



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



**“ESTUDO DO EFEITO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA NA  
TRANSFERÊNCIA DE RESISTÊNCIA BACTERIANA”**

**Rebeca Vieira de Lima**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

**Orientador:**

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

\* bolsista (CAPES)- 88882.461700/2019-01

**São Carlos - SP**  
**2023**

REBECA VIEIRA DE LIMA

**Estudo do efeito da inativação fotodinâmica na transferência de resistência bacteriana**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

BANCA EXAMINADORA

*Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato*

Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – Universidade de São Paulo – USP

*Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Paiva de Sousa*

Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) – Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

*Dra. Fernanda Alves Dias de Sousa*

Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – Universidade de São Paulo – USP

São Carlos  
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Folha de aprovação**

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Mestrado da candidata Rebeca Vieira de Lima, realizada em 27/03/2023:

---

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Instituição: Universidade de São Paulo (USP/IFSC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Instituição: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

---

Dra. Fernanda Alves Dias de Sousa

Instituição: Universidade de São Paulo (USP/IFSC)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a toda a minha família, Denise, Essio Jr., Ana, Armando, Helena e Meg,  
amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua presença em minha vida e por me guiar em Seu propósito.

É indispensável agradecer ao meu orientador Vanderlei Bagnato, pois ele, assim como meu avô, tornou-se uma inspiração para mim. Com a sua admirável maneira de se relacionar e lidar com o trabalho, transparecendo de forma ímpar sua paixão pela ciência que só realmente quem o conhece sabe.

É indispensável também agradecer a Jennifer Machado e a Kate Blanco pelo suporte do início ao fim, pela paciência e ensinamentos valiosíssimos, como o raciocinar científico que de fato, somente exemplos de cientistas como elas conseguiriam me passar.

Agradeço muito à Thaila Quatrini pela atenção com o meu trabalho, dedicação e ensinamentos científicos que levarei comigo para sempre e que são extremamente essenciais para mim.

Agradeço imensamente a Camila Boralli e a professora Ilana Camargo por contribuírem tanto com o projeto, desde discussões enriquecedoras acrescentando muito conhecimento até por ceder o laboratório Lemímo para que importantes experimentos acontecessem.

Agradeço muito aos membros da banca, Dra. Fernanda Alves, prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Paiva, Dra. Kate Blanco, prof. Dr. Clóvis de Souza e prof. Dr. Vanderlei Bagnato por aceitarem contribuir de forma ímpar com este trabalho, tão importante para mim.

Agradeço aos colegas do CEPOF, por me ajudarem sempre que precisei, seja com alguma parte técnica do trabalho e contribuição com seus conhecimentos ou também por uma conversa sincera, inspiradora ou acolhedora. Jennifer, Kate, Natalia Inada, Gabi, Shir, Didi, Claudinha, Fer, Thaila, Maju, Rapha, Camila e muitos que tem lugar guardado no meu coração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradeço muito a minha família, sem eles saberia menos ainda da vida e não teria os princípios e valores que prezo tanto, além do prazer e da alegria em conviver com eles.

Agradeço à minha mãe Denise e ao meu pai Essio Jr. que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a continuar, por toda a dedicação e atenção a mim, por todo o esforço, compreensão e cuidado que foram mediados com muito amor e carinho durante todos os dias da minha vida.

Agradeço aos meus avós Ana e Armando por toda paciência, apoio e ensinamentos que me guiaram até aqui.

Agradeço a minha tia Helena pelas conversas, carinho e todos os momentos divertidos que tivemos juntas.

Agradeço muito a minha melhor amiga Gabriela que sempre de forma muito gentil se manteve ao meu lado, na alegria, ansiedade e aprendizados.

Agradeço muito ao meu querido amigo Gaston Lozano-Calderón, que além do bom bate-papo de sempre e de alegrar o ambiente de trabalho com a “hora do café” é um grande exemplo de cientista que me apoia e me faz aproximar cada vez mais da comunidade científica.

Agradeço a minha pitbull, Meg, por sempre me recepcionar tão bem em casa após dias exaustivos e estressantes e poder só pelo olhar dela reencontrar minha serenidade.

Vieira, Rebeca **Estudo do efeito da inativação fotodinâmica na transferência de resistência bacteriana** 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

## RESUMO

Bactérias Gram-negativas são relativamente mais resistentes e difíceis de serem inativadas do que bactérias Gram-positivas, por possuírem uma membrana externa a mais e diversos mecanismos de resistência. Além disso, possuem grande importância clínica por causarem diversas infecções em humanos. Há estimativas de que em poucos anos, microrganismos resistentes podem se tornar a principal causa de morte mundialmente, superando mortes causadas pelo câncer, diabetes e até mesmo por acidentes de trânsito sendo, assim, uma questão urgente em escala global. A inativação fotodinâmica (IFD) é uma técnica vantajosa de redução de microrganismos que se apresenta como uma alternativa promissora ao uso de antibióticos, por exemplo por ser capaz de quebrar a resistência bacteriana e impossibilitar a resistência adquirida. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da IFD na transferência de resistência bacteriana em linhagens resistentes. Neste trabalho, foi possível avaliar o comportamento de Gram-negativas de grande importância clínica, como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, após tratamento de IFD, utilizando sub dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup> e como fotossensibilizador (FS) a curcumina e, assim, compreender através das curvas de crescimento como a IFD foi capaz de afetar o comportamento bacteriano característico. Além disso, na tentativa de estabelecer condições que levavam ao objetivo foi observado que com a metodologia feita houve interferência na ação fotodinâmica mediada pelo dodecil sulfato de sódio (SDS), que resultou em baixa inativação fotodinâmica e alteração da concentração inibitória mínima (CIM) dessas linhagens. De modo geral, são bactérias difíceis de serem tratadas e foi visto que, todos os elementos utilizados na IFD (FS, luz, SDS) afetaram as bactérias, sendo necessário mais estudos para investigar a melhor abordagem para essas Gram-negativas e, verificar se há alteração com moléculas externas, tais como o SDS.

**Palavras-chave:** Inativação fotodinâmica, linhagem bacteriana, SDS, resistência, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, curcumina.

Vieira, Rebeca. **Study of the effect of photodynamic inactivation on bacterial resistance transfer.** 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

## **ABSTRACT**

Gram-negative bacteria are relatively more resistant and difficult to treat because they have a larger outer membrane than Gram-positive bacteria and several resistance mechanisms. In addition, they are of great clinical importance because they cause several infections in humans. There are estimates that, in a few years, resistant microorganisms may become the leading cause of death worldwide, surpassing deaths caused by cancer, diabetes and even traffic accidents, thus being an urgent issue on a global scale. Photodynamic inactivation (PDI) is an advantageous technique for reducing microorganisms that presents itself as a promising alternative to avoid antibiotics, for example, by being able to break bacterial resistance and make acquired resistance impossible. Thus, this study aimed to attenuate or inhibit the transfer of bacterial resistance in resistant strains. In this way, it was possible to evaluate the behavior of clinically relevant Gram-negatives, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, after treatment with PDI using dose light of 30 J/cm<sup>2</sup> and curcumin as photosensitizer (PS) and thus to understand through logistic modeling of the growth curves how PDI was able to affect the characteristic bacterial behavior. Furthermore, in an effort to establish conditions leading to the goal it was observed that with the methodology made there was interference in the photodynamic action mediated by sodium dodecyl sulfate (SDS), which resulted in low photodynamic inactivation and alteration of the minimum inhibitory concentration (MIC) of these strains. In general, these are severely difficult bacteria to treat and it was seen that all the elements used in the PDI (PS, light, SDS) affected the bacteria, requiring further studies to investigate the best approach for these Gram-negative bacteria and to verify if there is an alteration with external molecules such as SDS.

**Keywords:** Photodynamic inactivation, bacterial strain, SDS, resistance, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, curcumin.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** Representação da aquisição de material genético contendo a resistência pelo processo denominado Transformação, (1) bactéria livre (2) plasmídeo contendo resistência livre no meio (3) a bactéria incorpora o material genético (4) bactéria contém genes resistentes em seu genoma. Fonte: autoria própria, imagem produzida pelo Software Inkscape 1.2..... 31

**Figura 2.** Representação dos quatro principais mecanismos de resistência bacteriana: (1) o antibiótico que entrou dentro da bactéria é inativado por enzimas, (2) a bactéria codificou a estrutura alvo do antibiótico e produziu uma estrutura nova mais resistente que não permitirá que o antibiótico se encaixe, (3) a bactéria reduz a permeabilidade de sua membrana dificultando a entrada do antibiótico e (4) na membrana bacteriana de Gram-negativas encontram-se proteínas específicas que agem como bomba de efluxo, expulsando o antibiótico do meio intracelular para o meio extracelular. Fonte: autoria própria, imagem produzida pelo Software Inkscape 1.2. .... 36

**Figura 3.** Representação do mecanismo de conjugação bacteriana, o qual uma bactéria doadora e portadora do gene de resistência se aproxima de uma bactéria receptora sem plasmídeo, ambas projetam os pili para a transferência do plasmídeo contendo o gene de resistência e depois com a conjugação bem sucedida elas se separam e seguem livres, ambas agora, portadoras do gene de resistência. Fonte: autoria própria, imagem produzida pelo software Inkscape 1.2. .... 37

**Figura 4.** Representação do Diagrama de Jablonski. Ocorre a ativação de uma molécula fotossensibilizadora (FS) por um determinado comprimento de onda, a energia absorvida pela molécula transforma o elétron de seu estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado mais excitado ( $S_n$ ). A tendência das moléculas é voltar ao menor estado de energia. Dessa forma, ocorre o decaimento de energia para o elétron em seu primeiro estado excitado ( $S_1$ ) e este é capaz de devolver a energia enquanto decai para o  $S_0$  em forma de luz, causando a fluorescência ou pode transitar sem radiação para o estado tripleto excitado ( $T_1$ ). A partir do estado tripleto excitado o elétron pode decair para o  $S_0$  e emitir fosforescência ou produzir os dois tipos de reações, tipo I produtora de ROS ou tipo II produtor de oxigênio singleto, ambas as reações podem causar dano ou morte celular. Fonte: autoria própria, imagem feita pelo Power Point. .... 39

**Figura 5.** Representação da morfologia estrutural de Gram-negativas e Gram-positivas. As Gram-negativas possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos que garantem mais resistência a alguns antimicrobianos. Fonte: Istock ttsz, imagem modificada do Google..... 41

**Figura 6.** Foto feita pela autora do Dispositivo BioTable ® 450nm. .... 50

**Figura 7.** Curvas de crescimento típica da linhagem de *K. pneumoniae* sem IFD (■) e curva de crescimento alterada após tratamento de IFD (●) com média e desvio padrão. Elaborado pela autora..... 57

**Figura 8.** Curvas de crescimento típica da linhagem de *E. coli* sem IFD (■) e curva de crescimento alterada após tratamento de IFD (●) com média e desvio padrão. Elaborado pela autora..... 58

**Figura 9.** Curvas de crescimento típica das culturas mistas sem IFD (■) e curva de crescimento alterada após tratamento de IFD (●) com média e desvio padrão. Elaborado pela autora..... 59

**Figura 10.** Log (UFC/mL) contendo média e desvio padrão dos grupos controle escuro FS 50, CONTROLE CM (cultura mista), CONTROLE KP (*Klebsiella pneumoniae*), CONTROLE EC (*Escherichia coli*), grupos LUZ e grupos de tratamento com IFD (30 J/cm<sup>2</sup>) utilizando como fotossensibilizador a curcumina (50µM) solubilizada em 10% de álcool etílico e 1,5% de DMSO. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (one-way ANOVA com teste TUKEY (p < 0,05)). Elaborado pela autora..... 61

**Figura 11.** Log (UFC/mL) contendo média e desvio padrão dos grupos CONTROLE, grupo escuro e SDS, LUZ, LUZ+SDS e grupos de tratamento com IFD (30 J/cm<sup>2</sup>) de *K. pneumoniae* variando a concentração do fotossensibilizador (50 µM, 100 µM e 150 µM) solubilizado em solução hidroalcoólica + 1,5% DMSO + 0,1% SDS. Houve diferença estatística significativa entre os grupos citados no texto, representados pelas letras A, B, C, D e E (one-way ANOVA com teste TUKEY (p < 0,05)). Elaborado pela autora.. ..... 63

**Figura 12.** Log (UFC/mL) contendo média e desvio padrão dos grupos CONTROLE, grupo escuro, SDS, LUZ, LUZ+SDS e grupo de tratamento com IFD (30 J/cm<sup>2</sup>) de *E. coli* variando a concentração do fotossensibilizador (50 µM, 100 µM e 150 µM) solubilizado em solução hidroalcoólica + 1,5% DMSO + 0,1% SDS. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (one-way ANOVA com teste TUKEY (p < 0,05)). Elaborado pela autora..... 64

**Figura 13.** Log (UFC/mL) contendo média e desvio padrão dos grupos CONTROLE, grupo escuro, SDS, LUZ, LUZ+SDS e grupo de tratamento com IFD (30 J/cm<sup>2</sup>) da cultura mista de *K. pneumoniae* + *E. coli* variando a concentração do fotossensibilizador (50 µM, 100 µM e 150 µM) solubilizado em solução hidroalcoólica + 1,5% DMSO + 0,1% SDS. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (one-way ANOVA com teste TUKEY (p < 0,05)). Elaborado pela autora..... 65

**Figura 14.** Teste da taxa de conjugação (cel/mL) dos grupos CONTROLE, FS, SDS, FS+SDS, IFD e IFD+SDS da cultura mista de linhagens resistentes

(BHKP 104+J53). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (one-way ANOVA com teste TUKEY ( $p < 0,05$ )). Elaborado pela autora. .... 67

**Figura 15.** Concentração inibitória mínima de gentamicina ( $\mu\text{g/mL}$ ) de *K. pneumoniae* dos grupos CONTROLE, controles escuros: FS (curcumina  $50 \mu\text{M}$ ), FS+SDS (curcumina  $50 \mu\text{M}$  + 0,1% SDS) e de tratamento com dose de  $30 \text{ J/cm}^2$  IFD e IFD + 0,1% SDS. Elaborado pela autora. .... 69

**Figura 16.** Concentração inibitória mínima de gentamicina ( $\mu\text{g/mL}$ ) de *E. coli* dos grupos CONTROLE, controles escuros: FS (curcumina  $50 \mu\text{M}$ ), FS+SDS (curcumina  $50 \mu\text{M}$  + 0,1% SDS) e de tratamento com dose de  $30 \text{ J/cm}^2$  IFD e IFD + 0,1% SDS. Elaborado pela autora..... 69

**Figura 17.** Concentração inibitória mínima de gentamicina ( $\mu\text{g/mL}$ ) de Culturas mistas dos grupos CONTROLE, controles escuros: FS (curcumina  $50 \mu\text{M}$ ), FS+SDS (curcumina  $50 \mu\text{M}$  + 0,1% SDS) e de tratamento com dose de  $30 \text{ J/cm}^2$  IFD e IFD + 0,1% SDS. Elaborado pela autora..... 70

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Parâmetros aplicados em cada grupo .....52

**Tabela 2** Identificação dos grupos .... **Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 3** Descrição dos conteúdos nas placas .....55

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

SDS	Sodium dodecyl sulfate (inglês)
BHI	Brain heart infusion
CRKP	Resistente a carbapenêmicos
ROS	Reactive oxygen Species (inglês)
FS	Fotossensibilizador
IFD	Inativação Fotodinâmica
LAT	Laboratório de Apoio Técnico
LB	Luria Bertani
MR	Bactérias multirresistentes
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
RAM	Resistência antimicrobiana
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
PA	Para Análise
CIM	Concentração Inibitória Mínima
MH	Mueller Hinton
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio

