para comprometer a matriz extracelular onde fosse possível que os FSs sejam distribuídos no biofilme bacteriano. As melhores condições obtidas no *Capítulo 4* foram utilizadas e após esse pré-tratamento enzimático, os biofilmes foram lavados duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de salina. A salina foi removida e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de FS (Curcumina, NewPS, PDZ, MBne ou AM) nas melhores concentrações (apresentadas no *Capítulo 5*) e 100  $\mu\text{L}$  de PBS nos grupos controle, com tempo de incubação de 2 h, tempo de irradiação de 20 min, resultando em fluência de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Após o tratamento foi utilizado uma pipeta de 100  $\mu\text{L}$  para esfregar o fundo do poço em diversos sentidos (horizontais, verticais e circulares) pelo menos três vezes cada sentido. Cada poço foi plaqueado em duplicata em meio BHI ágar, utilizando a diluição seriada para cada partição, sendo que a diluição zero advinha da ressuspensão do biofilme e o restante das diluições feitas em placas de 96 poços contendo 180  $\mu\text{L}$  de salina com mais 20  $\mu\text{L}$  da diluição anterior até a quinta (última) diluição. Para plaquear, foi usado a técnica da “micro-gota” que utiliza o volume de 10  $\mu\text{L}$  para cada diluição.

#### 6.1.2 Análise estatística

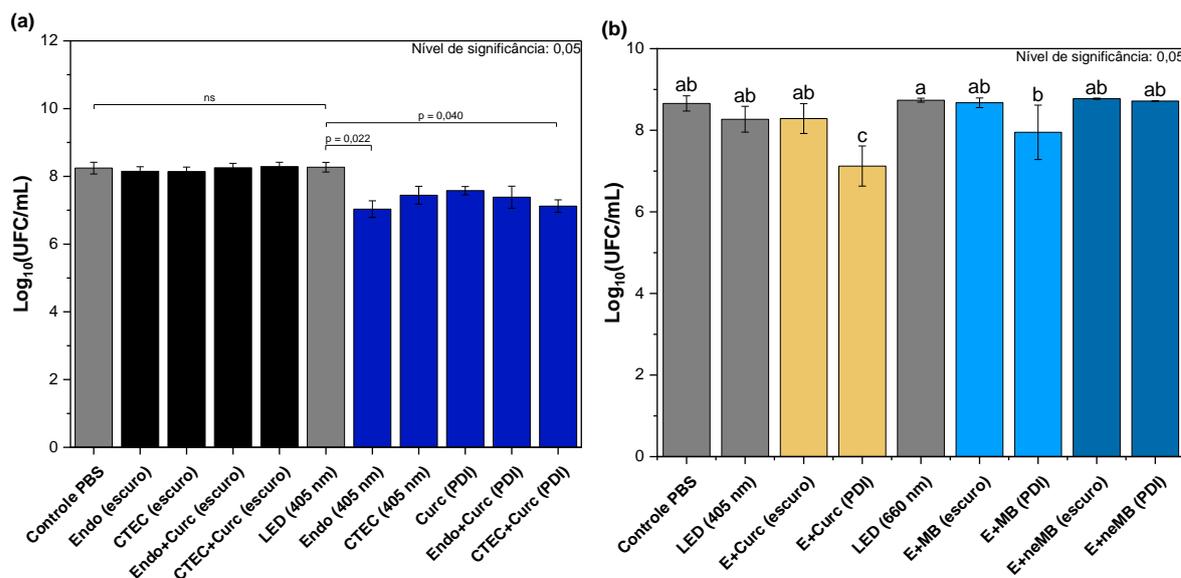
Os dados estatísticos foram obtidos em triplicatas de pelo menos duas ocasiões distintas ( $n = 6$ ). Cada dado apresentado mostra os valores médios e o desvio padrão de cada amostra. Análise estatística foi feita pelo método de comparação de pares utilizando o teste de Tukey ANOVA "one-way" com o programa *Origin 2020, versão 9.7.0.185 (Academic)*, *OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*, com nível de significância estatística equivalente a  $\alpha =$

0,05. Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05.

## 6.2 Resultados e Discussão

A *Figura 10* apresenta os resultados de viabilidade celular após o tratamento, onde a *Figura 10a* mostra as reduções significativas causadas pelas enzimas Endoglucanase (1,0 mg/mL) e CTEC (0,3 mg/mL) sozinhas e combinadas com Curcumina (40  $\mu$ M) após IFD, utilizando uma dose de 60 J/cm<sup>2</sup>. Os testes de toxicidade expressos pelas amostras mantidas no escuro revelam que tanto as enzimas sozinhas quanto combinadas com curcumina não apresentaram toxicidade, pois não houve redução bacteriana. Já as amostras que foram irradiadas contendo apenas enzimas ou combinadas com curcumina (IFD), sofreram redução variando entre 0,5 – 1 log<sub>10</sub>(UFC/mL) em relação ao total de biofilme cultivado. Esse padrão de redução apesar de combinadas as técnicas enzimáticas e fotodinâmica parecem não produzir efeitos aditivos ou sinérgicos devido ao fato de continuarem com os mesmos valores de redução apresentados nos Capítulos anteriores.

Na *Figura 10b* foram utilizados 3 FSs distintos (Curcumina - 100  $\mu$ M, AM - 20  $\mu$ M e MBne - 20  $\mu$ M) contra os biofilmes de *P. aeruginosa* e manteve-se o coquetel enzimático (CTEC - 0,3 mg/mL) utilizando sempre uma fluência de 60 J/cm<sup>2</sup>, onde foi possível visualizar uma pequena redução apenas na aplicação de Curc e AM com diminuição de aproximadamente 1 e 0,5 log<sub>10</sub>(UFC/mL) em relação aos respectivos controles. Novamente os valores foram mantidos os mesmos conforme havíamos mencionados.



