

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ISABELLE ALMEIDA DE LIMA

Estratégias para superação da barreira do surfactante pulmonar para  
sucesso da terapia fotodinâmica antimicrobiana

São Carlos

2024



ISABELLE ALMEIDA DE LIMA

Estratégias para superação da barreira do surfactante pulmonar para  
sucesso da terapia fotodinâmica antimicrobiana

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 Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador  
Bagnato

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2024

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.

Lima, Isabelle Almeida de

Estratégias para superação da barreira do surfactante pulmonar para sucesso da terapia fotodinâmica antimicrobiana / Isabelle Almeida de Lima; orientador Vanderlei Salvador Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2024.

76 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Pneumonia. 2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 3. Surfactante pulmonar. I. Bagnato, Vanderlei Salvador, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, que me sustentou e direcionou durante toda a caminhada. Ele é a minha Rocha, sem Ele eu nada sou.

Ao meu orientador, professor Vanderlei Bagnato, que sempre se manteve presente, mesmo quando de longe, trazendo ideias e discussões científicas enriquecedoras. À professora Cristina Kurachi e Natália Inada, que mesmo não sendo minhas orientadoras oficialmente, participaram ativamente de todo desenvolvimento do trabalho, dando todo o suporte necessário, sendo sempre muito gentis. À toda equipe do laboratório de Biofotônica e do Grupo de Óptica, e aos colegas do projeto de descontaminação pulmonar, especialmente à Lorraine, que se demonstrou uma verdadeira parceira e amiga, sempre disposta a ajudar em todas as etapas da pesquisa, e também ao Johan por todo apoio técnico e científico. Ao professor Valtencir Zucolotto pelo acesso aos equipamentos de DLS e NTA e a técnica Bruna por auxiliar na manipulação dos mesmos. À Dianeth Sara, pela síntese e fornecimento do gel do polímero Gantrez, à Michelle e Ana Júlia, pela colaboração para realização dos ensaios de citotoxicidade, e a todos os demais pesquisadores que contribuíram de alguma forma para realização do presente trabalho.

Ao meu marido Guilherme, e à minha família e amigos, que estiveram comigo em todos os momentos, trazendo leveza a esta caminhada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo 2022/03965-6) e à Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (EMBRAPII) (Contrato nº 1038) pela importante contribuição financeira para realização deste projeto.



*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,  
e os seus planos serão bem sucedidos.”*

Provérbios 16:3





## RESUMO

LIMA, I. A. **Estratégias para superação da barreira do surfactante pulmonar para sucesso da terapia fotodinâmica antimicrobiana.** 2024. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

A pneumonia é uma infecção caracterizada pela inflamação dos alvéolos que se enchem de líquido ou pus, dificultando a respiração e a passagem de oxigênio para corrente sanguínea. Esta infecção está entre as principais causas de morbimortalidade, devido principalmente a dificuldade de se encontrar tratamentos eficazes frente ao aumento da taxa de microrganismos resistentes a antibióticos. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) apresenta-se como uma potencial alternativa, devido sua alta eficiência antimicrobiana e ação não-específica com foco em múltiplos alvos moleculares, seletividade ao local de tratamento e caráter não invasivo. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa relataram a eficiência e segurança de um protocolo para fotoinativação de *Streptococcus pneumoniae in vitro*, bem como a entrega de luz e fotossensibilizador em modelo animal. No entanto, a redução de microrganismos *in vivo* ainda apresenta desafios a serem contornados, devido à presença do surfactante pulmonar (SP), que aprisiona os fotossensibilizadores (FS) impedindo que estes cheguem ao alvo microbiano. No presente trabalho, diferentes abordagens foram empregadas afim de se otimizar a resposta antimicrobiana da TFDa utilizando indocianina verde (ICV) na presença de SP, sendo este FS associado a perfluorocarbono e nanobolhas de oxigênio, além da combinação de TFDa com ultrassom. Entretanto, a estratégia mais promissora consistiu na combinação de ICV (10 µM) ao polímero Gantrez AN-139 (0,2% (m/v)), que apresentou elevada redução microbiana de *S. pneumoniae* concomitantemente a não toxicidade, em condições similares de tratamento, para linhagens celulares pulmonares humanas de fibroblasto (MRC-9) e epiteliais (A549). Os resultados obtidos demonstram as dificuldades no desenvolvimento de protocolos para desinfecção pulmonar e aponta uma possível resolução para otimização da resposta antimicrobiana da TFDa para este fim.

Palavras-chave: Pneumonia. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Surfactante pulmonar.



## ABSTRACT

LIMA, I A. **Strategies for overcoming pulmonary surfactant barrier for successful antimicrobial photodynamic therapy.** 2024. 76 p. Dissertation (Master of Science) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

Pneumonia is an infection characterized by inflammation of the alveoli that is filled with fluid or pus, making breathing and the passage of oxygen into the bloodstream difficult. This infection is among the main causes of morbidity and mortality, mainly due to the difficulty in finding effective treatments given the increase in the rate of antibiotic-resistant microorganisms. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) presents itself as a potential alternative, due to its high antimicrobial efficiency and non-specific action acting on multiple molecular targets, selectivity to the treatment site and through non-invasive procedure. Studies carried out by our research group reported the efficiency and safety of a protocol for *in vitro* photoinactivation of *Streptococcus pneumoniae*, as well as the delivery of light and photosensitizer in an animal model. However, the reduction of microorganisms *in vivo* still presents challenges to be overcome, due to the presence of lung surfactant (LS), which traps photosensitizer (PS) molecules preventing them from interacting with the microbial target. In the present study, different approaches were used in order to optimize the antimicrobial response of aPDT using indocyanine green (ICG) in the presence of LS, where this FS was associated with perfluorocarbon and oxygen nanobubbles, in addition to the combination of aPDT with ultrasound. However, the most promising strategy consisted of the combination of ICG (10  $\mu$ M) with the Gantrez AN-139 polymer (0.2% (w/v)), which showed high microbial reduction of *S. pneumoniae* concomitantly with non-toxicity for lung cell lines human fibroblast (MRC-9) and epithelial (A549), under same treatment conditions. The achieved results demonstrate the difficulties in developing protocols for lung disinfection and point to a possible solution for optimizing the antimicrobial response of aPDT for this purpose.

Keywords: Pneumonia. Antimicrobial photodynamic therapy. Pulmonary surfactant.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama de Jablonski simplificado.....	27
Figura 2 -	Absorbância relativa das principais biomoléculas presentes no tecido (Hb: desoxihemoglobina, HbO <sub>2</sub> :oxihemoglobina).....	28
Figura 3 -	Estrutura química da indocianina verde.....	29
Figura 4 -	Representação esquemática de um alvéolo normal, com a organização das membranas do SP na interface ar-líquido. ATI, pneumócitos alveolares tipo I; ATII, pneumócitos alveolares tipo II; AMΦ, macrófagos alveolares; DPPC, dipalmitoilfosfatidilcolina; COL, colesterol; PG, fosfatidilglicerol; SPA-A e SP-C, proteínas.....	31
Figura 5-	Biotable de 808 nm utilizada para iluminação.....	37
Figura 6 -	TFDa sob suspensões de <i>S. pneumoniae</i> usando formulações de ICV (10 μM), PFOB (70% (v/v)) e diferentes concentrações dos emulsificantes, em meio contendo 5% (v/v) de Curosurf® (D=20 J/cm <sup>2</sup> ). O grupo ICV refere-se ao uso do FS na ausência das formulações.....	40
Figura 7 -	Influência da adição prévia de emulsificantes (30 min antes da adição de ICV) a diferentes concentrações na resposta antimicrobiana da TFDa contra <i>S. pneumoniae</i> em meio contendo 5%(v/v) de Curosurf® (D=20 J/cm <sup>2</sup> ).....	41
Figura 8-	TFDa sob suspensões de <i>S. pneumoniae</i> utilizando ICV e ICV-NBs-O <sub>2</sub> em meio contendo 5%(v/v) de Curosurf® (20 J/cm <sup>2</sup> ).....	43
Figura 9 -	(a) Inativação de <i>S. pneumoniae</i> através do uso de US em diferentes intensidades. (b) Combinação de TFDa com US em meio contendo 5% de Curosurf® (I=1 W/cm <sup>2</sup> , 50% ciclo de trabalho, 1 MHz, 5 min; D=20 J/cm <sup>2</sup> ).....	44
Figura 10 -	Combinação de TFDa e US (I=1 e 2 W/cm <sup>2</sup> ) utilizando água como acoplador em meio contendo 5% Curosurf® (t=15 min, 50% de ciclo de trabalho, 1 MHz; 20 J/cm <sup>2</sup> ).....	45
Figura 11 -	Estrutura química de Gantrez AN ou poli(anidrido metilvinílico-co-maleico).....	47
Figura 12 -	Efeito antimicrobiano de Gantrez AN-139 (GA) de acordo com sua concentração %(m/v): (a) combinado a ICV (10 μM) em meio contendo 5%(v/v) de Curosurf® (TFDa); (b) irradiado e (c) no escuro. (40 J/cm <sup>2</sup> , 40 min incubação).....	52

Figura 13 -	Influência do tempo de incubação na inativação fotodinâmica de <i>S. pneumoniae</i> em meio contendo 5%(v/v) de Survanta® (20 J/cm <sup>2</sup> ).....	53
Figura 14 -	Efeito da adição de Gantrez (0,2% (m/v)) anteriormente a adição de ICV (10 µM) intervaladas por 10 e 60 min na TFDa, em meio contendo 5%(v/v) de Survanta® (20 J/cm <sup>2</sup> ).....	54
Figura 15 -	Espectro de absorvância da ICV livre e das formulações com diferentes concentrações de Gantrez em PBS, com ou sem 5% (v/v) de Survanta®.....	54
Figura 16 -	Espectro de fluorescência da ICV livre e em formulações com diferentes concentrações de Gantrez em PBS, com ou sem 5% (v/v) de Survanta®.....	56
Figura 17 -	Perfil de fotodegradação da ICV livre e em formulações em PBS.....	57
Figura 18 -	Medições da dispersão dinâmica de luz (DLS) da distribuição de tamanhos baseados em intensidade de amostras. Os histogramas representam três medições de cada amostra.....	58
Figura 19 -	Análise de distribuição de tamanho de partícula por NTA. Histogramas representativos da distribuição de tamanho médio (linha preta) de três medições de uma única amostra. As áreas vermelhas especificam o desvio padrão (DP) entre as medições e os números azuis indicam os máximos dos picos individuais.....	59
Figura 20 -	Gráfico de dispersão representativo de três medições referentes a uma única amostra da intensidade (unidades de absorvância, u.a.) em função do tamanho (nm) obtido por NTA.....	60
Figura 21 -	Viabilidade celular das linhagens MRC-9 e A549 após incubação por 40 min com 0,2% (m/v) de Gantrez AN-139. O ensaio MTT foi realizado imediatamente após a incubação (0 h). Resultados apresentados em % em relação ao controle. Os experimentos foram realizados em sextuplicata, em três ocasiões diferentes.....	62
Figura 22 -	Viabilidade celular das linhagens MCR-9 e A459 após incubação por 40 min com diferentes concentrações de Gantrez AN-139. O MTT foi realizado imediatamente (0h) ou 24 h após a incubação. Resultados apresentados em % em relação ao controle. Os experimentos foram realizados em sextuplicata.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Massa e volume dos componentes da formulação de PFOB, Pluronic e ICV.....	36
Tabela 2 -	Massa e volume dos componentes da formulação de PFOB, Tween 80 e ICV.....	36
Tabela 3 -	Massa e volumes correspondentes das formulações de Gantrez-ICV.	46
Tabela 4 -	Tamanho médio e desvio padrão das partículas medido por NTA para o polímero livre (0,2% (m/m)) e associado a ICV (10 $\mu$ M). Os parâmetros D <sub>10</sub> , D <sub>50</sub> e D <sub>90</sub> indicam que 10%, 50% ou 90%, respectivamente, da população da partícula apresentou diâmetro menor ou igual ao valor especificado.....	57
Tabela 5 -	Potencial zeta do polímero, da ICV livre e da formulação.....	58





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACQ –	Extinção causada pela agregação
AM –	Azul de metileno
AMne –	Azul de metileno nanoestruturado
ANOVA –	Análise de Variância
BHI –	<i>Brain Heart Infusion</i>
CIS –	Cruzamento intersistemas
CMI –	Concentração mínima inibitória
COL –	Colesterol
DLS –	Análise dinâmica de espalhamento de luz
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DPOC –	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPPC –	Ddipalmitoilfosfatidilcolina
EROs –	Espécies reativas de oxigênio
FDA –	<i>Food and Drug Administration</i>
FS –	Fotossensibilizador
GA –	Gantrez™ AN-139
ICC –	Insuficiência obstrutiva crônica
ICV –	Indocianina verde
ICV-	NBs-O <sub>2</sub> – Indocianina verde associada a nanobolhas de oxigênio
ITRIs –	Infecções do trato respiratório
MRSA –	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MTT -	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NTA –	Análise de rastreamento de nanopartículas
OMS –	Organização Mundial da Saúde
OS –	Fosfatidilserina
PAC –	Pneumonia adquirida na comunidade
PAH –	Pneumonia adquirida no hospital

PAV –	Pneumonia adquirida associada a ventilação
PBS –	Tampão fosfato salino
PC –	Fosfatidilcolina
PE –	Fosfatidiletanolamina
PFC –	Perfluorocarbono
PFOB –	Brometo de perfluorooctil
PG –	Fosfatidilglicerol
PI –	Fosfatidilinositol
PLA –	Poli-l-arginina
PLL –	Poli-l-lisina
PS –	Polissacarídeo
PZ –	Potencial Zeta
SDS –	Dodecil sulfato de sódio
SM –	Esfingomielina
SP –	Surfactante pulmonar
TFDa –	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TSB –	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC –	Unidades formadoras de colônias
US –	Ultrassom
VPC –	Vacinas pneumocócicas conjugadas
VPP –	Vacinas pneumocócicas polissacarídicas

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1	Pneumonia e resistência antimicrobiana.....	21
2.2	Terapia Fotodinâmica.....	24
2.3	Inativação fotodinâmica de microrganismos causadores de pneumonia.....	27
2.4	Surfactante pulmonar.....	28
3	OBJETIVOS .....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	DESAFIOS DA APLICAÇÃO DE INDOCIANINA VERDE NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PULMONAR.....	33
4.1	Metodologia.....	33
4.1.1	Abordagens químicas.....	33
4.1.1.1	ICV associada a brometo de perfluorooctil e diferentes emulsificantes .....	34
4.1.1.2	ICV associada a nanobolhas de oxigênio .....	35
4.1.1.3	Fonte de luz.....	35
4.1.1.4	Ensaio de inativação fotodinâmica .....	35
4.1.2	Abordagem física .....	36
4.1.2.1	Fonte de luz e ultrassom .....	36
4.1.2.2	Ensaio de inativação bacteriana.....	36
4.2	Resultados e discussão.....	37
4.2.1	Abordagens químicas.....	37
4.2.1.1	ICV associada a brometo de perfluorooctil e diferentes emulsificantes .....	37
4.2.1.2	Associação de indocianina verde a nanobolhas de oxigênio .....	40
4.2.2	Abordagem física .....	41
4.2.2.1	Uso associado de TFDa e ultrassom .....	41
6	SUPERANDO O SURFACTANTE PULMONAR ATRAVÉS DE FORMULAÇÕES DE INDOCIANINA VERDE COM GANTREZ™ AN-139 .....	45
6.1.6	Ensaio de citotoxicidade .....	48
6.2	Resultados e discussão.....	49
6.2.1	Inativação fotodinâmica de <i>S. pneumoniae</i> .....	49
6.2.2	Propriedades ópticas das formulações ICV-Gantrez .....	52
6.2.3	Análises de tamanho de partículas e potencial zeta .....	55
6.2.4	Ensaio de citotoxicidade .....	59
6.3	Desafios em modelo animal .....	61
7	CONCLUSÕES .....	63
	REFERÊNCIAS.....	67



## 1 INTRODUÇÃO

As infecções do trato respiratório inferior (ITRIs) atualmente ocupam a quinta posição entre todas as causas de morte globalmente, onde a pneumonia pneumocócica é responsável por 55,4% das mortes relacionadas a ITRIs, em todas as faixas etárias.<sup>1</sup> O tratamento convencional consiste no uso de antibióticos, entretanto, devido muitas vezes ao uso excessivo e inadequado destes medicamentos tanto pela comunidade quanto por diversos setores industriais e agropecuários, tem-se aumentado consideravelmente o número de microrganismos multiresistentes, sendo, portanto, de extrema urgência o desenvolvimento de novos protocolos para o tratamento destas infecções.<sup>2</sup>

Neste contexto, destaca-se a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), que apresenta amplo espectro de ação e foco em múltiplos alvos moleculares, o que dificulta o desenvolvimento da resistência microbiana e permite que a mesma seja utilizada eficientemente contra uma grande diversidade de microrganismos, inclusive os resistentes.<sup>3</sup> O mecanismo de ação da TFDa consiste na ativação de um fotossensibilizador (FS) através da luz em um comprimento de onda específico, que com a combinação do oxigênio molecular, resulta em espécies reativas de oxigênio (EROs) que ocasionam morte celular.<sup>4-5</sup>

Diante do exposto, nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem se empenhado para o desenvolvimento de um protocolo seguro e eficaz para inativação fotodinâmica de *Streptococcus pneumoniae* utilizando-se indocianina verde (ICV) e irradiação no infravermelho, apresentando ótimos resultados *in vitro*, sendo também comprovada anteriormente a entrega do FS e luz em modelo animal.<sup>6-7</sup> Entretanto, o sucesso desta terapia *in vivo* apresenta alguns desafios a serem contornados, devido a presença do surfactante pulmonar (SP), que aprisiona as moléculas dos fotossensibilizadores, impedindo que estas estejam disponíveis para interação com o alvo microbiano.<sup>8</sup>

Dessa forma, considerando a urgência do desenvolvimento de novos tratamentos alternativos à antibioticoterapia, e tendo em vista o potencial da TFDa contra diversas infecções, o presente trabalho teve por escopo a abordagem de estratégias em busca da diminuição da interação entre o FS e o SP para assim possibilitar a desinfecção pulmonar por ação fotodinâmica.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Pneumonia e resistência antimicrobiana

A pneumonia é uma das principais causas de morte em todo mundo, sendo um dos mais graves problemas de saúde pública global devido a seu fardo médico e econômico, concernente aos custos com hospitalização e às consequências a longo prazo.<sup>9-10</sup> Os principais acometidos por esta infecção são crianças de até 5 anos, além de idosos, pessoas com doenças crônicas e imunocomprometidas.<sup>11-14</sup>

Em um pulmão saudável, a cada inspiração, o ar é puxado e flui através da traqueia e de suas ramificações (brônquios), enchendo milhares de pequenos sacos de ar (alvéolos) localizados nas extremidades dos brônquios, que são rodeados por pequenos vasos sanguíneos (capilares). Neste local, ocorre a troca de gases (oxigênio e dióxido de carbono) entre o ar e o sangue. Mediante a infecção, a resposta corpórea consiste em encher os pulmões de pus, que contém elementos sanguíneos, como os glóbulos brancos e proteínas plasmáticas, que são essenciais para o combate dos micróbios. Entretanto, a alta concentração destes componentes nos alvéolos pode gerar danos às células pulmonares e ocasionar acúmulo de líquido na região (edema pulmonar), que dificulta a respiração e a passagem de oxigênio para a corrente sanguínea. Com isso, os sintomas mais recorrentes da pneumonia são tosse, falta de ar, dor no peito, produção de expectoração e fadiga.<sup>15-17</sup>