## Sumário

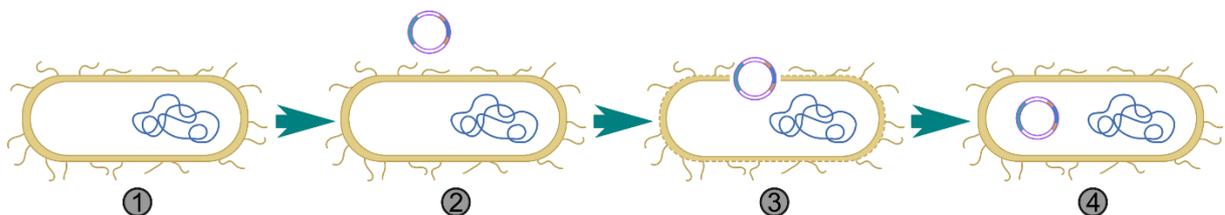
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	12
Lista de abreviaturas e siglas.....	13
<b>Capítulo 1</b>	
1. Introdução .....	31
1.1 Resistência bacteriana.....	34
1.2 Mecanismos de resistência bacteriana .....	35
1.3 O desafio com as bactérias super resistentes portadoras do gene bla <sub>kpc</sub> .....	38
1.4 Inativação fotodinâmica.....	39
1.5 Curcumina como fotossensibilizador.....	42
1.6 Cultura mista de <i>Klebsiela pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> ....	43
2. Objetivos .....	45
2.1 Objetivo geral.....	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
<b>Capítulo 2</b>	
3. Material e métodos .....	46
3.1 Microrganismos .....	46
3.2 Preparo do inóculo .....	46
3.6 Preparo do fotossensibilizador .....	48
3.7 Determinação da fonte de luz.....	50
3.8 Determinação de curvas de crescimento .....	51
3.8.1 Das espécies isoladas.....	51
3.8.2 Da cultura mista.....	51
3.9.1 Espécies isoladas.....	52
3.9.2 Culturas mistas.....	53
4. Experimento de IFD + Conjugação bacteriana.....	53
5. Experimento de CIM + IFD .....	54
<b>Capítulo 3</b>	
6. Resultados e Discussão .....	56
6.1 Curvas de crescimento características e após a IFD .....	56

<b>6.2.2 Inativação fotodinâmica utilizando solução hidroalcolica de curcumina + DMSO (solução estoque) + curcumina + etanol + SDS (solução de uso) .....</b>	<b>62</b>
<b>6.3 Experimentos de Inativação fotodinâmica + Conjugação bacteriana .....</b>	<b>66</b>
<b>6.4 Concentração Inibitória Mínima após Inativação fotodinâmica . .....</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo 4</b>	
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>71</b>
<b>6. Referências bibliográficas .....</b>	<b>72</b>

## Capítulo 1

### 1. Introdução

Bactérias estão entre uma das primeiras formas de vida do planeta Terra há mais de bilhões de anos. Na natureza há microrganismos produtores de moléculas com propriedades antimicrobianas chamadas de antimicrobianos e, conseqüentemente para sobreviver, algumas linhagens bacterianas desenvolveram mecanismos de resistência aos antibióticos, sendo muitas delas selecionadas naturalmente. Portanto, não é surpreendente que tenham se tornado resistentes à maioria dos antimicrobianos desenvolvidos nos últimos 50 anos, uma vez que a maior parte dos antimicrobianos desenvolvidos são baseados nos produzidos naturalmente, à exemplo da penicilina (HANCOCK, 2007). As bactérias podem adquirir material genético contendo a resistência de formas diferentes, por transformação, conforme a Figura 1, quando o encontram livre no meio e o incorporam em seu próprio genoma, por conjugação, a qual ocorre transmissão de elementos de resistência, tais como plasmídeos e transposons, podendo ser transferidos entre bactérias de mesma espécie ou entre bactérias de diferentes linhagens ou por transdução, quando um vírus bacteriófago infecta a bactéria transmitindo genes de resistência (COHEN & TARTASKY, 1997).



**Figura 1** Representação da aquisição de material genético contendo a resistência pelo processo denominado Transformação, (1) bactéria livre (2) plasmídeo livre contendo resistência solto no meio (3) a bactéria incorpora esse plasmídeo (4) bactéria passa a conter genes resistentes em seu genoma incorporados do meio. Fonte: autoria própria, imagem produzida pelo Software Inkscape 1.2.

É possível associar um maior consumo de antibióticos à aceleração desse processo de resistência pois muitas bactérias anteriormente suscetíveis a antibióticos comumente utilizados deixaram de responder a esses mesmos agentes (WHO, 2005). Nos EUA, por exemplo, 30% a 50% dos antibióticos podem ser prescritos inadequadamente ou de forma ineficaz (ROWE, 2019). E no Brasil, a identificação geral de infecções causadas por bactérias multirresistentes (MR) aumentou 23% durante a pandemia do SARS-CoV-2 (POLLY, 2022). Isso ocorreu devido ao aumento substancial da prescrição de antibióticos, até mesmo os de amplo espectro, necessários em casos de infecções secundárias, mas grande parte foi também um desfavor à luta contra microrganismos resistentes a antibióticos, por serem prescritos excessivamente de forma inadequada (LANGFORD, 2021; MURRAY, 2020).

Com o agravamento da “pandemia oculta”, denominada assim por causa do aumento gradativo de mortes causadas por bactérias resistentes a antibióticos anualmente, no ano de 2019 foi observado mais de 1,2 milhões de mortes no mundo devido a infecções resistentes (MURRAY, et al, 2022).

A falta de opção de tratamento e o potencial de disseminação de bactérias multirresistentes ou resistentes a todos os antimicrobianos desenvolvidos são de extrema preocupação (DE MAN, 2018; MALÁ et al., 2021). Dessa forma, a resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública, de tal forma que a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em 2019, recomendou em seu relatório o investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias com urgência para o combate à resistência microbiana.

A Inativação Fotodinâmica (IFD) vem como uma alternativa eficaz e vantajosa contra a resistência bacteriana, na qual se utiliza fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular. O FS quando ativado por luz em comprimento de onda determinado pela absorbância medida em espectrofotômetro, interage com moléculas vizinhas gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) responsáveis por causar a morte de microrganismos, tais como, bactérias, fungos e vírus (HUANG et al, 2012). O FS ativado reage com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), reações descritas na sessão 1.4 Inativação Fotodinâmica, que levam à produção

de oxigênio singleto (PERUSSI, 2007). Como FS, a curcumina extraída da raiz da *Curcuma longa*, atua sob irradiação de luz azul, inibindo os fatores de virulência bacteriana, o crescimento bacteriano e prevenindo a adesão bacteriana aos receptores do hospedeiro através do sistema de regulação do quórum sensing bacteriano por exemplo. Além disso, pode exercer um efeito antibacteriano sinérgico com outras substâncias antibacterianas (ZHENG, 2020). Os diversos estudos relatados na literatura mostraram que o uso da curcumina como FS para IFD apresenta efeito antimicrobiano em diferentes espécies bacterianas, tanto em Gram-positivas como em Gram-negativas, validando seu uso como FS (SOARES, 2019). Assim como foi demonstrado em estudos recentes que a IFD mediada pela curcumina é capaz de afetar a permeabilidade celular e potencializar a ação antimicrobiana tanto em linhagens sensíveis quanto em resistentes (SOARES, et al, 2022) e também, a combinação de IFD com antibióticos pode levar a uma redução das doses necessárias e ao mesmo tempo obter uma maior susceptibilidade das bactérias, comprometendo mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos (WILLIS, et al, 2022).

Dentre os principais patógenos associados às infecções nosocomiais, destacam-se, principalmente, as bactérias Gram-negativas do grupo das enterobactérias tais como, *Klebsiella pneumoniae* (35,5%) e *Escherichia coli* (24,1%), (MOTA, 2018).

Além disso, a *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (CRKP) tornou-se endêmica em diversos hospitais no sul da Europa, Israel, China, América do Norte e América Latina. No Brasil, por exemplo, foi detectado um novo clone bacteriano capaz de elevar a taxa de mortalidade de 30 dias de 60% num cenário endêmico a 95% (ANDREY, 2020).

Portanto, tendo em vista o caráter emergencial de se combater a intensificação da resistência antimicrobiana (RAM), a proposta deste estudo foi compreender o estresse oxidativo provocado pela IFD nas bactérias Gram-negativas de importância clínica, *K. pneumoniae* e *E. coli* e, avaliar a interferência na transferência de resistência de linhagens resistentes.

## **1.1 Resistência bacteriana**

A resistência bacteriana é uma resposta biológica natural dos microrganismos a uma pressão seletiva, como por exemplo a presença de um antibiótico (GOOSSENS, 2005; SANTOS, 2004). É um desafio de saúde global que envolve a transferência de bactérias e genes entre humanos, animais e o meio ambiente. Os patógenos adquirem frequentemente novos fatores de resistência de outras espécies, dificultando a prevenção e o tratamento de infecções bacterianas (LARSSON & FLACH, 2022). Após a introdução de uma nova classe de antibióticos a sua eficácia vai se reduzindo progressivamente levando à uma seleção da população bacteriana portadora de um mecanismo de resistência intrínseco ou adquirido (SOARES, 2012).

Isso sugere que, a resistência bacteriana é um enorme desafio na saúde mundial, pois atualizações nos mecanismos bacterianos surgem e se espalham pelo mundo, dificultando o uso de terapias por antibióticos, exigindo que novos medicamentos sejam lançados no mercado. No entanto, há pouca expectativa para a eficácia necessária em bactérias multirresistentes, tendo em vista que a velocidade com que um novo fármaco é colocado no mercado não acompanha o surgimento de bactérias cada vez mais resistentes (OPAS, 2017).

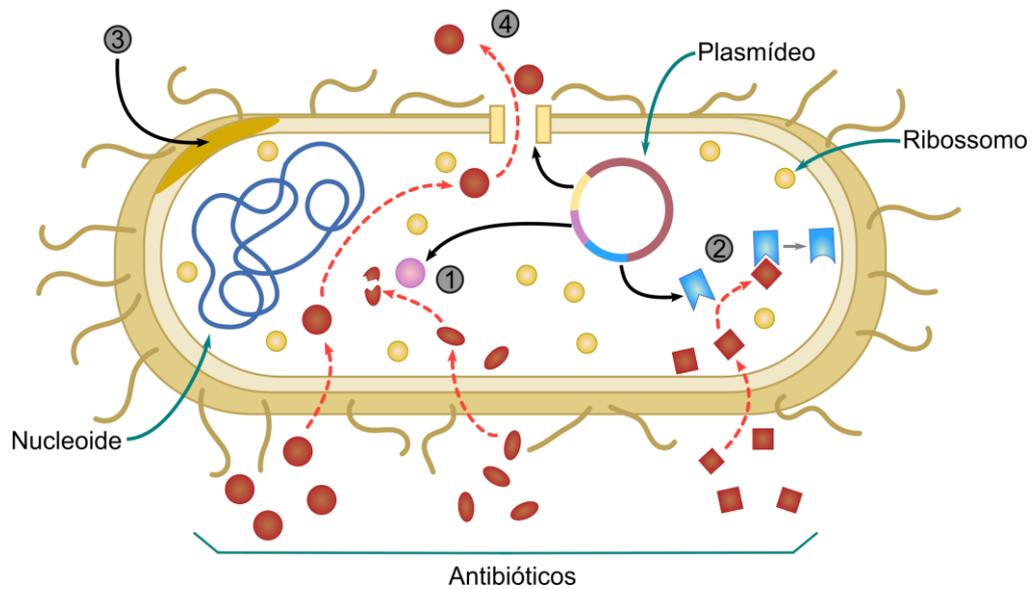
O crescimento exponencial de bactérias resistentes está relacionado ao uso indevido dos antibióticos, que se tornou uma prática comum e, por vezes, desnecessária. Sendo frequentemente indicados até mesmo como uso profilático, o antibiótico é muito utilizado inadequadamente também para a automedicação (ABDULAH, 2012).

Todas as classes de antibióticos aprovadas até agora, sejam eles compostos naturais, semissintéticos ou sintéticos, encontraram resistência em pelo menos um dos patógenos que eles atuam. Dessa forma, entende-se que no meio ambiente já existam fatores de resistência para todos os antibióticos que serão desenvolvidos, a menos que comecemos a projetar de forma diferente os antibióticos (LARSSON & FLACH, 2022). Sendo assim, estudos preveem que em 2050 esse aumento contínuo da resistência pode levar à morte de 10 milhões de pessoas a cada ano e, conseqüentemente, a uma redução de 2% a 3,5% em Produto Interno Bruto (PIB), podendo custar ao mundo até 100 trilhões de dólares (O'NEILL, 2016, NAYLOR et al, 2018).

## **1.2 Mecanismos de resistência bacteriana**

O desenvolvimento de resistência intrínseca à estrutura celular das bactérias pode ocorrer ao longo do tempo. Isso se deve a elevada atividade metabólica e reprodutiva, mecanismos de troca de material genético tais como, transferência de genes de resistência aos antimicrobianos para outras bactérias ou a eventos mutacionais (CLOETE, 2003).

Há quatro principais mecanismos de resistência que as bactérias podem apresentar. Assim, conforme a Figura 2, as bactérias podem: (1) produzir enzimas que inativam o fármaco; (2) alterar a estrutura alvo do antibiótico (3) reduzir a permeabilidade de sua membrana, dificultando a entrada do fármaco e (4) usufruir da bomba de efluxo para expulsar o antibiótico do citoplasma, sendo que originalmente expulsam substâncias nocivas ao metabolismo celular (LEVINSON, 2011).

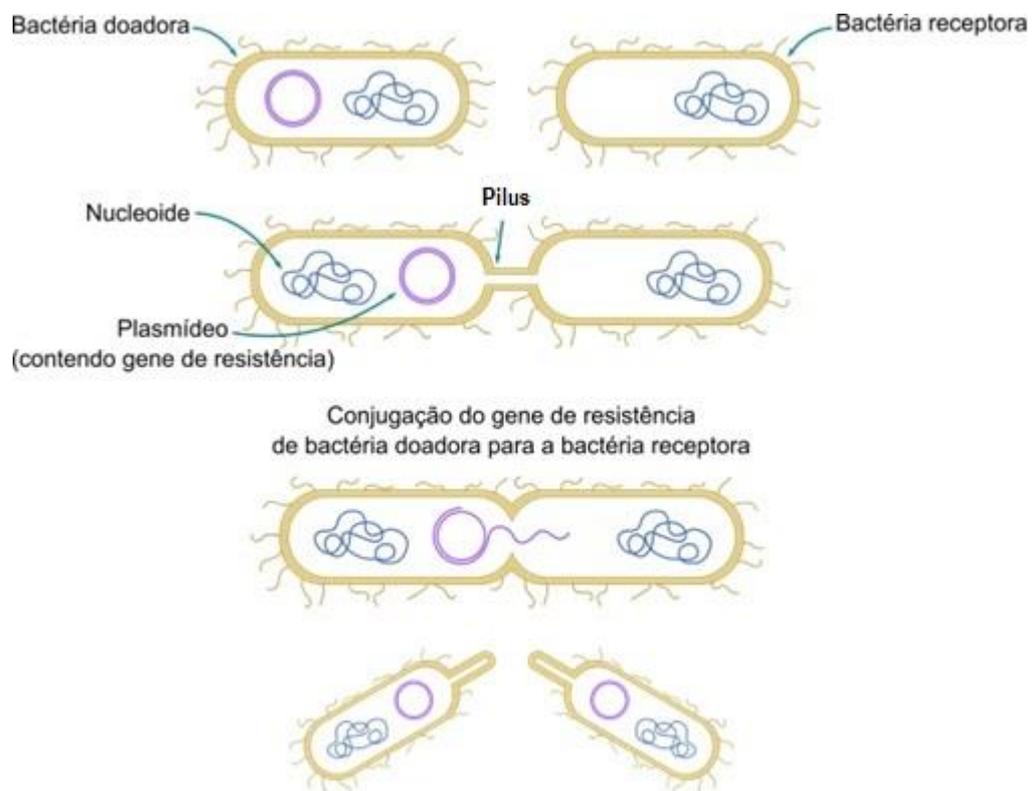


**Figura 2.** Representação dos quatro principais mecanismos de resistência bacteriana: (1) o antibiótico que foi capaz de passar para dentro da célula pela membrana bacteriana é inativado por enzimas, (2) a bactéria codificou a estrutura alvo do antibiótico e produziu uma estrutura nova mais resistente que não permitirá que o antibiótico alcance seu sítio ativo para iniciar sua ação, (3) a bactéria reduz a permeabilidade de sua membrana dificultando a entrada do antibiótico e (4) na membrana bacteriana de Gram-negativas encontram-se proteínas específicas que agem como bomba de efluxo, expulsando o antibiótico do meio intracelular para o meio extracelular. Fonte: autoria própria, imagem produzida pelo Software Inkscape 1.2.

A variedade de mecanismos de defesa bacteriana é expressa principalmente por genes presentes em plasmídeos (SECO, 2016). Os plasmídeos são moléculas de DNA tipicamente circulares e pequenos com replicação autônoma presentes no interior da célula bacteriana, podem conter genes de resistência a antibióticos e existir livremente no organismo ou, ainda, integrar o DNA cromossômico bacteriano (DE OLIVEIRA & SILVA, 2008). Além disso, podem ser classificados em dois grupos principais: conjugativos e não conjugativos.