**Figura 10** – Pré-tratamento enzimático seguido da ação fotodinâmica contra biofilme de *P. aeruginosa*. (a) Teste de viabilidade celular do biofilme bacteriano de *P. aeruginosa* após ação enzimática combinada com a ação fotodinâmica. (b) Teste de viabilidade celular do biofilme de *P. aeruginosa* após ação combinada com CTEC como enzimas e Curc, AM e MBne como fotossensibilizadores. Colunas representam a média de triplicatas feitas em dois experimentos distintos ( $n = 6$ ) e as barras de erro são os desvios padrões. Nível de significância estatística equivalente a  $\alpha = 0,05$ . Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05. **Legenda:** Endo: endoglucanase; CTEC: coquetel enzimático; Curc: Curcumina; E: Enzima; AM: azul de metileno; MBne: nanoemulsão de azul de metileno; ns: não significante.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

De acordo com as conclusões apresentadas no Capítulo 4, a enzima (CTEC) é capaz de reduzir 50 % da porcentagem de biomassa contida nos biofilmes analisados, utilizando apenas 0,3 mg/mL de concentração enzimática. Já o Capítulo 5 mostrou que o único fotossensibilizador capaz de provocar uma redução no biofilme de *P. aeruginosa* foi o AM com aproximadamente 1 log de redução. Uma hipótese levantada seria utilizar ambas as técnicas para obter resultados mais eficientes contra esses tipos de comunidades microbianas, visto que a utilização da IFD em bactérias planctônicas houve redução quase que completa desses microrganismos, utilizando concentrações baixas de AM. No entanto, a maior redução obtida foi cerca de 1  $\text{log}_{10}(\text{UFC/mL})$  utilizando curcumina após realizar um pré-tratamento enzimático e ação fotodinâmica posteriormente. Apesar da curcumina parecer mais eficiente que o AM a concentração utilizada desse FS foi de 100  $\mu\text{M}$ , sendo que para o AM e MBne foram de 20  $\mu\text{M}$ . Ambas as ações contribuíram para que ocorresse um evento de diminuição na quantidade de bactérias no biofilme maduro de *P. aeruginosa*, entretanto está longe da erradicação completa desse tipo de infecção para aplicação pré-clínicas ou até mesmo chegar no ambiente clínico.

Alguns estudos, em vez de utilizar enzima e posterior ação fotodinâmica, utilizam antibióticos no lugar das enzimas. Certos pontos em relação ao uso de antibióticos foram discutidos e analisados, todavia a busca por métodos alternativos e eficazes para a substituição dos antibióticos, utilizados em larga escala, continuam sendo investigados e analisados. (46-47, 67) De acordo com Ronqui e colaboradores (94), onde verificaram que bactérias planctônicas de *S. aureus* e *E. coli* mesmo utilizando concentrações de antibiótico (Ciprofloxacina) menores que a concentração inibitória mínima (CIM) e utilizando AM como fotossensibilizador foi possível obter uma redução de  $4 \log_{10}(\text{UFC/mL})$  e  $5 \log_{10}(\text{UFC/mL})$ , respectivamente, ou seja, a combinação de técnicas aumentou a efetividade das respostas empregadas de maneira distinta. Já para biofilmes bacterianos dessas mesmas espécies de *S. aureus* e *E. coli*, a ação fotodinâmica sozinha não obteve redução bacteriana, no entanto, a ação conjunta de antibiótico (Ciprofloxacina) mais IFD resultou em  $1 \log_{10}(\text{UFC/mL})$  de redução em *S. aureus* e  $2,4 \log_{10}(\text{UFC/mL})$  em *E. coli*. Embora os resultados apresentados não ilustrem danos elevados nos biofilmes testados, eles foram similares com os valores obtidos neste estudo utilizando o coquetel enzimático (CTEC – 0,3 mg/mL) e IFD (Curc – 100  $\mu\text{M}$  ou AM – 20  $\mu\text{M}$ ), mostrando que tais técnicas são capazes de exercer a mesma redução atuando em alvos diferentes.

### 6.3 Conclusão parcial

De acordo com os dados apresentados nos Capítulos anteriores e buscando uma associação entre o tratamento pré-enzimático e a IFD não foi possível apresentar uma maior resposta de inativação bacteriana no biofilme de *P. aeruginosa*. Embora muitos estudos estejam focados na utilização de antibióticos como agente anti-biofilme e outros compostos que auxiliam na união de técnicas convencionais, o foco deste estudo visa desvincular o uso de antibióticos devido aos problemas e limitações a longo prazo, que este composto traz, além do seu histórico para seleção das bactérias resistentes e perda de efetividade conforme ocorra uma modificação no microambiente bacteriano. No entanto, os resultados obtidos apesar de serem similares aos usos de antibióticos em diversas espécies bacterianas, eles não corroboram com a substituição do uso dos antibióticos com a utilização da técnica de IFD, pois os resultados demonstraram inferioridade na efetividade ou apresentam as mesmas reduções, ou seja, é necessário a busca por outras alternativas que eleve essa eficiência e proponha essa substituição com mais propriedade.

## 7 IFD COM ADIÇÃO DE IODETO DE POTÁSSIO

### 7.1 Metodologia

#### 7.1.1 Crescimento e tratamento do biofilme

A metodologia apresentada nos *Capítulos 4,5 e 6* construíram um protocolo padrão que foi utilizado em todos os experimentos desta seção. A única mudança novamente foi em relação ao tratamento aplicado, onde foi aplicado a IFD com adição de KI, precedido do pré-tratamento enzimático para verificar se as técnicas atingiriam níveis de erradicação da infecção causada pelo biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Foram testados dois compostos: *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) com 0,1 % de concentração e um sal inorgânico chamado Iodeto de Potássio (KI) na concentração de 100 mM. A utilização em conjunto desses dois compostos é expressa pela Soma (S) que contém SDS+KI na mesma solução e utilizada nos experimentos. Ambos os compostos foram dissolvidos de maneira separada e quando necessário foi combinado com os FSs e aplicados no biofilme. Ou seja, os grupos foram distribuídos conforme a *Tabela 9*.

