



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



**Análises das Terapias Fotodinâmica, Sonodinâmica e Sonofotodinâmica  
para a Inativação de Biofilmes de *Candida albicans***

**Gabriela Gomes Guimarães**

Dissertação de Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

<b><i>Orientador:</i></b>
Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
<b><i>Co-orientador (a):</i></b>
Prof. Dr. Sebastião Pratavieira Dra. Fernanda Alves

\* bolsista: CAPES - 88887.653731/2021-00

**São Carlos - SP  
2023**

Gabriela Gomes Guimarães

**Análises das Terapias Fotodinâmica, Sonodinâmica e Sonofotodinâmica para a Inativação  
de Biofilmes de *Candida albicans***

Dissertação do Exame de Defesa apresentada ao Programa Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

<b><i>Orientador:</i></b>
---------------------------

Prof. Dr. Vanderlei Bagnato
-----------------------------

BANCA EXAMINADORA

*Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato*  
*Instituto de Física (IFSC) - Universidade de São Paulo - USP*

Dra. Thaila Quatrini Corrêa  
Instituto de Física (IFSC) - Universidade de São Paulo - USP

*Prof. Dra. Cristina Paiva de Sousa*  
Departamento de Morfologia e Patologia – DMP - UFSCar

São Carlos  
2022

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**Folha de aprovação**  
(após a defesa)

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de [Mestrado ou Doutorado] do candidato [nome do aluno], realizada em dd/mm/aaaa:

---

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato  
Instituição: Universidade de São Paulo USP-IFSC

---

Dra. Thaila Quatrini Corrêa  
Instituição: Universidade de São Paulo USP-IFSC

---

Prof. Dra. Cristina Paiva de Sousa  
Instituição: Departamento de Morfologia e Patologia – DMP - UFSCar

Agradeço a Deus que me deu forças para concluir este projeto de forma satisfatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que não mediram esforços para que eu chegasse até  
essa etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por me ajudar a superar as dificuldades para realizar este sonho, bem como conceder oportunidades de viver experiências.

Agradeço a minha falecida avó Maria Mecca, que sempre estará comigo, independente da circunstância.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao corpo docente, pelos ensinamentos e a oportunidade de prosseguir com a minha formação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato por toda orientação, confiança e oportunidade de realizar esta pesquisa.

Aos meu coorientadores Prof. Sebastião Pratavieira e Dra. Fernanda Alves por todas as reuniões para direcionar o meu trabalho, a todos os conselhos e ensinamentos.

Agradeço ao pessoal do grupo SPDT por todo apoio, pelo trabalho em conjunto e também por todas as risadas.

A minha amiga Rebeca por sempre me ouvir, me levantar quando eu mais precisei, e também, por sempre me ajudar com direcionamentos, e muitos conselhos que irei levar para a vida. Nossa conexão é de outro mundo, muito mais que uma amiga, uma irmã!

A minha amiga Bruna por também me ouvir, me ajudar com conselhos e direcionamentos, e também, por todas as risadas no Lab e na sala 35, ela conseguiu fazer dias ruins, se tornarem bons.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar e contribuir na avaliação do meu trabalho.

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

Guimarães, Gabriela. **Análises das Terapias Fotodinâmica, Sonodinâmica e Sonofotodinâmica para a Inativação de Biofilmes de *Candida albicans***. 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2022.