Os plasmídeos não conjugativos não são capazes de se transferir de uma célula bacteriana para a outra. Já os plasmídeos conjugativos, apresentam em sua estrutura genes que codificam toda a maquinaria necessária para sua própria transferência, e isso é extremamente importante para a troca de genes entre bactérias de diferentes classes ou filogeneticamente distantes (SECO, 2016; FROST, 2005). Esse processo de transferência horizontal é denominado conjugação (DE LA CRUZ *et al* 2010), conforme mostrado na Figura 3.

A conjugação pode levar à alta transmissão de genes e à resistência de diversos fármacos, sendo que a principal problemática relacionada aos plasmídeos conjugativos é a facilidade das bactérias de mesma espécie ou de diferentes espécies em transferir os genes (JÚNIOR, 2019; CARNEIRO, 2011).



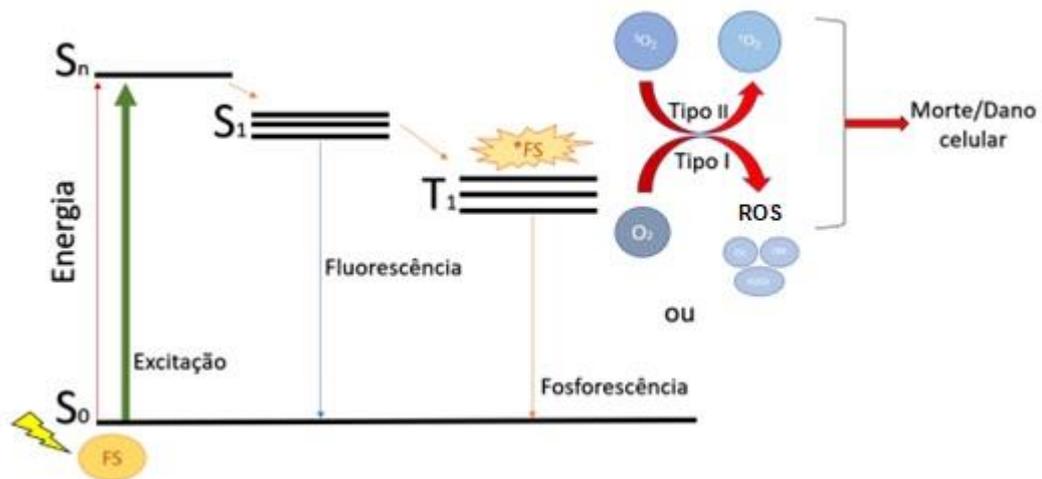
**Figura 3.** Representação do mecanismo de conjugação bacteriana o qual, uma bactéria doadora e portadora do gene de resistência se aproxima de uma bactéria receptora sem plasmídeo, projeta o pilus para a transferência do plasmídeo, contendo o gene de resistência e, depois com a conjugação bem-sucedida elas se separam e seguem livres, ambas agora, portadoras do gene de resistência. Fonte: autoria própria, imagem produzida pelo software Inkscape 1.2.

### 1.3 O desafio da super resistência do gene bla<sub>kpc</sub>

Como característica associada aos plasmídeos, o grande potencial de disseminação dos genes blaKPC e blaNDM tem contribuído para o aumento da prevalência de Gram-negativas produtoras de KPC e NDM (JOHNSON *et al*, 2013). KPC e NDM são enzimas carbapenemases cujo potencial de hidrólise inclui praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos, foi detectado a primeira vez em *K. pneumoniae*, dessa forma a nova beta-lactamase ficou então conhecida como KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase) (YIGIT *et al*, 2001). E NDM ficou assim conhecida por ter sido relatada a primeira vez na cidade de Nova Delhi - Índia, (New Delhi metallo-β-lactamase). Posteriormente, tanto a KPC quanto a NDM passaram a não ser mais exclusiva à essa linhagem pois foi detectada também em diversas outras Gram-negativas, como *Escherichia coli* por exemplo, ainda assim a produção de KPC e NDM são os mecanismos de resistência mais frequentes em *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos no Brasil (SAMPAIO *et al*, 2016; JOHNSON *et al*, 2013; YIGIT *et al*, 2001). Além da resistência à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos estudados é comum que essas bactérias sejam resistentes também a quase todos os antibióticos não beta-lactâmicos como, aminoglicosídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas, devido a presença de múltiplos mecanismos de resistência. Sendo assim, infecções causadas por bactérias super-resistentes têm restringido abruptamente as opções de tratamento que não ocasionem ainda mais o aumento da resistência e taxa de mortalidade hospitalar (ANDRADE & DARINI, 2017).

## 1.4 Inativação fotodinâmica

A inativação fotodinâmica de microrganismos é um excelente método para inativar isolados microbianos resistentes a antibióticos (RAPACKA-ZANDONCYK *et al*, 2021). O princípio de ação da Inativação Fotodinâmica (IFD) é demonstrado pelo Diagrama de Jablonski e conforme mostra a Figura 4, ocorre através da ativação de uma molécula fotossensibilizadora (FS) por luz em comprimento de onda adequado, capaz de transformar um elétron em seu estado fundamental ( $S_0$ ) para o estado singlete excitado ( $S_1$ ) que possui alta probabilidade em transitar sem radiação para o estado tripleto excitado ( $T_1$ ), via cruzamento intersistema, conforme o Princípio de Exclusão de Pauli. Sendo assim, o tempo de vida para o  $T_1$  é mais longo e permite interagir com o oxigênio molecular ( $O_2$ ).

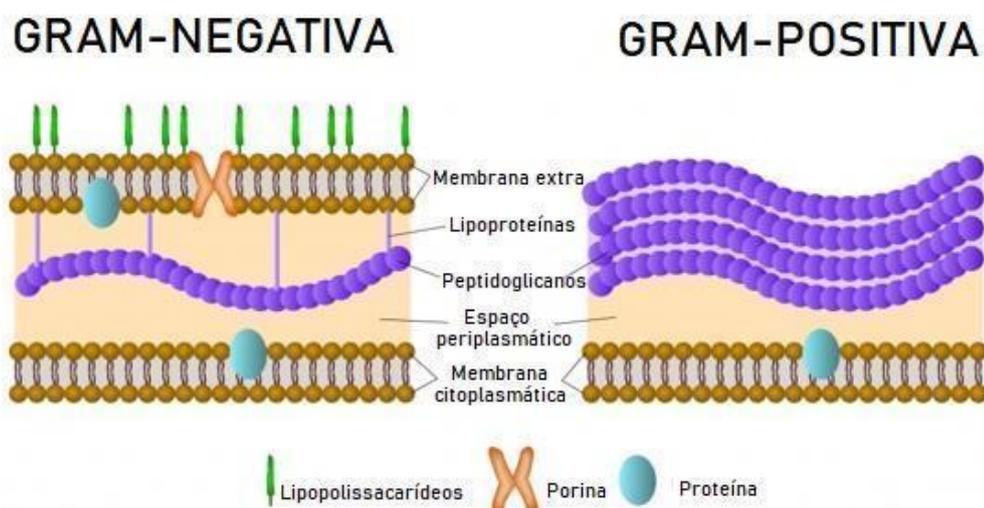


**Figura 4.** Representação do Diagrama de Jablonski. Ocorre a ativação de uma molécula fotossensibilizadora (FS) por um determinado comprimento de onda, a energia absorvida pela molécula transforma o elétron de seu estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado mais excitado ( $S_n$ ). A tendência das moléculas é voltar ao menor estado de energia. Dessa forma, ocorre o decaimento de energia para o elétron em seu primeiro estado excitado ( $S_1$ ) e este é capaz de devolver a energia enquanto decai para o  $S_0$  em forma de luz, causando a fluorescência ou pode transitar sem radiação para o estado tripleto excitado ( $T_1$ ). A partir do estado tripleto excitado o elétron pode decair para o  $S_0$  e emitir fosforescência ou produzir os dois tipos de reações, tipo I produtora de ROS ou tipo II produtor de oxigênio singleto, ambas as reações podem causar dano ou morte celular. Fonte: autoria própria, imagem feita pelo Power Point.

O processo da IFD diferencia-se dos processos oxidativos celulares por ser dependente da absorção da luz. A interação do FS com o O<sub>2</sub> pode ocorrer por meio de dois tipos de reações denominadas de reação tipo I e tipo II, respectivamente (SPERANDIO *et al*, 2013). A reação do tipo I, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) como superóxido ( $\cdot\text{O}_{-2}$ ), radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As EROs causam peroxidação lipídica, perturbando a integridade da membrana celular, produção de energia e transportes celulares. Possuem como alvo várias biomoléculas dentro de uma célula, lipídios de membrana, ácidos nucleicos, carboidratos, tióis e proteínas que parecem ser o alvo principal (ALVES *et al*, 2013). Na reação do tipo II, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é o principal produto, este reage com aminoácidos aromáticos formando produtos causadores de efeitos citotóxicos (MICHAELI & FEITELSON, 1994; GONDIM *et al*, 2021). Os produtos de reação do tipo I e do tipo II podem ser produzidos simultaneamente na IFD, com a proporção de cada dependendo do tipo de fotossensibilizador utilizado e da força iônica de seu solvente (HUANG *et al*, 2012). Recentemente, foi descrito uma reação do tipo III em que, independentemente da presença de oxigênio, são produzidos radicais livres de compostos inorgânicos, que também podem estar envolvidos em a fotoinativação de microrganismos (HAMBLIN & AMBRAHAMSE, 2020).

A técnica apresenta várias vantagens, tais como, o uso para tratar infecções localizadas, podendo ser feita por aplicação local, ou seja, tópica do FS na área infectada (AROSO, 2022). Outra vantagem da técnica é a baixa probabilidade de seleção de microrganismos resistentes, uma vez que a resistência às espécies reativas de oxigênio é praticamente impossível de ocorrer (WAINWRIGHT *et al*, 2017; DIAS *et al*, 2020). Além disso, anterioridades demonstraram que a resistência pode ser quebrada pela IFD (SOARES *et al*, 2022; WILLIS *et al*, 2022).

Sabe-se que, geralmente, as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à IFD enquanto as bactérias Gram-negativas são significativamente resistentes à muitos FS (MAISCH, *et al*; 2005). Isso é explicado pelas diferenças estruturais das paredes celulares das bactérias. A Figura 5 mostra as diferenças estruturais das paredes celulares dessas bactérias, já que o envelope celular das bactérias Gram-negativas tem uma membrana externa complexa incluindo duas bicamadas lipídicas que funcionam como uma barreira física e funcional entre a célula e seu ambiente, enquanto as bactérias Gram-positivas têm somente uma membrana que é relativamente permeável. Dessa forma, as diferenças de Gram são facilmente notadas pela técnica de coloração de Gram, assim, a facilidade das Gram-positivas em capturar o corante é a mesma para a incorporação de um FS por exemplo, que conseqüentemente as matam, enquanto o contrário é verdadeiro para as Gram-negativas (DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005).



**Figura 5.** Representação da morfologia estrutural de Gram-negativas e Gram-positivas. As Gram-negativas possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos que garantem mais resistência a alguns antimicrobianos. Fonte: Istock ttsz, imagem modificada do Google.

No entanto, vale ressaltar que são importantes as características de cada FS, tais como, a hidrofobicidade e a presença de cargas nos FSs que levam a diferentes interações com as organelas. Desse modo, a ação fotodinâmica de um corante positivo pode ocorrer na mitocôndria em eucariotos, enquanto a de um corante negativo pode ocorrer na membrana nuclear para uma mesma classe de bactérias, por exemplo (TARDIVO, *et al*; 2005).

### **1.5 Curcumina como fotossensibilizador**

A curcumina é um polifenol derivado da planta *Curcuma longa*, popularmente conhecida como açafrão da terra, pertencente à família *Zingiberaceae*. É utilizada como FS tendo em vista que apresenta um amplo espectro de efeitos terapêuticos, como por exemplo, propriedades anti-inflamatória (BASNET, 2011), antioxidante (KAWAKISHI, 1996) e antibacteriana (ZHANG, 2018). Além disso, diversos estudos são relatados na literatura sobre o uso da curcumina como FS para IFD em diferentes espécies bacterianas, tanto Gram-positiva como Gram-negativa (DIAS *et al*, 2020; ABDULRAHMAN *et al*, 2020, JOCHELAVICIUS, 2018; SOARES, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2012b). ABDULRAHMAN *et al* (2020) relataram que a exposição à curcumina com luz causa a regulação negativa da sinalização para a comunicação bacteriana em função da densidade populacional, denominada *quórum sensing*, sendo um tratamento efetivo na Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* por exemplo.

Além disso, resultados de JOCHELAVICIUS (2018) demonstraram que a curcumina se estabiliza melhor em contato com lipídeos das membranas externas de Gram-negativas, produzindo, através da ação do oxigênio singlete, hidroperóxido lipídico, mais hidrofílico, o que intensifica o efeito da IFD por causar um dano maior na membrana. Sabe-se também que a curcumina possui um amplo pico de absorção, na faixa de 300 a 430 nm, exercendo potentes efeitos fototóxicos em quantidades micromolares, assim, a IFD se restringe na aplicação de infecções superficiais, de modo que possa ativar a curcumina internalizada na bactéria (SOARES, 2019).

Estudos de SOARES, 2019, apresentaram que independente da espécie bacteriana as concentrações da formulação e a dose de luz entregue geralmente são mais elevadas quando comparada a outros FSs, contudo, o efeito antimicrobiano é alcançado, validando o uso da curcumina como FS. Dessa forma, a curcumina apresenta-se como um FS que apresenta vantagens econômicas, devido ao seu baixo custo, manipulação simples e grande efetividade (ARAÚJO et al., 2012b).

### **1.6 Cultura mista de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli***

Espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são bacilos (formato de bastonete) Gram-negativos que são: anaeróbicos facultativos com fermentação de glicose, encapsulados, de motilidade variável, não esporulados, apresentam oxidase negativa e são amplamente conhecidas por serem os principais patógenos relacionados a infecções nosocomiais, tais como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (ANVISA, 2004; MURAI et al, 2022). No ambiente hospitalar, o aumento na incidência de microrganismos multirresistentes, principalmente na ala de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) é considerado um dos principais problemas no tratamento de infecções nosocomiais e de saúde pública global. Assim como foi demonstrado em estudos de WOLLHEIM et al 2011, existe uma alta prevalência de genes de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) em bactérias hospitalares como *K. pneumoniae* e *E. coli* e, além disso é um fator de risco pois podem ser transferidos entre diferentes espécies enterobacterianas. SEJAS, 2015 avaliou a resistência aos antibióticos, a variabilidade genética e as relações clonais em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL). Foi visto que ambas as espécies apresentam altos percentuais de resistência à cefepime (98% e 94%, respectivamente) e à ceftazidima (100% e 96%, respectivamente) e somente os isolados de *K. pneumoniae* demonstraram resistência a ertapenem (61%), imipenem (54%) e meropenem (43%). Foram evidenciados, ainda, isolados de *E. coli* carreando até três diferentes genes e *K. pneumoniae* com até seis genes responsáveis pela produção de diferentes  $\beta$ -lactamases. A tipificação molecular feita nesse mesmo estudo, indicou uma grande diversidade genética entre os isolados de *K. pneumoniae* (68 perfis / 70 isolados) e de *E. coli* (37 perfis /

47 isolados) Além disso, estudos indicam que a conjugação entre isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* ocorre em maior frequência do que de *K. pneumoniae* para outras espécies (CARVALHO, 2021). Portanto é imprescindível que haja estudos de culturas mistas a fim do controle das infecções hospitalares.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o comportamento das bactérias Gram-negativas *K. pneumoniae* e *E. coli* após tratamento de inativação fotodinâmica e, assim, compreender seus efeitos antimicrobianos na transferência de resistência bacteriana em linhagens resistentes.

### **2.2 Objetivos específicos**

Testar condições de IFD para as Gram-negativas *K. pneumoniae* e *E. coli* em culturas puras e em culturas mistas.

Analisar o comportamento bacteriano através da curva de crescimento de *K. pneumoniae* e *E. coli* isoladas e também em culturas mistas com e sem IFD.

Testar e analisar se há ou não interferência da IFD na conjugação entre linhagens resistentes de *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Determinar a concentração inibitória mínima para as Gram-negativas antes e após tratamento de IFD e comparar com e sem o uso do SDS.

## Capítulo 2

### 3. Material e métodos

#### 3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram as bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* (CBAM0435) e *Escherichia coli* (ATCC25922), linhagens pertencentes ao laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil. E para os estudos de conjugação bacteriana os microrganismos utilizados nos ensaios foi um par de bactérias doadora-receptora, a *Klebsiella pneumoniae* (BHKPC104), que possui o gene *bla<sub>KPC</sub>* em um plasmídeo e *Escherichia coli* (J53), a que irá receber o plasmídeo caso a conjugação aconteça. Estas são linhagens pertencentes ao Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Moleculares (LEMiMo) da Universidade de São Paulo – São Carlos.