**Tabela 9** - Grupos amostrais utilizados para ambos os fotossensibilizadores AM e MBne.

Grupos	Concentrações					Dose (J/cm <sup>2</sup> )
	SDS (%)	KI (mM)	S (SDS + KI)	E (mg/mL)	FS (μM)	
Controle PBS	-	-	-	-	-	-
AM 20μm (escuro)	-	-	-	-	20	-
SDS+AM 20μM (escuro)	0,1	-	-	-	20	-
KI+AM 20μM (escuro)	-	100	-	-	20	-
S+AM 20μM (escuro)	-	-	✓	-	20	-
E+AM 20μM (escuro)	-	-	-	0,3	20	-
E+SDS+AM 20μM (escuro)	0,1	-	-	0,3	20	-
E+KI+AM 20μM (escuro)	-	-	-	0,3	20	-
E+S+AM 20μM (escuro)	-	-	✓	0,3	20	-
LED (660 nm)	-	-	-	-	-	60
AM 20μm (IFD)	-	-	-	-	20	60
SDS+AM 20μM (IFD)	0,1	-	-	-	20	60
KI+AM 20μM (IFD)	-	-	-	-	20	60
S+AM 20μM (IFD)	-	-	✓	-	20	60
E+AM 20μM (IFD)	-	-	-	0,3	20	60
E+SDS+AM 20μM (IFD)	0,1	-	-	0,3	20	60
E+KI+AM 20μM (IFD)	-	-	-	0,3	20	60
E+S+AM 20μM (IFD)	-	-	✓	0,3	20	60

Fonte: Elaborada pelo autor

As melhores condições obtidas no *Capítulo 4* foram utilizadas e os biofilmes de *P. aeruginosa* submetidos aos tratamentos combinados com IFD e/ou com adição dos compostos já mencionados. Visto que os testes em células planctônicas de *P. aeruginosa* apresentaram melhores resultados de redução bacteriana utilizando o fotossensibilizador, AM, os testes seguintes foram realizados com este FS. Além disso, uma construção de nanoemulsão com MB (MBne) obtida em colaboração com o Prof. Dr. Gang Zheng foi utilizada para verificar se as propriedades de distribuição e penetração dessa nanoemulsão seria mais efetiva nos biofilmes de *P. aeruginosa*. Os testes foram feitos apenas em biofilmes, utilizando a concentração de 20  $\mu\text{M}$ , tempo de incubação de 2 h, irradiação de 20 min e dose de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

### 7.1.2 Análise estatística

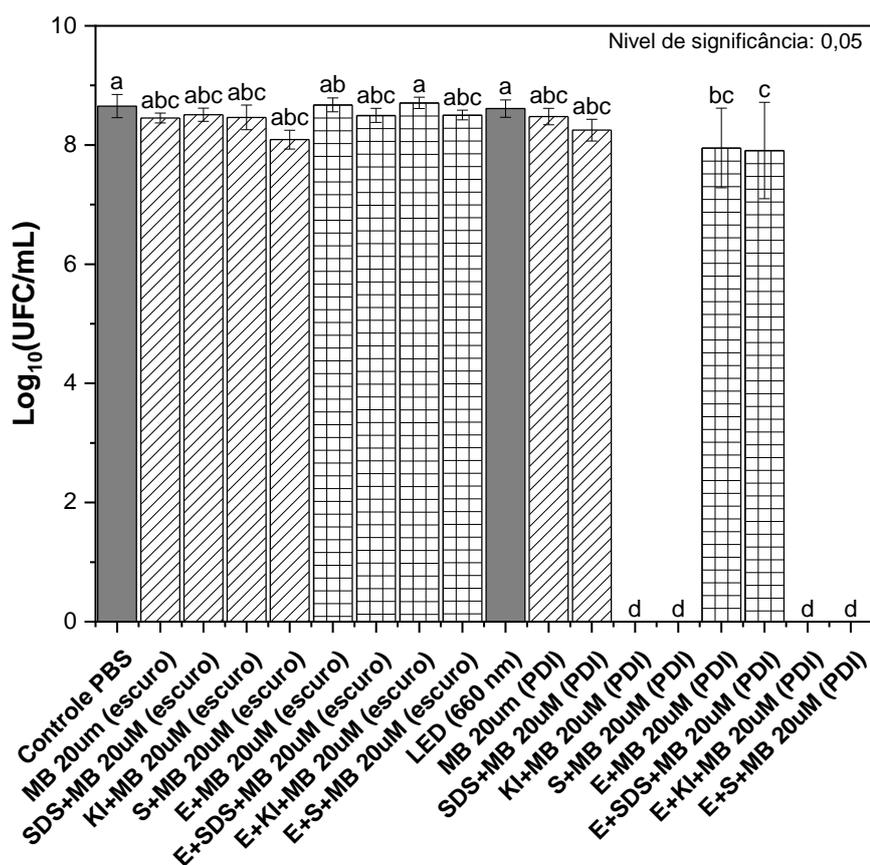
Os dados estatísticos foram obtidos em triplicatas de pelo menos três ocasiões distintas ( $n = 9$ ). Cada dado apresentado mostra os valores médios e o desvio padrão de cada amostra. Análise estatística foi feita pelo método de comparação de pares utilizando o teste de Tukey ANOVA "one-way" com o programa *Origin 2020, versão 9.7.0.185 (Academic)*, *OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*, com nível de significância estatística equivalente a  $\alpha = 0,05$ . Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05.

## 7.2 Resultados e Discussão

### 7.2.1 Estratégias combinadas utilizando o Azul de Metileno (AM) e sua construção em uma nanoemulsão de Azul de Metileno (MBne)

Os resultados seguintes são frutos de diversas ocasiões de experimentos, no qual foi possível variar um leque de grupos amostrais tanto para o AM quanto para a MBne. De acordo com a *Tabela 9*, as amostras foram testadas em pelo menos três dias distintos e sempre em triplicata para cada dia. As *Figura 11* e *Figura 12* ilustram em cada coluna todos os grupos amostrais utilizados, onde foi possível observar as reduções bacterianas causadas pelos tratamentos aplicados. Para todo grupo exposto à luz (IFD) há um grupo correspondente que não foi submetido a essa exposição (toxicidade no escuro). Como é possível visualizar, todos os grupos que não foram expostos a irradiação LED de 660 nm ( $50 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ) não obtiveram redução significativa em relação ao controle. Afirmando que todas as técnicas utilizadas no