## RESUMO

A humanidade tem sido atormentada por doenças infecciosas ao longo da história e continuam sendo uma das principais causas de morte no mundo. As infecções fúngicas (IFs) representam um exemplo dessas doenças emergentes, sendo responsáveis por aproximadamente 1,7 milhão de mortes anualmente. O fungo *Candida albicans* pode atuar como patógeno oportunista que possui como mecanismo de resistência a capacidade da formação de biofilmes. Biofilmes de *C. albicans* são resistentes à agentes antifúngicos, portanto, a busca por terapias alternativas que sejam capazes de inativar os biofilmes é necessária. Tratamentos alternativos surgem, como é o caso da inativação fotodinâmica (PDI), sonodinâmica (SDI) e sonofotodinâmica (SPDi). O presente trabalho analisou a PDI, SDI e SPDi, mediados pela Curcumina como fotossensibilizador na inativação de biofilmes de *C. albicans*, além disso, o trabalho avaliou o papel dos parâmetros de ultrassom e luz na inativação sonofotodinâmica. Dessa forma, os resultados demonstraram que a SPDi, PDI e SDI foram capazes de reduzir a viabilidade em 6,0; 1,2; 2,0 log, respectivamente, em comparação com o biofilme controle. Os resultados mostraram que com doses baixas de US, diminui a efetividade do tratamento, e com doses maiores, a efetividade é maior, portanto, o US possui um papel fundamental na efetividade. Os resultados também demonstraram que o uso da luz em combinação com o US é uma opção promissora alternativa para superar limitações da PDI e SDI. Esses aspectos reforçam e incentivam o uso e avaliação da SPDi para doenças microbianas.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica. Terapia Sonodinâmica. Terapia Sonofotodinâmica. *Candida albicans*. Curcumina. Ultrassom. Biofilme.

Guimarães, Gabriela. **Analyzes of Photodynamic, Sonodynamic and Sonophotodynamic Therapies for *Candida albicans* Biofilm Inactivation**. 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2022.

#### **ABSTRACT**

Humanity has been plagued by infectious diseases throughout history and they remain one of the leading causes of death in the world. Fungal infections (FIs) represent an example of these emerging diseases, accounting for approximately 1.7 million deaths annually. The fungus *Candida albicans* can act as an opportunistic pathogen that has the ability to form biofilms as a resistance mechanism. *C. albicans* biofilms are resistant to antifungal agents, therefore, the search for alternative therapies that are able to inactivate biofilms is necessary. Alternative treatments arise, such as photodynamic inactivation (PDI), sonodynamic (SDI) and sonophotodynamic (SPDI). The present work analyzed PDI, SDI and SPDI, mediated by Curcumin as a photosensitizer in the inactivation of *C.albicans* biofilms, in addition, the work evaluated the role of ultrasound and light parameters in sonophotodynamic inactivation. Thus, the results showed that SPDI, PDI and SDI were able to reduce viability by 6.0; 1.2; 2.0 log, respectively, compared to the control biofilm. The results showed that with low doses of US, the effectiveness of the treatment decreases, and with higher doses, the effectiveness is greater, therefore, the US has a fundamental role in the effectiveness. The results also demonstrate that the use of light in combination with US is a promising alternative option to overcome limitations of PDI and SDI. These aspects reinforce and encourage the use and evaluation of SPDI for microbial diseases.

**Keywords:** Photodynamic Therapy. Sonodynamic Therapy. Sonophotodynamic Therapy. *Candida albicans*. Curcumin. Ultrasound. Biofilm.