A classificação da pneumonia pode ser dada de diferentes maneiras, sendo a mais comum relacionada a localização do paciente no momento da aquisição da infecção, sendo estas a pneumonia adquirida na comunidade (PAC) e pneumonia adquirida no hospital (PAH) (também chamada pneumonia nosocomial, que ocorre após 48h de admissão hospitalar e que inclui a pneumonia associada a ventilação (PAV)).<sup>15</sup>

Os principais agentes microbióticos causadores da PAC podem ser classificados em típicos, como: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* e atípicos, como: *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*.<sup>18</sup> A taxa de mortalidade por PAC varia drasticamente de acordo com a gravidade da doença no início do tratamento e as comorbidades apresentadas pelo paciente. Em casos em que há necessidade de hospitalização, esta taxa é cerca de 12%. Entretanto, em

pacientes mais severamente debilitados com bacteremia, internados em UTI, a taxa de mortalidade chega a 40%.<sup>19</sup> A presença de comorbidades subjacentes, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, diabetes mellitus, insuficiência renal, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), doença arterial coronariana, malignidade, alcoolismo, idade superior a 70 anos, doença neurológica crônica e/ou doença hepática crônica, não apenas pode contribuir significativamente para a mortalidade por PAC, mas também pode alterar os microrganismos subjacentes à infecção.<sup>19-20</sup> No que concerne ao tratamento, na maioria dos casos por não ser possível identificar qual o agente etiológico específico envolvido logo após a detecção da PAC, o mesmo é dado de acordo com o microrganismo mais provável no local da aquisição da doença, além de levar em consideração as particularidades de cada paciente. As principais classes de antibióticos empregados no Brasil são macrolídeos,  $\beta$ -lactâmicos e fluoroquinolonas.<sup>21</sup>

Com relação a PAH, esta tem sido a segunda causa mais comum de infecção nosocomial, sendo a antibióticoterapia inadequada ou tardia associada a maior mortalidade, com taxas podendo chegar até 50%.<sup>22-23</sup> Os microrganismos envolvidos incluem *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Acinetobacter* spp e *Staphylococcus aureus*.<sup>24</sup>

A principal preocupação na PAH e PAV se dá pelo aumento cada vez mais proeminente dos microrganismos multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), que limita as opções de tratamentos e o encarecem. Nestes casos, geralmente, o antibiótico receitado é a vancomicina, que devido sua baixa penetração nos pulmões e nefrotoxicidade, leva ao insucesso da terapia em uma taxa de até 70%.<sup>25-26</sup>

Nesse sentido, novos fármacos têm sido desenvolvidos, como a linezolida, que apresenta potente atividade antimicrobiana bastante relatada na literatura. Entretanto, o uso deste medicamento deve ser estritamente regulado, uma vez que já há relatos de incidência de resistência microbiana devido principalmente ao uso prolongado do mesmo, que além disso pode apresentar efeitos colaterais como alterações hematológicas e interações medicamentosas com inibidores seletivos de recaptção de serotonina e outros medicamentos com atividade serotoninérgica.<sup>27-29</sup>

As vias convencionais de administração de antibióticos consistem principalmente em oral e intravenosa, que ocasionam distribuição sistêmica, onde apenas uma pequena quantidade do fármaco chega de fato ao local da infecção. Para



o caso de fluoroquinolonas, por exemplo, boa parte da droga é excretada rapidamente por meio do sistema biliar e cerca de um terço está eventualmente presente nas fezes.<sup>30-31</sup> Alternativamente, os fármacos podem ser administrados pela via pulmonar, contornando assim o metabolismo de primeira passagem, além de minimizar os efeitos colaterais sistêmicos e aumentar a biodisponibilidade local. Entretanto, no caso da nebulização, deve-se considerar as possíveis perdas devido a deposição extrapulmonar do medicamento e do reflexo de tosse pós-inalação, além da defesa inata pulmonar, que pode eliminar rapidamente os antibióticos, requerendo administração repetida destes fármacos, o que pode levar a não adesão do tratamento pelos pacientes.<sup>30-32</sup> Outra possibilidade, consiste na instilação intratraqueal, um método simples e barato, no qual uma pequena quantidade do medicamento é entregue por meio de uma seringa especial. Entretanto, a distribuição e deposição do fármaco não é dada de maneira uniforme, sendo necessário o tratamento repetida vezes. Além disso, este procedimento pode ser desconfortável, não sendo bem aceito em práticas clínicas.<sup>33-34</sup>

Além dos antibióticos, outra possível abordagem contra a pneumonia consiste na vacinação. Os primeiros tipos a serem produzidos foram as vacinas pneumocócicas polissacarídicas (VPP), a partir de 1980, com 23 sorotipos diferentes (VPP23). Entretanto, a VPP23 induz resposta independente de células T e por esta razão não era indicada para crianças menores que dois anos, e além disso, para pessoas com mais de 60 anos, a resposta obtida era inferior quando comparado a jovens adultos. Assim, após os anos 2000, outra geração de vacinas foi desenvolvida, as pneumocócicas conjugadas (VPC), que consistiu na combinação do polissacarídeo (PS) com proteínas transportadoras, que ocasionam uma resposta dependentes de células T de memória ao PS e proteção de bebês.<sup>35-37</sup> Após o surgimento destas vacinas, houve grande diminuição da propagação da pneumonia e proteção dos não vacinados através do efeito rebanho. Entretanto, considerando que estas vacinas só são eficazes contra os sorotipos que contém, há uma crescente preocupação quanto a real eficácia da vacinação, principalmente quando há prevalência de sorotipos relacionados a cepas resistentes a antibióticos.<sup>35,38</sup>

Dessa forma, o desenvolvimento de tratamentos que não ocasionem a resistência antimicrobiana é de suma importância, sendo a terapia fotodinâmica antimicrobiana uma potencial candidata.

## 2.2 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento promissor que surgiu originalmente como alternativa a quimio e radioterapia utilizadas contra o câncer, sendo atualmente utilizada também em doenças não oncológicas.<sup>5</sup> A combinação de fotossensibilizadores (FS) e luz para terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) foi inicialmente descrita por Oscar Raab, no início do século XX, na Alemanha, que observou a morte do *Paramecium caudatum* quando expostos a luz solar e ao ar, na presença de acridina.<sup>39</sup> O princípio da TFDa, baseia-se, portanto, na ativação de uma molécula fotossensibilizadora no comprimento de onda adequado, na presença de oxigênio, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são citotóxicas.<sup>40</sup>

Dentre as vantagens oferecidas pela TFDa frente aos antibióticos tem-se sua tripla especificidade ao local de tratamento, havendo baixa absorção do FS pelas células não-alvo, e possibilidade de administração do FS e luz de forma tópica, o que conseqüentemente diminui drasticamente a toxicidade sistêmica fora da zona irradiada contendo FS. Outra vantagem importante diz respeito a possibilidade muito limitada de desenvolvimento de resistência microbiana, uma vez que os FS costumemente não apresentam toxicidade no escuro e as EROs formadas após a irradiação possuem tempo de vida curto e ação em múltiplos alvos moleculares e diferentes vias metabólicas, e dessa forma as bactérias não são aptas a desenvolverem mecanismos adaptativos nestas condições.<sup>41-42</sup>

O processo fotodinâmico inicia-se com a transferência eletrônica a um estado de energia mais alto após a absorção de luz. A molécula, em seu estado excitado, pode então dissipar sua energia emitindo fluorescência ou passar pelo cruzamento intersistemas (CIS) e ir para o estado tripleto. Deste ponto, pode ocorrer um decaimento radiativo (fosforescência) ou então a geração de toxicidade por meio de dois tipos de reações.<sup>43-44</sup>

Na reação do tipo I, o FS no seu estado tripleto excitado reage com moléculas orgânicas transferindo carga, que dará origem a radicais e íons radicais que reagem com o oxigênio molecular, produzindo EROs, como o ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Na reação do tipo II, o FS no estado tripleto excitado transfere energia diretamente para a molécula de oxigênio no estado tripleto

fundamental. Ocorre a transferência direta de energia entre moléculas ( $FS \rightarrow O_2$ ) (aniquilação tripleto-triplete). Dessa maneira é gerado o oxigênio singleto.<sup>45</sup>

O diagrama de Jablonski ilustra estes mecanismos (figura 1).

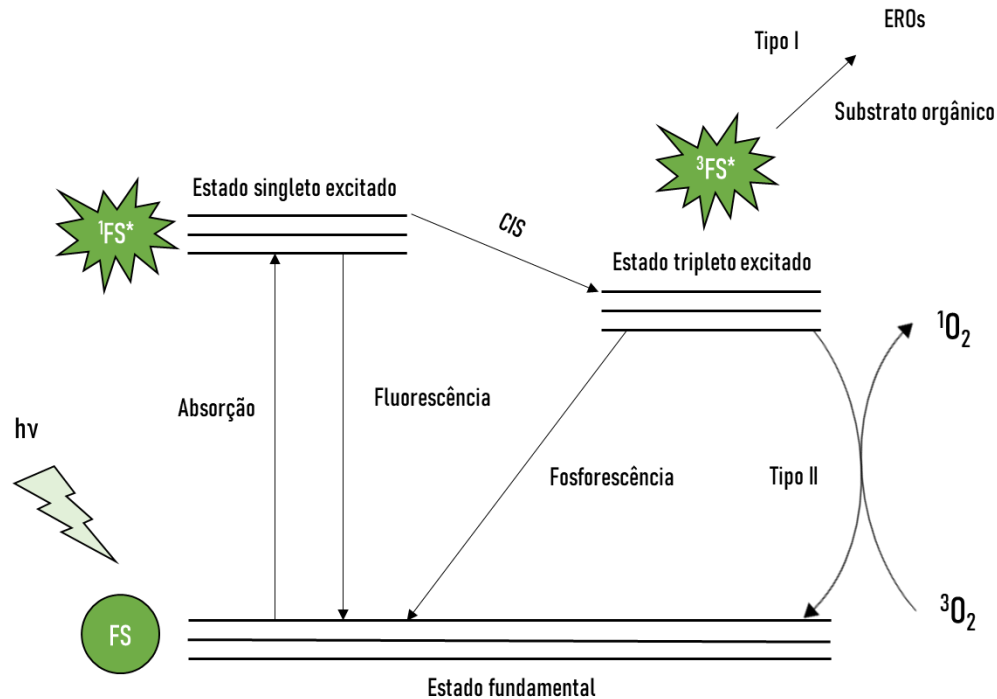


Figura 1 - Diagrama de Jablonski simplificado.  
Fonte: Elaborada pela autora.

Supõe-se que o mecanismo tipo II seja o processo mais importante que condiciona a eficiência da TFD. Entretanto, a contribuição de ambos os mecanismos depende de muitos fatores, incluindo: concentração de oxigênio, pH e estrutura do FS. À medida que o oxigênio se esgota, o primeiro tipo de reação começa a prevalecer.<sup>5,</sup>

46

Outro fator determinante para o sucesso da TFD, especialmente quando o tecido alvo não está na superfície, ou quando não se ilumina diretamente o tecido, diz respeito a penetração da luz, que apesar de sua dispersão nos mesmos, deve ser entregue de forma suficiente ao local do tratamento. Na região espectral de 600-1300 nm, chamada “janela óptica” ou também “janela terapêutica” a maioria dos tecidos biológicos apresentam “transparência”, indicando alta profundidade de alcance da luz, uma vez que a mesma é menos absorvida pela água, melanina e hemoglobina (figura 2).<sup>47-48</sup>

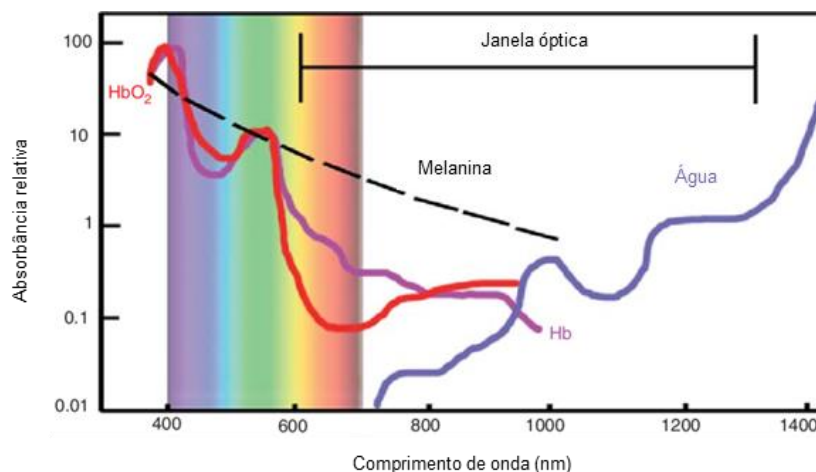


Figura 2 – Absorvância relativa das principais biomoléculas presentes no tecido (Hb: desoxihemoglobina, HbO<sub>2</sub>: oxihemoglobina).

Fonte: Adaptada de LYONS *et al.* <sup>49</sup>

A maioria dos FS conhecidos e utilizados atualmente são excitados por luz na região do UV-Visível. Entretanto, há casos em que a utilização de FS ativados no infravermelho próximo podem ser extremamente visados, uma vez que há maior penetrabilidade tecidual, atingindo assim órgãos internos. <sup>50-51</sup> Para o tratamento da pneumonia, por exemplo, a aplicação de iluminação externa no infravermelho é um fator importante para considerar-se uma terapia minimamente invasiva.

Neste contexto, destaca-se a indocianina verde (ICV), que possui maior amplitude de absorção em 780 nm em água e 805 nm em plasma humano.<sup>52</sup> A ICV é um corante tricarbocianina (figura 3), solúvel em água, inerte (não ionizante) e com alta segurança relatada, que desde sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos em 1956, tem sido amplamente empregada para aplicações médicas, como na determinação das funções hepáticas, medição do débito cardíaco e dos volumes de fluxo sanguíneo, bem como para angiografia oftálmica.<sup>53-55</sup> Para TFD, este FS tem sido empregado em nanoformulações para uso em tratamentos oncológicos que apresentam efeitos terapêuticos altamente eficientes. <sup>55-59</sup> Além disso, resultados promissores também têm sido relatados para inativação fotodinâmica de diversos microrganismos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus faecali*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>60-64</sup>

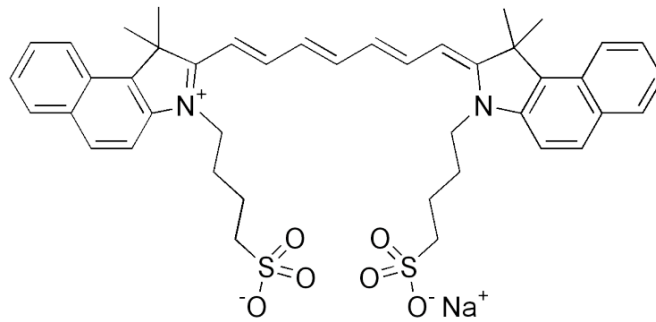


Figura 3 – Estrutura química da indocianina verde.

Fonte: TOVAR *et al.*<sup>65</sup>

### 2.3 Inativação fotodinâmica de microrganismos causadores de pneumonia

A combinação de indocianina verde e iluminação externa com luz no infravermelho para o tratamento de infecções pulmonares foi primeiramente descrita por nosso grupo em 2014.<sup>66</sup> Leite *et al.* delinearam um protocolo *in vitro* para inativação de *S. pneumoniae* usando ICV e avaliaram sua segurança através de culturas de células de macrófagos murinos RAW 264.7, onde foi possível demonstrar a erradicação da carga bacteriana sem causar danos aos macrófagos, havendo ainda indícios que a TFDa potencializa a ação antimicrobiana destas células durante a infecção.<sup>67</sup> Posteriormente, Kassab *et al.* estudaram e propuseram a nebulização como um novo método para entrega de fotossensibilizadores ao trato respiratório, onde foi demonstrado a compatibilidade com validação em um modelo murino.<sup>68</sup> Além disso, Tovar *et al.* demonstraram a eficiência da entrega de luz, ativação de ICV e a redução microbiana de *S. pneumoniae* em um modelo *ex vivo* de carcaça torácica de porco.<sup>69</sup>

Além de *S. pneumoniae*, a TFDa também tem sido proposta para o tratamento de outros patógenos causadores de pneumonia, incluindo aqueles indicados na lista prioritária da Organização Mundial da Saúde (OMS) para os quais são urgentemente necessários novos antibióticos devido ao aumento da resistência microbiana.<sup>70</sup> Dentre estes microrganismos, encontram-se *S. aureus* (resistente a meticilina), *K. pneumoniae* (multirresistente) e *P. aeruginosa* (multirresistente) que demonstraram-se susceptíveis a inativação fotodinâmica utilizando diferentes FSs como porfirinas, azul de toluidina, ICV, azul de metileno, dentre outros, em estudos *in vitro*.<sup>71-75</sup> Ademais, com o advento da pandemia de Covid-19, a eficiência desta terapia foi

amplamente avaliada, onde empregando-se FSs como azul de metileno, radaclorina, ftalocianina de zinco e nanopartículas de curcumina foi possível observar elevada eliminação de SARS-CoV-2 *in vitro*.<sup>76-79</sup> Em adição, por meio de modelos *in silico*, a interação entre ICV e SARS-CoV-2 foi estudada, observando-se alta afinidade entre a molécula e o domínio responsável pela invasão celular deste vírus.<sup>80</sup>

Entretanto, embora a inativação fotodinâmica destes patógenos apresente grande potencial *in vitro*, até o momento não há relatos de sucesso da TFDa para o tratamento da pneumonia em modelo animal. Recentemente, em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a presença de baixa concentração do surfactante pulmonar clínico Survanta® já é suficiente para inibir a ação fotodinâmica de diversos fotossensibilizadores como indocianina verde, fotoditazina, bacterioclorina-trizma e protoporfirina IX contra *S. pneumoniae in vitro*. Além disso, em simulações de dinâmica molecular observou-se uma alta afinidade dos FSs pelas cabeças polares dos fosfolipídios contidos no surfactante, onde possivelmente ocorre um aprisionamento de forma que os FSs não ficam livres para ligar-se a parede bacteriana. Sendo assim, a interação entres estas moléculas deve ser fortemente considerada para o desenvolvimento de um protocolo para descontaminação pulmonar.<sup>8</sup>

## 2.4 Surfactante pulmonar

Toda superfície alveolar dos pulmões dos mamíferos é revestida por um fino fluido contínuo, denominado camada de revestimento alveolar. Este revestimento consiste em uma hipófase aquosa coberta por uma película de surfactante pulmonar (SP).<sup>81-82</sup>

O SP é produzido por pneumócitos alveolares tipo II sendo armazenado em organelas específicas denominadas corpos lamelares, que regulam a secreção do surfactante funcional. O SP reveste todo epitélio respiratório alveolar e é essencial para respiração dos mamíferos, uma vez que seu papel principal consiste em reduzir a tensão superficial na interface ar-água no epitélio, que evita o colapso alveolar durante a expiração. Além disso, apresenta como função secundária a atuação como uma barreira de proteção entre a corrente sanguínea e o ar externo.<sup>83-84</sup>

O surfactante pulmonar é uma mistura complexa de diversas biomoléculas. Os fosfolipídios correspondem a aproximadamente 90% do SP, os lipídios neutros (principalmente colesterol (COL)) 3-10% e as proteínas 5-10%. Dentre os fosfolipídios, 70-80% é fosfatidilcolina (PC), 10% é fosfatidilglicerol (PG), juntamente com pequenas quantidades de fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e esfingomiéline (SM). Da parte correspondente a fosfatidilcolina, quase metade encontra-se na forma de dipalmitoil (DPPC), sendo este componente o principal responsável pela manutenção da baixa tensão superficial nos alvéolos.<sup>85-87</sup>

As proteínas associadas ao surfactante podem ser agrupadas em duas famílias, dependendo de sua estrutura e propriedades: as proteínas hidrofílicas SP-A e SP-D e os pequenos polipeptídios hidrofóbicos SP-B e SP-C. As proteínas hidrofílicas têm um papel essencial nos mecanismos de defesa inatos do pulmão, incluindo a modulação da atividade de células imunes como os macrófagos. Já as hidrofóbicas estão intrinsicamente envolvidas na organização dos fosfolipídios e sua adsorção na interface ar-líquido.<sup>88-89</sup>

A figura 4 abaixo retrata a organização dos componentes do surfactante pulmonar no microambiente alveolar.