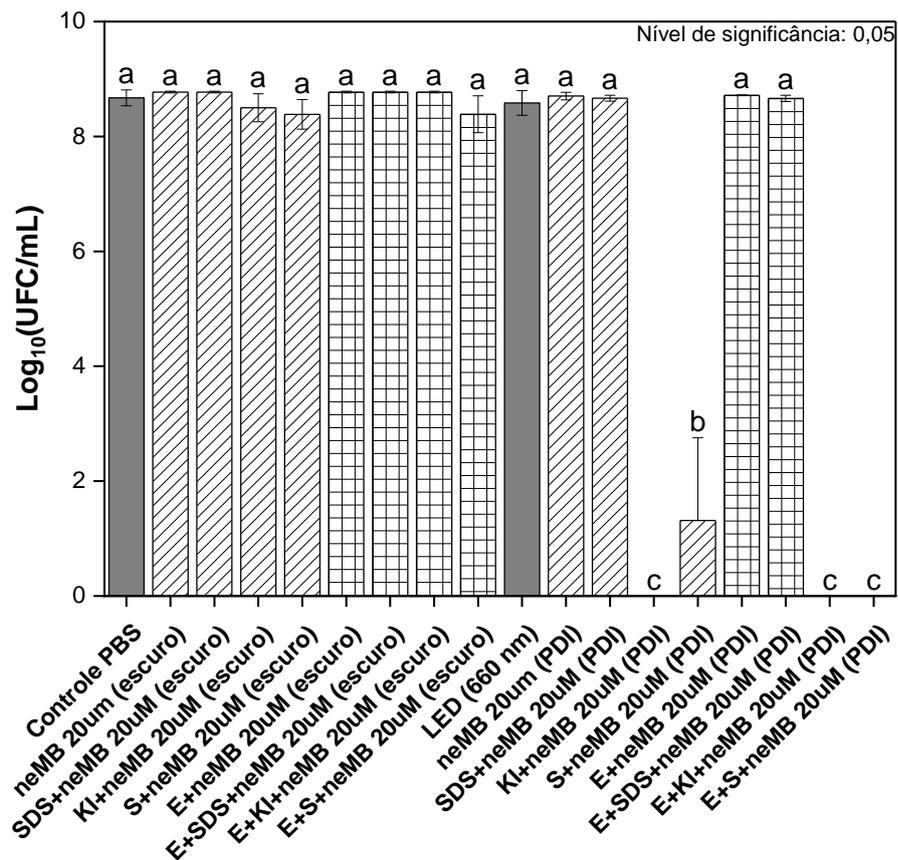
escuro não foram passíveis de toxicidade dos reagentes e técnicas utilizadas. Os grupos que receberam a fluência de  $60 \text{ J/cm}^2$ , ou seja, que foram submetidos à IFD, mas não apresentaram nenhum tipo de redução foram os grupos: AM, SDS+AM, E+AM e E+SDS+AM, portanto, para esses grupos, não houve morte bacteriana significativa em relação ao controle. Já para os grupos KI+AM, S+AM, E+KI+AM e E+S+AM resultaram em algo totalmente único no qual apresentaram fotoinativação total de  $8,6 \log_{10}(\text{UFC/mL})$  para o biofilme de *P. aeruginosa* e como já mencionado é uma espécie de bactéria completamente difícil de erradicar devido as propriedades físicas e químicas que os biofilmes possuem. (61) Para esses quatro últimos grupos, além do AM, o único composto em comum é o sal inorgânico KI (100 mM) que possui uma reação de dissociação, no qual os íons dissociados produzem novas espécies reativas quando combinados com os produtos gerados pela IFD, sendo apontadas como as principais espécies causadoras da erradicação total observada, completando os efeitos citotóxicos. Todos os parâmetros experimentais estão descritos na *Tabela 9*.



**Figura 11** – Fotoinativação do biofilme de *P. aeruginosa* utilizando AM a 20 µM com ou sem KI a 100 mM. Todos os grupos IFD foram irradiados por um dispositivo LED (*Biotable*) de 660 nm (50 mW/cm<sup>2</sup>) durante 20 min e dose final de 60 J/cm<sup>2</sup>. Colunas representam a média de triplicatas feitas em três experimentos distintos (n = 9) e as barras de erro são os desvios padrões. Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05. **Legenda:** IFD: inativação fotodinâmica; AM: azul de metileno; SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*; KI: iodeto de potássio; S: SDS+KI; E: Enzima; LED: *Light Emitting Diode*;

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Para os grupos contendo a MBne, os resultados foram semelhantes, apenas com uma mudança no comportamento do grupo S+MBne, no qual houve uma resposta bastante acentuada, cerca de 7,3 log<sub>10</sub>(UFC/mL) de redução, porém não apresentou erradicação total observadas em outras amostras (*Figura 12*).

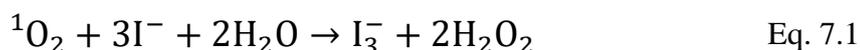


**Figura 12** – Fotoinativação do biofilme de *P. aeruginosa* utilizando MBne a 20 µM com ou sem KI a 100 mM. Todos os grupos IFD foram irradiados por um dispositivo LED (*Biotable*) de 660 nm (50 mW/cm<sup>2</sup>) durante 20 min e dose final de 60 J/cm<sup>2</sup>. Colunas representam a média de triplicatas feitas em três experimentos distintos (n = 9) e as barras de erro são os desvios padrões. Letras iguais no topo de cada barra nos gráficos mostram semelhança estatística entre os grupos e letras diferentes possuem nível de significância estatística de pelo menos 0,05. **Legenda:** IFD: inativação fotodinâmica; MBne: nanoemulsão de azul de metileno; SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*; KI: iodeto de potássio; S: SDS+KI; E: Enzima; LED: *Light Emitting Diode*;

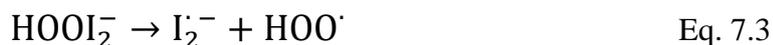
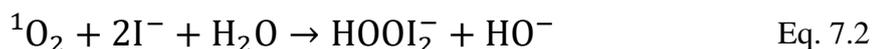
**Fonte:** Elaborada pelo autor.

### 7.2.2 Mecanismo de dissociação do KI em conjunto com a IFD

O principal mecanismo dessa erradicação total mostra que os produtos gerados durante a IFD, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e, principalmente, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), são capturados pela reação de dissociação do KI e produzem espécies reativas de iodo de longa vida e são capazes de produzir efeitos citotóxicos com altíssima efetividade. Como é possível ver pelas equações abaixo:



sendo que a Eq. 7.1 produziu espécies antibacterianas estáveis ( $\text{I}_3^- + 2\text{H}_2\text{O}_2$ ).



e a Eq. 7.3 radicais reativos  $\text{I}_2^- + \text{HOO}^\cdot$ .