#### 3.2 Preparo do inóculo

##### 3.2.1 Experimentos de inativação fotodinâmica (IFD)

Os microrganismos, *Klebsiella pneumoniae* (CBAM0435) e *Escherichia coli* (ATCC25922), foram cultivados, adicionando uma alíquota (1 mL) da amostra criopreservada em criotubo, em (9 mL) meio líquido Brain Heart Infusion (BHI) (KASVI<sup>®</sup>) a 37 °C ± 2 °C e 150 rotações por minuto (rpm) em incubadora com agitação orbital (Quimis<sup>®</sup>). Após o crescimento microbiano em overnight, em torno de 18h, as amostras foram centrifugadas (5702 Eppendorf<sup>®</sup>) e ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS) e posteriormente ajustadas para obtenção do inóculo em 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro), ou seja, DO = 0,6, verificado pela densidade ótica em 600 nm (Cary UV-Vis50, Varian).

### **3.2.2 Experimentos de conjugação bacteriana antes e depois da IFD**

Os microrganismos, *Klebsiella pneumoniae* (BHKPC104) e *Escherichia coli* J53, foram cultivados adicionando uma alíquota (10 µL) da amostra criopreservada em criotubo, em meio líquido (8 mL) Brain Heart Infusion (BHI) (KASVI®) e incubados a 37 °C ± 2 °C. Após o crescimento microbiano por 24 h, as amostras foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão fosfato salino (PBS) e posteriormente ajustadas para obtenção do inóculo em 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro), ou seja, DO = 0,6, verificado pela densidade ótica em 600 nm (Spectramax M5 (Molecular Devices, EUA)).

### **3.3 Experimentos de concentração inibitória mínima antes e depois da IFD**

Foi utilizado o método de suspensão da colônia direta, o qual inocula algumas colônias da bactéria (10<sup>8</sup>) previamente incubada por 24 h a 37 °C ± 2 °C da placa de petri em meio líquido Mueller Hinton (10 mL).

### **3.4 Preparo dos solventes**

Com o auxílio de uma balança analítica foi pesado 0,1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) da Lab synth ® e adicionado em um eppendorf com 1mL de H<sub>2</sub>O destilada previamente autoclavada. Posteriormente, foi diluído a fim de se obter 0,1% na solução de uso do FS. Outro solvente utilizado foi o dimetilsulfoxido (DMSO) da Synth ®, no momento do preparo da solução estoque de FS, sendo incorporado 1,5%.

### **3.5 Preparo da solução de Resazurina [0,015%]**

Com auxílio da balança analítica, foi pesado 0,075 g de sal de resazurina e transferido para um tubo falcon com 50 mL de H<sub>2</sub>O previamente autoclavada.

### **3.6 Preparo dos meios seletivos e antimicrobianos**

Nos experimentos de conjugação bacteriana, foram utilizados meio seletivo para o plaqueamento das colônias. Para isso, primeiramente foi preparado o meio de cultura Lúria Bertani (LB) 20 g/L + ágar 1,5 g/100 mL da KASVI ®. Em seguida, foi preparada a solução estoque do antibiótico Imipenem a 4 mg/ mL, cuja potência é de 85%, em tampão fosfato de sódio 10 mM, para ser acrescentado no meio de cultura. E também foi preparado o bacteriostático azida sódica a 100 mg/mL. Dessa forma, em uma garrafa contendo meio LB + ágar, foi acrescentado imipenem e azida e, em outra garrafa contendo meio LB + ágar foi acrescentado somente azida, em seguida, seus volumes foram transferidos para placas de petri para que o plaqueamento com os meios seletivos fosse feito.

### **3.7 Preparo da solução estoque de gentamicina (5 µg/mL) para experimento de concentração inibitória mínima**

Com auxílio da balança analítica, foi pesado 5 mg de gentamicina e adicionado 1 mL de H<sub>2</sub>O num eppendorf.

### **3.8 Preparo da solução de uso de gentamicina (5 µg/mL) para experimento de concentração inibitória mínima**

Em um tubo falcon foi adicionado 3.321 µL de meio MH + 179 µL da solução estoque de gentamicina.

### **3.9 Preparo do fotossensibilizador**

O fotossensibilizador (FS) utilizado foi a curcumina sintética, produzida pela PDT Pharma ®. Todas as soluções foram armazenadas a 5 °C por um período máximo de 15 dias.

#### **3.9.1 Solução Estoque**

A solução estoque foi preparada em álcool etílico 95% P.A, contendo 5 mM de curcumina e 1,5% de dimetilsulfoxido (DMSO).

### **3.9.2 Solução de uso para experimento de inativação fotodinâmica**

Para os primeiros ensaios, a concentração de FS utilizada foi de 50  $\mu\text{M}$  com 10% de álcool, seção (6.2.1 dos resultados).

Posteriormente foi incorporado nos ensaios 0,1% de SDS e também a concentração do FS foi variada entre 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$  em cada experimento, seção (6.2.2 dos resultados)

### **3.9.3 Solução de uso para experimento de conjugação bacteriana antes e após IFD**

A concentração do FS utilizada foi de 50  $\mu\text{M}$ . Para o preparo dessa solução sem SDS foi adicionado 120  $\mu\text{L}$  da solução estoque + 5880  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada previamente autoclavada a fim de se obter 6 mL de FS. Já para os experimentos em que foi utilizado 0,1 % de SDS, foi adicionado 120  $\mu\text{L}$  da solução estoque + 120  $\mu\text{L}$  de SDS + 5820  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada previamente autoclavada a fim de se obter o mesmo volume de FS.

### **3.10 Solução de uso para experimento de concentração inibitória mínima antes e depois da IFD**

Solução de uso com SDS: Em um tubo falcon foi adicionado 120  $\mu\text{L}$  de SDS + 120  $\mu\text{L}$  de solução estoque de curcumina + 5760  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Solução de uso **sem** SDS: Em um tubo falcon foi adicionado 60  $\mu\text{L}$  de solução estoque de curcumina + 2970  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$

### 3.10 Determinação da fonte de luz

Foi utilizada baixa dose de luz a fim de não causar morte celular. Como fonte de luz foi utilizado um dispositivo intitulado BioTable® (Figura 6), desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico (LAT), do Instituto de Física de São Carlos. Esse dispositivo é composto por 24 diodos emissores de luz (LED - Light Emitting Diode) no comprimento de onda de 450 nm. Cada amostra recebeu irradiação uniforme com intensidade média de 33,9 mW/cm<sup>2</sup>. A dose de luz aplicada foi de 30 J/cm<sup>2</sup>, o que corresponde a um tempo de irradiação de 14 minutos e 44 segundos, calculado da seguinte forma:

$$D = iT$$

Sendo dose de luz (D), expressa em J/cm<sup>2</sup>, equivalente a intensidade luminosa (i) expressa em W/cm<sup>2</sup> multiplicada pelo tempo (T) em segundos.



**Figura 6.** Foto feita pela autora do Dispositivo BioTable ® 450nm.

### **3.11 Determinação de curvas de crescimento**

#### **3.11.1 Das espécies isoladas**

As curvas de crescimento foram feitas a partir do pré inóculo que estava em overnight. Dessa forma, para as curvas características, 1 mL do pré inóculo foi adicionado em um tubo do tipo falcon contendo 39 mL de BHI. Após ajustar a densidade óptica da amostra a 0.03 no espectrofotômetro (Cary UV-Vis50, Varian), foram transferidos para as cubetas 2 mL do inóculo e, assim, foram feitas medidas a cada 1 h durante 8 h. As medidas de densidade óptica foram realizadas a 600 nm utilizando o mesmo espectrofotômetro. Após coletar os dados do experimento, utilizando o software Origin®, os dados foram ajustados pela função logística para uma análise numérica da diferença entre as curvas de crescimento (quantitativo), além do visual (qualitativo). No tratamento com IFD, o protocolo IFD (seção 3.12) foi aplicado previamente às bactérias, após o tratamento foram transferidas (1 mL) nas cubetas contendo 1 mL de meio BHI, pois as bactérias para o tratamento de IFD não se encontravam em meio de cultura na placa de tratamento. Em seguida a cubeta foi levada para dar início as medidas de curva de crescimento.

#### **3.11.2 Da cultura mista**

O protocolo para curvas de crescimento da cultura mista foi o mesmo, 1 mL do inóculo de *K. pneumoniae* (CBAM0435) foi adicionado em um tubo do tipo falcon contendo 39 mL de BHI e o mesmo foi feito para a *E. coli* (ATCC25922). Em seguida foi ajustada a densidade óptica de cada amostra a 0.03 no espectrofotômetro e nas cubetas foi adicionado 1 mL contendo 50% de *K. pneumoniae* + 50% de *E. coli* e 1 mL de meio BHI. No tratamento com IFD, foi seguido o protocolo de IFD para culturas mistas seção 3.9.2 e após tratamento as bactérias juntas foram transferidas (1 mL) nas cubetas contendo 1 mL de meio BHI. E, assim, as coletas de dados e análise foram feitas como descrito na seção anterior (3.8.1).

### **3.12 Inativação fotodinâmica**

Todos os grupos foram levados para o tempo de incubação de 30 minutos e, em seguida, os grupos escuros foram retirados e mantidos fora da incubadora e os grupos luz foram levados a Biotable<sup>®</sup>. Após o tempo de irradiação, todas as amostras foram diluídas e semeadas em placas de Petri com meio de cultura ágar Brain Heart Infusion (BHI). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C ± 2 °C por 24 horas para a realização da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). A quantificação das colônias bacterianas foi feita considerando o número de células presentes em 1 mL do meio líquido. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

### 3.12.1 Espécies isoladas

Após a coleta do sobrenadante as espécies de bactérias separadamente foram resuspendidas em PBS e preparadas para serem submetidas a IFD. Em cada experimento, foram feitos os grupos chamados escuros (a), que não foram expostos à luz azul, os controles positivos (b) e os e os grupos que foram tratados e avaliados chamados grupos luz (c).

**Tabela 1** Parâmetros aplicados em cada grupo

Grupos	Bactéria (µL)	PBS (µL)	FS (µL)	SDS (µL)	Luz (30J/cm <sup>2</sup> )
<b>(a) CONTROLE</b>	250	250	-	-	-
<b>(a) FS 50</b>	250	-	250	-	-
<b>(a) FS 100</b>	250	-	250	-	-
<b>(a) FS 150</b>	250	-	250	-	-
<b>(a) SDS</b>	250	-	-	250	-
<b>(b) LUZ</b>	250	250	-	-	✓
<b>(b) SDS + LUZ</b>	250	-	-	250	✓
<b>(c) IFD 50</b>	250	-	250	-	✓
<b>(c) IFD 100</b>	250	-	250	-	✓
<b>(c) IFD 150</b>	250	-	250	-	✓

### 3.12.2 Culturas mistas

Para experimentos de culturas mistas, as duas espécies de bactérias foram colocadas juntas em cada grupo descrito na seção anterior, na proporção de 50:50.

### 3.13 Experimento de IFD + Conjugação bacteriana

Para os testes iniciais de conjugação bacteriana com IFD, foram utilizadas linhagens resistentes, a doadora *K. pneumoniae* contendo o gene *bla<sub>KPC</sub>* e a receptora *E. coli*, cedidas pela prof<sup>a</sup>. Dra. Ilana L. B. C. Camargo. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Moleculares (LEMiMo), com auxílio da prof<sup>a</sup>. Dra. Ilana L. B. C. Camargo e da aluna de doutorado Camila Maria dos Santos Boralli.

Em uma placa de 24 poços foi adicionado o grupo IFD; 250 µL da cultura mista das linhagens resistentes + 250 µL de FS 50, já calculado com o dobro de concentração a fim de permanecer na concentração correta após a diluição. Os grupos foram levados para a estufa para incubação de 30 minutos. Após a incubação, apenas o grupo IFD foi levado a Biotable® para o tratamento com luz, e enquanto isso o grupo controle se manteve fora da estufa.

Posteriormente, todos os grupos foram mantidos na estufa a 37°C por 24h para ensaio de conjugação. A fim de se obter a taxa de conjugação entre as linhagens, foi feita a diluição seriada do grupo IFD de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-12</sup> em PBS e as diluições foram semeadas pela técnica de microgotas (3 gotas de 10 µL cada) em placas de Petri com meio Luria Bertani ágar (LB-ágar). Um grupo de placas de Petri contém apenas um antibiótico seletivo para a linhagem receptora e em outro grupo contém dois antibióticos, um seletivo para a linhagem receptora e outro antibiótico seletivo para as linhagens portadoras do gene *bla<sub>KPC</sub>*. A menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento visível das linhagens bacterianas foi utilizada nessas placas seguindo a Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo a concentração de 4 mg/L estabelecidas pelo BrCAST.

Em seguida, foram incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Vale ressaltar que o segundo grupo, é seletivo às bactérias da linhagem receptora que conjugaram e receberam o plasmídeo contendo o gene  $bla_{KPC}$ . Após as 24 h de incubação, as UFC foram contabilizadas e o valor de UFC/mL foi calculado. Sendo assim, a taxa de conjugação foi obtida segundo a equação abaixo:

$$\text{Taxa de conjugação} = \frac{\text{UFC transconjugantes /mL}}{\text{UFC total de receptoras /mL}}$$

### 3.14 Experimento de concentração inibitória mínima antes e depois da IFD

O experimento foi dividido em sem e com SDS ('), dessa forma, foram utilizadas soluções de uso de fotossensibilizador diferentes, uma preparada com SDS e a outra sem. Conforme a tabela 2, foram colocados os grupos de tratamento (a e a'), que passam pela Biotable e os grupos escuros que não recebem irradiação (b e b') em duas placas de 24 poços.

<b>Tabela 2</b> Identificação dos grupos				
Grupos	TRATAMENTO (a)	TRATAMENTO (a')	ESCURO (b)	ESCURO (b')
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IFD	IFD+SDS	CURCUMINA	CURCUMINA + SDS
Culturas mistas	IFD	IFD+SDS	CURCUMINA	CURCUMINA + SDS
<i>Escherichia coli</i>	IFD	IFD+SDS	CURCUMINA	CURCUMINA + SDS

Em cada poço foram adicionados bactéria e fotossensibilizador com volume final de 500  $\mu\text{L}$ . Sendo divididos como sugere a tabela 3.

**Tabela 3** Descrição dos conteúdos nas placas

	Volume de bactéria ( $\mu\text{L}$ )	Volume fotossensibilizador ( $\mu\text{L}$ )
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	250	250
<i>Escherichia coli</i>	250	250
Cultura mista	250 (125+125)	250
Curcumina	250	250
Curcumina + SDS	250	250

Após realizado o preparo das placas de 24 poços, todas foram levadas para o tempo de incubação de 30 minutos na estufa DBO. E em seguida, a placa contendo os tratamentos foram levadas a BioTable pelo tempo de 14 minutos e 44 segundos. Posteriormente ao tempo de irradiação, foi feito o preparo das 4 placas de 96 poços para o experimento de CIM. Em três placas de tratamento, a primeira coluna foi preenchida com 100  $\mu\text{L}$  da solução de uso do antibiótico gentamicina, com exceção da primeira coluna todos os outros poços foram preenchidos com 50  $\mu\text{L}$  de meio de cultura MH e em seguida foi feita a diluição do antibiótico para os demais poços. Para a placa de controle o mesmo foi feito, porém com exceção das duas últimas linhas onde o controle positivo (com 10% de bactéria em cada poço) e negativo (50% meio 50% antibiótico) foram feitos. Todas as placas foram colocadas na estufa DBO para o tempo de ação do antibiótico por 24h. Após esse tempo, as placas foram coradas de azul com o sal de resazurina e foram recolocadas na estufa pelo tempo de 4 h, para ação do corante no metabolismo bacteriano, após o tempo, a CIM foi estabelecida.