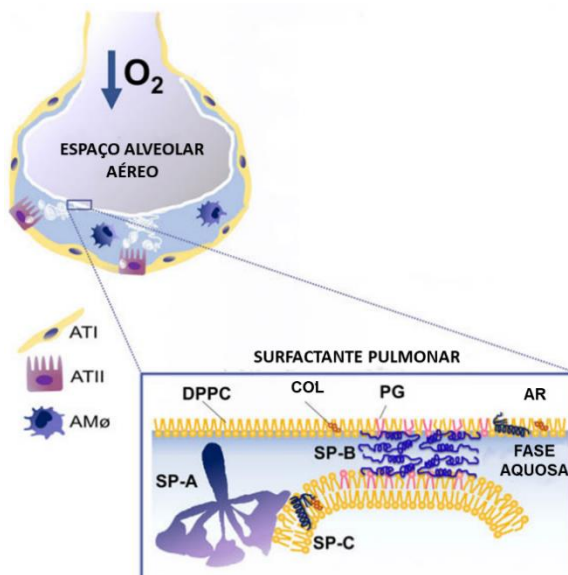


Figura 4 - Representação esquemática de um alvéolo normal, com a organização das membranas do SP na interface ar-líquido. ATI, pneumócitos alveolares tipo I; ATII, pneumócitos alveolares tipo II; AM $\phi$ , macrófagos alveolares; DPPC, dipalmitoilfosfatidilcolina; COL, colesterol; PG, fosfatidilglicerol; SPA-A e SP-C, proteínas.

Fonte: Adaptada de AUTILIO; PÉREZ-GIL.<sup>90</sup>

Além do trabalho anteriormente mencionado do nosso grupo de Kassab *et al.*<sup>8</sup> que relata a interação entre o SP e diferentes FSs, Silverman *et al.* em 2005, haviam previamente reportado a ineficácia da daptomicina para tratamento da pneumonia brônquio-alveolar em modelo murino devido a interação deste antibiótico com o surfactante pulmonar, onde ensaios *in vitro* contra *S. pneumoniae* na presença de SP comprovaram este efeito inibitório.<sup>91</sup> Schwameis *et al.*<sup>92</sup> observaram o mesmo efeito de diminuição da atividade de diversos antibióticos contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* em meio contendo SP.<sup>93</sup> Ademais, também foi relatado na literatura que um fenômeno semelhante ocorre com peptídeos antimicrobianos e diversas nanopartículas.<sup>87, 94- 96</sup>



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Aprimorar a resposta antimicrobiana da terapia fotodinâmica inibida pelo surfactante pulmonar através de abordagens físicas (TFDa associada ao ultrassom) e químicas (formulações com indocianina verde).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o potencial da TFDa utilizando indocianina verde (ICV) combinada ao ultrassom para inativação de *Streptococcus pneumoniae*;
- Determinar a eficácia de formulações de ICV: (1) associada à perfluorocarbono, (2) associada à nanobolhas de oxigênio, (3) à emulsificantes e (4) ao biopolímero Gantrez para redução de *S. pneumoniae*;
- Caracterizar a formulação mais promissora quanto a suas propriedades ópticas, distribuição de tamanho e estabilidade, bem como avaliar a citotoxicidade.



## 4 DESAFIOS DA APLICAÇÃO DE INDOCIANINA VERDE NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA PULMONAR

Como relatado por Kassab *et al.*,<sup>97</sup> diversos fotossensibilizadores como indocianina verde, fotoditazina, bacterioclorina-trizma e protoporfirina IX tem sua mobilidade e suas respectivas atividades antimicrobianas limitadas pelo surfactante pulmonar, sendo o azul de metileno (AM) o único a manter seu efeito bactericida *in vitro* dentre os FSs estudados. Contudo, ensaios em um modelo complexo de infecção alveolar *in vitro*, que contém células hospedeiras de mamíferos (incluindo as que expressam SP naturalmente) e também o patógeno alvo, demonstraram que o AM não apresenta o mesmo comportamento observado em suspensão (com baixa concentração de SP), mas, em contrapartida, sua forma nanoestruturada (AMne) possui maior penetrabilidade da camada de SP e considerável redução microbiana neste modelo. Entretanto, tendo em vista a patologia e a natureza infecciosa da pneumonia, faz-se necessário a busca por um tratamento menos invasivo possível, e assim a utilização da iluminação externa no infravermelho seria a mais almejada. Além disso, fontes de luz com estes comprimentos de onda possuem maior penetração em tecidos biológicos, devido à baixa absorção pela água, melanina e hemoglobina,<sup>47</sup> indicando que o AMne não seria o mais adequado, devido a sua absorção em 660 nm, sendo a ICV ainda uma potencial candidata.

Dessa forma, em busca de superar as limitações impostas pelo surfactante pulmonar, estratégias químicas (formulações de ICV e uso de emulsificantes) e físicas (combinação de TFDa e ultrassom) foram empregadas. Vale ressaltar, que a variação da concentração de ICV não foi avaliada pois sabe-se que acima de 10  $\mu\text{M}$  este FS apresenta extensa agregação, que altera suas propriedades químicas e fotofísicas,<sup>98</sup> além de toxicidade no escuro,<sup>99</sup> e dessa forma, portanto, foram variadas somente as concentrações dos demais componentes das formulações.

### 4.1 Metodologia

#### 4.1.1 Abordagens químicas

Para a realização dos testes de TFDa, Indocianina Verde (ICV - Ophthalmos, Brasil) foi pesada e diluída em água estéril para obtenção da solução estoque (1 mM), sendo esta preparada a cada dia de experimento. A partir do estoque, obteve-se a

solução de trabalho das diferentes associações do FS realizadas. A concentração final de ICV em todos os experimentos foi de 10  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.1.1 ICV associada a brometo de perfluorooctil e diferentes emulsificantes

Com relação as formulações com brometo de perfluorooctil (PFOB, Oakwood Chemical-EUA), primeiramente os emulsificantes Pluronic® F-127 e Tween® 8 foram adicionados ao PFOB e levados a agitação. Em seguida, a solução de ICV foi acrescentada e a formulação agitada até completa emulsão, sendo utilizadas imediatamente. As formulações foram preparadas conforme descrito na tabela 1 e 2, sendo as concentrações de PFOB 70%(v/v), de Pluronic 0,03; 0,05 e 0,07% (m/v), de Tween 0,1; 0,5 e 1% (v/v).

Tabela 1 - Massa e volume dos componentes da formulação de PFOB, Pluronic e ICV.

Concentração (%m/v)	Massa Pluronic (mg)	Volume PFOB ( $\mu\text{L}$ )	Volume ICV ( $\mu\text{L}$ )
0,03	1	2450	1050
0,05	1	1400	600
0,07	1,4	1400	600

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 – Massa e volume dos componentes da formulação de PFOB, Tween 80 e ICV.

Concentração (%v/v)	Volume Tween 80 ( $\mu\text{L}$ )	Volume PFOB ( $\mu\text{L}$ )	Volume ICV ( $\mu\text{L}$ )
0,1	0,5	210	89,5
0,5	3	420	177
1	3	210	87

Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliação do efeito de diferentes emulsificantes sobre o SP sem o PFOB, além de Pluronic e Tween, colato de sódio e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram utilizados. Para tal, soluções dos emulsificantes foram preparadas em tampão fosfato salino (PBS) nas concentrações de 0,01 a 1%, dependendo do emulsificante, sendo adicionados ao meio contendo bactéria e o SP 30 min antes da ICV.

#### 4.1.1.2 *ICV associada a nanobolhas de oxigênio*

Para a associação da ICV a nanobolhas de oxigênio (ICV-NBs-O<sub>2</sub>), seguiu-se a metodologia reportada por Yang *et al.*<sup>100</sup>. A obtenção das NBs- O<sub>2</sub> livres foi dada pelo preenchimento de um frasco-ampola hermético com 2 mL de água e supersaturação de O<sub>2</sub>, onde posteriormente, conectou-se uma seringa médica com 3 mL de O<sub>2</sub>, e por meio da alteração da pressão interior periodicamente, formaram-se as NBs- O<sub>2</sub>. Após isso, a solução de ICV foi adicionada (200 µM), sendo as ICV-NBs-O<sub>2</sub> formadas por automontagem.

#### 4.1.1.3 *Fonte de luz*

Para o tratamento dos grupos TFDa foi utilizado um sistema com 24 LEDs com pico de emissão em 808 nm e irradiância de 60 mW/cm<sup>2</sup>, desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico (LAT) do IFSC. A dose de luz utilizada foi de 20 J/cm<sup>2</sup>.



Figura 5 – Biotable de 808 nm utilizada para iluminação.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.1.4 *Ensaio de inativação fotodinâmica*

*Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 49619™) – uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, alfa-hemolítica fastidiosa, foi mantida em *Tryptic Soy Broth*

(TSB) com 15% (v/v) de glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para realização dos ensaios, um pré-inóculo foi preparado, adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  da bactéria em 10 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubando-se em estufa de  $\text{CO}_2$  a 5%,  $37^{\circ}\text{C}$ , por 4 h (ou até a densidade ótica a 600nm atingir um valor entre 0,2 e 0,8  $\text{UA}_{600\text{nm}}$ ), de forma a proporcionar condições para expressão genética similares a ocorrente na pneumonia. Após isso, a suspensão bacteriana foi centrifugada e ressuspensa em PBS, e então o inóculo foi preparado a uma concentração de aproximadamente  $5 \times 10^7$  UFC/mL.

A suspensão bacteriana foi distribuída em placas de 96-poços, juntamente com ICV/ICV associada e o surfactante pulmonar de grau médico Curosurf® resultando nas concentrações finais durante o tratamento, de respectivamente:  $2,7 \times 10^6$  UFC/mL, 10  $\mu\text{M}$  e 5% (v/v). As amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  no escuro por 20 min previamente a irradiação. Após o tratamento, procedeu-se com a microdiluição em PBS e plaqueamento pelo método da gota em ágar sangue, e incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , com contagem das colônias após aproximadamente 24h. Os dados foram processados transformando-se o número contado de unidades formadoras de colônias (UFC) em  $\log_{10}$ , sendo os gráficos plotados utilizando o Origin 2022b.

## 4.1.2 Abordagem física

### 4.1.2.1 Fonte de luz e ultrassom

Os ensaios combinando TFDa e ultrassom foram conduzidos utilizando-se indocianina verde, um dispositivo de laser com pico de emissão em 808 nm (irradiância de 22 ~ 67  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) e ultrassom (Ibramed), com os seguintes parâmetros: 5 e 15 min de irradiação, 50% de ciclo de trabalho, 1 MHz, variando-se as intensidades entre 1 e 2  $\text{W}/\text{cm}^2$ , empregando-se gel ou água como acoplador.

### 4.1.2.2 Ensaios de inativação bacteriana

Para verificação da susceptibilidade microbiana, *S. pneumoniae* foi cultivada conforme descrito anteriormente (4.1.1.4) e ressuspensa em PBS a  $5 \times 10^7$  UFC/mL. Cada grupo foi tratado individualmente em placas de Petri de 35x10mm. Em cada

placa foi adicionado 50 µL da suspensão bacteriana, 50 µL de ICV ou PBS, 50 µL de Curosurf® e o volume foi então completo com 850 µL de PBS, resultando nas concentrações finais de  $2,7 \times 10^6$  UFC/mL e 10 µM de ICV (nos grupos TFDa e TFDa+US), conforme os experimentos anteriores. As amostras foram concomitantemente irradiadas com luz e ultrassom por 5 ou 15 min. Após o tratamento, as amostras foram diluídas e plaqueadas em ágar sangue, com contagem das colônias após aproximadamente 24 h.

## **4.2 Resultados e discussão**

### **4.2.1 Abordagens químicas**

#### *4.2.1.1 ICV associada a brometo de perfluorooctil e diferentes emulsificantes*

Em busca de se aumentar a mobilidade da ICV no surfactante pulmonar, no presente trabalho foi proposto o uso de perfluorocarbono (PFC), mais especificamente o brometo de perfluorooctil (PFOB) que apresenta alta solubilidade de oxigênio (característica vantajosa para TFD) e dióxido de carbono, baixa tensão superficial, que lhe permite fluir através de vias aéreas extremamente estreitas, baixa viscosidade e também alto coeficiente de espalhamento.<sup>101</sup> Estudos anteriores com fármacos vasoativos<sup>102</sup>, antibióticos<sup>103-106</sup> e plasmídeos<sup>107-108</sup> relataram que PFCs são veículos efetivos para distribuição de fármacos em todo pulmão. Entretanto, estes compostos apresentam características hidro-lipofóbicas, o que os tornam bastante imiscíveis, sendo necessário, dessa forma, o uso de agentes emulsificantes como o Tween® 80 e Pluronic® F-127. Assim, formulações contendo 70%(v/v) de PFOB e diferentes concentrações dos emulsificantes foram empregadas, e os resultados estão apresentados na Figura 6 abaixo.

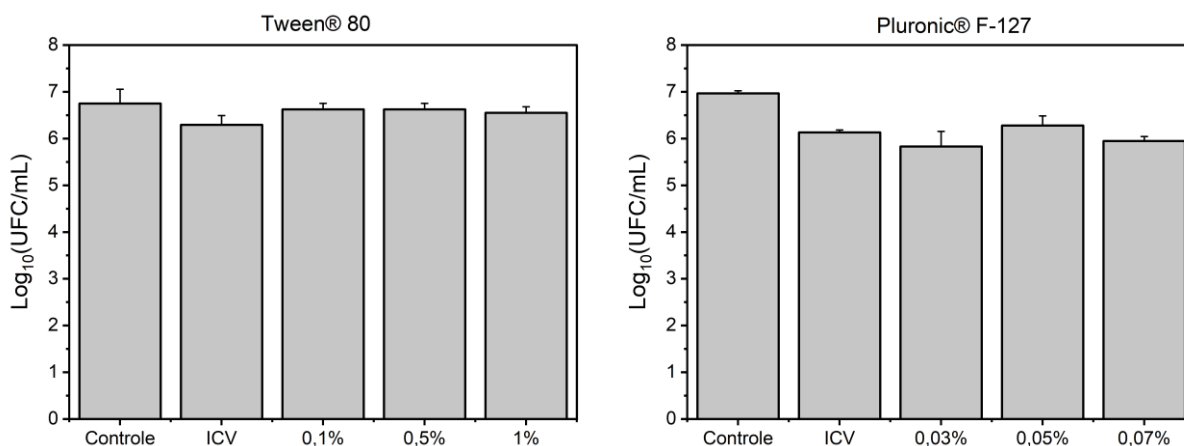


Figura 6 – TFDa sob suspensões de *S. pneumoniae* usando formulações de ICV (10  $\mu$ M), PFOB (70% (v/v)) e diferentes concentrações dos emulsificantes, em meio contendo 5% (v/v) de Curosurf® (D=20 J/cm<sup>2</sup>). O grupo ICV refere-se ao uso do FS na ausência das formulações (n=3).

Fonte: Elaborada pela autora.

As concentrações dos emulsificantes utilizadas foram mínimas, afim de se atenuar qualquer outro possível efeito de aprisionamento por estes polímeros e maximizar a ação do PFOB. Entretanto, em nenhuma das condições estudadas foi possível observar redução microbiana significativa na presença do surfactante pulmonar Curosurf®.

Na literatura, o uso de fluorocarbonos para terapia fotodinâmica tem sido relatado para fins antimicrobianos e oncológicos, sendo estes compostos combinados a fotossensibilizadores como clorina e6, bacterioclorina, derivados de porfirina, indocianina verde e hipericina através de nanoformulações, com aplicação contra diferentes tipos de microrganismos e cânceres, onde em todos os casos, a capacidade de transporte de oxigênio intrínseco dos fluorocarbonos foram fundamentais para melhoramento da TFD. <sup>109-114</sup>

Entretanto, nas condições aqui estudadas, esta capacidade não foi considerável para promover respostas antimicrobianas. Além disso, devido ao caráter inerte destes compostos e sua baixa interação com o surfactante pulmonar, possivelmente a ICV permaneceu ligada a este último, e com isso não atingiu o alvo microbiano.

Dessa forma, considerando que os emulsificantes “detergentes” são ferramentas valiosas para permeabilização de membranas fosfolipídicas, como o caso do surfactante pulmonar, <sup>94,115</sup> também foi proposto o uso de emulsificantes de diferentes naturezas, além do Tween® 80 e Pluronic® F-127 (não iônicos), como o



dodecilsulfato de sódio - SDS (iônico) e colato de sódio (sal biliar) sem o PFOB, sendo estes incubados por 30 min com o meio contendo o surfactante pulmonar e a bactéria, previamente a adição de ICV. Tendo em vista a possível toxicidade que estes compostos podem apresentar as bactérias e as células, as concentrações utilizadas foram mínimas afim de se observar somente o efeito antimicrobiano da TFDa. <sup>116-117</sup>

Além da desorganização de membranas, os emulsificantes são relatados por desagregar fotossensibilizadores e aumentar a internalização dos mesmos pelos microrganismos, o que potencializa a TFDa. <sup>118-119</sup> Entretanto, conforme os resultados apresentados na Figura 7 abaixo, é possível notar que dentre as concentrações testadas, nenhuma promoveu redução microbiana nos grupos TFDa, e que o SDS e colato de sódio são tóxicos por si só a partir de 0,1 e 1% (m/v), respectivamente, no escuro.