Ambos os produtos gerados são advindos da união favorável entre IFD e adição de KI para inativação total de uma das piores infecções causadas por microrganismos, que é o caso dos biofilmes de *P. aeruginosa* que pode causar infecções em humanos como: fibrose cística, feridas crônicas, otite média crônica, prostatite bacteriana crônica, infecção pulmonar crônica. (17,95-96) Além de causar infecções no trato urinário, que são as principais infecções nosocomiais, seguidas por infecções por cateterismo e intubação. (17,97)

De acordo com o estudo pioneiro coordenado por Vecchio e colaboradores, no qual utilizaram IFD associado com KI e identificaram um efeito sinérgico dessa combinação aplicando em testes *in vitro* e *in vivo* nas espécies de *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans*. (49) Os autores utilizaram 10  $\mu\text{M}$  de AM, 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 10 mM de KI e obtiveram uma redução de 4  $\log_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$  para Gram-positivas (*S. aureus*) e 2-3  $\log_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$  com Gram-negativas (*E. coli*) para os testes *in vitro*. E para os testes *in vivo* foram avaliadas as queimaduras em rato infectadas com  $10^8$  UFC/mL de MRSA e tratadas utilizando associação de IFD e KI, sendo que os resultados para essa associação de técnicas ficaram por volta de 3,5  $\log_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$  utilizando 50  $\mu\text{M}$  de AM e 10 mM de KI sob irradiação no comprimento de onda 660 nm com

fluência de  $150 \text{ J/cm}^2$ . Outro estudo publicado que deu continuidade aos esforços de Vecchio, foi apresentado por Hamblin, no qual selecionou os melhores sais inorgânicos testados e descreveu alguns efeitos e mecanismos de reação que esses sais apresentaram quando se utilizou em conjunto com IFD, tais sais foram: azida de sódio, iodeto de potássio, brometo de potássio e tiocianato. (31) Devido as limitações de alguns sais, como toxicidade, baixa produção de espécies citotóxicas, o sal mais eficiente foi o KI na concentração de 100 mM, cujo valor foi extraído como referência. Os valores reportados são próximos aos obtidos e serviram de guia para saber se os tratamentos utilizados eram capazes de reduzir com efetividade os biofilmes analisados.

Alves e colaboradores (98) investigaram alguns efeitos que ocorrem quando se utiliza SDS ou KI contra biofilmes de *S. aureus* e mostram uma redução acentuada quando se combina terapia sonofotodinâmica (SPDT, do inglês *Sonophotodynamic Therapy*) e SDS, pois essa combinação entre surfactante e FS é uma alternativa para aumentar a solubilidade do FS com o meio aquoso utilizado, sendo que o FS utilizado foi a Curcumina. Além disso, foram investigados os efeitos com as técnicas de sono e terapia fotodinâmica separadas para obter uma margem de comparação entre as técnicas, no entanto, o resultado com maior redução continuou sendo a SPDT com  $7,43 \log_{10}(\text{UFC/mL})$  de diminuição comparado com o controle, além disso as técnicas separadas de TFD e SPD obtiveram reduções de 2,57 e 2,60  $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ . Essas reduções são bastante significantes, sendo que a diminuição apresentada para a SPDT foi muito próxima da erradicação total da formação de biofilme analisada e é um ótimo resultado para a combinações das técnicas. Além da utilização de diversas técnicas um complemento para se introduzir nos parâmetros experimentais seria o uso do SDS que, neste caso, gerou resultados satisfatórios.

Outro relato publicado por Vieira (99) e colaboradores acompanha os efeitos fotodinâmicos quando se utiliza uma mistura de cinco porfirinas, chamada de Formulação de FS (FORM), sendo que os autores variam a sua concentração de 1,0 a 20,0  $\mu\text{M}$ , além de adicionar ou não KI (100 mM), os testes foram realizadas em formas planctônicas e biofilmes de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e um bacteriófagos semelhantes a T4 (vírus) sob radiação fotossinteticamente ativa de luz branca (380-700 nm) com um irradiância de  $25 \text{ W/m}^2$  e os valores de fluência foram variados conforme o tempo de exposição. Apesar dos vários testes apresentados os melhores resultados para *E. coli* na forma planctônica foi utilizando 5  $\mu\text{M}$  de FORM + KI 100 mM que foi possível obter uma redução total após 75 min ( $11,25 \text{ J/cm}^2$ ). Para *S. aureus* planctônica os dois melhores resultados descritos foram utilizando 5,0 e 1,0  $\mu\text{M}$  de FORM + KI 100 mM, no qual os autores obtiveram uma redução total ( $\sim 9 \text{ logs}$ ) com 5 min

(2,25 J/cm<sup>2</sup>) e 20 min (9 J/cm<sup>2</sup>), respectivamente. Para *C. albicans* planctônica, 5 µM de FORM + KI 100 mM foi capaz de obter uma redução total (6,7 log<sub>10</sub>(UFC/mL)), ou seja, a fotoinativação total para este tipo de fungo foi tão eficiente quanto os valores apresentados para bactérias. Os autores destacam que muitos estudos publicados na literatura não possuem tanta eficiência quanto os resultados apresentados neste estudo. Além disso, foram testadas as formas planctônicas de bacteriófagos semelhantes a T4 nas concentrações de FORM (2,5 µM, 1,0 µM, 0,5 µM) com ou sem adição de KI e os resultados mostram que ocorrem inativações semelhantes, mas todas elas totais. Sendo que as melhores condições foram utilizando FORM sozinho (2,5 µM) e FORM (2,5 µM) + KI 100 mM, onde os resultados apresentaram fotoinativação total após 5 min (2,25 J/cm<sup>2</sup>) e 7,5 min (3,38 J/cm<sup>2</sup>), respectivamente. Seguindo com as contribuições de Vieira e colaboradores, os resultados obtidos para as comunidades de biofilmes para *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* foram bastante interessantes, visto que os autores conseguiram uma fotoinativação total desses biofilmes em certas condições. Para *E. coli* e *S. aureus* utilizando FORM + KI (100 mM) os biofilmes foram fotoinativados completamente (~ 7,5 log<sub>10</sub>(UFC/mL)) utilizando as concentrações de FORM de (20, 10, 5 e 1,0 µM) e dose final de luz de 9,0 J/cm<sup>2</sup>. A única concentração de FORM que não obteve fotoinativação total dos biofilmes de *E. coli* e *S. aureus* foi a de 0,5 µM que obteve cerca de 1 a 2 logs de redução, respectivamente. Para os biofilmes de *C. albicans* apresentaram resultados um pouco mais susceptível, sendo que foi capaz de obter uma fotoinativação total (~ 7,5 log<sub>10</sub>(UFC/mL)) nas concentrações de 0,5, 1,0, 5, 10 e 20 µM, porém todos na presença de KI (100 mM) e com dose final de luz de 9,0 J/cm<sup>2</sup>. A única concentração que não apresentou fotoinativação total foi 0,1 µM. De fato, os resultados apresentados possuem uma eficácia bastante elevada para as três espécies de microrganismos testados e a presença de KI foi crucial para a fotoinativação total.