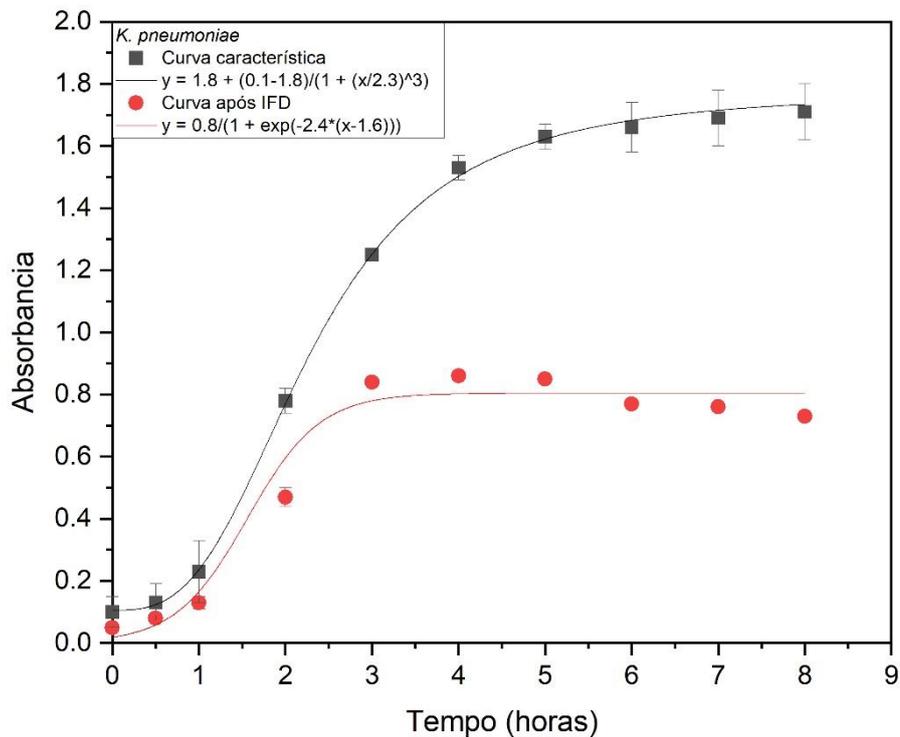
## Capítulo 3

### 4 Resultados e Discussão

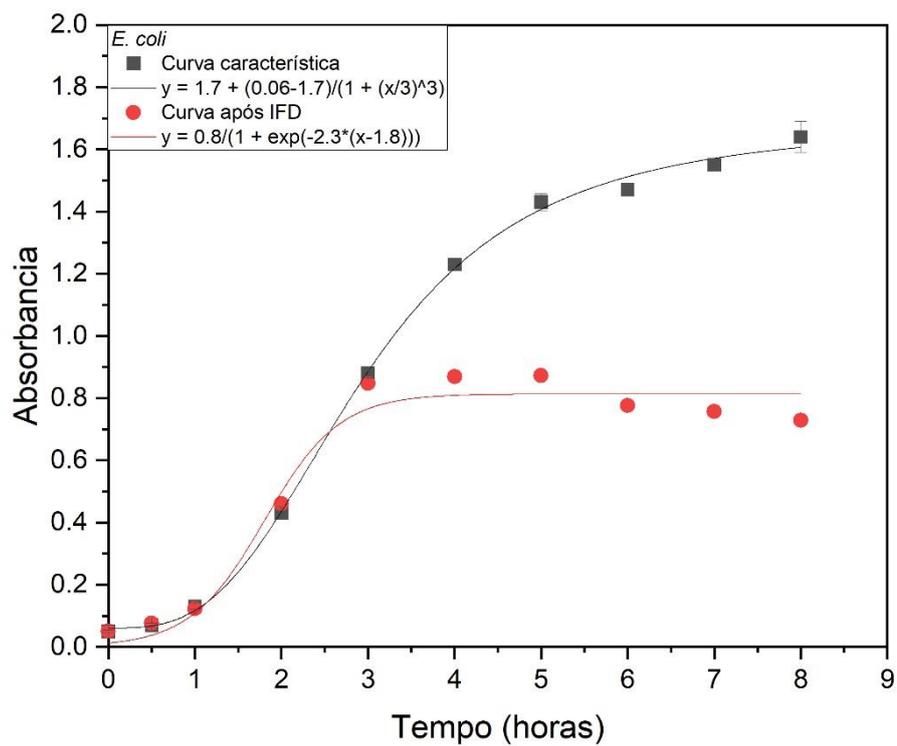
#### 4.1 Curvas de crescimento características e após a IFD

Inicialmente, o intuito foi estabelecer condições de IFD para *K. pneumoniae* e *E. coli*, além de observar se interfere no comportamento bacteriano por meio do experimento da curva de crescimento para que, assim, fosse possível inibir ou atenuar a resistência bacteriana pela ação fotodinâmica. Dessa forma, primeiramente, foram realizados testes para avaliar as curvas de crescimento bacteriano características de cada linhagens de forma isolada e em culturas mistas antes e após IFD utilizando 0,1% SDS. Assim, através do espectrofotômetro, foi possível observar que a IFD é capaz de afetar os comportamentos das curvas características de crescimento bacteriano tanto puras quanto em culturas mistas. Em experimentos sem IFD, ambas as espécies em cultura pura apresentaram padrões de crescimento típicos, atingindo pontos de saturação a aproximadamente 1,75, conforme ilustrado na Figura 7 e na Figura 8. Ambas as curvas também apresentaram um valor  $R^2$  idêntico de 1. Do mesmo modo, as culturas mistas apresentaram um valor de saturação de aproximadamente 1,60, com um valor  $R^2$  de 1, conforme ilustrado na Figura 9. Após a IFD com o uso de SDS no tratamento, as linhagens em cultura pura exibiram um crescimento acelerado, mas reduzido, atingindo aproximadamente 0,80, como demonstrado na Figura 7 e na Figura 8, com valores  $R^2$  de 0,97 e 0,96, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado em culturas mistas, com um ponto de saturação de aproximadamente 0,60 e um valor de  $R^2$  de 0,97, como demonstrado na Figura 9. Os parâmetros das curvas sem IFD foram modelados pela função logística  $y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$  e após o tratamento do IFD pela função logística  $y = a/(1 + \exp(-k*(x-xc)))$ . As funções sigmóides, aplicadas para esses resultados, são utilizadas para descrever o crescimento dos microrganismos, os modelos permitem a predição do tempo de vida dos microrganismos e recursos disponíveis no meio além de proporcionar o entendimento do comportamento bacteriano sobre diferentes condições ambientais, tais como a temperatura e pH (ZWIETERING, 1990). Tendo isso em vista, além das diferenças de absorbância máxima na fase estacionária entre as

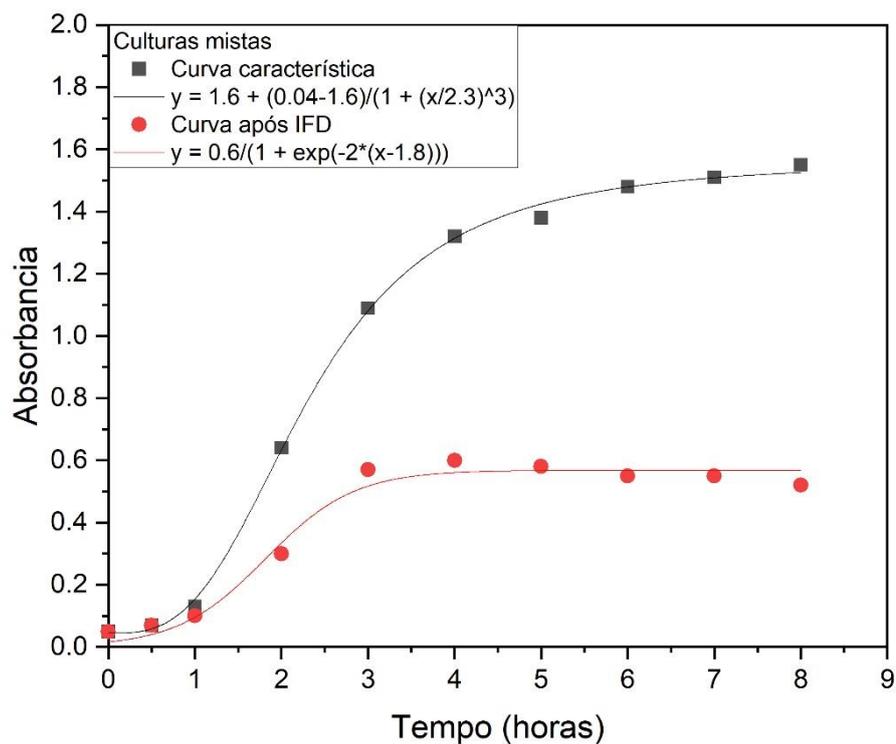
espécies e as culturas mistas, os parâmetros das curvas modeladas pela função logística mostram que a aplicação prévia da IFD acelera a fase estacionária das bactérias em culturas puras e mista. Para *K. pneumoniae* a inflexão da curva é dada em 2,3 h, com a aplicação da IFD é de 1,6 h. Para *E. coli*, o ponto de inflexão é mais longo 3 h e reduz para 1,8 h após a aplicação da IFD e para as culturas mistas, a inflexão da curva é identificada em 2,3 h e com a aplicação da IFD retarda para 1,8 h.



**Figura 7.** Curvas de crescimento típica da linhagem de *K. pneumoniae* sem IFD (■) e curva de crescimento alterada após tratamento de IFD (●) com média e desvio padrão. Elaborado pela autora.



**Figura 8.** Curvas de crescimento típica da linhagem de *E. coli* sem IFD (■) e curva de crescimento alterada após tratamento de IFD (●) com média e desvio padrão. Elaborado pela autora.



**Figura 9.** Curvas de crescimento típica das culturas mistas sem IFD (■) e curva de crescimento alterada após tratamento de IFD (●) com média e desvio padrão. Elaborado pela autora.

Dessa forma, com base nas curvas de crescimento analisadas é possível notar que a resposta aos tratamentos em cultura pura é diferente quando em cultura mista, essas condições podem ser vistas como pressões do ambiente. Sendo assim, esses comportamentos provavelmente se devem ao sistema de regulação de expressão gênica, ou de comunicação, entre bactérias em função da densidade celular, denominado *quórum sensing* (QS). Após a fase exponencial de crescimento ou durante a fase estacionária as bactérias são capazes de produzir autoindutores que coordenam o comportamento bacteriano de acordo com a densidade populacional, aumentando proporcionalmente seus níveis no meio até a indução da ativação de genes de QS, resultando no fenótipo associado ao comportamento coletivo (GOO *et al*, 2015; LLAMAS *et al*, 2005; KIEVIT & IGLEWSKI, 2000). Isso propicia grandes avanços em questão de sobrevivência e persistência no ambiente, pois quando expostas a pressões do ambiente as bactérias necessitam de alterações fisiológicas e estruturais para sobreviverem (NG *et al*, 2009; STALEY *et al*, 2015).

## **4.2 Inativação fotodinâmica em Gram-negativas**

### **4.2.1 Inativação fotodinâmica utilizando solução hidroalcoólica de curcumina + DMSO (solução estoque) e curcumina + 10% de álcool etílico (solução de uso)**

As Gram-negativas possuem a membrana externa contendo lipopolissacarídeos fosfolipídicos que dificulta a internalização de moléculas, principalmente de tamanhos grandes, ou que estejam agregadas (ELLIOTT, 2020; CAMA, 2019). Embora a curcumina tenha grande potencial como FS, seu desempenho é prejudicado por se tratar de uma molécula hidrofóbica, ou seja, possui baixa solubilidade e estabilidade em água. Sendo assim, uma solução de uso aquosa acaba favorecendo a formação de agregados de curcumina, dificultando a internalização desse FS pelas bactérias, principalmente Gram-negativas, diminuindo a eficiência da IFD (LI *et al*, 2015; ONOUE *et al*, 2010). Dessa forma, experimentos de IFD foram realizados variando os solventes da solução de uso para padronizar a de melhor efeito fotodinâmico, com baixa toxicidade na ausência de luz em bactérias Gram-negativas. Primeiramente, a curcumina foi solubilizada em solução hidroalcoólica com 1,5% de DMSO. Uma vez que o DMSO é um solvente orgânico que favorece a solubilidade da curcumina, devido às suas características físico-químicas. Por ser um excelente solvente, tornou-se o meio mais utilizado para avaliar os efeitos fototóxicos da inativação fotodinâmica e um referencial para a avaliação de outros tipos de meios (PICOLI *et al*, 2015; RIBEIRO *et al*, 2012; HAUKIVIK *et al*, 2009). Além disso, para garantir que seja completamente dispersa em meio aquoso, geralmente a curcumina é dissolvida em solventes polares, podendo ser facilmente solúvel em DMSO e, também, em etanol (LI *et al*, 2021; PRIYARDASINI, 2014). Então, na solução de uso foi acrescentado 10% de álcool etílico para manter a solubilidade do FS durante o tempo de incubação com as células bacterianas. A toxicidade dessa solução de uso foi avaliada e não foi considerada tóxica.

Conforme a Figura 10, os grupos de tratamento:

IFD 50 CM – IFD com FS [50mM] em culturas mistas

IFD 50 KP – IFD com FS [50mM] em *Klebsiella pneumoniae*

## IFD 50 EC – IFD com FS [50mM] em *Escherichia coli*

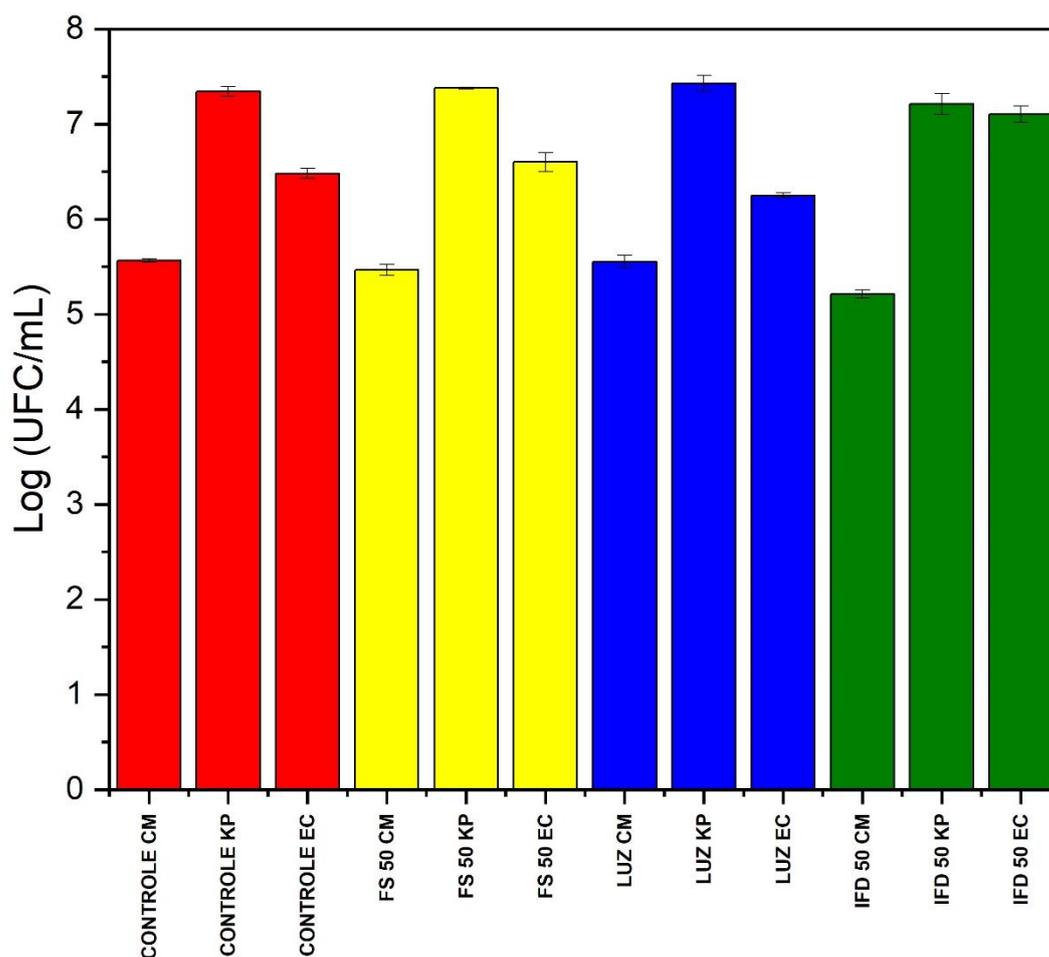
em relação aos seus respectivos controles:

CONTROLE CM – PBS + culturas mistas

CONTROLE KP – PBS + *Klebsiella pneumoniae*

CONTROLE EC – PBS + *Escherichia coli*

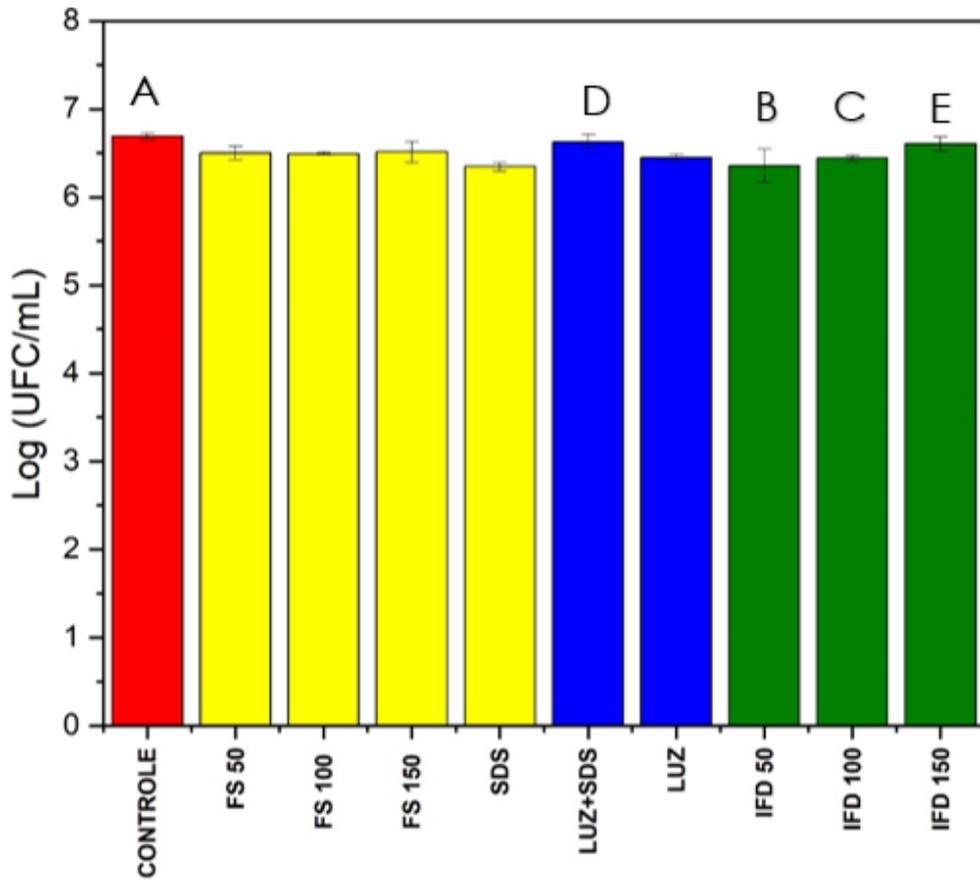
não se apresentaram significativos estatisticamente. Portanto, as condições utilizadas não resultaram numa ação fotodinâmica significativa nessas Gram-negativas. Sendo assim, foi preciso realizar outros testes e incorporar outro veículo capaz de aproximar o FS da membrana das Gram-negativas.



**Figura 10.** Log (UFC/mL) contendo média e desvio padrão dos grupos controle escuro FS 50, CONTROLE CM (cultura mista), CONTROLE KP (*Klebsiella pneumoniae*), CONTROLE EC (*Escherichia coli*), grupos LUZ e grupos de tratamento com IFD (30 J/cm<sup>2</sup>) utilizando como fotossensibilizador a curcumina (50µM) solubilizada em 10% de álcool etílico e 1,5% de DMSO. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (one-way ANOVA com teste TUKEY ( $p < 0,05$ )). Elaborado pela autora.

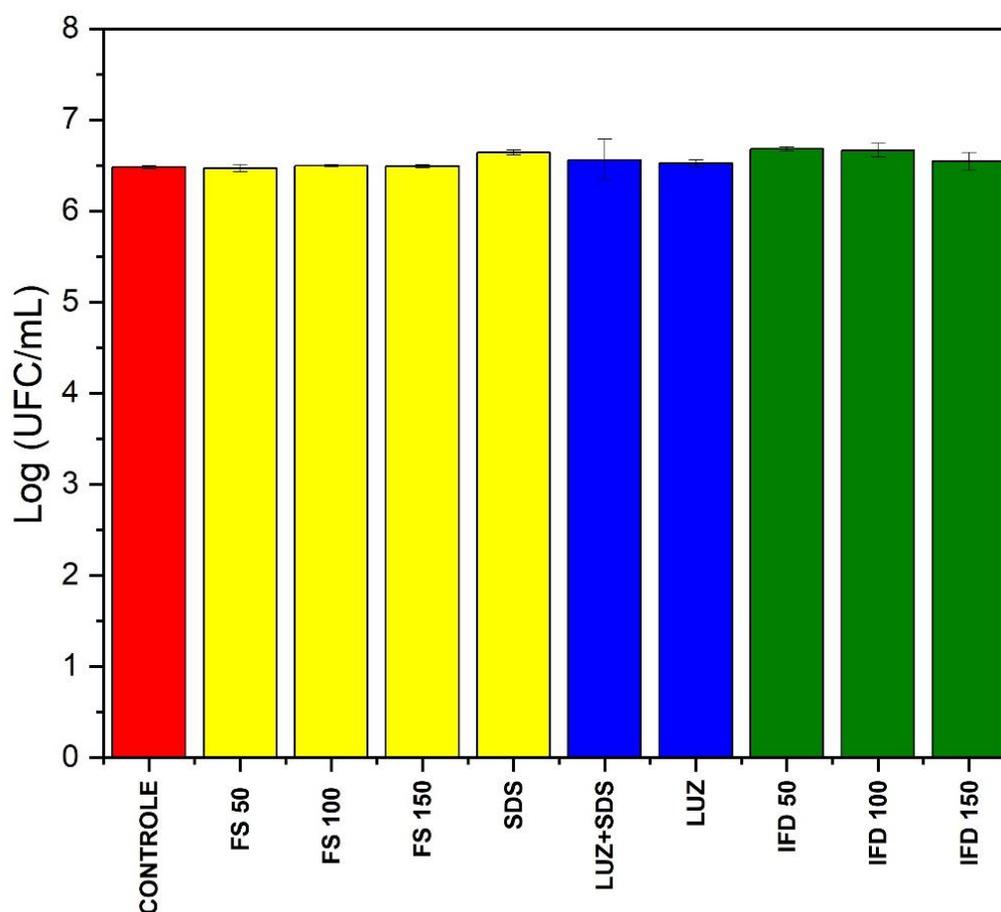
#### **4.2.2 Inativação fotodinâmica utilizando solução hidroalcoólica de curcumina + DMSO (solução estoque) + curcumina + etanol + SDS (solução de uso)**

Dodecil sulfato de sódio (SDS) é um surfactante aniônico poderoso em dissociar e desnaturar proteínas, podendo ser capaz de afetar a estrutura da membrana da Gram-negativa (HAMAGUCHI *et al*, 2003). Diversos estudos associaram o uso da curcumina com o SDS e obtiveram um melhor desempenho na redução bacteriana (PANHOCA *et al*, 2016; ROY, 2020; ALVES, 2021). Dessa forma, a fim de se obter um melhor efeito da IFD, foram feitos novos testes alterando o preparo da solução de uso do FS, incorporando 0,1% de SDS. Conforme mostra a Figura 11, o grupo IFD 50, de bactérias (*K. pneumoniae*) tratadas com IFD e fotossensibilizador de concentração 50 µM, apresentou diferença significativa em relação aos grupos controles; CONTROLE ( $p = 0,00507$ ) e LUZ+SDS ( $p = 0,02851$ ). O grupo IFD 50 apresentou também redução bacteriana significativa em relação ao grupo com o dobro de concentração de FS (IFD 100), ( $p = 0,00735$ ). Além disso, o grupo de tratamento IFD 150, apresentou diferença significativa em relação aos grupos controles, CONTROLE ( $p = 0,00892$ ) e LUZ+SDS ( $p = 0,04643$ ). E o grupo IFD 100 apresentou uma menor redução que foi estatisticamente significativa em relação ao grupo IFD 150 ( $p = 0,01276$ ). Dessa forma, podemos afirmar que os testes feitos com *K. pneumoniae* demonstram que a relação de redução bacteriana está inversamente proporcional a concentração de FS.



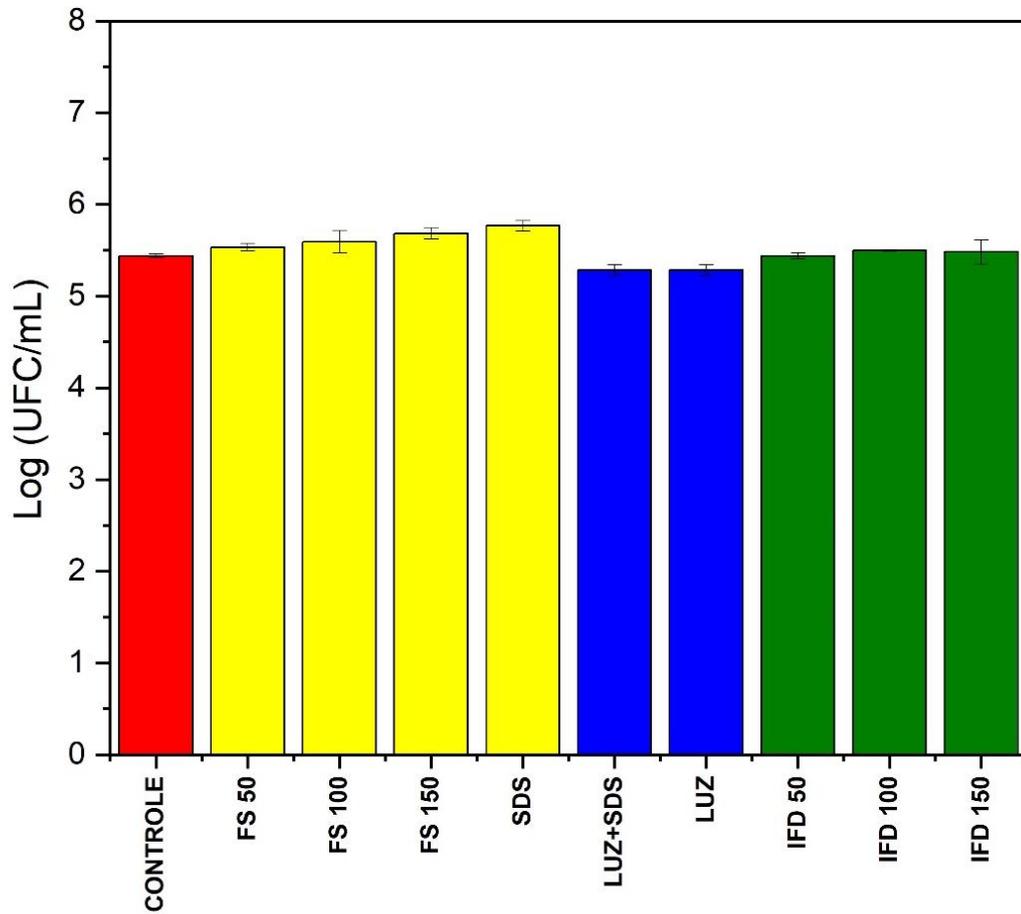
**Figura 11.** Log (UFC/mL) contendo média e desvio padrão dos grupos CONTROLE, grupo escuro e SDS, LUZ, LUZ+SDS e grupos de tratamento com IFD (30 J/cm<sup>2</sup>) de *K. pneumoniae* variando a concentração do fotossensibilizador (50 µM, 100 µM e 150 µM) solubilizado em solução hidroalcoólica + 1,5% DMSO + 0,1% SDS. Houve diferença estatística significativa entre os grupos citados no texto, representados pelas letras A, B, C, D e E (one-way ANOVA com teste TUKEY (p < 0,05)). Elaborado pela autora.

Acerca dos testes feitos com *E. coli*, conforme Figura 12, não foi obtida nenhuma redução bacteriana significativa. Como produto da inativação fotodinâmica as EROs podem afetar vários alvos procarióticos de uma vez, como exemplo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se difunde através do envelope procariótico, induz a oxidação dos aminoácidos e causa o estresse transcricional. No entanto, o estresse oxidativo acarreta num “sistema de defesa” bacteriano que produz enzimas que regulam em prol da desintoxicação oxidativa. Dessa forma, a *E. coli* por exemplo é capaz de detectar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através de um processo em cascata de sinalizadores associados a expressão de genes para se desintoxicar (IMLAY, 2013). Devido a isso, a inativação fotodinâmica dessa linhagem nas condições em que foram feitas tornou-se mais desafiadora.



**Figura 12.** Log (UFC/mL) contendo média e desvio padrão dos grupos CONTROLE, grupo escuro, SDS, LUZ, LUZ+SDS e grupo de tratamento com IFD (30 J/cm<sup>2</sup>) de *E. coli* variando a concentração do fotossensibilizador (50 µM, 100 µM e 150 µM) solubilizado em solução hidroalcoólica + 1,5% DMSO + 0,1% SDS. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (one-way ANOVA com teste TUKEY (p < 0,05)). Elaborado pela autora.

Além disso, foi feito o mesmo protocolo de experimento em culturas mistas de *K. pneumoniae* e *E. coli* juntas (Figura 13) e os tratamentos não se apresentaram significativos em relação aos controles (luz e escuro).

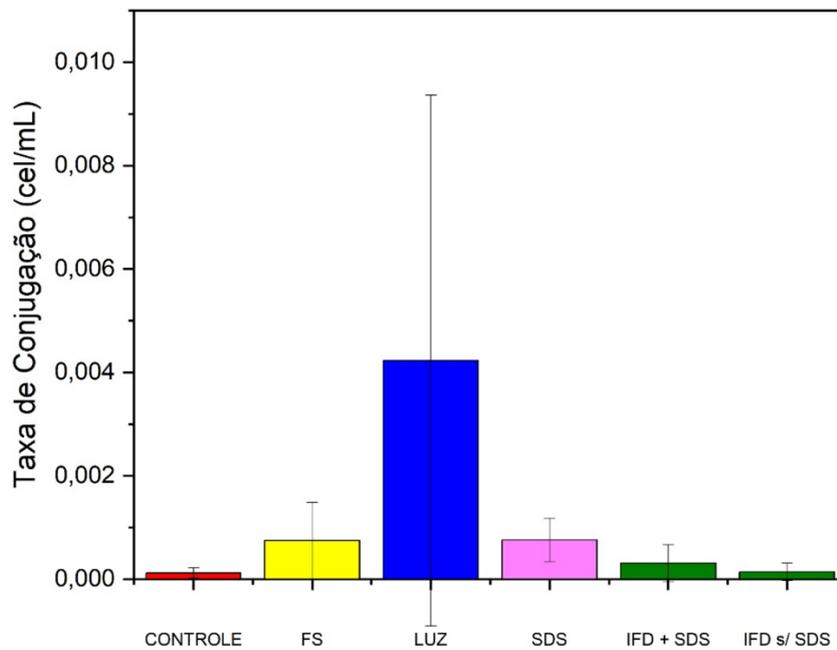


**Figura 13.** Log (UFC/mL) contendo média e desvio padrão dos grupos CONTROLE, grupo escuro, SDS, LUZ, LUZ+SDS e grupo de tratamento com IFD (30 J/cm<sup>2</sup>) da **cultura mista de *K. pneumoniae* + *E. coli*** variando a concentração do fotossensibilizador (50 µM, 100 µM e 150 µM) solubilizado em solução hidroalcoólica + 1,5% DMSO + 0,1% SDS. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (one-way ANOVA com teste TUKEY (p < 0,05)). Elaborado pela autora.

Dessa forma, além do desafio de estabelecer condições de IFD para as Gram-negativas em estudo foi observada a interferência de moléculas externas, tais como o SDS, na ação fotodinâmica. Portanto, embora na literatura a IFD utilizando o SDS pode ser capaz de obter uma redução bacteriana significativa para algumas linhagens, o mesmo não foi constatado neste estudo com as condições utilizadas para as linhagens estudadas, corroborando com outros estudos da literatura em que foi relatado que a presença de SDS pode levar a respostas diferentes devido aos diferentes comportamentos metabólicos de cada linhagem bacteriana (TORTAMANO *et al*, 2020).

#### **4.3 Experimentos de Inativação fotodinâmica + Conjugação bacteriana**

A taxa de conjugação com e sem a aplicação prévia de IFD em linhagens resistentes também foram avaliadas. As linhagens foram plaqueadas em meios seletivos para que depois do tempo de conjugação fossem contabilizados os valores da taxa de conjugação (cel/mL). É possível observar que a taxa de conjugação da IFD sem o uso de SDS ( $1,4 \times 10^{-4}$ ) apresentou-se irrelevante em relação ao controle de conjugação sem tratamento aplicado ( $1,04 \times 10^{-4}$ ) e a taxa de conjugação do grupo IFD com o uso de SDS foi maior ( $2,2 \times 10^{-4}$ ), conforme a Figura 14. A junção das técnicas de conjugação bacteriana com as condições utilizadas de IFD levaram a resultados inconclusivos.