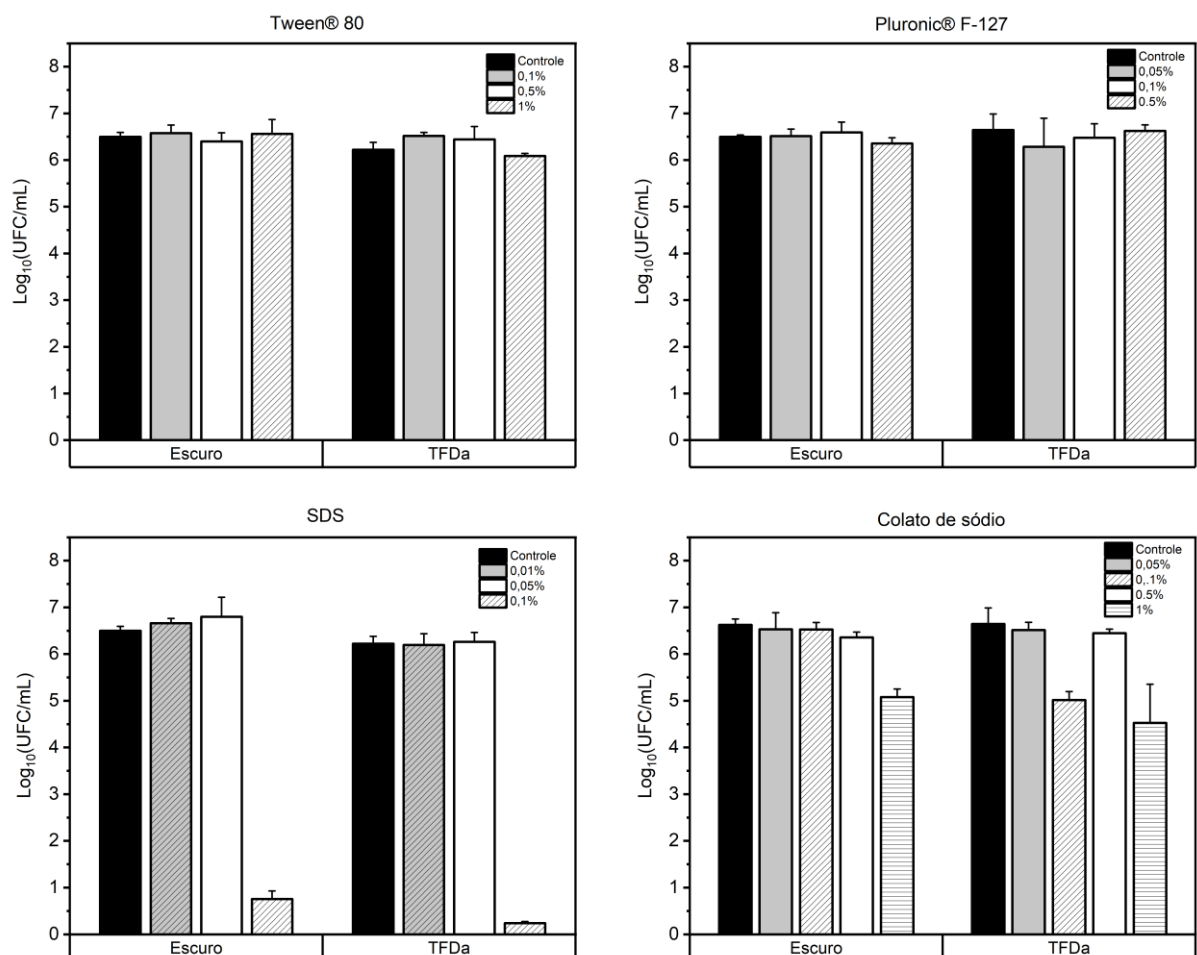


Figura 7 - Influência da adição prévia de emulsificantes (30 min antes da adição de ICV) a diferentes concentrações na resposta antimicrobiana da TFDa contra *S. pneumoniae* em meio contendo 5%(v/v) de Curosurf® (D=20 J/cm<sup>2</sup>) (n=3).

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2.1.2 Associação de indocianina verde a nanobolhas de oxigênio

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pela indocianina verde, como sua boa solubilidade em água, pico de absorção mais alto que os fotossensibilizadores convencionais (~800 nm) que permite iluminação externa, baixa toxicidade, rápida eliminação do organismo, além de apresentar resultados promissores na inativação de microrganismos <sup>120-122</sup>, a ICV possui algumas limitações, como seu baixo rendimento quântico de oxigênio singleto ( $\Phi_{\Delta}$ ). <sup>123</sup>

Em vista disso, sabendo-se que o surfactante pulmonar não interfere na fotodegradação da ICV e conseqüentemente na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), mas sim dificulta a aproximação do FS da parede bacteriana, <sup>8</sup> neste trabalho também foi estudada a associação da ICV a nanobolhas de oxigênio (ICV-NBs-O<sub>2</sub>), que são reportadas por melhorarem a eficácia da TFD, pelo aumento no rendimento quântico de oxigênio singleto e de sua estabilidade em meio aquoso. <sup>100</sup> Assim, propôs-se que este arranjo poderia diminuir a interação entre a ICV e o surfactante, além de elevar a formação de EROs que teriam mais chance de chegar ao alvo microbiano, levando a sua morte. Os resultados estão apresentados na Figura 8, onde observa-se que o emprego de ICV-NBs-O<sub>2</sub> ocasionou a redução de 2 log<sub>10</sub> da carga de *S. pneumoniae*.

Na literatura, o uso de nanobolhas de oxigênio é dado majoritariamente pelas formulações empregando perfluorocarbono, que são excelentes carregadores deste gás, como reportado no tópico 3.2.1.1. A associação simples de FS à nanobolhas foi relatada apenas por Yang *et al.*, <sup>100</sup> que as utilizaram com ICV para contornar o problema da hipoxia, com grande sucesso para o tratamento de câncer de boca em modelo animal através da TFD.

As nanobolhas convencionais consistem em dois principais componentes: o núcleo interno e o invólucro externo. O núcleo geralmente contém ar, oxigênio, hexafluoreto de enxofre ou perfluorocarbono. Já a casca é constituída principalmente por lipídios ou polímeros. Quanto aos fármacos carregados, estes podem ser encapsulados no núcleo ou incorporados dentro ou logo abaixo da casca das nanobolhas. Outra possibilidade se dá pela adesão de nanopartículas carregadas com a molécula alvo à superfície da bolha. <sup>124</sup>

As nanobolhas podem ser obtidas através da manipulação de microbolhas pré-formadas, utilizando-se métodos como a filtração, centrifugação e/ou condensação.

Além disso, podem produzidas *ab initio* em nanoescala empregando-se evaporação em camada fina, sonicação, emulsificação de alto cisalhamento, agitação mecânica e coacervação ou coalescência.<sup>125</sup>

A abordagem aqui apresentada demonstra-se como uma alternativa simples para obtenção de nanobolhas, sem o uso de solventes ou métodos mais complexos, tendo potencial para ser empregada para descontaminação pulmonar, podendo ser combinada a outras técnicas, como as formulações de ICV-Gantrez que serão apresentadas no capítulo seguinte, para aumentar a resposta antimicrobiana observada.

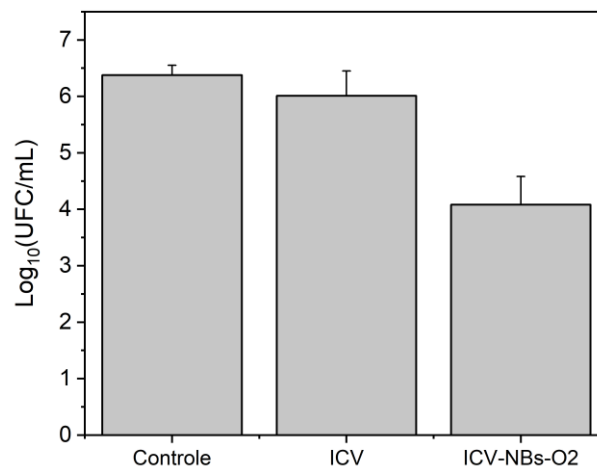


Figura 8 - TFDa sob suspensões de *S. pneumoniae* utilizando ICV e ICV-NBs-O<sub>2</sub> em meio contendo 5%(v/v) de Cursourf® (20 J/cm<sup>2</sup>) (n=3).

Fonte: Elaborada pela autora.

## 4.2.2 Abordagem física

### 4.2.2.1 Uso associado de TFDa e ultrassom

O uso de ultrassom (US) de baixa frequência associado a TFDa tem sido reportado por diversos autores por aumentarem a eficiência antimicrobiana de inativação de diferentes microrganismos.<sup>126</sup> Considerando que o espalhamento das ondas ultrassônicas nos tecidos é significativamente menor do que a luz e dessa forma podem penetrar mais profundamente, o uso do US torna-se bastante promissor para o tratamento de infecções localizadas internamente.<sup>126-127</sup> Além disso, a possibilidade de desagregar e desaglomerar partículas paralelamente à sua dispersão homogênea, torna o US um potencial candidato na busca de diminuição da interação ICV-SP.<sup>128</sup>

Para se avaliar a atividade antimicrobiana do US isoladamente, uma curva foi obtida variando-se as intensidades do mesmo, como apresentado na Figura 9(a), onde é possível observar que a partir de 1,4 W/cm<sup>2</sup> o US é capaz de inativar completamente a carga de *S. pneumoniae*. Dessa forma, para se verificar os efeitos da combinação das terapias, estudos subsequentes foram realizados utilizando-se a intensidade de 1 W/cm<sup>2</sup> (Figura 9(b)).

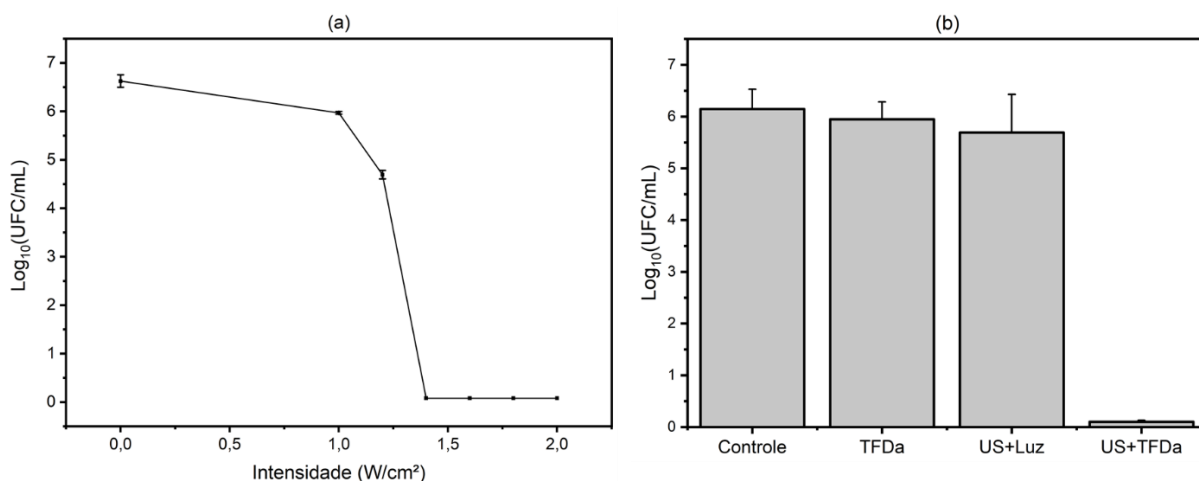


Figura 9 - (a) Inativação de *S. pneumoniae* através do uso de US em diferentes intensidades. (b) Combinação de TFDa com US em meio contendo 5% de Curosurf® (I=1 W/cm<sup>2</sup>, 50% ciclo de trabalho, 1 MHz, 5 min; D=20 J/cm<sup>2</sup>) (n=6).

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da Figura 9(b) é possível notar que a resposta antimicrobiana observada nestas condições é obtida somente quando a TFDa é combinada com US.

Afim de se ponderar se um dos mecanismos envolvidos nesta inativação poderia ser devido a efeitos térmicos, os mesmos experimentos foram realizados utilizando água como acoplador (que absorve o calor gerado), ao invés de gel. Neste sentido, a intensidade e o tempo do US foram aumentados para 2 W/cm<sup>2</sup> e 15 min, respectivamente, onde a temperatura atingiu um máximo de 40°C, entretanto, não houve morte bacteriana, como demonstrado na figura 10. Considerando que *S. pneumoniae* é inativada somente a partir de 56°C,<sup>129</sup> os resultados indicam que as forças de cisalhamento geradas pelo US sozinhas não foram eficazes para redução microbiana, assim como reportado na literatura, onde diversos estudos tem relatado que bactérias Gram-positivas, como a *S. pneumoniae*, devido sua parede celular mais espessa, são mais resistentes a cavitação do que as Gram-negativas.<sup>130-132</sup>

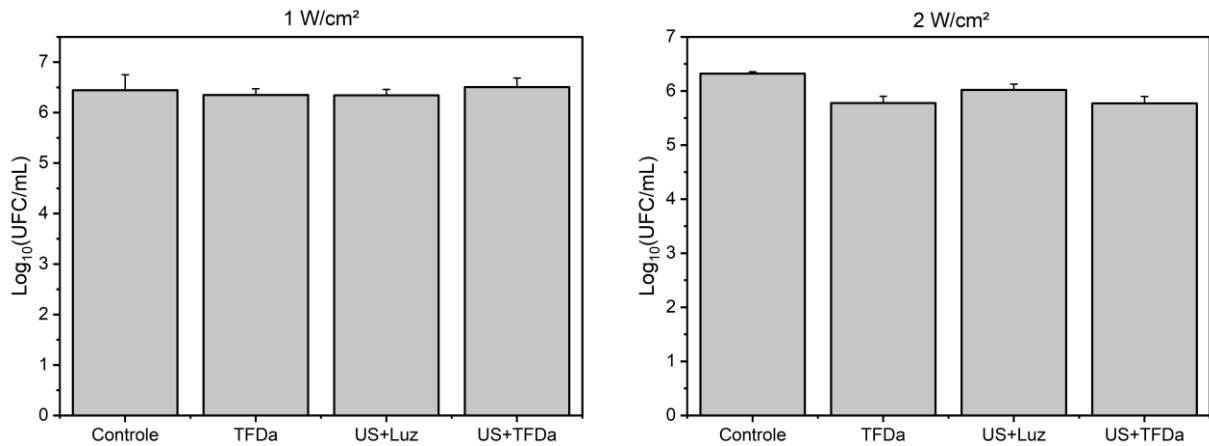


Figura 10 – Combinação de TFDa e US ( $I=1$  e  $2 \text{ W/cm}^2$ ) utilizando água como acoplador em meio contendo 5% Curosurf® ( $t=15 \text{ min}$ , 50% de ciclo de trabalho, 1 MHz;  $20 \text{ J/cm}^2$ ) ( $n=3$ ).

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, embora a temperatura não tenha sido aferida durante todo o experimento, sugere-se que a inativação observada na figura 9(a), em intensidades acima de  $1,4 \text{ W/cm}^2$ , seja devido a uma elevação na temperatura para mais de  $56^\circ\text{C}$ .

Por outro lado, sabe-se que o surfactante pulmonar também é bastante sensível ao aumento da temperatura, e que acima de  $41,2^\circ\text{C}$ , este pode ser desestruturado, tendo suas propriedades físico-químicas alteradas. Esta variação pode levar as membranas a uma transição de fusão, apresentando coexistência de fases.<sup>133-134</sup> Este fato explicaria os resultados apresentados na figura 9(b), uma vez que foi utilizado  $1 \text{ W/cm}^2$ , um ligeiro aumento na temperatura pode ter levado a uma deterioração do surfactante, que deixando a ICV livre, permitiu que este FS se ligasse a parede bacteriana, e assim quando irradiado, inativou o microrganismo. Sendo assim, o efeito da combinação de TFDa+US deve ser mais profundamente estudado quanto aos danos gerados ao surfactante, uma vez que este é essencial para respiração humana.

Além disso, considerando que os ossos exibem características de propagação diferentes das apresentadas pelos tecidos, na caixa torácica pode ser observada difração e absorção das ondas ultrassônicas,<sup>135</sup> e assim estes efeitos devem ser investigados, para melhor compreender quais os parâmetros a serem utilizados para se atingir a região alveolar, com o mínimo de danos teciduais possíveis. Dessa forma, estudos acerca de citotoxicidade *in vitro* também devem ser realizados.



## 6 SUPERANDO O SURFACTANTE PULMONAR ATRAVÉS DE FORMULAÇÕES DE INDOCIANINA VERDE COM GANTREZ™ AN-139

Os copolímeros de éter metilvinílico e anidrido maleico, vendido comercialmente como Gantrez AN™, são moléculas biodegradáveis que apresentam baixa toxicidade, alta biocompatibilidade, alta mucoadesividade e baixo custo, e tem sido largamente empregados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas (com encapsulamento de fármacos em nanopartículas) e de higiene bucal (como espessante e agente de suspensão).<sup>136-139</sup>

A estrutura química do Gantrez está apresentada abaixo na figura 11.

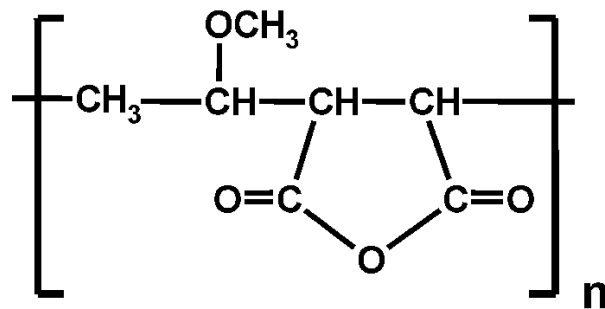


Figura 11 - Estrutura química de Gantrez AN ou poli(anidrido metilvinílico-co-maleico).  
Fonte: IRACHE *et al.*<sup>140</sup>

No presente trabalho, Gantrez™ AN-139 (GA) foi associado a ICV de maneira simples, sem utilização de solventes orgânicos, onde as propriedades antimicrobianas, ópticas e a citotoxicidade foram avaliadas.

### 6.1 Metodologia

#### 6.1.1 Preparo das formulações

Para as formulações de ICV com Gantrez™ AN-139 (Ashland, EUA), o polímero em pó foi primeiramente pesado e diluído em água miliQ, onde após ser misturado vigorosamente foi colocado em estufa de aquecimento a 95°C até que o gel fosse formado através de uma reação de hidrólise da forma anidrita do copolímero ao ácido correspondente. Foi então preparado um estoque de 30% (m/v) que foi utilizado para

obtenção das formulações, conforme mostrado na tabela 3 abaixo, onde as massas correspondentes a cada concentração testada foram diluídas em água miliQ.

Tabela 3 – Massa e volumes correspondentes das formulações de Gantrez-ICV.

Concentração (%m/v)	Massa estoque Gantrez (g)	Volume ICV (mL)	Volume água miliQ (mL)
3	0,1		745
4	0,133	0,155	712
5	0,167		678

Fonte: Elaborada pela autora.

Posteriormente, 155 µL da solução de ICV foi adicionada (1 mM), e a formulação agitada em vórtex. Em seguida, prosseguiu-se com centrifugação a 3500 rpm, por 10 min, para completa homogeneização da amostra e retirada das bolhas. A concentração das formulações preparadas foram de 3, 4 e 5% (m/v) de Gantrez e 200 µM de ICV.

Para os testes empregando-se o polímero separadamente da ICV, o volume correspondente a ICV (155 µL) foi substituído por água, sendo o restante da preparação prosseguida da mesma forma.