Visto que a adição de reagentes como SDS e KI produzem resultados altamente eficazes em associação com técnica fotodinâmica, sendo capazes de produzir uma erradicação total das comunidades de biofilmes de diversas espécies como *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. A possibilidade da utilização dessa combinação de AM com KI foi altamente eficaz contra o biofilme de *P. aeruginosa*, produzindo uma erradicação total desse microrganismo. Conforme os excelentes resultados apresentados é necessário o desenvolvimento e análises *in vivo*, para obter respostas em um ambiente mais complexo e, dessa forma, aprimorar esta técnica conjunta bastante promissora.

### 7.3 Conclusão parcial

A utilização da IFD com adição de KI é uma combinação bastante promissora que potencializa os efeitos da inativação fotodinâmica devido a produção de espécies reativas de iodo, que provavelmente possuem um tempo de vida mais longo que as espécies reativas de oxigênio (EROs), entretanto ambos os produtos são essenciais para obtenção dos resultados observados de erradicação total dos biofilmes analisados. A hipótese inicial não apresentou resultados satisfatórios em relação a desestruturação do biofilme e redução de sua biomassa, no qual sugerimos utilizar um pré-tratamento enzimático para comprometer a matriz extracelular do biofilme e depois utilizar um tratamento que realmente fosse voltado para inativação bacteriana. Por fim, a adição de KI (sal inorgânico), que não possui toxicidade no escuro e é fácil de ser manipulado, produziu os efeitos desejados por outros caminhos já descritos, mas que superou algumas expectativas. Como os parâmetros descritos são facilmente replicáveis e de fácil manipulação, é nítido que os próximos passos são palpáveis para evoluir os estudos para ensaios pré-clínicos e clínicos, no qual seria o foco para os próximos experimentos.



## 8 Considerações Finais

Os experimentos realizados e os resultados obtidos tiveram como objetivo avaliar a efetividade da inativação fotodinâmica contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando duas estratégias para aumentar a efetividade do tratamento. Investigando o tratamento enzimático, o tratamento fotodinâmico e a associação entre eles contra os biofilmes maduros de *P. aeruginosa* afirmar-se que não há maneiras efetivas para obtenção de resultados próximos da erradicação total deste tipo de infecção e os melhores resultados não demonstraram superioridade em relação ao uso de antibióticos, indicando a necessidade de buscar outras alternativas. Devido a elevada complexidade e dificuldade de tratamento dos biofilmes, além da problemática envolvendo o uso exacerbado de antibióticos, uma maneira alternativa encontrada para contornar ambas as limitações foi a combinação da inativação fotodinâmica com a adição de iodeto de potássio que se mostrou uma técnica bastante promissora devido a sua erradicação total dos biofilmes de *P. aeruginosa*. Apesar dos resultados animadores que ultrapassaram as expectativas traçadas, há um longo caminho de análises mais profundas e testes *in vivo* para obtenção de resultados próximos da realidade clínica e definições de protocolos que possam ser utilizados como padrão de qualidade.



## REFERÊNCIAS

- 1 HOOPER, L. V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Review Microbiology*, v. 7, n. 5, p. 367–374, May 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2114.
- 2 SANCHEZ, E.; S. DORON, S. Bacterial infections: overview. *In: International Encyclopedia of Public Health Second Edition*, vol. 1, Elsevier, 2017. p. 196–205.
- 3 BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*, v. 121, n. 136, p. 1–58, May 2013. DOI: 10.1111/apm.12099.
- 4 O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 49–79, Oct. 2000. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
- 5 SEN, C. K. Human wounds and its Burden: an updated compendium of estimates. *Advances in Wound Care*, v. 8, n. 2, p. 39–48, Feb. 2019. DOI: 10.1089/wound.2019.0946.
- 6 STORR, J. *et al.* Core components for effective infection prevention and control programmes: new WHO evidence-based recommendations. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 6, n. 1, p. 6, Dec. 2017. DOI: 10.1186/s13756-016-0149-9
- 7 KIFFER, C. R. *et al.* Exploratory model for estimating occupation-day costs associated to hospital related infections based on data from national prevalence project: IRAS Brasil project. *Journal of Infection Control*, v. 4, n. 1, p. 30–33, 2015.
- 8 WHO. *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.* 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 27 abr. 2022.
- 9 BRAUNER, A. *et al.* Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 5, p. 320–330, May 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.34.
- 10 RUPEL, K. *et al.* Antimicrobial activity of amphiphilic nanomicelles loaded with curcumin against *Pseudomonas aeruginosa* alone and activated by blue laser light. *Journal Biophotonics*, v. 14, n. 3, p. e202000350, Mar. 2021. DOI: 10.1002/jbio.202000350.
- 11 AZEREDO, J. *et al.* Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 313–351, May 2017. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1208146.
- 12 COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318–22, May 1999. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
- 13 FLEMING, D.; RUMBAUGH, K. Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms*, v. 5, n. 2, p. 15, Apr. 2017. DOI: 10.3390/microorganisms5020015.
- 14 HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 95–108, Feb. 2004. DOI: 10.1038/nrmicro821.