## LISTA DE FIGURA

Figura 1 . <i>Candida albicans</i> em suspensão vista em microscópio de luz. Fonte: Autoria própria. ....	12
Figura 1.1 . Representação esquemática da formação de biofilme. Fonte: Autoria própria. ....	14
Figura 1.2. Inativação fotodinâmica. A PDT é baseada na interação entre um fármaco fotoativo não tóxico (fotossensibilizador, FS) e luz visível de baixa intensidade. Fonte: Autoria própria.....	16
Figura 1.3 . Inativação sonodinâmica. Efeitos sonomecânicos e sonoquímicos induzidos pelo fenômeno de cavitação atuando sobre um biofilme de <i>C. albicans</i> . Reações mecânicas de pull-push, força de radiação e microstreaming são geradas através da cavitação estável, enquanto a cavitação inercial leva a microjateamento e emissão de ondas de choque. As reações sonoquímicas ocorrem por dois mecanismos: a sonoluminescência, onde a luz emitida pela implosão da bolha ativa as moléculas sensibilizadoras que reagem com o oxigênio e as biomoléculas, gerando ROS, como OH•, O <sub>2</sub> •, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e <sup>1</sup> O <sub>2</sub> . No ponto quente, os altos valores de temperatura e pressão produzem vapor de água e quebram as moléculas de água. Adicionalmente, no ponto quente as moléculas sensibilizadoras são quebradas, originando mais EROs. Esses eventos levam à inativação do microrganismo e danos ao biofilme. Fonte: Autoria própria.....	18
Figura 1.4. Inativação sonofotodinâmica. Biofilme de <i>C. albicans</i> recebendo tratamento simultâneo de sono e fotodinâmica. Os mecanismos de ação de ambas as terapias ocorrem simultaneamente. A luz ativa o PS gerando reações tipo I e tipo II, que produzem ROS. Adicionalmente, a aplicação do ultrassom produz efeitos sonoquímicos e sonomecânicos, gerando mais ROS e também forças mecânicas, respectivamente. Esses eventos danificam o microrganismo e seu biofilme, contribuindo para o efeito de inativação. Fonte: Autoria própria.....	19
Figura 1.5 . Curcuma Longa - Açafrão-da-terra. Fonte: Brasil Escola, 2020. ....	20
Figura 1.6. Estrutura molecular dos curcuminóides. (a) curcumina, (b) demetoxicurcumina e (c) bisdemetoxicurcumina. Fonte: MAZZARINO, 2013. ....	21
Figura 2. Aparelho de ultrassom Recupero utilizado para a irradiação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> . Elaborado pela empresa MMO Optics (São Carlos). ....	23
Figura 2.1 . Aparelho de luz LED utilizado para iluminação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> . Elaborado pelo Instituto de Física, USP – São Carlos (A/B). ....	24
Figura 2.2 . Inativação Sonofotodinâmica (A/B). Inativação Fotodinâmica (C). Fonte: Autoria própria.....	26
Figura 3 . Valores médios e desvio padrão de Log(UFC/mL) dos grupos Controle, SDT, PDT e SPDT tratados na presença de Curcumina e SDS e valores médios e desvio padrão de Log(UFC/mL) dos grupos PDT+SDT, SDT+PDT e seus controles tratados na presença de Curcumina e SDS. ....	30
Figura 3.1 . Valores médios e desvio padrão de Log(UFC/mL) na avaliação dos parâmetros do US na eficácia da SPDI. ....	34
Figura 3.1. Gráfico da dinâmica temporal variando as intensidades de ultrassom de acordo com a diminuição microbiana. ....	36

Figura 3.3. Valores médios e desvio padrão de Log(UFC/mL) na avaliação de parâmetros da dose de luz na eficácia da SPDI. ....	36
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### LISTA DE TABELAS

Tabela 3. Parâmetros dos grupos de estudo. ....	27
Tabela 3.1. Parâmetros de ultrassom utilizados nesta etapa do estudo.....	27
Tabela 3.2. Parâmetros de luz utilizados nesta etapa do estudo. ....	29

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1. Introdução</b>	11
1.1 <i>Candida albicans</i>	11
1.2 Antifúngicos	12
1.3 Biofilme	13
1.4 Inativação Fotodinâmica	15
1.5 Inativação Sonodinâmica	16
1.6 Inativação Sonofotodinâmica	18
1.7 Curcumina e SDS	19
<b>2. Objetivos</b>	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivo Específico	22
<b>Capítulo 3. Materiais e Métodos</b>	22
3.1 Fotossensibilizador	22
3.2 Fonte de luz e ultrassom	23
3.3 Microrganismo e formação do biofilme	24
3.4 Aplicação dos tratamentos no biofilme	25
3.5 Avaliação do Threshold do US e Fonte de Luz	27
<b>Capítulo 4 . Resultados e Discussão</b>	30
<b>Capítulo 5. Conclusões</b>	37