### 6.1.2 Inativação fotodinâmica

Os ensaios foram conduzidos conforme descrito anteriormente no item 4.1.1.4. Em uma placa de 96-poços, 5 µL da suspensão bacteriana foi adicionado, juntamente a 5 µL de Curosurf® ou Survanta®, 5 µL de ICV, de formulação ou PBS, e o restante do volume completo com PBS (85 µL). As concentrações finais dos experimentos foram de:  $2,7 \times 10^6$  UFC/mL, 5% (v/v) do surfactante pulmonar, 0,15, 0,2 ou 0,25% (m/v) de Gantrez e 10 µM de ICV. Foi utilizado um sistema de 24 LEDs (figura 5) com pico de emissão em 808 nm, irradiância de 60 mW/cm<sup>2</sup> e doses de luz de 20 e 40 J/cm<sup>2</sup>. Os tempos de incubação foram variados de 0 a 40 min.

O número de colônias contadas foi transformado em log<sub>10</sub> e os testes estatísticos ANOVA (Análise de Variância) one-way com pós-teste de Tukey com nível de significância de 5% (p <0,05) foram realizados usando o software Origin 2022b.



### 6.1.3 Medições das propriedades ópticas

Os espectros de absorvância e fluorescência foram coletados utilizando Cary 50- Varian Bio UV-Vis e Espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse, respectivamente.

As amostras foram preparadas diluindo-se as 50  $\mu\text{L}$  das formulações de Gantrez<sup>TM</sup>-ICV ou ICV livre em 950  $\mu\text{L}$  de PBS ou 900  $\mu\text{L}$  + 50  $\mu\text{L}$  de Survanta®, utilizando-se para as leituras uma cubeta quadrada de quartzo com caminho óptico de 1 cm. O espectro de absorvância foi obtido em temperatura ambiente na faixa de 300-1000 nm e para o espectro de fluorescência foi empregado  $\lambda_{\text{excitação}}$  de 780 nm e  $\lambda_{\text{detecção}}$  de 800-1000nm. Nos ensaios de fotodegradação, o tempo total de irradiação (330 s) correspondente a dose de luz de 40 J/cm<sup>2</sup> foi fracionado, e a cada 66 s de iluminação a absorvância foi coletada no comprimento de onda de maior amplitude. Para tal, foi utilizado um sistema de 18 lasers, com pico de emissão em 808 nm e iluminação centralizada, com irradiância de 116 mW/cm<sup>2</sup>.

Os dados foram processados utilizando-se Origin 2022b, no qual o processamento de suavização foi aplicado afim de reduzir o ruído. O método de Savitzky-Golay foi empregado uma vez que este preserva as formas originais do pico do sinal (pontos de janela: 5 ou 10, ordem polinomial: 2, sem condições de contorno).

### 6.1.4 Análise dinâmica de espalhamento de luz (DLS)

A distribuição de intensidade de tamanho das partículas e o potencial zeta foram medidos utilizando a técnica DLS, através do Zetasizer Lab (Malvern Panalytical). Para tal, as amostras concentradas foram diluídas (1:20) em água miliQ, e a leitura realizada em triplicata. Os gráficos apresentados foram retirados do *software* de análise “ZS Xplorer”.

### 6.1.5 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A caracterização do tamanho das partículas também foi realizada por NTA, usando o dispositivo NanoSight NS300 (Malvern Instruments), equipado com laser

verde de 532 nm e câmera sCMOS. Para as leituras, as amostras foram diluídas em água miliQ (1:20), e as leituras realizadas em triplicata. A coleta e análise dos dados foram realizadas por meio do software NTA 3.4.

### 6.1.6 Ensaio de citotoxicidade

Os experimentos de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do IFSC com colaboração da pesquisadora Ana Júlia Barbosa Tomé e parte em colaboração com o Departamento de Engenharia Biomédica da Texas A&M University pela pesquisadora Michelle Barreto Requena.

Para tal, células humanas epiteliais pulmonares A549 (ATCC® CCL-185TM) e de fibroblastos pulmonares MRC-9 (ATCC® CCL-212TM) foram cultivadas em meio Ham's F-12K (Kaighn's) e EMEM (do inglês Eagle's Minimum Essential Medium), respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para cada experimento,  $5 \times 10^4$  de células foram plaqueadas em placas de 96-poços e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 18-24 h. As condições foram replicadas em seis poços.

Após este período pra adesão e crescimento das células, o meio de cultura foi retirado dos poços, sendo adicionado então, as soluções de Gantrez AN-139, preparadas nas concentrações de 0,15, 0,2 e 0,25 (m/v) em meio F-12K ou EMEM, incubando-se por 40 min na estufa. Após a incubação, o polímero foi retirado, os poços foram lavados com PSB e o reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma Aldrich, EUA) adicionado. Este é um teste colorimétrico utilizado para avaliar atividade metabólica celular como indicador de viabilidade, proliferação e citotoxicidade celular.<sup>141</sup>

O grupo (0 h) significa que logo após a incubação, o teste de MTT foi realizado, enquanto no grupo (24 h) foi adicionado meio de cultura suplementado, as placas retornaram para a incubadora e o teste foi realizado após 24 horas. Em ambos os grupos, as amostras foram incubadas por 3 h com MTT, o reagente foi retirado e os cristais dissolvidos em 100 µL de DMSO em cada poço. A absorbância foi medida nos comprimentos de onda 570 e 690 nm usando os leitores de placa Thermo Scientific™ Multiskan™ (para A549) e Infinite® M Nano Tecan (para MRC-9).

Para análise dos resultados, a absorção em 570 nm foi subtraída da absorção de 690 nm, então, normalizado pela absorção da condição controle (células não

submetidas à solução de Gantrez). Os testes estatísticos ANOVA (Análise de Variância) one-way com pós-teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) foram realizados usando o software Origin 2022b para os ensaios realizados em três ocasiões distintas ( $n=18$ ).

## 6.2 Resultados e discussão

### 6.2.1 Inativação fotodinâmica de *S. pneumoniae*

Considerando que o tempo de incubação e irradiação são parâmetros que influenciam fortemente o sucesso da TFDa,<sup>142-143</sup> nos experimentos iniciais, estes fatores foram alterados para 40 min e 40 J/cm<sup>2</sup>, em busca de atingir máxima inativação microbiana. Os resultados da TFDa utilizando Gantrez™ AN-139 e sua toxicidade quando irradiado e no escuro estão apresentadas na figura 12 abaixo.

De acordo com os resultados apresentados na figura 12(a) é possível observar que para TFDa na combinação de 0,2%(m/v) do polímero com ICV ocorre completa inativação microbiana. Por outro lado, nota-se que nesta concentração, o Gantrez não é tóxico para a bactéria nem no escuro e nem quando irradiado, sendo este efeito observado somente a partir de 0,25%(m/v). Dessa forma, a concentração de 0,2%(m/v) torna-se ideal, uma vez que apenas há morte bacteriana quando aplicada a TFDa.

Assim, ensaios adicionais foram realizados com a concentração de 0,2%(m/v) para se verificar se o mesmo perfil de inativação era observado quando utilizado um surfactante pulmonar de origem bovina, chamado Survanta®, amplamente utilizado para reposição exógena de surfactante. Sua principal diferença quanto ao Curosurf® se dá na carga lipídica, onde o Survanta® possui uma concentração de fosfolipídios de 25 mg/mL, dentre os quais 11,0-15,5 mg/mL são de DPPC. Já o Curosurf® apresenta 76 mg/mL de fosfolipídios, sendo 30 mg/mL correspondentes ao DPPC. Nestes ensaios adicionais, a influência do tempo de incubação e da adição do polímero e do FS de forma separada foram avaliadas.

O tempo de incubação refere-se ao período em que o FS fica em contato com os microrganismos previamente a irradiação, podendo-se ligar à membrana plasmática e/ou ser internalizado.<sup>144</sup> Um protocolo de TFDa otimizado (fototóxico para

bactérias com danos mínimos ao hospedeiro) inclui um período de 5 a 10 min de incubação, sendo considerado bactericida, de acordo com a Sociedade Americana de Microbiologia, quando há diminuição de 99,9% ( $>3 \text{ Log}_{10}$ ) do número total de unidades formadoras de colônias (UFC).<sup>145</sup> Os dados apresentados na figura 13 demonstram que a partir de 10 min a redução da carga microbiana já é completa, não sendo necessário, portanto, 40 min de incubação como aplicado inicialmente, indicando que a ICV quando associada ao polímero tem grande potencial para descontaminação.

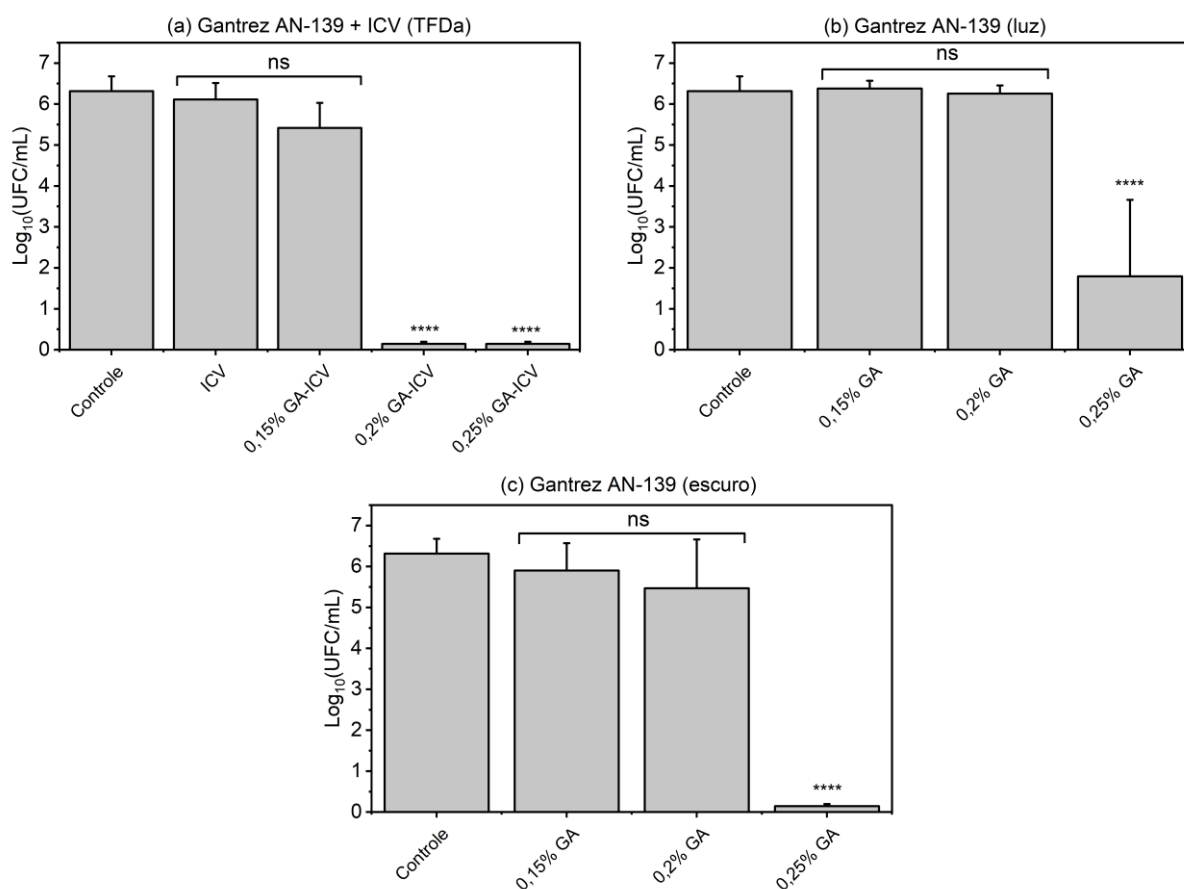


Figura 12 – Efeito antimicrobiano de Gantrez AN-139 (GA) de acordo com sua concentração %(m/v): (a) combinado a ICV (10  $\mu\text{M}$ ) em meio contendo 5%(v/v) de Curosurf® (TFDa); (b) irradiado e (c) no escuro. (40  $\text{J/cm}^2$ , 40 min incubação) (n=9). ns: não significativo; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Fonte: Elaborada pela autora.

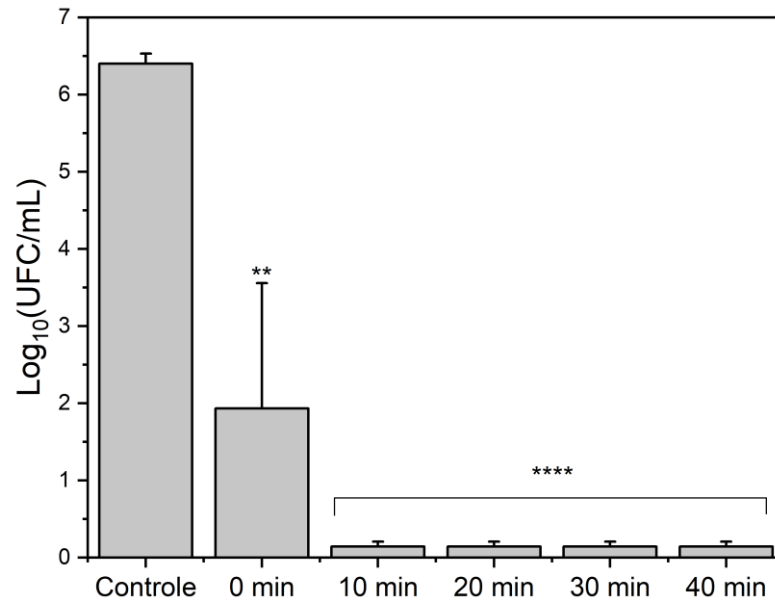


Figura 13- Influência do tempo de incubação na inativação fotodinâmica de *S. pneumoniae* em meio contendo 5%(v/v) de Survanta® (20 J/cm<sup>2</sup>) (n=9). \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para melhor compreensão do mecanismo envolvido na inativação, foi verificado também se adição do polímero previamente a ICV seria eficiente para redução microbiana, considerando que o mesmo poderia se associar ao surfactante pulmonar, de forma a deixar a ICV livre para que assim se aproximasse do alvo bacteriano. Entretanto, conforme demonstrado na figura 14 abaixo, este efeito não foi observado. Este fato indica que a ligação prévia entre os dois componentes é essencial para o sucesso da TFDa, e que possivelmente o polímero se liga a ICV e a “protege”, conferindo mobilidade ao FS no surfactante, diminuindo sua interação com os fosfolípidios.

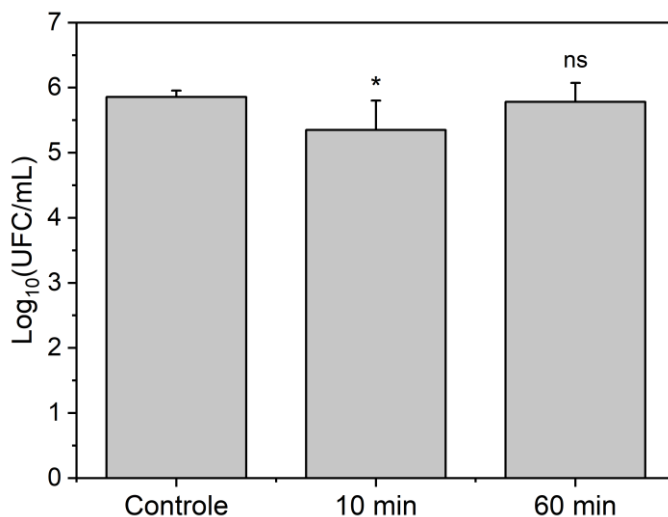


Figura 14 – Efeito da adição de Gantrez (0,2% (m/v)) anteriormente a adição de ICV (10  $\mu$ M) intervaladas por 10 e 60 min na TFDa, em meio contendo 5%(v/v) de Survanta® (20 J/cm<sup>2</sup>) (n=6). ns: não significativo; \*p  $\leq$  0.05

Fonte: Elaborada pela autora.

## 6.2.2 Propriedades ópticas das formulações ICV-Gantrez

Para verificação da interação entre Gantrez e ICV, as propriedades ópticas destes componentes associados foram estudadas. A figura 15 apresenta o espectro de absorvância das formulações na presença e ausência de Survanta®.

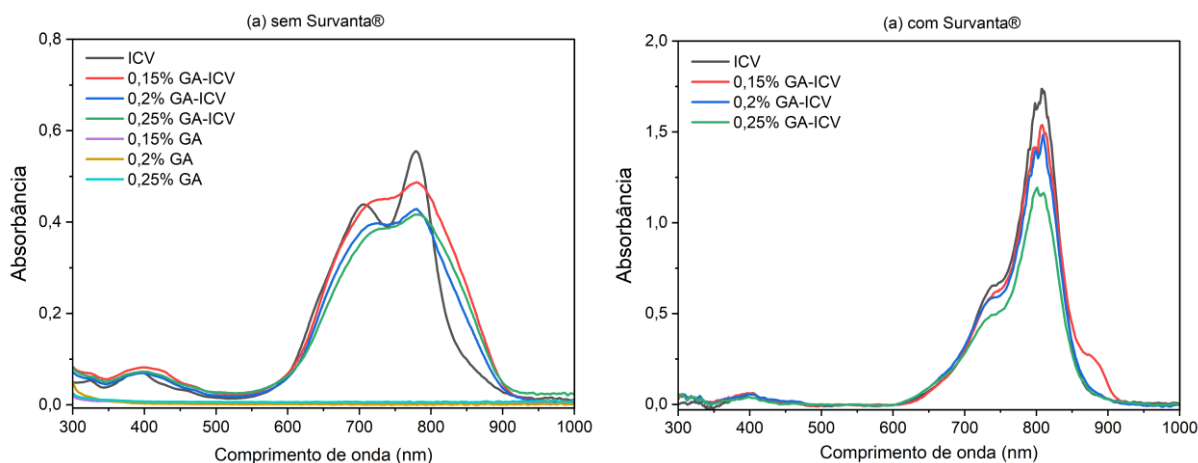


Figura 15 - Espectro de absorvância da ICV livre e das formulações com diferentes concentrações de Gantrez em PBS, com ou sem 5% (v/v) de Survanta®.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em soluções ionizadas, como PBS, sabe-se que há uma forte tendência a formação de agregados.<sup>146</sup> Este efeito é visto na figura 15(a), onde na faixa entre

600-750 nm, há uma banda associada a agregados H, com pico de absorção em 706 nm. Já para os monômeros, o pico de absorção máxima encontra-se em 780 nm.

Quando a ICV é associada a Gantrez, suas propriedades espectroscópicas mudaram, indicando uma ligação de fato entre o fotossensibilizador e o polímero, havendo um alargamento espectral, com deslocamento para o vermelho.

A presença de resíduos de anidrido altamente reativos no polímero confere a este componente a capacidade de ligação a diferentes nucleófilos. Dessa forma, propõe-se que o Gantrez apresente interação suficientemente forte com a ICV, “protegendo” o FS e prevenindo que o mesmo se associe aos fosfolipídios do surfactante pulmonar, estando então disponível para interação com a bactéria, inativando-a após irradiação.<sup>147-148</sup>

Devido a força de atração entre o Gantrez e a ICV, ao serem misturados, o FS possivelmente se associou a matriz polimérica em sua forma agregada, o que é demonstrado pelo alargamento da banda de absorção. Este mesmo comportamento espectral foi observado por Kumari e seus colaboradores,<sup>149-150</sup> em seus trabalhos encapsulando a ICV com poli-l-arginina (PLA) e poli-l-lisina (PLL). Os autores então corroboraram esta hipótese pela coleta dos espectros de emissão de fluorescência, onde foi observada uma diminuição da intensidade com relação a ICV livre, podendo esta ocorrência ser atribuída à extinção causada pela agregação (em inglês – ACQ).