- 15 VERDEROSA, A. D.; M. TOTSIKA, M.; FAIRFULL-SMITH, K. E. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Frontiers in Chemistry*, v. 7, p. 1–17, Nov. 2019. DOI: 10.3389/fchem.2019.00824.
- 16 VUOTTO, C.; G. DONELLI, G. Novel treatment strategies for biofilm-based infections. *Drugs*, v. 79, n. 15, p. 1635–1655, Oct. 2019. DOI: 10.1007/s40265-019-01184-z.
- 17 THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. Pseudomonas aeruginosa biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 1–25, Nov. 2020. DOI: 10.3390/ijms21228671.
- 18 PANG, Z. *et al.* Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 1, p. 177–192, Jan. 2019. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- 19 O'NEILL, J. *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*. 2014. Disponível em: <https://www.naturallivestockfarming.com/wp-content/uploads/2015/09/Antibiotics-UK-dec-2014-Review-paper-on-health-wealth1.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2022.
- 20 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 5, p. 380–387, May 2003. DOI: 10.1038/nrc1071.
- 21 RAAB, O. Über die wirkung Fluorescirender Stoffe auf Infusorien. *Zeitschrift für Biologie*, v. 39, p. 524–546, 1900.
- 22 DAI, T. *et al.* Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, p. 1–16, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00120.
- 23 KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, p. 1098–1107, Oct. 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- 24 LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; OLSEN, A. M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 26, n. 1, p. 1–11, Jan. 1961. DOI: 10.1093/jnci/26.1.1.
- 25 HAMBLIN, M. R. Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation by inorganic salts. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 15, n. 11, p. 1059–1069, Nov. 2017. DOI: 10.1080/14787210.2017.1397512.
- 26 ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, v. 473, n. 4, p. 347–364, Feb. 2016. DOI: 10.1042/BJ20150942.
- 27 HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 4, n. 3, p. 283–293, June 2005. DOI: 10.1177/153303460500400308.
- 28 SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to Kill Gram-negative bacteria. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, v. 8, n. 2, p. 108–120, July 2013. DOI: 10.2174/1574891X113089990012.

- 29 HUANG, L. *et al.* Potassium iodide potentiates broad-spectrum antimicrobial photodynamic inactivation using photofrin. *ACS Infectious Diseases*, v. 3, n. 4, p. 320–328, Apr. 2017. DOI: 10.1021/acsinfecdis.7b00004.
- 30 FLEMING, D.; RUMBAUGH, K. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Science Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–7, Dec. 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-29121-2.
- 31 BAKER, P. *et al.* Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Science Advances*, v. 2, n. 5, p. 1–10, 2016. DOI: 10.1126/sciadv.1501632.
- 32 ASKER, D. *et al.* Non-eluting, surface-bound enzymes disrupt surface attachment of bacteria by continuous biofilm polysaccharide degradation. *Biomaterials*, v. 167, p. 168–176, June 2018. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.016.
- 33 BANAR, M. *et al.* The efficacy of lyticase and  $\beta$ -glucosidase enzymes on biofilm degradation of *Pseudomonas aeruginosa* strains with different gene profiles. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 291, Dec. 2019. DOI: 10.1186/s12866-019-1662-9.
- 34 PIRLAR, R. F. *et al.* Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium. *PLoS One*, v. 15, n. 6, p. e0235093, June 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0235093.
- 35 LAUDERDALE, K. J. *et al.* Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 28, n. 1, p. 55–61, Jan. 2010. DOI: 10.1002/jor.20943.
- 36 STREET, C. N. *et al.* In vitro photodynamic eradication of *pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture. *Photochemistry and Photobiology*, v. 85, n. 1, p. 137–143, Jan. 2009. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00407.x.
- 37 HØIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 4, p. 322–332, Apr. 2010. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- 38 KAWCZYK-KRUPKA, A. *et al.* Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 23, p. 132–143, Sept. 2018. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.05.001.
- 39 TAYLOR, P. K.; YEUNG, A. T. Y.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology*, v. 191, p. 121–130, Dec. 2014. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.003.
- 40 MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 14, n. 8, p. 1518–1526, 2015. DOI: 10.1039/C5PP00037H.
- 41 GIULIANI, F. *et al.* In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 2, p. 637–642, Feb. 2010, DOI: 10.1128/AAC.00603-09.
- 42 HU, X. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm

infections. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1–24, June 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01299.

43 VECCHIO, D. *et al.* Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 9, p. 5203–5212, 2015. DOI: 10.1128/AAC.00019-15.

44 RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, v. 272, n. 6, p. 541–561, Dec. 2012. DOI: 10.1111/joim.12004.

45 LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 4, p. 1–9, Dec. 2014. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00178.

46 VENDRAMINI, Y. *et al.* Antimicrobial effect of photodynamic therapy on intracanal biofilm: a systematic review of in vitro studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 32, p. 102025, Dec. 2020. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102025.

47 FOSTER, T. J. *et al.* Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 49–62, Jan. 2014. DOI: 10.1038/nrmicro3161.

48 KIM S.-K.; LEE, J.-H. Biofilm dispersion in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 71–85, Feb. 2016. DOI: 10.1007/s12275-016-5528-7.

49 RASAMIRAVAKA, T. *et al.* The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1–17, 2015. DOI: 10.1155/2015/759348.

50 WALTERS, M. C. *et al.* Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 1, p. 317–323, Jan. 2003. DOI: 10.1128/AAC.47.1.317-323.2003.

51 CHIANG, W.-C. *et al.* Extracellular DNA shields against aminoglycosides in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 5, p. 2352–2361, May 2013. DOI: 10.1128/AAC.00001-13.

52 CHAO, Y. *et al.* Streptococcus pneumoniae biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 4, p. 1–16, Jan. 2015. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00194.

53 MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 165–199, Oct. 2001. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.

54 O'LOUGHLIN, C. T. *et al.* A quorum-sensing inhibitor blocks Pseudomonas aeruginosa virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 44, p. 17981–17986, Oct. 2013. DOI: 10.1073/pnas.1316981110.

55 KARYGIANNI, L. *et al.* Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, v. 28, n. 8, p. 668–681, Aug. 2020. DOI:

10.1016/j.tim.2020.03.016.

56 REDMAN, W. K.; WELCH, G. S.; RUMBAUGH, K. P. Differential efficacy of glycoside hydrolases to disperse biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 1–7, July 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00379.

57 YU, S. *et al.* PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix. *Cell Research*, v. 25, n. 12, p. 1352–1367, Dec. 2015. DOI: 10.1038/cr.2015.129.

58 ALLESEN-HOLM, M. *et al.* A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, v. 59, n. 4, p. 1114–1128, Feb. 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x.

59 TOSATO, M. G. *et al.* Synergistic effect of carboxypterin and methylene blue applied to antimicrobial photodynamic therapy against mature biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Heliyon*, v. 6, n. 3, p. e03522, Mar. 2020. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03522.

60 HAN, C. *et al.* Enzyme-encapsulating polymeric nanoparticles: a potential adjunctive therapy in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated infection treatment. *Colloids Surfaces B: biointerfaces*, v. 184, p. 110512, Dec. 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110512.