## Capítulo 1 Introdução

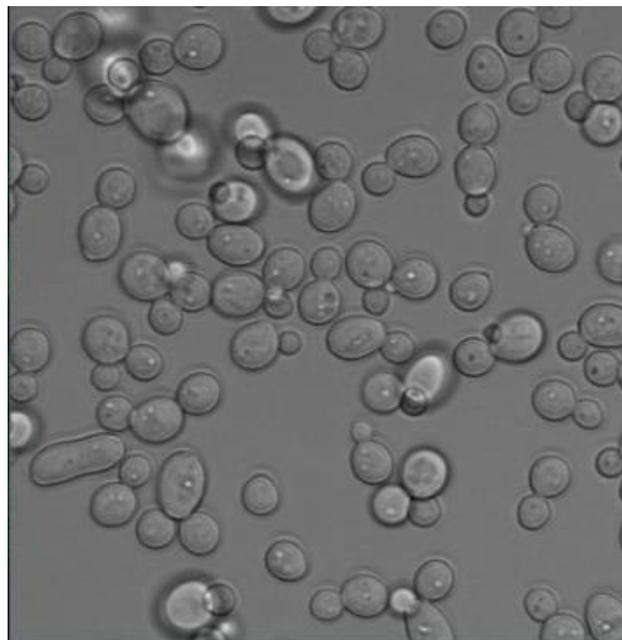
### 1.1 *Candida albicans*

A humanidade tem sido atormentada por doenças infecciosas ao longo da história, e a atual pandemia de COVID-19 (doença de coronavírus) é um lembrete assustador de que essa suscetibilidade persiste em nossa sociedade moderna. Afinal, as doenças infecciosas continuam sendo uma das principais causas de morte no mundo. Infelizmente, algumas dessas “ameaças microbianas” foram subestimadas e negligenciadas pelas autoridades de saúde, embora ponham em risco milhões de vidas todos os anos em todo o mundo. As infecções fúngicas (IFs) representam um exemplo dessas doenças emergentes negligenciadas, sendo responsáveis por aproximadamente 1,7 milhão de mortes anualmente. Assim, as IFs estão se tornando cada vez mais um problema de saúde global associado a altas taxas de morbidade e mortalidade, bem como a consequências socioeconômicas devastadoras. Em relação às infecções fúngicas, elas apresentam um desafio clínico particular devido à alta mortalidade, falta de vacinas, diagnósticos limitados e aumento da resistência aos antifúngicos (BAYONA et al; 2021; HOENIGL et al; 2022; KAINZ et al; 2020; BONGOMIN et al , 2017).

A *Candida albicans* e espécies correlatas vivem como comensais no corpo da maioria dos seres humanos saudáveis. Como patógenos oportunistas, esses microrganismos podem colonizar cavidades, e penetrar nos tecidos em resposta a alterações na fisiologia do hospedeiro com funções imunológicas comprometidas. Este microrganismo apresenta a capacidade de dimorfismo, ou seja, pode alterar sua morfologia de blastóporo (Figura 1), unicelular e frequentemente esporulado para a forma de hifas sob determinadas alterações das condições ambientais. (CAMPANHA, 2005).

Em muitos indivíduos saudáveis, a *Candida spp.* está presente como um comensal inofensivo, em cavidade oral, na pele, nas mucosas, no sistema urogenital e no trato gastrointestinal. Entretanto, a prevalência de doenças graves causadas por estes fungos

aumentou nas últimas décadas devido ao número crescente de indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com câncer, receptores de transplante de órgãos, indivíduos infectados com HIV e o aumento da população idosa. A espécie *Candida albicans* é a espécie mais isolada em infecções micóticas, podendo causar infecções superficiais ou até fungemia. A capacidade deste fungo em causar infecções está relacionada a diversas características que o auxiliam na penetração do tecido hospedeiro, como por exemplo, a produção das enzimas proteinases e fosfolipases, uma vez que hidrolisam importantes constituintes da membrana citoplasmática da célula hospedeira (LEE et al; 2021; ALVES, 2018). Além disso, a capacidade de crescer e formar filamentos também facilitam a invasão do tecido epitelial (ALVES et al; 2018).



**Figura 2.** *Candida albicans* em suspensão vista em microscópio de luz. Fonte: Autoria própria.

## 1.2 Antifúngicos

Dentre os antifúngicos utilizados na área terapêutica de candidíases invasivas, destacam-se triazólicos, como fluconazol, derivados poliênicos, como anfotericina B, e, do grupo das equinocandinas, a caspofungina. A anfotericina B é indicada para formas graves de

doença invasiva, pertence ao grupo dos poliênicos. Uma vez identificado o patógeno causador da infecção, a falha na terapia antifúngica pode ocorrer devido à resistência do microrganismo. A resistência a medicamentos antifúngicos é um amplo conceito que descreve o fracasso de uma terapia antifúngica, e resulta na persistência ou progressão de uma infecção. A resistência microbiológica envolve mecanismos moleculares e pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de uma determinada espécie de microrganismo, e confere a ele a resistência antes da exposição deste ao antifúngico. Já a resistência adquirida ocorre em microrganismos que desenvolveram mutações após a exposição ao antifúngico e posteriormente houve a seleção, sobrevivência e proliferação daqueles mutantes resistentes (VIEIRA et al; 2017).