O espectro de emissão de fluorescência da ICV livre e das formulações com Gantrez, na presença ou ausência de Survanta®, estão apresentados na figura 16, onde da mesma forma percebe-se a redução da emissão de fluorescência da ICV quando combinada ao polímero.

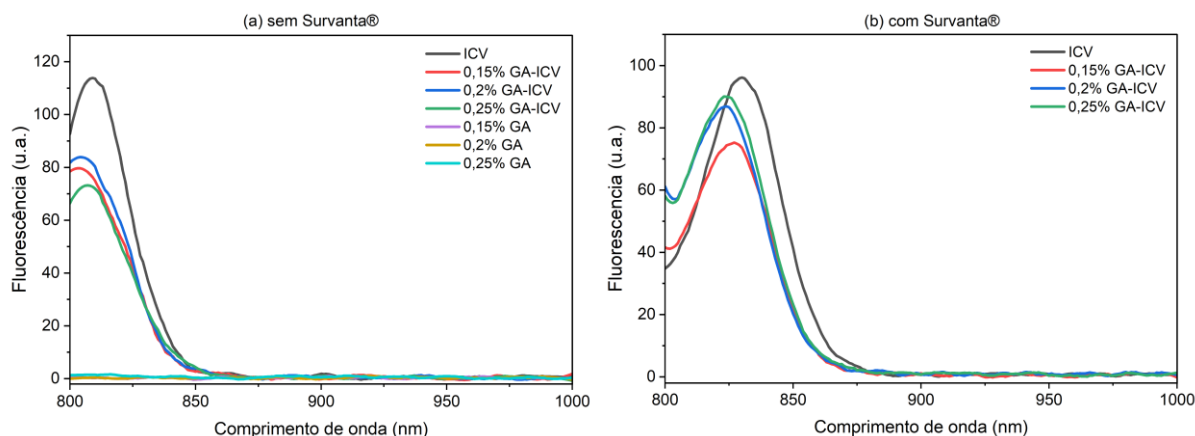


Figura 16 - Espectro de fluorescência da ICV livre e em formulações com diferentes concentrações de Gantrez em PBS, com ou sem 5% (v/v) de Surfactant®.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ademais, como relatado por Kassab *et al.*<sup>8</sup> alterações nos espectros demonstram mudanças no campo local de uma molécula, o que resulta em diferença na energia necessária para que os elétrons sejam promovidos a estados excitados. Os autores também relatam que o surfactante pulmonar ocasiona diminuição do agregado H (banda entre 600-750nm) e conseqüentemente aumento da absorbância dos monômeros, onde há uma mudança no pico máximo de absorção para 806 nm. Já com relação a fluorescência, em meio com Surfactant® há um deslocamento da emissão em direção a comprimento de ondas mais altos. No presente trabalho, ambos efeitos foram observados tanto para ICV livre como para as formulações.

As curvas de fotodegradação da ICV livre e das formulações estão apresentadas na figura 17. Esta taxa é uma medida indireta do efeito fotodinâmico, uma vez que as EROs geradas destroem o fotossensibilizador, única molécula alvo na solução, e conseqüentemente a absorbância da amostra diminui. Dessa forma, altas taxas de fotodegradação resultam em maior produção de EROs. A eficiência da TFD depende da alta produção de EROs, mas também de um fotossensibilizador que tenha uma adequada fotoestabilidade para poder sofrer diversos processos de transições eletrônicas.

Através da figura 17, nota-se que o FS esteve disponível durante todo o período de irradiação, não sendo completamente fotodegradado até 198 s, correspondente a 20 J/cm<sup>2</sup>, dose de luz padrão utilizada nos experimentos microbiológicos. Além disso, nota-se também um pequeno aumento na fotoatividade da ICV quando combinada ao Gantrez.



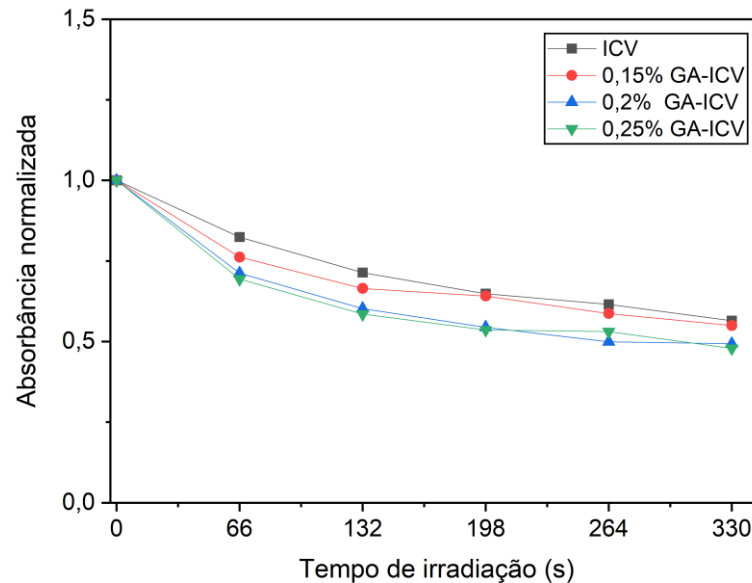


Figura 17 - Perfil de fotodegradação da ICV livre e das formulações em PBS.  
Fonte: Elaborada pela autora.

### 6.2.3 Análises de tamanho de partículas e potencial zeta

A formulação com ICV-Gantrez na concentração mais promissora (0,2%(m/v)) foi então avaliada quanto ao seu tamanho e potencial zeta, através da medição dinâmica de dispersão de luz (DLS). A Figura 18 abaixo demonstra a distribuição de intensidade dos tamanhos das partículas, onde para cada amostra três medições foram realizadas. Nas análises referentes ao polímero e a ICV (18(a) e (b)) separadamente é possível observar grande polidispersividade, com populações de partículas com variados diâmetros. Com relação a ICV especialmente, nota-se que as replicatas variaram bastante, sendo este problema relacionado a alta fluorescência apresentada por este fotossensibilizador, pois a própria luz emitida pelas amostras pode ser detectada como luz espalhada, o que impacta nos resultados obtidos, levando a altas taxas de contagem e sinais com ruído.<sup>151</sup> Entretanto, nota-se que este efeito é diminuído quando a ICV é combinada ao Gantrez, como mostra a Figura 18(c), o que indicaria menor emissão de fluorescência neste complexo, se comparado a ICV livre, corroborando com os espectros demonstrados anteriormente (Figura 16).

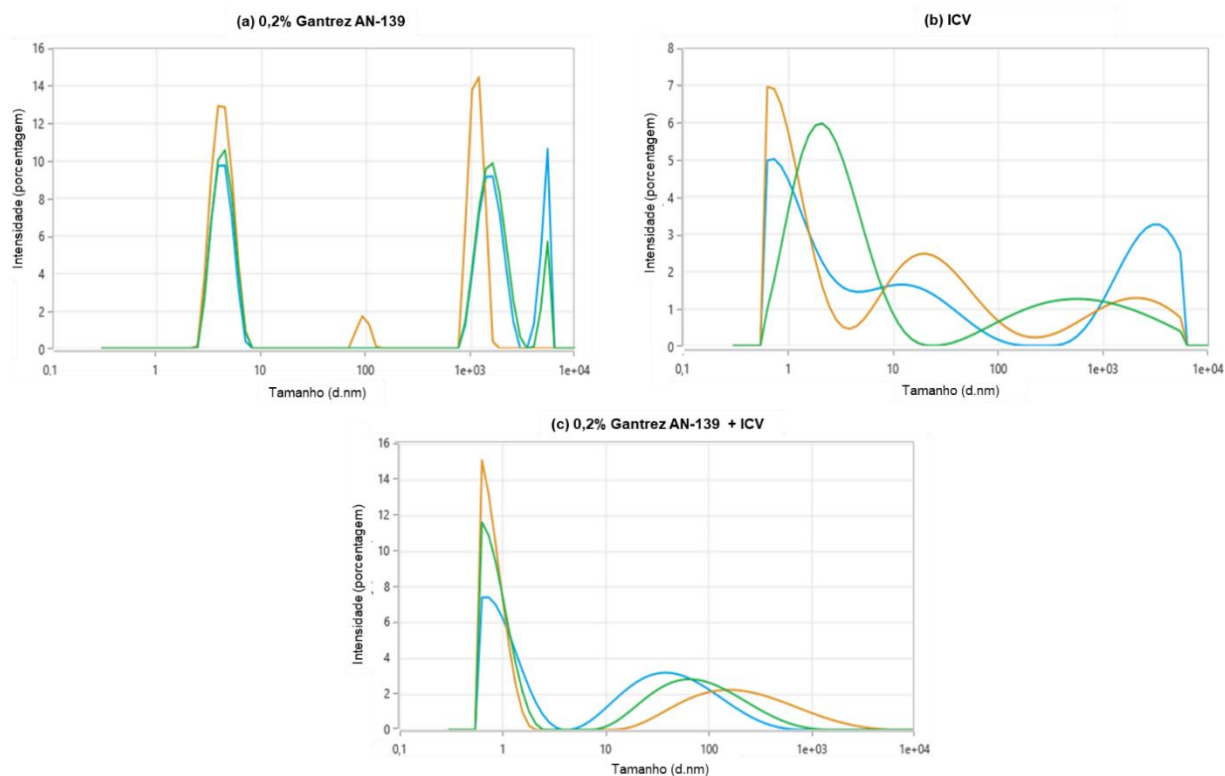


Figura 18- Medições da dispersão dinâmica de luz (DLS) da distribuição de tamanhos baseados em intensidade de amostras. Os histogramas representam três medições de cada amostra.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificação dos resultados obtidos por DLS, a análise de rastreamento de partículas (do inglês-NTA) também foi utilizada. O DLS lê a mudança de intensidade da luz espalhada para determinar o coeficiente de difusão das partículas. Já o NTA calcula o coeficiente de difusão com base nos movimentos de partículas individuais em sucessivas imagens de vídeo óptico.<sup>152</sup> A figura 19 apresenta a caracterização do polímero e do mesmo associado a ICV quanto ao seu número e distribuição de tamanho pela NTA.

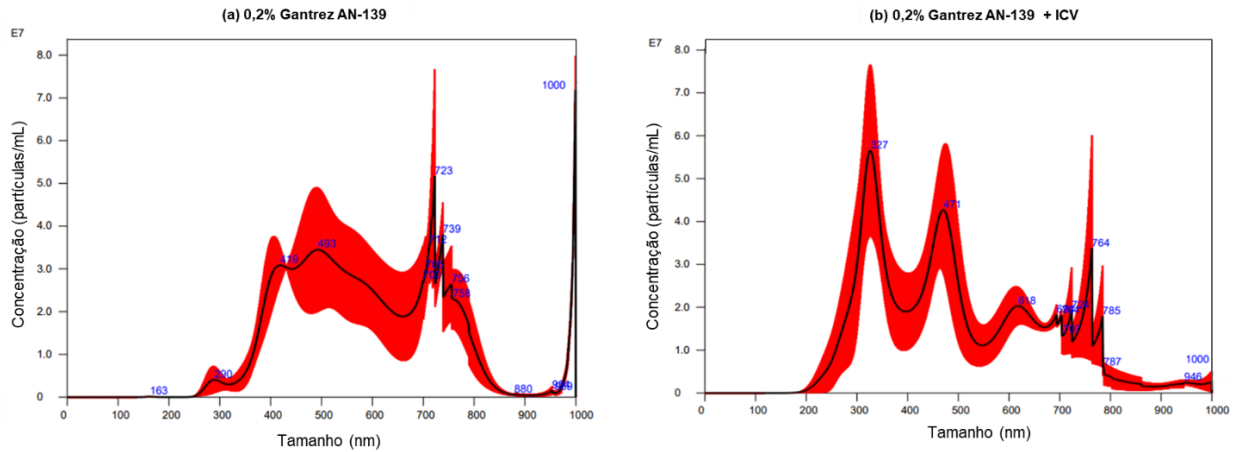


Figura 19 – Análise de distribuição de tamanho de partícula por NTA. Histogramas representativos da distribuição de tamanho médio (linha preta) de três medições de uma única amostra. As áreas vermelhas especificam o desvio padrão (DP) entre as medições e os números azuis indicam os máximos dos picos individuais.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados obtidos em NTA confirmaram a polidispersividade observada também por DLS. Conforme demonstrado na tabela 4, os tamanhos variaram de  $(314 \pm 17 \text{ nm})$  a  $(769 \pm 18 \text{ nm})$ , com 90% da população de partículas do polímero e polímero-ICV com tamanho até  $(769 \pm 18 \text{ nm})$  e  $(726 \pm 27 \text{ nm})$ , respectivamente. Além disso, o parâmetro moda, que mostra o tamanho da partícula (ou faixa de tamanho) mais comumente encontrado na distribuição da população<sup>153</sup> e aponta o ponto médio pra distribuições assimétricas foi de  $469 \pm 147$  para a formulação e  $907 \pm 92$  para o polímero. Assim, nota-se que embora haja diversas populações de tamanhos em ambos os casos, a associação de Gantrez a ICV gera um deslocamento das populações para menores tamanhos, como observado na figura 20 e nos parâmetros da tabela 4.

Tabela 4 – Tamanho médio e desvio padrão das partículas medido por NTA para o polímero livre (0,2% (m/m)) e associado a ICV (10 µM). Os parâmetros D<sub>10</sub>, D<sub>50</sub> e D<sub>90</sub> indicam que 10%, 50% ou 90%, respectivamente, da população da partícula apresentou diâmetro menor ou igual ao valor especificado.

Parâmetros	Gantrez AN-139	Gantrez AN-139 + ICV
Média (nm)	590 ± 21	499 ± 24
Moda (nm)	907 ± 92	469 ± 147
DP (nm)	154 ± 1	162 ± 13
D <sub>10</sub> (nm)	407 ± 9	314 ± 17
D <sub>50</sub> (nm)	570 ± 39	453 ± 33
D <sub>90</sub> (nm)	769 ± 18	726 ± 27
Concentração (partículas/mL)	(1,29 ± 0,09) x 10 <sup>10</sup>	(1,27 ± 0,08) x 10 <sup>10</sup>

Fonte: Elaborada pela autora.

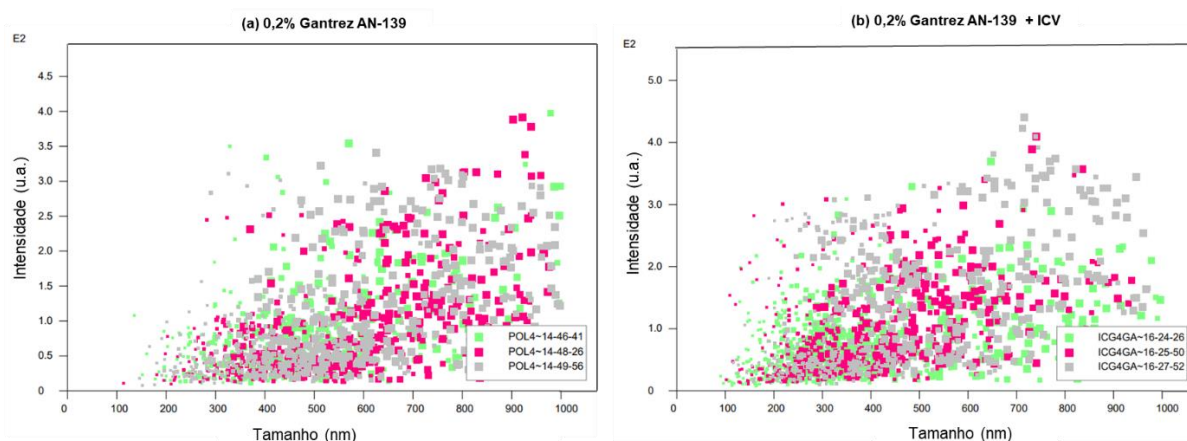


Figura 20 – Gráfico de dispersão representativo de três medições referentes a uma única amostra da intensidade (unidades de absorvância, u.a.) em função do tamanho (nm) obtido por NTA.

Fonte: Elaborada pela autora.

Entender sobre o tamanho das partículas e seu estado de agregação é de extrema importância, uma vez que estes parâmetros determinam sua penetrabilidade e deposição nas vias aéreas, consequentemente interferindo no sucesso da terapia. No geral, partículas na faixa de tamanho entre 0,002 a 6 µm podem penetrar nas vias aéreas inferiores. Para as que possuem tamanhos <3 µm há 80% de chance de se depositarem nestas regiões, onde 50-60% alcançam os alvéolos.<sup>154-155</sup> Estes dados indicam que as formulações aqui estudadas apresentam tamanhos promissores para administração pulmonar por nebulização, sendo necessário também avaliar o estado e tamanho das partículas após a aerossolização. Além disso, pretende-se separar os

diferentes tamanhos por centrifugação diferencial ou filtração, e avaliar se o efeito antimicrobiano desejado permanece nestas condições de menores tamanhos apenas.

Outro importante parâmetro para caracterização de formulações é o potencial Zeta (PZ), que reflete a carga superficial, a afinidade de ligação com íons circundantes e a estabilidade coloidal de soluções. A estabilidade é diretamente proporcional ao PZ, onde geralmente os valores mais adequados encontram-se acima de 30 mV em módulo, pois nestas condições as partículas se repelem e resistem a formação de agregados.<sup>156</sup> Os valores de PZ obtidos por DLS estão apresentados na tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Potencial zeta do polímero, da ICV livre e da formulação.

<b>Amostra</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
0,2% (m/v) Gantrez	-5,2 ± 0,2
10 µM ICV	-23,8 ± 4,3
0,2% (m/v) Gantrez - 10 µM ICV	- 20,8 ± 1,3

Fonte: Elaborada pela autora.

Através dos valores observados na tabela 5, nota-se que há indicativos de que a ICV estabiliza o polímero, uma vez que o PZ dos complexos Gantrez-ICV é bem maior do que apenas o Gantrez. Considerando que este parâmetro é fortemente influenciado pelo pH do meio, e que a infecção e inflamação promovem acidificação do microambiente local, caracterizar a formulações em pH mais baixos seria interessante para as próximas etapas, para avaliar seu comportamento quando administradas *in vivo*.<sup>157-158</sup>

#### **6.2.4 Ensaios de citotoxicidade**

A toxicidade de Gantrez AN-139 foi verificada em ensaios de MTT. Primeiramente, a concentração mais promissora para inativação microbiana (0,2% (m/v) ou 2 mg/mL) foi avaliada em linhagens celulares humanas pulmonares de fibroblasto (MRC-9) e epiteliais (A549). A figura 21 demonstra que esta concentração não apresenta citotoxicidade para as linhagens estudadas.