61 MAHMOUDI, H. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control bacterial infections. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, v. 9, n. 3, p. 154–160, July 2018. DOI: 10.15171/jlms.2018.29.

62 CADY, N. C. *et al.* Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PLoS One*, v. 7, n. 6, p. e38492, June 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0038492.

63 DÍAZ, M. A. *et al.* Human probiotic bacteria attenuate *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and virulence by quorum-sensing inhibition. *Biofouling*, v. 36, n. 5, p. 597–609, May 2020. DOI: 10.1080/08927014.2020.1783253.

64 CAI, Y.; WEBB, J. S. Optimization of nitric oxide donors for investigating biofilm dispersal response in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 20, p. 8859–8869, Oct. 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10859-7.

65 SURESH, M. K.; BISWAS, R.; BISWAS, L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 309, n. 1, p. 1–12, Jan. 2019. DOI: 10.1016/j.ijmm.2018.11.002.

66 WALL, G. *et al.* *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, v. 52, p. 1–6, Dec. 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.04.001.

67 JIA, Q. *et al.* Rejuvenated photodynamic therapy for bacterial infections. *Advanced Healthcare Materials*, v. 8, n. 14, p. 1900608, July 2019. DOI: 10.1002/adhm.201900608.

68 RAPACKA-ZDOŃCZYK, A. *et al.* Factors determining the susceptibility of bacteria to antibacterial photodynamic inactivation. *Frontiers in Medicine*, v. 8, May 2021. DOI: 10.3389/fmed.2021.642609.

- 69 WAINWRIGHT, M. Photodynamic therapy – from dyestuffs to high-tech clinical practice. *Review of Progress in Coloration and Related Topics*, v. 34, n. 1, p. 95–109, June 2004. DOI: 10.1111/j.1478-4408.2004.tb00155.x.
- 70 PARK, J. O. *et al.* Metabolite concentrations, fluxes and free energies imply efficient enzyme usage. *Nature Chemical Biology*, v. 12, n. 7, p. 482–489, 2016. DOI: 10.1038/nchembio.2077.
- 71 FDA. Guidance potassium iodide as a thyroid blocking agent in radiation emergencies. 2001. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/72510/download>. Acesso em: 23 jan. 2022.
- 72 KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1241, n. 1, p. 104–121, Dec. 2011. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06281.x.
- 73 LOMBARD, V. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochemical Journal*, v. 432, n. 3, p. 437–444, Dec. 2010. DOI: 10.1042/BJ20101185.
- 74 LIBERATO, M. V. *et al.* Insights into the dual cleavage activity of the GH16 laminarinase enzyme class on  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds. *Journal of Biological Chemistry*, v. 296, n. 9, p. 100385, Jan. 2021. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100385.
- 75 ZHANG, A. *et al.* A novel bacterial  $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase from Chitinolytic bacter *meiyuanensis* possessing transglycosylation and reverse hydrolysis activities. *Biotechnology for Biofuels*, v. 13, n. 1, p. 115, Dec. 2020. DOI: 10.1186/s13068-020-01754-4.
- 76 LEITE, A. E. T. *et al.* Low-resolution molecular shape, biochemical characterization and emulsification properties of a halotolerant esterase from *Bacillus licheniformis*. *European Biophysics Journal*, v. 49, n. 6, p. 435–447, Sept. 2020. DOI: 10.1007/s00249-020-01448-7.
- 77 PELLEGRINI, V. O. A. *et al.* Recombinant *Trichoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 22, p. 9591–9604, Nov. 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-6772-1.
- 78 SUGIMOTO, S. *et al.* Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-20485-z.
- 79 SAGGU, S. K.; JHA, G.; MISHRA, P. C. Enzymatic degradation of biofilm by metalloprotease from microbacterium sp. SKS10. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, Aug. 2019. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00192.
- 80 HOU, W. *et al.* A nanoemulsion with a porphyrin shell for cancer theranostics. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 58, n. 42, p. 14974–14978, Oct. 2019. DOI: 10.1002/anie.201908664.
- 81 BANFI, S. *et al.* Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 85, n. 1, p. 28–38, 2006. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2006.04.003.
- 82 LI, X. *et al.* Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on antibiotic-

resistant staphylococcal biofilm: an in vitro study. *Journal of Surgical Research*, v. 184, n. 2, p. 1013–1021, Oct. 2013. DOI: 10.1016/j.jss.2013.03.094.

83 SOUKOS, N. S. *et al.* Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 10, p. 2595–2601, Oct. 1998. DOI: 10.1128/AAC.42.10.2595.

84 POURHAJIBAGHER, M. *et al.* Sub-lethal doses of photodynamic therapy affect biofilm formation ability and metabolic activity of *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 15, p. 159–166, Sept. 2016. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.06.003.

85 NADELL, C. D. *et al.* Flow environment and matrix structure interact to determine spatial competition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Elife*, v. 6, p. 1–13, 2017. DOI: 10.7554/eLife.21855.

86 LAWRENCE, J. R. *et al.* In situ evidence for metabolic and chemical microdomains in the structured polymer matrix of bacterial microcolonies. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 92, n. 11, p. fiw183, 2016. DOI: 10.1093/femsec/fiw183.

87 OKSHEVSKY, M.; MEYER, M.; R. L. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 341–352, 2015. DOI: 10.3109/1040841X.2013.841639.

88 RONQUI, M. R. *et al.* Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 158, p. 122–129, May 2016. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.036.

89 RYBTKE, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *Journal of Molecular Biology*, v. 427, n. 23, p. 3628–3645, Nov. 2015. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.08.016.

90 TOLKER-NIELSEN, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *Apmis*, v. 122, n. s138, p. 1–51, Dec. 2014. DOI: 10.1111/apm.12335.

91 SKARIYACHAN, S. *et al.* Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiologica*, v. 63, n. 4, pp. 413–432, July 2018. DOI: 10.1007/s12223-018-0585-4.

92 ALVES, F. *et al.* Strategies to Improve the antimicrobial efficacy of photodynamic, sonodynamic, and sonophotodynamic therapies. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 53, n. 8, p. 1113–1121, Oct. 2021 DOI: 10.1002/lsm.23383.

93 VIEIRA, C. *et al.* Advances in aPDT based on the combination of a porphyrinic formulation with potassium iodide: effectiveness on bacteria and fungi planktonic/biofilm forms and viruses. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 23, n. 4-5, p. 290–301, Apr. 2020. DOI: 10.1142/S1088424619500408.