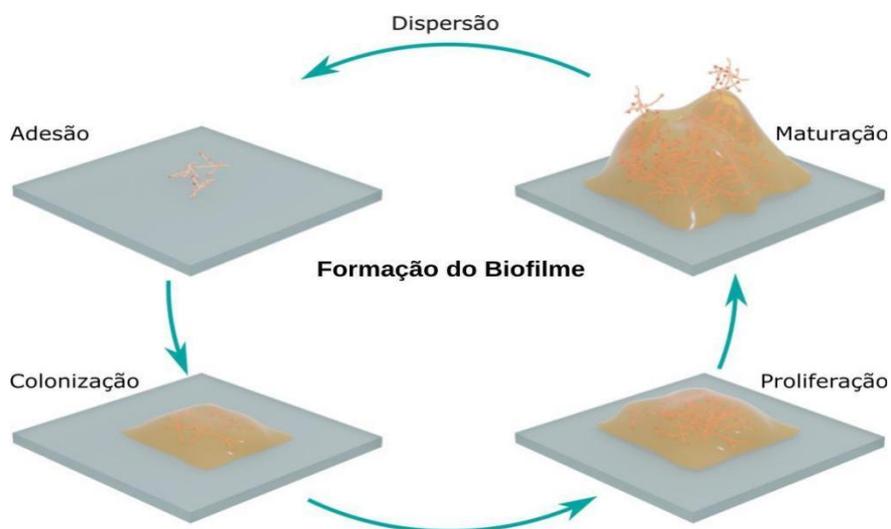
### 1.3 Biofilme

Uma outra forma de mecanismo de resistência, é a capacidade da formação de biofilmes. Várias espécies de leveduras do gênero *Candida* têm a habilidade de produzir biofilme, inclusive *C. albicans*. O biofilme é uma comunidade estruturada de microrganismos ligados a uma superfície, e estão protegidos por uma matriz extracelular (COSTERTON et al; 1999; RAMAGE et al; 2009; VIEIRA et al; 2017). Os benefícios de organismos que estão sendo organizados como biofilmes incluem proteção de mudanças ambientais, proteção contra defesa, permitindo cooperação metabólica e regulação de expressão gênica. Por estas razões, células de biofilmes exibem características fenotípicas únicas comparados a suas células planctônicas, e de uma perspectiva, tendem a ser mais resistentes aos agentes antimicrobianos (RAMAGE et al. 2009). Desta forma, possuem grande importância clínica, uma vez que estão relacionados à resistência aos tratamentos antifúngicos, o que contribui para alta morbidade e mortalidade, podendo ser considerado dos principais fatores de virulência que contribuem para a patogênese da candidíase. (WALL et al; 2019).

A matriz extracelular que envolve as células, contribui para a preservação da arquitetura do biofilme e para a manutenção de interações célula-célula estáveis, célula-superfície e célula-ambiente. Em geral, o processo de desenvolvimento do biofilme de *C.*

*albicans* pode ser dividido em quatro fases principais: adesão, proliferação, maturação e dispersão, conforme é representado na Figura 1.1. O início fase de aderência, as células de levedura aderem a uma superfície do material e formam uma camada basal que irá ancorar o biofilme em superfície. Isto é seguido por uma fase de proliferação, que é caracterizada pelo início de filamentos que levam ao surgimento de hifas e pseudo-hifas, que continuam a se alongar durante todo o processo de desenvolvimento do biofilme, formando uma rede que contribui para a robustez do biofilme. Na fase de maturação, o andaime de hifas ficam envoltos em um manto de substâncias poliméricas (EPS) auto produzidas que agem essencialmente como um adesivo que mantém toda a estrutura do biofilme unida (Flemming e Wingender 2010; WALL et al; 2019).