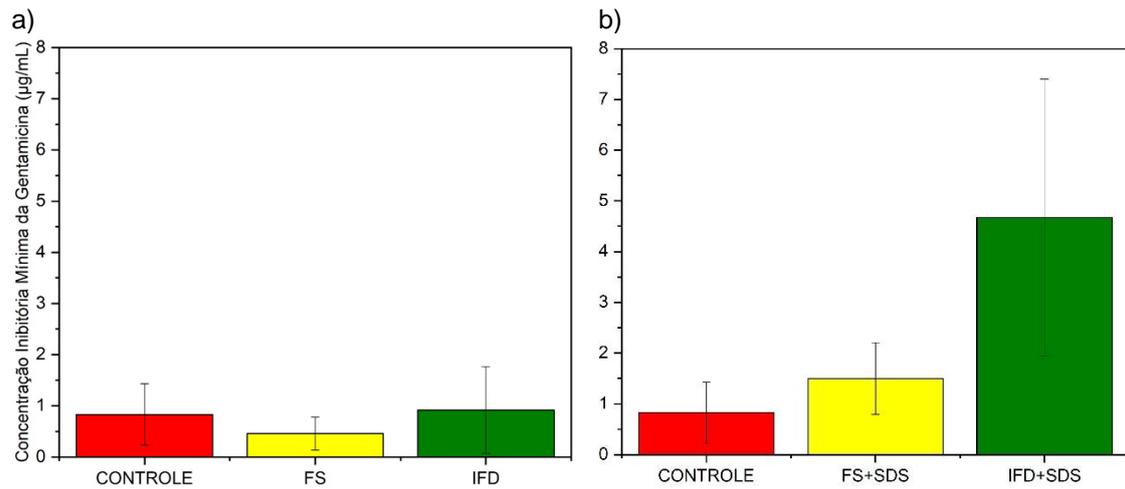
**Figura 14.** Teste da taxa de conjugação (cel/mL) dos grupos CONTROLE, FS, SDS, FS+SDS, IFD e IFD+SDS da cultura mista de linhagens resistentes (**BHKP 104+J53**). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos (one-way ANOVA com teste TUKEY ( $p < 0,05$ )). Elaborado pela autora.

Possivelmente, considerando a diferença entre a IFD com e sem SDS, também pode ser evidenciada a interferência desse agente, assim como elementos da IFD, tais como, a concentração de FS ou dose de luz por exemplo. Vale ressaltar que as condições utilizadas, como o uso de sub dose de luz, foi excepcionalmente designada para que fosse obtida uma redução bacteriana de forma não letal, a fim de que as bactérias estivessem viáveis para o processo de transferência de resistência e concomitantemente fosse possível estudar os efeitos da inativação fotodinâmica.

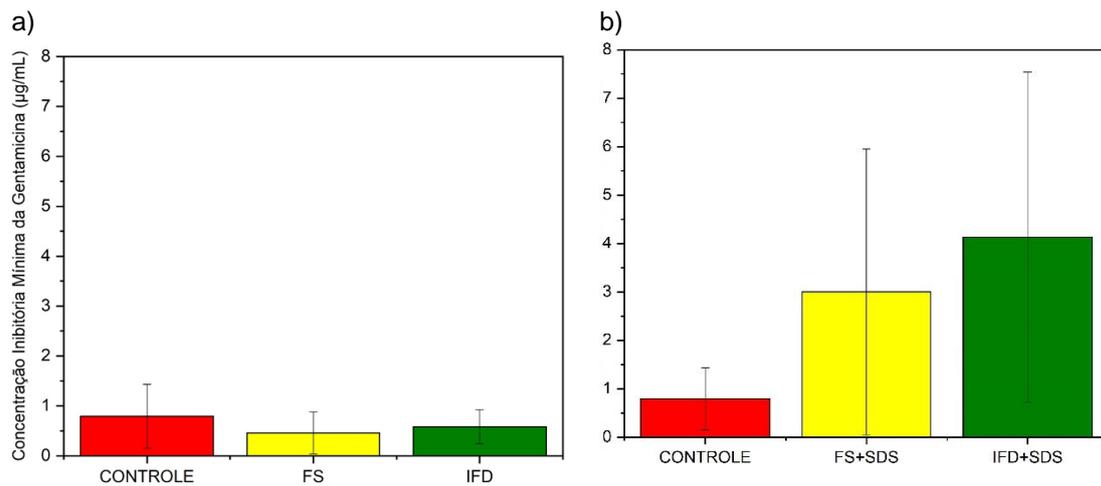
#### 4.4 Concentração Inibitória Mínima após Inativação fotodinâmica

A fim de investigar qual o efeito da IFD na resistência aos antibióticos das Gram-negativas em estudo também foi feita a verificação da concentração inibitória mínima (CIM) após IFD e se havia alteração da mesma utilizando o SDS. A partir da literatura, pelo BrCAST, foi levado em consideração o ponto de corte de CIM de gentamicina para *Enterobacterales* (CIM=2). Além disso, a CIM foi determinada também em laboratório através do grupo controle. Dessa forma, foram feitos os testes com os grupos de IFD e curcumina com e sem SDS, para as bactérias isoladas e em culturas mistas, também foram feitos grupos controles positivo e negativo. E conforme as Figuras 15, 16 e 17, foi observado o aumento significativo da CIM nos grupos tratados com SDS, tais como KP IFD+SDS e KP IFD ( $p = 0,01576$ ) e KP IFD+SDS, KP CONTROLE ( $p = 0,01201$ ), EC IFD+SDS e EC IFD ( $p = 0,03029$ ).

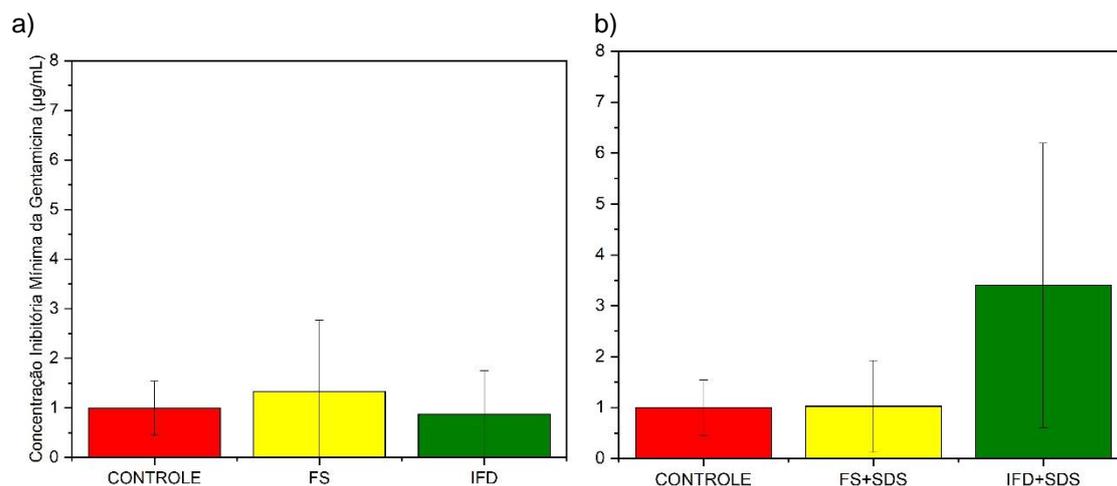
Tendo em vista os resultados adquiridos, podemos afirmar que o uso do SDS interfere na ação fotodinâmica acarretando num efeito contrário ao esperado (CIM>2), enquanto a inativação fotodinâmica sem o uso do SDS resulta num efeito de susceptibilidade das bactérias tratadas, sejam elas isoladas ou em culturas mistas (CIM<2). Isso não significa necessariamente que o SDS acarrete bactérias resistentes pois é mais provável que o surfactante esteja atrapalhando a ação do antibiótico, por exemplo através da formação de uma estrutura supramolecular ou interagindo com o FS ou, ainda, circundando a bactéria impedindo a ação do antibiótico ou mesmo a ação fotodinâmica.



**Figura 15.** Concentração inibitória mínima de gentamicina (µg/mL) de *K. pneumoniae* dos grupos CONTROLE, controles escuros: FS (curcumina 50 µM), FS+SDS (curcumina 50 µM + 0,1% SDS) e de tratamento com dose de 30 J/cm<sup>2</sup> IFD e IFD + 0,1% SDS. Elaborado pela autora.



**Figura 16.** Concentração inibitória mínima de gentamicina (µg/mL) de *E. coli* dos grupos CONTROLE, controles escuros: FS (curcumina 50 µM), FS+SDS (curcumina 50 µM + 0,1% SDS) e de tratamento com dose de 30 J/cm<sup>2</sup> IFD e IFD + 0,1% SDS. Elaborado pela autora.



**Figura 17.** Concentração inibitória mínima de gentamicina ( $\mu\text{g/mL}$ ) de **Culturas mistas** dos grupos CONTROLE, controles escuros: FS (curcumina  $50 \mu\text{M}$ ), FS+SDS (curcumina  $50 \mu\text{M}$  +  $0,1\%$  SDS) e de tratamento com dose de  $30 \text{ J/cm}^2$  IFD e IFD +  $0,1\%$  SDS. Elaborado pela autora.

É fato que as bactérias respondem de formas diferentes aos antibióticos, por exemplo, as Gram-negativas possuem em sua parede celular porinas, proteínas que bloqueiam a entrada de moléculas no meio intracelular tornando o antibiótico ineficaz em sua ação, essa característica de Gram-negativas as torna mais difíceis de serem tratadas do que Gram-positivas (TORTORA *et al*, 2012). Outro exemplo são as bactérias capazes de substituir o alvo no qual o antibiótico teria efeito, codificando uma nova estrutura resistente que não deixa o antibiótico ter efeito (MOREIRA *et al*, 2013). Diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem resistência às penicilinas e às cefalosporinas de 3ª geração, por exemplo as do gênero *Klebsiella* e da espécie *E. coli*, são microrganismos resistentes a antibióticos que adquiriram a resistência sendo capazes de hidrolisar as cefalosporinas de 3ª geração e monobactâmicos (LOREIRO *et al*, 2016; HAWKEY, 2008). Portanto, ao comparar o resultado de inativação das diferentes linhagens deste estudo, temos que, apesar das bactérias responderem de formas diferentes aos antibióticos, no tratamento de IFD as diferenças não são tão significativas entre as diferentes linhagens, de modo que a IFD se torna um tratamento mais abrangente.

## Capítulo 4

### 5 Conclusões

As bactérias Gram-negativas avaliadas neste estudo se mostram mais difíceis de serem afetadas pela ação fotodinâmica, mas foram severamente atingidas por todos os componentes da IFD (FS, luz, SDS) quando testadas, tanto de forma isoladas quanto em cultura mista. A técnica de medir a taxa de conjugação combinada com a técnica de IFD possuiu limitações e, conseqüentemente, resultados inconclusivos que não permitiram analisar de tal maneira a interferência da IFD na conjugação bacteriana. Mesmo assim, percebe-se que a IFD afeta o comportamento característico das Gram-negativas e que tem potencial para inibir ou atenuar a transferência da resistência nesta classe de bactérias. Através da determinação da CIM foi possível observar que a IFD diminui a CIM e que há o aumento da resistência quando o surfactante é acrescentado no tratamento de IFD. Dessa forma, a presença de moléculas externas, como o surfactante SDS, modifica a dinâmica dos microrganismos em relação aos antibióticos e produziu outros efeitos que prejudicaram a ação da IFD.

Portanto, são necessários mais estudos para testar outras condições de IFD para essas Gram-negativas, como o fotossensibilizador e sua concentração ou doses de luz diferentes, a fim de então verificar se há alteração com outras moléculas externas, como por exemplo surfactantes e, verificar de que forma isso ocorre.

## 6. Referências bibliográficas

HANCOCK, R.E.W. The end of an era?. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, n. 1, jan. 2007, p. 28-28. Disponível em: <[link.gale.com/apps/doc/A185628131/AONE?u=anon~388d3ebe&sid=googleScholar&xid=2ecd4eb6](http://link.gale.com/apps/doc/A185628131/AONE?u=anon~388d3ebe&sid=googleScholar&xid=2ecd4eb6)>. Acesso em: 22 ago. 2022.

World Health Organization. Containing antimicrobial resistance. **World Health Organization**. v. 1, n. 10. abr. 2005, p.1-6. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/69036>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

ROWE, T.A, LINDER, J.A. Novel approaches to decrease inappropriate ambulatory antibiotic use, **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.17, n. 7, p. 511-521, jun. 2019. Disponível em: <[10.1080/14787210.2019.1635455](https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1635455)>. Acesso em: 22 ago. 2022.

POLLY, M., *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. **American journal of infection control**, v. 50, n. 1, jan. 2022, p. 32-38. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.09.018>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

LANGFORD, B.J; SO, M; RAYBARDHAN, S; LEUNG, V; SOUCY, J.P.R, WESTWOOD, D; DANEMAN, N; MACFADDEN, D.R. Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. **Clinical microbiology and infection**, v. 27, n. 4, abr. 2021, p. 520-531. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7785281/>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

MURRAY, A.K. The Novel Coronavirus COVID-19 Outbreak: Global Implications for Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1020, nov. 2020, p, 1-4. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7237633/pdf/fmicb-11-01020.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

MURRAY, C.J.L; *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, fev. 2022, p. 629-655. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext)>. Acesso em: 22 ago. 2022.

DE MAN, Tom JB *et al.* Genomic analysis of a pan-resistant isolate of *Klebsiella pneumoniae*, United States 2016. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e00440-18, 2018.

MALÁ, Z., *et al.* The application of antimicrobial photodynamic inactivation on methicillin-resistant *S. aureus* and ESBL-producing *K. pneumoniae* using porphyrin photosensitizer in combination with silver nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 33, mar. 2021, p. 102140. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102140>>. Acesso em 22 ago. 2022.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). **Relatório Anual do Diretor 2019: Avanço da Agenda de Saúde Sustentável para as Américas 2018-2030**. Sumário executivo. Washington, D.C.: OPAS; 2019.

COHEN, F. L; TARTASKY, D. Microbial resistance to drug therapy: a review. **American journal of infection control**, v. 25, n. 1, fev. 1997, p. 51-64. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0196-6553\(97\)90054-7](https://doi.org/10.1016/S0196-6553(97)90054-7)>. Acesso em: 22 ago. 2022.

HUANG, L; XUAN, Y; KOIDE, Y; ZHIYENTAYEV. T; TANAKA, M; HAMBLIN, M.R. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers Surgery and Medicine**. v. 44, n. 6, ago. 2012, p. 490-499. Disponível em: <10.1002/lsm.22045>. Acesso em: 22 ago. 2022.

PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, ago. 2007, p. 988-994. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/558zVdtQmDWrMmT4kkVp5ps/?lang=pt>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

ZHENG, D; HUANG, C; HUANG, H; ZHAO, Y; KHAN, M.R.U; ZHAO, H; HUANG, L. Antibacterial mechanism of curcumin: A review. *Chemistry & Biodiversity*, v. 17, n. 8, jun. 2020, p. e2000171. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.202000171>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

SOARES, J.M. **Estudo de parâmetros microbianos em múltiplas sessões de terapia fotodinâmica antimicrobiana**. 2019. 85 f. Dissertação (Mestrado em - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

SOARES, J.M; GUIMARÃES, F.E.G; YAKOVLEV, V.V; BAGNATO, V.S; BLANCO, K.C. Physicochemical mechanisms of bacterial response in the photodynamic potentiation of antibiotic effects. **Scientific Reports**. v. 12, n. 21146, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-25546-y>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

WILLIS, J.A; CHEBURKANOV, V; CHEN, S; SOARES, J.M; KASSAB, G; BLANCO, K.C; BAGNATO, V,S; DE FIGUEIREDO, P; YAKOVLEV, V.V. Breaking down antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Combining antimicrobial photodynamic and antibiotic treatments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 36, p. e2208378119, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.2208378119>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

MOTA, F.S; DE OLIVEIRA, H.A; SOUTO, R.C.F. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, nov. 2018, p. 270-277. Disponível em: <<http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2019/01/RBAC-vol-50-3-2018-ref-740-final.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

ANDREY, D.O; DANTAS, P.P; MARTINS, W.B.S; DE CARVALHO, F.M; ALMEIDA, L.G.P; SANDS, K; PORTAL, E; SAUSER, J; CAYÔ, R; NICOLAS, M.F; VASCONCELOS, A.T.R; MEDEIROS, E.A; WALSH, T.R; GALES, A.C. An Emerging Clone, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 16, Associated With High Mortality Rates in a CC258-Endemic Setting, **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 7, out. 2020, p. e141-e150. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1095>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

GOOSSENS, H; FERRECH, M; STICHELE, R.V. Elsevier's M.Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. **Lancet**, v. 365, n.9459, fev. 2005, p. 579-587. Disponível em: <10.1016/S0140-6736(05)17907-0.>. Acesso em: 22 ago. 2022.