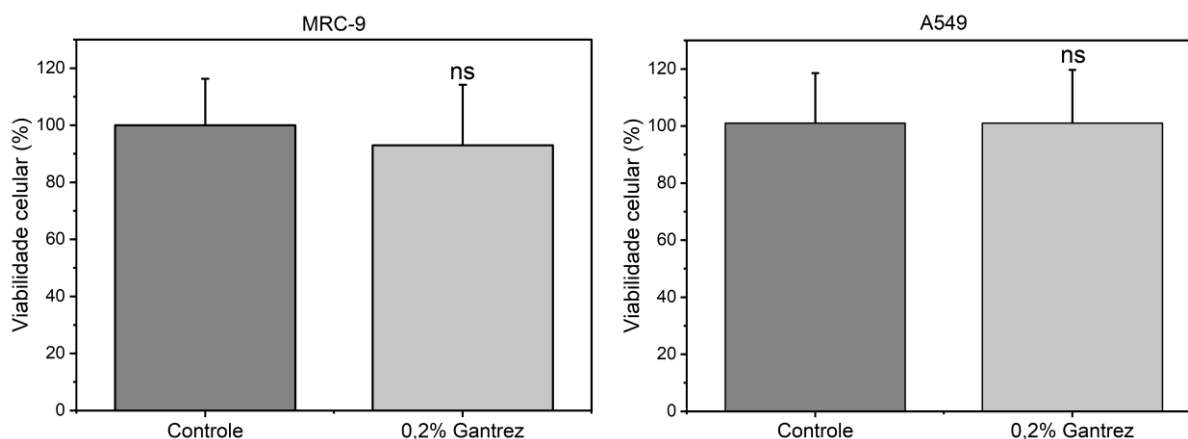


Figura 21 – Viabilidade celular das linhagens MRC-9 e A549 após incubação por 40 min com 0,2% (m/v) de Gantrez AN-139. O ensaio MTT foi realizado imediatamente após a incubação (0 h). Resultados apresentados em % em relação ao controle (n=18). ns: não significativo ( $p>0,05$ ).

Fonte: Elaborada pela autora.

No trabalho de Souza *et al.*<sup>159</sup>, ensaios de MTT relataram que para nanopartículas de Gantrez descarregadas (apenas o polímero) na concentração de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  não foi observada redução da viabilidade de A549, mesmo 72 h após incubação. Ojer<sup>160</sup> em ensaios de MTS (teste colorimétrico que também mede a viabilidade e proliferação celular) reportaram não que há toxicidade para linhagem celular Caco2 quando incubadas até a 72 h com nanopartículas de Gantrez descarregadas na concentração de 2  $\text{mg}/\text{mL}$ . Por outro lado, para HepG2, a toxicidade demonstrou-se ser dependente do tempo, onde para 1  $\text{mg}/\text{mL}$  não há redução da viabilidade com até 48 h de incubação, entretanto para 72 h há redução de cerca de 80%. Estes resultados demonstram a importância de se avaliar a citotoxicidade em diferentes concentrações e tempos de incubação, sendo estes parâmetros alvo de estudos subsequentes desta pesquisa.

Resultados preliminares foram obtidos comparando-se o MTT realizado imediatamente e após 24h da incubação de 40 min com o polímero em diferentes concentrações. Através da figura 22, nota-se que não há toxicidade para A549 nas diferentes condições testadas, entretanto para MCR-9, a concentração de 0,25% (m/v) apresenta uma leve redução da viabilidade, indicando dessa forma, um limiar de toxicidade, que também é observado nos ensaios microbiológicos apresentados anteriormente (figura 12).

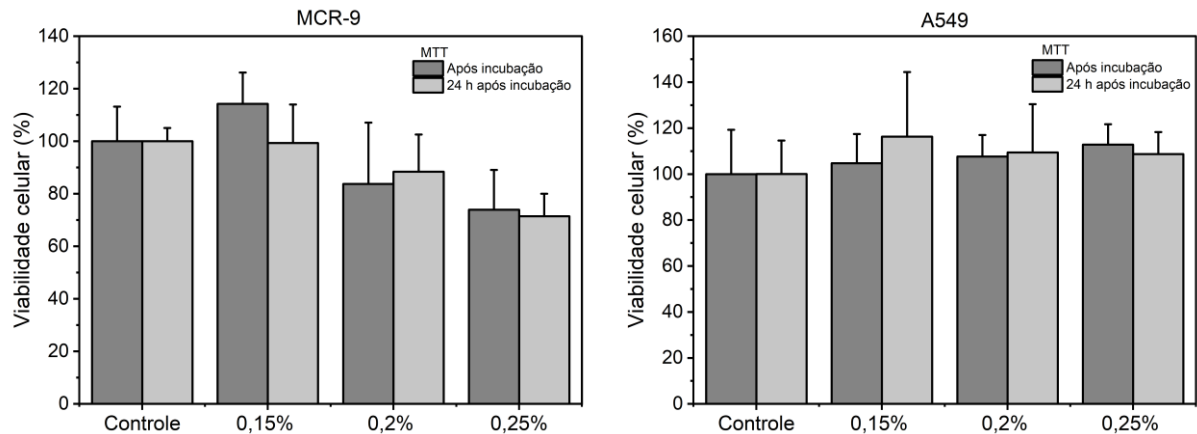


Figura 22 – Viabilidade celular das linhagens MCR-9 e A549 após incubação por 40 min com diferentes concentrações de Gantrez AN-139. O MTT foi realizado imediatamente (0h) ou 24 h após a incubação. Resultados apresentados em % em relação ao controle (n=6).

Fonte: Elaborada pela autora.

### 6.3 Desafios em modelo animal

No presente projeto de descontaminação pulmonar, tendo em vista a busca por um tratamento minimamente invasivo, a proposta da terapia consiste no uso da nebulização como via de administração e iluminação externa no infravermelho. Considerando que a iluminação já está bem estabelecida, como reportado em trabalhos anteriores do grupo<sup>7</sup>, sabe-se que um dos desafios possíveis a serem encontrados em modelo animal relaciona-se a entrega das formulações no trato respiratório inferior, considerando a viscosidade do biopolímero Gantrez, sendo necessário, portanto, a otimização das formulações e dos parâmetros de nebulização previamente aos estudos *in vivo*. Além disso, vale ressaltar que o microambiente alveolar é muito mais complexo do que as condições experimentais possíveis de serem reproduzidas *in vitro*, bem como a própria disposição e integridade do surfactante pulmonar pode ser dada de maneira diferente durante a infecção. Ademais, considerando o papel fundamental do surfactante na respiração, evitando o colapamento dos alvéolos, será necessário avaliar quais as condições do mesmo pós terapia, indicando um extenso trabalho a ser desenvolvido pela frente.





## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os experimentos realizados, conclui-se que o uso de formulações com perfluorocarbono, bem como o uso de emulsificantes (detergentes) não são capazes de aumentar a mobilidade da ICV no surfactante pulmonar. Em contrapartida, a combinação de ICV com nanobolhas e o uso da TFDa combinada ao US resultaram em reduções microbianas de  $2 \log_{10}$  e da carga total, respectivamente, indicando que estas abordagens podem ser promissoras através do ajuste de alguns parâmetros para se otimizar os resultados, e diminuir os efeitos térmicos, no caso do ultrassom.

Entretanto, dentre as estratégias apresentadas no presente trabalho, as formulações de ICV com Gantrez foram as mais promissoras, ocasionando a redução total da carga microbiana, mesmo na presença do surfactante pulmonar, ao passo que o polímero isoladamente não é tóxico para a bactéria até a concentração de interesse estudada (0,2% (m/v) Gantrez + 10  $\mu$ M ICV). As análises de tamanho de partícula demonstraram grande polidispersividade das formulações, indicando que técnicas como centrifugação diferencial ou filtração poderiam ser utilizadas para padronização dos tamanhos, que se quando reduzidos mantiverem a ação antimicrobiana, serão melhor administrados, tendo em vista que há maior deposição nas vias aéreas inferiores partículas com diâmetros menores.

Além disso, a citotoxicidade do polímero foi avaliada por ensaios de MTT em linhagens celulares A549 e MRC-9, havendo leve redução da viabilidade apenas na concentração de 0,25% (m/v), que também apresenta toxicidade para as bactérias, sendo este, portanto, um limiar da concentração mais ideal a ser utilizada.

Estes achados demonstram uma abordagem simples e reprodutível para controle de um dos principais agentes etiológicos causadores da pneumonia, apresentando vantagens relevantes frente ao uso de antibióticos tradicionais, considerando o aumento exacerbado da resistência antimicrobiana.



## REFERÊNCIAS

- 1 ABLAKIMOVA, N. *et al.* Bibliometric analysis of global research output on antimicrobial resistance among pneumonia pathogens (2013–2023). **Antibiotics**, v. 12, p. 1411, v. 12, n. 9, p. 1411, Sept. 2023.
- 2 CILLÓNIZ, C.; DOMINEDÒ, C.; TORRES, A. Multidrug resistant gram-negative bacteria in community-acquired pneumonia. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 1–9, Mar. 2019.
- 3 ANAS, A. *et al.* Advances in photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: photochemistry reviews**, v. 49, p. 100452, 1 Dec. 2021.
- 4 KLAUSEN, M.; UCUNCU, M.; BRADLEY, M. Design of photosensitizing agents for targeted antimicrobial photodynamic therapy. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5239, v. 25, Nov. 2020.
- 5 KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098–1107, Oct. 2018.
- 6 KASSAB, G. *et al.* Safety and delivery efficiency of a photodynamic treatment of the lungs using indocyanine green and extracorporeal near infrared illumination. **Journal of Biophotonics**, v. 13, n. 10, p. e202000176, Oct. 2020.
- 7 DÍAZ TOVAR, J. S. *et al.* Photodynamic inactivation of *Streptococcus pneumoniae* with external illumination at 808 nm through the ex vivo porcine thoracic cage. **Journal of Biophotonics**, v. 15, n. 2, p. e202100189, Feb. 2022.
- 8 KASSAB, G. *et al.* Lung surfactant negatively affects the photodynamic inactivation of bacteria—in vitro and molecular dynamic simulation analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 25, p. e2123564119, June 2022.
- 9 ASSEFA, M. Multi-drug resistant gram-negative bacterial pneumonia: etiology, risk factors, and drug resistance patterns. **Pneumonia**, v. 14, n. 1, p. 1–12, May 2022.
- 10 TANG, J. *et al.* Nanomaterials for delivering antibiotics in the therapy of pneumonia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15738, Dec. 2022.
- 11 HENIG, O.; KAYE, K. S. Bacterial pneumonia in older adults. **Infectious disease clinics of North America**, v. 31, n. 4, p. 689–713, Dec. 2017.
- 12 PAKHALE, S. *et al.* Antibiotics for community-acquired pneumonia in adult outpatients. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 10, Oct. 2014.
- 13 MICHELIN, L. *et al.* Mortalidade e custos da pneumonia pneumocócica em adultos: um estudo transversal. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, n. 6, p. e20180374, Oct. 2019.

- 14 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pneumonia in children**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>. Acesso em: 7 dez. 2023.
- 15 TORRES, A. *et al.* Pneumonia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 1–28, Apr. 2021.
- 16 SEER Training. **Anatomy of the Lung**. Disponível em: <https://training.seer.cancer.gov/lung/anatomy/>. Acesso em: 2 jan. 2024.
- 17 PNEUMONIA BIOLOGY. **What is pneumonia?** Disponível em: <https://www.bumc.bu.edu/pneumonia/background/what/>. Acesso em: 2 jan. 2024.
- 18 REGUNATH, H.; OBA, Y. Community-acquired pneumonia. *In: StatPearls*. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2022.
- 19 HAAS, A. R.; MARIK, P. E. Community-acquired pneumonia. **Pharmacology and Therapeutics: principles to practice**, p. 1081–1087, Jan. 2009. DOI: 10.1016/B978-1-4160-3291-5.50082-2.
- 20 FILE, T. M. Community-acquired pneumonia, bacterial. **Netter's Infectious Disease**, p. 127–136, Jan. 2012. DOI: 10.1016/B978-1-4377-0126-5.00026-4
- 21 CORRÊA, R. A. *et al.* Recomendações para o manejo da pneumonia adquirida na comunidade 2018. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 5, p. 405–423, Sept. 2018.
- 22 KELLIHER, K.; KIRTON, O. C. Infections in critically ill patients. *In: HUPP, J. R.; FERNEINI, E. M. (ed.). Head, neck, and orofacial infections: an interdisciplinary approach*. St. Louis: Elsevier, 2016. p. 383–394.
- 23 HOWIE, S. R. C.; HAMER, D. H.; GRAHAM, S. M. Pneumonia. **International Encyclopedia of Public Health**, p. 500–508, Jan. 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00334-9
- 24 SHEBL, E.; GULICK, P. G. Nosocomial pneumonia. *In: StatPearls*. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023.
- 25 TORRES, A. Antibiotic treatment against methicillin-resistant staphylococcus aureus hospital- and ventilator-acquired pneumonia: a step forward but the battle continues. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 5, p. 630–632, Mar. 2012.
- 26 RUSSO, A. Spotlight on new antibiotics for the treatment of pneumonia. **Clinical Medicine Insights: circulatory, respiratory and pulmonary medicine**, v. 14, Dec. 2020. DOI: 10.1177/1179548420982786
- 27 STEFANI, S. *et al.* Linezolid resistance in staphylococci. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 7, p. 1988–2006, June. 2010.
- 28 GU, B. *et al.* The emerging problem of linezolid-resistant Staphylococcus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 4–11, Jan. 2013.
- 29 AZZOUZ, A.; PREUSS, C. V. Linezolid. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

- 30 TANG, J. *et al.* Nanomaterials for delivering antibiotics in the therapy of pneumonia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15738, Dec. 2022.
- 31 HE, S. *et al.* A roadmap to pulmonary delivery strategies for the treatment of infectious lung diseases. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–22, Mar. 2022.
- 32 LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 588–599, Dec. 2003.
- 33 PATIL, J. S.; SARASIJA, S. Pulmonary drug delivery strategies: a concise, systematic review. **Lung India**, v. 29, n. 1, p. 44–49, Jan. 2012.
- 34 HARKEMA, J. R.; NIKULA, K. J.; HASCHEK, W. M. Respiratory system. *In*: WALLIG, M. A. *et al.* (ed.). **Fundamentals of toxicologic pathology**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 351-393.
- 35 OLIVEIRA, G. S. *et al.* Pneumococcal vaccines: past findings, present work, and future strategies. **Vaccines**, v. 9, n. 11, p. 1338, 2021.
- 36 MUSHER, D. M.; ANDERSON, R.; FELDMAN, C. The remarkable history of pneumococcal vaccination: an ongoing challenge. **Pneumonia**, v. 14, n. 1, p. 1–15, Sept. 2022.
- 37 FELDMAN, C.; ANDERSON, R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. **Journal of Infection**, v. 69, n. 4, p. 309–325, Oct. 2014.
- 38 HICKS, L. A. *et al.* Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 9, p. 1346–1354, Nov. 2007.
- 39 SILVA, A. C. P. *et al.* Atividade fotodinâmica e conceitos: um experimento demonstrativo. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 706–712, 2018.
- 40 DAI, T. *et al.* Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 120, Apr. 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00120
- 41 LIU, Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical Translational Research**, v. 1, n. 3, p. 140-167, 2015.
- 42 CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571–589, Sept. 2018.
- 43 AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, Jul. 2011.
- 44 SCHOLZ, M.; DĚDIC, R. **New trends in photodynamic therapy research**. 2012. Disponível em:

[https://physics.mff.cuni.cz/wds/proc/pdf12/WDS12\\_308\\_f4\\_Scholz.pdf](https://physics.mff.cuni.cz/wds/proc/pdf12/WDS12_308_f4_Scholz.pdf). Acesso em: 23 jan. 2022.

45 CALIXTO, G. M. F. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, Mar. 2016.

46 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.

47 JACQUES, S. L. Optical properties of biological tissues: a review. **Physics in Medicine & Biology**, v. 58, n. 11, p. R37, May 2013.

48 HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M.; CHEN, A. C.-H. **Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm**. Disponível em: <https://spie.org/news/1669-low-level-laser-therapy-an-emerging-clinical-paradigm>. Acesso em: 11 dez. 2023.

49 LYONS, S. K.; PATRICK, P. S.; BRINDLE, K. M. Imaging mouse cancer models in vivo using reporter transgenes. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2013, n. 8, p. pdb.top069864, Aug. 2013.

50 CHINNA AYYA SWAMY, P. *et al.* Near infrared (NIR) absorbing dyes as promising photosensitizer for photo dynamic therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 411, p. 213233, May 2020.

51 ABELS, C. *et al.* Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. **Archives of Dermatological Research**, v. 292, n. 8, p. 404–411, 2000.

52 GRATZ, H. *et al.* Photo-isomerisation, triplet formation, and photo-degradation dynamics of indocyanine green solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry**, v. 128, n. 1–3, p. 101–109, Nov. 1999.

53 DI NEZZA, F. *et al.* Thermodynamic properties and photodegradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. **Dyes and Pigments**, v. 134, p. 342–347, Nov. 2016.

54 LIM, H. J.; OH, C. H. Indocyanine green-based photodynamic therapy with 785 nm light emitting diode for oral squamous cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 4, p. 337–342, Dec. 2011.

55 ARA, E. S.; NOGHREIYAN, A. V.; SAZGARNIA, A. Evaluation of photodynamic effect of Indocyanine green (ICG) on the colon and glioblastoma cancer cell lines pretreated by cold atmospheric plasma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 35, p. 102408, Sept. 2021.

56 LUO, T.; ZHANG, Q.; LU, Q. BIN. Combination of near infrared light-activated photodynamic therapy mediated by indocyanine green with etoposide to treat non-small-cell lung cancer. **Cancers**, v. 9, n. 6, p. 63, June 2017.

57 HISHIKAWA, H. *et al.* Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosomes has antineoplastic effects for gallbladder cancer. **Oncotarget**, v. 10, n. 54, p. 5622–5631, Sept. 2019.

- 58 TAMAI, K. *et al.* Photodynamic therapy using indocyanine green loaded on super carbonate apatite as minimally invasive cancer treatment. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 7, p. 1613–1622, Jul. 2018.
- 59 YOROZU, K. *et al.* Experience with photodynamic therapy using indocyanine green liposomes for refractory cancer. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 7, p. 1039, June 2022.
- 60 WONG, T. W. *et al.* Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by indocyanine green and near infrared light. **Dermatologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 8–15, Mar. 2018.
- 61 HIGUCHI, N. *et al.* Photodynamic inactivation of an endodontic bacteria using diode laser and indocyanine green-loaded nanosphere. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8384, Aug. 2021.
- 62 OMAR, G. S.; WILSON, M.; NAIR, S. P. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1–10, July 2008.
- 63 BELTES, C. *et al.* Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and near-infrared diode laser against enterococcus faecalis in infected human root canals. **Photomedicine Laser Surgery**, v. 35, n. 5, p. 264–269, May 2017.
- 64 MEISTER, J. *et al.* Indocyanine green (ICG) as a new adjuvant for the antimicrobial photo-dynamic therapy (aPDT) in dentistry. **Proceedings of the SPIE**, v. 8929, p. 205–214, Feb. 2014. <https://doi.org/10.1117/12.2057433>.
- 65 DIAZ TOVAR, J. S. *et al.* Photodegradation in the infrared region of indocyanine green in aqueous solution. *In: SBFOTON INTERNATIONAL OPTICS AND PHOTONICS CONFERENCE, 2019, São Paulo. Proceedings [...]* São Paulo: IEEE, 2019.
- 66 GERALDE, M. C. *et al.* Pulmonary decontamination for photodynamic inactivation with extracorporeal illumination. **Proceedings of SPIE**, v. 8927, p. 54–59, Mar. 2014. DOI: 10.1117/12.2039366.
- 67 LEITE, I. S. *et al.* Near-infrared photodynamic inactivation of *S. pneumoniae* and its interaction with RAW 264.7 macrophages. **Journal of Biophotonics**, v. 11, n. 1, p. e201600283, Jan. 2018.
- 68 KASSAB, G. *et al.* Nebulization as a tool for photosensitizer delivery to the respiratory tract. **Journal of Biophotonics**, v. 12, n. 4, p. e201800189, Apr. 2019.
- 69 DÍAZ TOVAR, J. S. *et al.* Photodynamic inactivation of *Streptococcus pneumoniae* with external illumination at 808 nm through the ex vivo porcine thoracic cage. **Journal of Biophotonics**, v. 15, n. 2, p. e202100189, Feb. 2022.
- 70 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.** 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: 12 dez. 2023.