A EPS de *C. albicans* é composta por carboidratos, proteínas, lipídios e DNA que interagem entre si, e conferem as propriedades da matriz. Como parte deste processo de desenvolvimento, continuamente há a dispersão de células de levedura dos biofilmes de *C. albicans* que servem para infectar novos locais. O estágio de dispersão garante que o “ciclo de vida do biofilme” recomece e haja a formação de colônias fúngicas nas superfícies vizinhas (WALL et al; 2019).



**Figura 1.1.** Representação esquemática da formação de biofilme. Fonte: Autoria própria.

O surgimento de microrganismos resistentes tem preocupado os profissionais que lidam com doenças infecciosas. De acordo com uma revisão presidida por Jim O'Neill, em 2050 a resistência antimicrobiana causará cerca de 10 milhões de mortes, ainda mais do que o câncer (aproximadamente 8,2 milhões de mortes) (ALVES et al; 2021). Diante das dificuldades relacionadas à resistência fúngica, a inativação fotodinâmica antimicrobiana (PDI) vem sendo sugerida como promissora para inativação microbiana (DONELLEY et al; 2008; ALVES et al; 2021).

#### **1.4 Inativação Fotodinâmica**

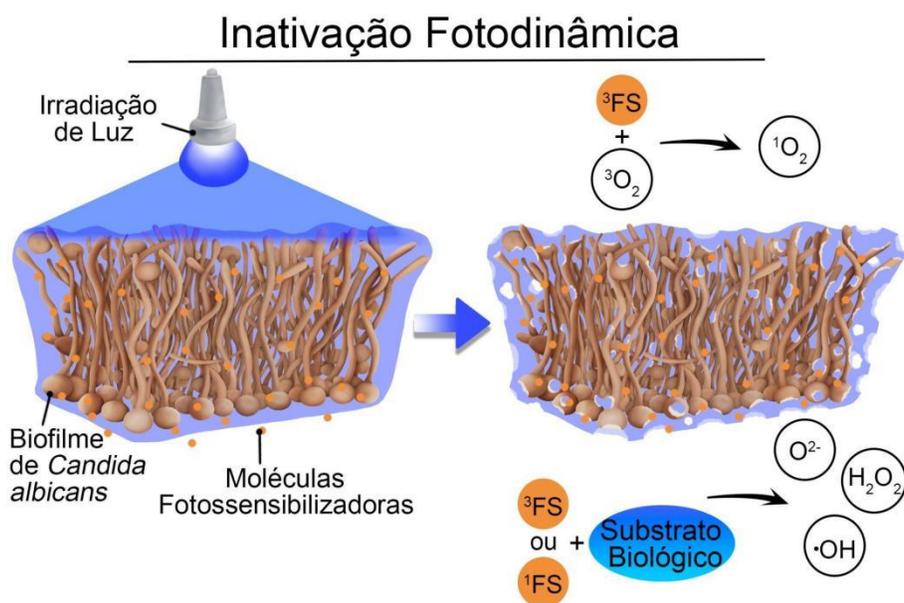
A Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (PDI) teve origem no início do século XX, em Munique, quando Oscar Raab e seu professor Herman von Tappeiner observaram os efeitos decorrentes da fotossensibilização em paramécio. Raab observou a morte rápida de um protozoário, *Paramecium caudatum*, depois da exposição à luz na presença do corante acridina. A presença da luz, modificando a ação do corante, permitiu a identificação de um fotossensibilizante. Subsequentemente, seu professor Von Tappeiner ampliou as descobertas com outros experimentos e descobriu a necessidade da presença do oxigênio para a reação, criando o termo PDT (TAUB, 2007).

A PDI requer a associação de oxigênio, uma fonte de luz visível e fotossensibilizador para exercer a atividade antimicrobiana (Bonnett e Martínez 2001), a figura 1.2 representa a inativação Fotodinâmica em biofilme de *Candida albicans*.

O mecanismo de ação da PDI baseia-se na administração tópica ou sistêmica de uma substância não tóxica e sensível à luz, denominada de fotossensibilizador (FS), que em seguida é irradiada em baixas doses de luz visível em um comprimento de onda na região de absorção da substância em questão. Assim, quando o FS é irradiado, absorve fótons da fonte de luz e seus elétrons passam para o estado excitado singleto, indo para um nível eletrônico de maior energia. Dessa forma, uma vez no estado excitado, o FS pode retornar ao seu estado fundamental por via de dois processos: radiativos (fluorescência ou fosforescência) ou não radiativos. O FS excitado pode reagir 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), levando à produção de oxigênio singleto, ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente (HAMBLIN, 2017).