SANTOS, N.de Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto**. v. 13, n. spe, fev. 2004, p. 64-70. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

LARSSON, D.G.J; FLACH, CF. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, mai. 2022, p. 257-269, Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00649-x#citeas>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

SOARES, G.M.S; FIGUEIREDO, L.C; FAVERI, M; CORTELLI, S.C; DUARTE, P.M; FERES, M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. **J Appl Oral Sci**. v. 20, n. 3, jun. 2012, p. 295-309. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000300002>>. Acesso em 22 ago. 2022.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), **Folha informativa - Resistência aos antibióticos**. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812), 2017. Acesso em: 08 mar. 2021.

ABDULAH, R. Antibiotic abuse in developing countries. **Pharmaceutical Regulatory Affairs**, v. 1, n. 2, p. 1000e106, 2012. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.4172/2167-7689.1000e106>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

O'NEILL, Jim et al. Review on antimicrobial resistance. **Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations**, v. 2014, n. 4, 2014.

NAYLOR, N.R; ATUN, R; ZHU, N. *et al.* Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. **Antimicrob Resist Infect Control**, v.7, n. 58, abr. 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0336-y>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 277-282, 2003. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00042-8)>. Acesso em: 22 ago. 2022.

LEVISON, W. **Microbiologia** médica e imunologia. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

SECO, B. M. S. Persistência de plasmídeos que codificam carbapenemases do tipo New-DelhiMetallo- $\beta$ -Lactamase. 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

DE OLIVEIRA, A. C; DA SILVA, R. S. Challenges in health care attention with regard to bacterial resistance: a review. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v. 10, n. 1, p. 189-197, 2008.

FROST, L.S; LEPLAE, R; SUMMERS, A.O, TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, n. 9, set. 2005, p. 722-732. Disponível em: <10.1038/nrmicro1235.>. Acesso em: 22 ago. 2022.

DE LA CRUZ, F; FROST, L.S, MEYER, R.J; ZECHNER, E.L. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 34, n. 1, jan. 2010, p. 18-40. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00195.x.>. Acesso em: 22 ago. 2022.

JUNIOR, A. M. de M. Multirresistência bacteriana e a consequência do uso irracional dos antibióticos. **Scire Salutis**, v.9, n.2, p.1-8, 2019.

CARNEIRO, M; FERRAZ, T; BUENO, M; KOCH, B.E; FORESTI, C; LENA, V.F, MACHADO, J; RAUBER, J.M; KRUMMENAUER, E.C; LAZAROTO, D.M. Antibiotic prescription in a teaching hospital: a brief assessment. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, ago. 2011, p. 421-424. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S0104-42302011000400016> >. Acesso em: 27 ago. 2022.

JOHNSON, A.P & WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62, n. 4, p. 499–513, 2013. Disponível em: <doi:10.1099/jmm.0.052555-0>. Acesso em 15 mar. 2023.

YIGIT, H; QUEENAN, A.M; ANDERSON, G.J; DOMENECH-SANCHEZ, A; BIDDLE, J.W; STEWARD, C.D. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 4, p. 1151-61, abr. 2001. Disponível em: <10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>. Acesso em 15 mar. 2023.

SAMPAIO, J.L; GALES, A.C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. **Brazilian Journal Microbiology** [Review]. v. 47, n. 1, p. 31-37, out. 2016. Disponível em: <10.1016/j.bjm.2016.10.002>. Acesso em 15 mar. 2023.

ANDRADE, L.N; DARINI, A.L.C. Beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: which bla bla bla is this?, **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, jan/mar, 2017. Disponível em: <<https://jic-abih.com.br/index.php/jic/article/view/173>>. Acesso em 15 mar. 2023.

RAPACKA-ZDOŃCZYK, A. *et al.* Factors determining the susceptibility of bacteria to antibacterial photodynamic inactivation. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 1-18, mai. 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.642609>>. Acesso em: 27 ago. 2022.

SPERANDIO, F.F; HUANG, Y.Y; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery**. v. 8, n. 2, ago. 2013, p. 108-120. Disponível em: <10.2174/1574891x113089990012.>. Acesso em: 22 ago. 2022.

ALVES, E. *et al.* Photodynamic oxidation of Escherichia coli membrane phospholipids: new insights based on lipidomics. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 27, n. 23, out. 2013, p. 2717-2728. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/rcm.6739>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

MICHAELI, A; FEITELSON, J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. **Photochemistry and Photobiology**. v. 59, n. 3, mar. 1994, p. 284–289. Disponível em: <10.1111/j.1751-1097.1994.tb05035.x.>. Acesso em: 22 ago. 2022.

GONDIM, L.C; DIETRICH, L; MARTINS, L.H.B; BARROS, D.V.de. Photodynamic therapy as a coadjuvant in endodontics: Literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, mai. 2021, p. e20410615709. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/15709>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

HUANG, L. *et al.* Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers in surgery and medicine**, v. 44, n. 6, p. 490-499, 2012.

HAMBLIN, M.R; ABRAHAMSE, H. Oxygen-independent antimicrobial photoinactivation: Type III photochemical mechanism?. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, jan. 2020, p. 1-17. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics9020053>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

AROSO, R.T; DIAS, L.D; BLANCO, K.C; SOARES, J.M; ALVES, F; DA SILVA, G.J; ARNAUT, L.G; BAGNATO, V.S; PEREIRA, M.M. Synergic dual phototherapy: Cationic imidazolyl photosensitizers and ciprofloxacin for eradication of in vitro and in vivo E. coli infections. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 233, ago. 2022. p. 112499. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134422001130>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

WAINWRIGHT, M., *et al.* Photoantimicrobials—are we afraid of the light?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, fev. 2017, p. e49-e55. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30268-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30268-7)>. Acesso em: 22 ago. 2022.

DIAS, L.D; BLANCO, K.C; MFOUO-TYNGA, I.S; INADA, N.M; BAGNATO, V.S. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recente advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 45, n. 100384, dez. 2020, p. 1-35. Disponível em: <

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100384>.>. Acesso em: 22 ago. 2022.

MAISCH, T; BOSL, C; SZEIMIES, R.-M; LEHN, N; ABELS, C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49, n. 4, p.1542- 1552, 2005.

DEMIDOVA, T.N; HAMBLIN, M.R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, jun. 2005, p. 2329-2335. Disponível em:<<https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005>>. Acesso em: 27 ago. 2022.

TARDIVO, J.P; GIGLIO, A.G; OLIVEIRA, C.S; GABRIELLI, D.S; JUNQUEIRA, H.C; TADA, D.B; SEVERINO, D; TURCHIello, R.F; BAPTISTA, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**. v, 2, n. 3, set. 2005, p. 175-191. Disponível em:<[10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9)>. Acesso em: 27 ago. 2022.

BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4567–4598, 2011.

KAWAKISHI, S. Antioxidative of the P-Diketone moiety in the mechanism of Tetrahydrocurcumin. **Science**. v. 52, n. 4, p. 519–525, 1996.

ZHANG, T; CHEN, Y; GE, Y; HU, Y; LI, M; JIN, Y. Inhalation treatment of primary lung cancer using liposomal curcumin dry powder inhalers. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 3, p. 440–448, 2018.

ABDULRAHMAN, H; MISBA, L; AHMAD, S; KHAN, A.U. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**. India, v. 30:101645, jun. 2020, p.1-7. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31899376/>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

JOHELAVICIUS, K. **Efeito da foto-ativação da curcumina e do azul de metileno em monocamadas de lipídios bacterianos**. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 21 fev. 2018.

ARAÚJO, N.C; FONTANA, C.R; GERBI, M.E.M; BAGNATO, V.S. Overall-Mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. **Photomed. Laser Surg.** v. 30, n. 2, p. 96-101, 2012b. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/pho.2011.3053>. Acesso em: 16 mar. 2021.

ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica 2004, Disponível em: <[https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf)> Acesso: 12 jan. 23.

MURAI, A.Y; CABRERA, G.D; OYAMA, K.T; ALMEIDA, R.R. Tratamento de infecções hospitalares causadas pela *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KCP) com antibióticos da classe das cefalosporinas. **Revista Brasileira de Ciências Biomédicas**. v. 3, p. 1-12, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.46675/rbcbm.v3i1.65>>. Acesso em 12 jan.23.

WOLLHEIM, Claudia *et al.* Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 138-143, 2011. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70159-3](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70159-3)>. Acesso em 12 jan.23.

SEJAS, C. G. F. Avaliação da resistência aos antibióticos, a variabilidade genética e as relações clonais de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de ESBL de cultura de vigilância de uma unidade de terapia Intensiva no Município do Rio de Janeiro. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

CARVALHO, Iago Silva e BORALLI, Camila Maria dos Santos e CAMARGO, Ilana Lopes Baratella da Cunha. Avaliação in vitro da possibilidade de disseminação da resistência bacteriana aos carbapenêmicos mediada pelo gene blaKPC através da conjugação. 2021, Anais. São Paulo: Universidade de São Paulo - USP, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/directbitstream/226404e0-b7c9-48c5-813b-dd659b0d2a8e/3050681.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

ZWIETERING, M.H; JONGENBURGER, I; ROMBOUTS, F.M, VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, jun. 1990, p. 1875-1881. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>>. Acesso em 24 ago. 2022.

GOO, E; AN, J.H; KANG, Y; HWANG, I. Control of bacterial metabolism by quorum sensing. **Trends Microbiol**, v. 23, n. 9, set. 2015, p. 567-576. Disponível em: <[10.1016/j.tim.2015.05.007](https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.007)>. Acesso em: 24 ago. 2022.

LLAMAS, I; QUESADA, E; MARTÍNEZ-CÁNOVAS, M.J; GRONQUIST, M; EBEHARD, A; GONZÁLEZ, J.E. Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. **Extremophiles**, v. 9, n. 1, ago. 2005, p. 333-341. Disponível em: <[10.1007/s00792-005-0448-1](https://doi.org/10.1007/s00792-005-0448-1)>. Acesso em: 24 ago. 2022.

DE KIEVIT, T.R & IGLEWSKI, B.H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**. v. 68, n. 9, p.4839-49. set. 2000. Disponível em: > doi: [10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000](https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000).> Acesso em 14 mar. 2023.

NG, W.L; BASSLER, B.L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, ago. 2009, p. 197-222. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>>. Acesso em: 24 ago. 2022

STALEY, Z.R; HARWOOD, V.J; ROHR, J.R. A synthesis of the effects of pesticides on microbial persistence in aquatic ecosystems. **Crit Rev Toxicol**, v. 45, n. 10, 2015, p. 813-836. Disponível em: <10.3109/10408444.2015.1065471.>. Acesso em: 25 ago. 2022.

ELLIOTT, A.G, HUANG, J.X, NEVE, S. *et al.* An amphipathic peptide with antibiotic activity against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Nature Communication**, v. 11, n. 3184, jun. 2020, p.1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16950-x.>. Acesso em: 23 ago. 2022.

CAMA, J; HENNEY, A.M; WINTERHALTER, M. Breaching the barrier: Quantifying antibiotic permeability across Gram-negative bacterial membranes. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 18, p. 3531-3546, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.031.>. Acesso em: 23 ago. 2022.

LI, J; SHIN, G.H; CHEN, X; PARK, H.J. Modified curcumin with hyaluronic acid: Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin challenge. **Food research international**, v. 69, p. 202-208, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.045.>. Acesso em: 22 ago. 2022.

ONOUE, S; TAKAHASHI, H; KAWABATA, Y; SETO, Y; HATANAKA, J; TIMMERMANN, B; YAMADA, S. Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability. **J Pharm Sci**. v. 99, n. 4, abr. 2010, p. 1871-1881. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.21964.>. Acesso em: 22 ago. 2022.

PICOLI, T; BARBOSA, J.S; VARGAS, G.D; HUBNER, S. de O; FISCHER, G. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (dmsO) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (mdbk). **Science and Animal Health**, v. 3, n. 2, jul/dez. 2015, p. 159-168. Disponível em: <https://doi.org/10.15210/sah.v3i2.6585.>. Acesso em: 23 ago. 2022.

RIBEIRO, A.P.D; PAVARINA, A.C, DOVIGO, L.N *et al.* Efeito fototóxico da curcumina em *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e fibroblastos L929. **Lasers Medical Science**. v. 28, fev. 2012, p. 391-398. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1064-9.>. Acesso em: 23 ago. 2022.

HAUKVIK, T; BRUZELL, E; KRISTENSEN, S; TONNESEN, H.H. Photokilling de bactérias por curcumina em diferentes preparações aquosas. Estudos sobre curcumina e curcuminoides XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, n. 10, out. 2009, p. 666-673. Disponível em: <https://doi.org/10.1691/ph.2009.0000.>. Acesso em: 23 ago. 2022.

LI, H. *et al.* Entrapment of curcumin in soy protein isolate using the pH-driven method: Nanoencapsulation and formation mechanism. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - LWT**, v. 153, n. 12, set. 2021, p. 112480. Disponível em: <10.1016/j.lwt.2021.112480.>. Acesso em 24 ago. 2022.

PRIYADARSINI, K.I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091-20112, 2014. Disponível em: <10.3390/molecules191220091.>. Acesso em 24 ago. 2022.

HAMAGUCHI, P.Y; SHIKU, Y; TANAKA, M. Property Improvement of Fish Water Soluble Protein Films by Dialdehyde Starch (DAS) and / or Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Treatments. **Pack Sci Tech**, v. 12, n. 5, 2003, p. 272-282. Disponível em: <<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.497.1493&rep=rep1&type=pdf..>> Acesso em 24 ago. 2022.

PANHOCA, V.H; FLOREZ, F.L.E; CORRÊA, T.Q; PAOLILLO, F.R; DE SOUSA, C.W.O; BAGNATO, V.S. Oral decontamination of orthodontic patients using photodynamic therapy mediated by blue-light irradiation and curcumin associated with sodium dodecyl sulfate. **Photomedicine and laser surgery**, v. 34, n. 9, set. 2016, p. 411-417. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/pho.2015.4080.>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

ROY, S; RHIM J.-W. Preparation of antimicrobial and antioxidant gelatin/curcumin composite films for active food packaging application. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 188, abr. 2020, p. 110761. Disponível em: <[10.1016/j.colsurfb.2019.110761.>](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110761.>). Acesso em: 24 ago. 2022.

ALVES, F; GUIMARÃES, G.G; INADA, N.M; PRATAVIEIRA, S; BAGNATO, V.S, KURACHI, C. Strategies to improve the antimicrobial efficacy of photodynamic, sonodynamic, and sonophotodynamic therapies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 53, n. 8, out. 2021, p. 1113-1121. Disponível em: <[10.1002/lsm.23383.>](https://doi.org/10.1002/lsm.23383.>). Acesso em 24 ago. 2022.

IMLAY, J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n.7, p. 443–454. jul. 2013. Disponível em: <[doi:10.1038/nrmicro3032>](https://doi.org/10.1038/nrmicro3032.>). Acesso em 14 mar. 2023.

TORTAMANO, A.C.A.C; ANSELMO, G.G; KASSA, C.T; GODOY-MIRANDA, B; PAVANI, C; KATO, I.T; WAINWRIGHT, M; PRATES, R.A. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle on periodontopathogens. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 31:101784. set. 2020. Disponível em: <[doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101784.>](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101784.>). Acesso em 14 mar. 2023.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Microbiologia.10 ed. Porto Alegre: Artmed, ago. 2012

MOREIRA, N. M; SOLA, M. C; FEISTEL, J. C; OLIVEIRA J. J; FREITAS F. A. O mecanismo de resistência bacteriana da salmonela sp. Frente à utilização de antibióticos. **Centro Científico Conhecer**, v.9, n. 16, jun. 2013, p.1131-1153. Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/3473/3368.>>. Acesso em 25 ago. 2022.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n.1, jan-abr. 2016, p. 77–84. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003.>>. Acesso em: 25 ago. 2022.

HAWKEY, P.M. The growing burden of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n.1, set. 2008, p. i1-i9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkn241>>. Acesso em: 25 ago. 2022.