71 PÉREZ, C.; ZÚÑIGA, T.; PALAVECINO, C. E. Photodynamic therapy for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, p. 102285, June 2021.

72 WONG, T. W. *et al.* Indocyanine green—mediated photodynamic therapy reduces methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* drug resistance. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 3, p. 411, Mar. 2019.

73 MIYABE, J. C. *et al.* Microbiology effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 3, p. 230–234, 2011.

74 VALENZUELA-VALDERRAMA, M.; GONZÁLEZ, I. A.; PALAVECINO, C. E. Photodynamic treatment for multidrug-resistant Gram-negative bacteria: perspectives for the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 256–264, Dec. 2019.

75 XIE, Y. *et al.* Antimicrobial efficacy of aloe-emodin mediated photodynamic therapy against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 690, p. 149285, Jan. 2024.

76 SVYATCHENKO, V. A. *et al.* Antiviral photodynamic therapy: inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and radachlorin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 33, p. 102112, 1 mar. 2021.

77 ARENTZ, J.; VON DER HEIDE, H. J. Evaluation of methylene blue based photodynamic inactivation (PDI) against intracellular B-CoV and SARS-CoV2 viruses under different light sources in vitro as a basis for new local treatment strategies in the early phase of a Covid19 infection. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 37, p. 102642, Mar. 2022.

78 SHARSHOV, K. *et al.* The photosensitizer octakis(choliny)zinc phthalocyanine with ability to bind to a model spike protein leads to a loss of SARS-CoV-2 infectivity in vitro when exposed to Far-Red LED. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 643, Apr. 2021.

79 POURHAJIBAGHER, M. *et al.* Robust antimicrobial photodynamic therapy with curcumin-poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles against COVID-19: a preliminary in vitro study in Vero cell line as a model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, Jun. 2021. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2021.102286

80 POURHAJIBAGHER, M.; BAHADOR, A. Computational biology analysis of COVID-19 receptor-binding domains: a target site for indocyanine green through antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 433–441, 2020.

81 SOSNOWSKI, T. **Application of maximum bubble pressure tensiometry in the studies of pulmonary surfactant activity**, 2014. Disponível em: <[https://www.academia.edu/71734402/Application\\_of\\_maximum\\_bubble\\_pressure\\_tensiometry\\_in\\_the\\_studies\\_of\\_pulmonary\\_surfactant\\_activity](https://www.academia.edu/71734402/Application_of_maximum_bubble_pressure_tensiometry_in_the_studies_of_pulmonary_surfactant_activity)>. Acesso em: 13 dez. 2023



- 82 ZUO, Y. Y.; NEUMANN, A. W. Pulmonary surfactant and its in vitro assessment using axisymmetric drop shape analysis (ADSA): a review. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 42, n. 3, p. 126-147, 2005.
- 83 HIDALGO, A. *et al.* Pulmonary surfactant and drug delivery: vehiculization, release and targeting of surfactant/tacrolimus formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 329, p. 205–222, Jan. 2021.
- 84 CONFALONIERI, M. *et al.* Alveolar epithelial type II cells. *In*: JANES, S. M. (ed.) **Encyclopedia of respiratory medicine**. 2nd ed. London: Elsevier, 2022. p. 10–17. DOI: 10.1016/B978-0-08-102723-3.00157-8.
- 85 KEATING, E. *et al.* Effect of cholesterol on the biophysical and physiological properties of a clinical pulmonary surfactant. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 4, p. 1391–1401, Aug. 2007.
- 86 GARMANY, T. H. *et al.* Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. **Pediatric Research**, v. 59, n. 6, p. 801–805, Jun. 2006.
- 87 GARCIA-MOUTON, C. *et al.* The Lord of the Lungs: the essential role of pulmonary surfactant upon inhalation of nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 144, p. 230–243, Nov. 2019.
- 88 ALCORN, J. L. Pulmonary surfactant trafficking and homeostasis. *In*: SIDHAYE, V. K.; KOVAL, M. (ed.). **Lung epithelial biology in the pathogenesis of pulmonary disease**. Cham: Elsevier, 2017. p. 59–75.
- 89 OLMEDA, B.; GARCÍA-ÁLVAREZ, B.; PÉREZ-GIL, J. Structure–function correlations of pulmonary surfactant protein SP-B and the saposin-like family of proteins. **European Biophysics Journal**, v. 42, n. 2, p. 209–222, Sept. 2012.
- 90 AUTILIO, C.; PÉREZ-GIL, J. Understanding the principle biophysics concepts of pulmonary surfactant in health and disease. **Archives of Disease in Childhood - fetal and neonatal edition**, v. 104, n. 4, p. F443–F451, July. 2019.
- 91 SILVERMAN, J. A. *et al.* Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: In vitro modeling and clinical impact. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 12, p. 2149–2152, June 2005.
- 92 SCHWAMEIS, R. *et al.* Effect of pulmonary surfactant on antimicrobial activity in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5151–5154, Oct. 2013.
- 93 - SCHWAMEIS, R. *et al.* Effect of pulmonary surfactant on antimicrobial activity in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5151–5154, Oct. 2013.
- 94 SOUZA, L. M. P. *et al.* Penetration of antimicrobial peptides in a lung surfactant model. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 167, p. 345–353, Jul. 2018.
- 95 BANASCHEWSKI, B. J. H. *et al.* Antimicrobial and biophysical properties of surfactant supplemented with an antimicrobial peptide for treatment of bacterial

pneumonia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3075–3083, June 2015.

96 MOUSSEAU, F.; BERRET, J. F. The role of surface charge in the interaction of nanoparticles with model pulmonary surfactants. **Soft Matter**, v. 14, n. 28, p. 5764–5774, July 2018.

97 KASSAB, G. **Pulmonary antimicrobial photodynamic therapy and the role of the lung surfactant**. Thesis (Doctor in Science) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

98 LI, D. H.; SMITH, B. D. Deuterated indocyanine green (ICG) with extended aqueous storage shelf-life: chemical and clinical implications. **Chemistry – a european journal**, v. 27, n. 58, p. 14535–14542, Oct. 2021.

99 LEITE, I. S. *et al.* Near-infrared photodynamic inactivation of *S. pneumoniae* and its interaction with RAW 264.7 macrophages. **Journal of Biophotonics**, v. 11, n. 1, p. e201600283, Jan. 2018.

100 YANG, L. *et al.* Indocyanine green assembled free oxygen-nanobubbles towards enhanced near-infrared induced photodynamic therapy. **Nano Research**, v. 15, n. 5, p. 4285–4293, May 2022.

101 LEHMLER, H. J. Perfluorocarbon compounds as vehicles for pulmonary drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 4, n. 3, p. 247–262, May 2007.

102 WOLFSON, M. R.; GREENSPAN, J. S.; SHAFFER, T. H. Pulmonary administration of vasoactive substances by perfluorochemical ventilation. **Pediatrics**, v. 97, n. 4, p. 449–455, Apr. 1996.

103 FOX, W. W. *et al.* Pulmonary administration of gentamicin during liquid ventilation in a newborn lamb lung injury model. **Pediatrics**, v. 100, n. 5, p. e5–e5, Nov. 1997.

104 DICKSON, E. W. *et al.* Partial liquid ventilation with perfluorocarbon in the treatment of rats with lethal pneumococcal pneumonia. **Anesthesiology**, v. 88, n. 1, p. 218–223, Jan. 1998.

105 SMITH, D. J. *et al.* Liquid dose pulmonary instillation of gentamicin pulmoSpheres® formulations: tissue distribution and pharmacokinetics in rabbits. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 11, p. 1556–1561, 2001.

106 ORIZONDO, R. A. *et al.* Effects of fluorosurfactant structure and concentration on drug availability and biocompatibility in water-in-perfluorocarbon emulsions for pulmonary drug delivery. **Colloid and Polymer Science**, v. 295, n. 12, p. 2413, Dec. 2017.

107 LISBY, D. A. *et al.* Enhanced distribution of adenovirus-mediated gene transfer to lung parenchyma by perfluorochemical liquid. **Human Gene Therapy**, v. 8, n. 8, p. 919–928, Mar. 2008.

108 WEISS, D. J. *et al.* Perflubron enhances adenovirus-mediated gene expression in lungs of transgenic mice with chronic alveolar filling. **Human Gene Therapy**, v. 10, n. 14, p. 2287–2293, July 2004.

109 NIU, P. *et al.* Sensitization of antibiotic-resistant gram-negative bacteria to photodynamic therapy via perfluorocarbon nanoemulsion. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, p. 156, Feb. 2022.

110 WU, M. *et al.* Regulating the bacterial oxygen microenvironment via a perfluorocarbon-conjugated bacteriochlorin for enhanced photodynamic antibacterial efficacy. **Acta Biomaterialia**, v. 142, p. 242–252, Apr. 2022.

111 HSIAO, K. H.; HUANG, C. M.; LEE, Y. H. Development of rifampicin-indocyanine green-loaded perfluorocarbon nanodroplets for photo-chemo-probiotic antimicrobial therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 412359, Nov. 2018.

112 MARKOVA, A. A. *et al.* Perfluorocarbon nanoemulsions containing fluorinated photosensitizer for photodynamic cancer therapy. **IOP Conference Series: materials science and engineering**, v. 848, n. 1, p. 012054, May 2020.

113 KAMUHABWA, A. R. *et al.* Enhancing the photodynamic effect of hypericin in human bladder transitional cell carcinoma spheroids by the use of the oxygen carrier, perfluorodecalin. **International Journal of Oncology**, v. 28, n. 3, p. 775–780, Mar. 2006.

114 GAMAL-ELDEEN, A. M. *et al.* Effect of combined perftoran and indocyanine green-photodynamic therapy on hypoxamirs and oncomirs in lung cancer cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 844104, Mar. 2022.

115 KELLER, S. *et al.* Thermodynamics of lipid membrane solubilization by sodium dodecyl sulfate. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 12, p. 4509–4521, June 2006.

116 UEDA, Y. *et al.* Inhibitory effects of polysorbate 80 on MRSA biofilm formed on different substrates including dermal tissue. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, Feb. 2019.

117 DONG, L.; HENDERSON, A.; FIELD, C. Antimicrobial activity of single-walled carbon nanotubes suspended in different surfactants. **Journal of Nanotechnology**, 2012. DOI: 10.1155/2012/928924.

118 ALVES DA COLLINA, G. *et al.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy action of phenothiazinium dyes in planktonic *Candida albicans* is increased in sodium dodecyl sulfate. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101612, Mar. 2020.

119 KUSTOV, A. V. *et al.* Interaction of cationic chlorin photosensitizers with non-ionic surfactant Tween 80. **Mendeleev Communications**, v. 31, n. 1, p. 65–67, Jan. 2021.

120 ROSTAMI, G. *et al.* The evaluation of SWEEPS plus antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green in eliminating enterococcus faecalis biofilm from infected root canals: an in vitro study. **Biomedicines**, v. 11, n. 7, p. 1850, Jun. 2023.

121 TOPALOGLU, N. *et al.* The role of reactive oxygen species in the antibacterial photodynamic treatment: photoinactivation vs proliferation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 230–236, Mar. 2016.

122 PREIS, E. *et al.* Biocompatible indocyanine green loaded PLA nanofibers for in situ antimicrobial photodynamic therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 115, p. 111068, Oct. 2020.

123 SILVA, Â. R. A. E. **Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010

124 CAVALLI, R.; SOSTER, M.; ARGENZIANO, M. Nanobubbles: a promising efficient tool for therapeutic delivery. **Therapeutic delivery** v. 7, n. 2, p. 117–138, Jan. 2016.

125 SU, C. *et al.* Current advances in ultrasound-combined nanobubbles for cancer-targeted therapy: a review of the current status and future perspectives. **RSC Advances**, v. 11, n. 21, p. 12915–12928, Mar. 2021.

126 WANG, Y. *et al.* Enhanced antimicrobial activity through the combination of antimicrobial photodynamic therapy and low-frequency ultrasonic irradiation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 183, p. 114168, Apr. 2022.

127 VÖGELING, H. *et al.* Synergistic effects of ultrasound and photodynamic therapy leading to biofilm eradication on polyurethane catheter surfaces modified with hypericin nanoformulations. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109749, Oct. 2019.

128 SAUTER, C. *et al.* Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 4, p. 517–523, Apr. 2008.

129 UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA. **Streptococcus pneumoniae**. 2023. Disponível em: [https://sc.edu/about/offices\\_and\\_divisions/ehs/research\\_and\\_laboratory\\_safety/biological\\_safety/biological\\_agent\\_safety\\_guides/agent\\_safety\\_guides/s-pneumoniae-safety-guide.pdf](https://sc.edu/about/offices_and_divisions/ehs/research_and_laboratory_safety/biological_safety/biological_agent_safety_guides/agent_safety_guides/s-pneumoniae-safety-guide.pdf). Acesso em: 28 dez. 2023.

130 COSTELLO, K. M. *et al.* The effect of ultrasound treatment in combination with nisin on the inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, p. 105776, Nov. 2021.

131 INGUGLIA, E. S. *et al.* Effects of high intensity ultrasound on the inactivation profiles of *Escherichia coli* K12 and *Listeria innocua* with salt and salt replacers. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 492–498, Nov. 2018.

132 GUZEL, B. H. *et al.* Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by ultrasonic waves under pressure at nonlethal (Manosonication) and lethal temperatures (Manothermosonication) in acidic fruit juices. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 6, p. 1701–1712, Jun. 2014.

133 OSELIERO FILHO, P. L. *et al.* Structure and thermotropic behavior of bovine- and porcine-derived exogenous lung surfactants. **Langmuir**, v. 36, n. 48, p. 14514–14529, Dec. 2020.

- 134 MUŽIĆ, T. *et al.* Melting transitions in biomembranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - biomembranes, v. 1861, n. 11, p. 183026, Nov. 2019.
- 135 CHAO, Y. T. *et al.* A novel sound-blocking structure based on the muffler principle for rib-sparing transcostal high-intensity focused ultrasound treatment. **International Journal of Hyperthermia**, v. 31, n. 5, p. 507–527, July 2015.
- 136 PRIETO, E. *et al.* Gantrez AN nanoparticles for ocular delivery of memantine: in vitro release evaluation in albino rabbits. **Ophthalmic Research**, v. 48, n. 3, p. 109–117, Sept. 2012.
- 137 MIRA, A. *et al.* Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and ethyl monoester as building polymers for drug-loadable electrospun nanofibers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 8 Dec. 2017.
- 138 EFSA. **Publications**. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/publications>. Acesso em: 29 dez. 2023.
- 139 CALÓ, E. *et al.* Poly(vinyl alcohol)–Gantrez® AN cryogels for wound care applications. **RSC Advances**, v. 6, n. 107, p. 105487–105494, Nov. 2016.
- 140 IRACHE, J. M. *et al.* Bioadhesive properties of gantrez nanoparticles. **Molecules**, v. 10, n. 1, p. 126–145, Jan. 2005.
- 141 SIGMA ALDRICH. **Protocolo do ensaio de MTT para viabilidade e proliferação celular**. 2023. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>. Acesso em: 29 dez. 2023.
- 142 ZHAO, Z. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy combined with antibiotic in the treatment of rats with third-degree burns. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 622410, Feb. 2021.
- 143 WIENCH, R. *et al.* Influence of incubation time on ortho-toluidine blue mediated antimicrobial photodynamic therapy directed against selected candida strains—an in vitro study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 10971, Oct. 2021.
- 144 FURTADO, G. S. *et al.* Does pre-irradiation time influence the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101884, Sept. 2020.
- 145 ALVES, E. *et al.* An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future Medicine Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 141–164, Jan. 2014.
- 146 DIAZ TOVAR, J. S. *et al.* Photodegradation in the infrared region of indocyanine green in aqueous solution. *In: SBFOTON INTERNATIONAL OPTICS AND PHOTONICS CONFERENCE, 2019, São Paulo. Proceedings [...]* São Paulo: IEEE, 2019. DOI: 10.1109/SBFoton-IOPC.2019.8910207.
- 147 NOH, Y. W. *et al.* Enhancement of the photostability and retention time of indocyanine green in sentinel lymph node mapping by anionic polyelectrolytes. **Biomaterials**, v. 32, n. 27, p. 6551–6557, Sept. 2011.

148 HUARTE, J. *et al.* Nanoparticles from Gantrez-based conjugates for the oral delivery of camptothecin. **International Journal of Pharmaceutics**: X, v. 3, p. 100104, Dec. 2021.

149 KUMARI, A.; KUMARI, K.; GUPTA, S. Protease responsive essential amino-acid based nanocarriers for near-infrared imaging. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 30 dez. 2019.

150 The effect of nanoencapsulation of ICG on two-photon bioimaging. **RSC Advances**, v. 9, n. 32, p. 18703–18712, Jun. 2019.

151 WYATT TECHNOLOGY. **What are some considerations and strategies when working with fluorescing samples?** - waters. Disponível em: <https://www.wyatt.com/support/ask-the-expert-what-are-some-considerations-and-strategies-when-working-with-fluorescing-samples.html>. Acesso em: 17 dez. 2023.

152 KIM, A. *et al.* Validation of size estimation of nanoparticle tracking analysis on polydisperse macromolecule assembly. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, Dec. 2019.

153 AZEVEDO, S. G. *et al.* Pulsatile controlled release and stability evaluation of polymeric particles containing piper nigrum essential oil and preservatives. **Materials**, v. 15, n. 15, p. 5415, Aug. 2022.

154 CHENG, Y. S. Mechanisms of pharmaceutical aerosol deposition in the respiratory tract. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 3, p. 630–640, Feb. 2014.

155 LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 588–599, Dec. 2003.

156 FATFAT, Z. *et al.* Nanoliposomes as safe and efficient drug delivery nanovesicles. **Advanced and Modern Approaches for Drug Delivery**, p. 159–197, 2023.

157 ITO, Y. *et al.* Lung abscess caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 23, p. 71–73, Jan. 2018.

158 TORRES, I. M. *et al.* Acidosis increases the susceptibility of respiratory epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa*-induced cytotoxicity. **American Journal of Physiology - lung cellular and molecular physiology**, v. 313, n. 1, p. L126–L137, 2017.

159 DE SOUZA, L. R. *et al.* PVM/MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1–17, Aug. 2014.

160 OJER, P. Toxicity evaluation of poly(anhydride) nanoparticles as carriers for oral administration of drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 9, p. 2615–2627. 2013.