Entretanto, estudos mostraram que os biofilmes de *Candida* são menos suscetíveis à PDT quando comparados com suas células planctônicas (ALVES et al; 2018).



**Figura 1.2.** Inativação fotodinâmica. A PDT é baseada na interação entre um fármaco fotoativo não tóxico (fotossensibilizador, FS) e luz visível de baixa intensidade. Fonte: Autoria própria

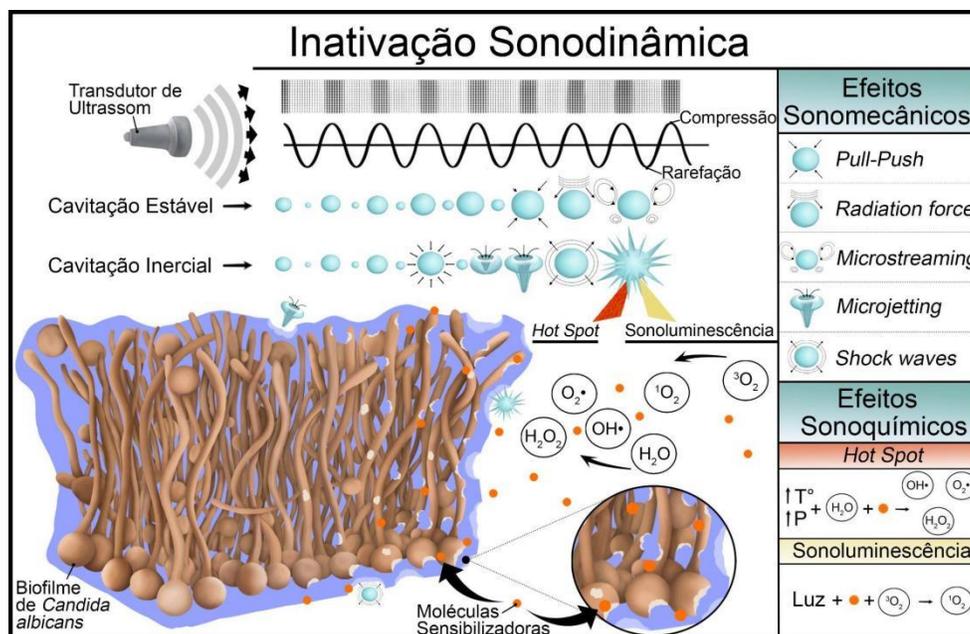
### 1.5 Inativação Sonodinâmica

A inativação sonodinâmica (SDI), ou terapia sonodinâmica antimicrobiana (SDI), foi sugerida como uma nova abordagem para a descontaminação microbiana e para o tratamento de doenças infecciosas. Essa técnica é capaz de inativar células por meio de efeitos sonomecânicos e sonoquímicos que ocorrem com a aplicação do ultrassom na presença de moléculas sonossensibilizadoras (SS) (ALVES et al; 2021). Conforme mostrado na

Figura 1.3, as ondas acústicas que se propagam em um meio criam zonas de alta pressão (compressão) e zonas de baixa pressão (rarefação), respectivamente. Essa diferença de pressão em movimento provoca a formação e oscilação de microbolhas no meio líquido, em um fenômeno denominado cavitação (CHOI, et al., 2020)).

A cavitação estável ou não inercial ocorre quando um ultrassom de baixa intensidade é aplicado em um fluido e as microbolhas oscilam de forma estável, tendo uma vida útil muito longa sem colapsar. A cavitação estável gera forças mecânicas como pull-push, microstreaming e forças de radiação. Eles criam poros transitórios na membrana celular (sonoporação), facilitando a penetração de drogas, como os sensibilizadores (CHOI, et al., 2020). Quando a energia fornecida é mais intensa, as microbolhas oscilantes atingem um tamanho maior que seu raio crítico e colapsam, no fenômeno da cavitação inercial. Durante o colapso das microbolhas, a energia absorvida causa microjateamento e emissão de ondas de choque, efeitos sonomecânicos que danificam a membrana plasmática causando sonoporação e podem levar à ruptura e morte celular (WISCHHUSEN et al., 2018). Por fim, quando as microbolhas implodem, a grande quantidade de energia liberada cria um microambiente em condições extremas de temperatura e pressão (pontos quentes), e causa emissão de luz (sonoluminescência) (YASUI, 2018). O aumento de temperatura e pressão quebra o vapor d'água e as moléculas sensibilizadoras, gerando espécies altamente reativas de oxigênio (ROS), como  $\text{OH}\bullet$ ,  $\text{O}_2\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $1\text{O}_2$ , nas reações sonoquímicas. As ERO interagem com moléculas biológicas danificando as células dos microrganismos e seus biofilmes. Além das reações químicas, as forças mecânicas são de grande importância, pois causam o rompimento do biofilme (CHOI et al., 2020; FAN et al., 2021).

A utilização do US na inativação de biofilmes permite superar algumas limitações de luz na PDI, melhorando a eficácia do tratamento. O ultrassom tem a capacidade de penetrar nos tecidos profundos (Martins et al., 2021), podendo assim penetrar mais profundamente na matriz extracelular, desestruturando o biofilme e ativando o FS em camadas profundas. Além disso, as células podem absorver maior quantidade de FS devido aos poros criados na membrana na sonoporação, aumentando a inativação de microrganismos.



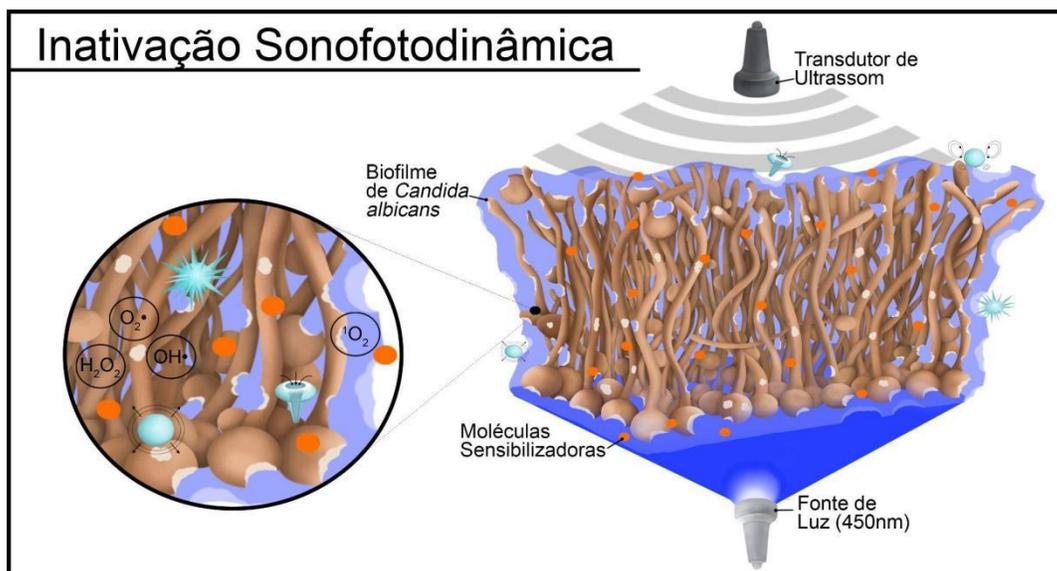
**Figura 1.3.** Inativação sonodinâmica. Efeitos sonomecânicos e sonoquímicos induzidos pelo fenômeno de cavitação atuando sobre um biofilme de *C. albicans*. Reações mecânicas de pull-push, força de radiação e microstreaming são geradas através da cavitação estável, enquanto a cavitação inercial leva a microjateamento e emissão de ondas de choque. As reações sonoquímicas ocorrem por dois mecanismos: a sonoluminescência, onde a luz emitida pela implosão da bolha ativa as moléculas sensibilizadoras que reagem com o oxigênio e as biomoléculas, gerando ROS, como  $OH^\bullet$ ,  $O_2^\bullet$ ,  $H_2O_2$  e  $^1O_2$ . No ponto quente, os altos valores de temperatura e pressão produzem vapor de água e quebram as moléculas de água. Adicionalmente, no ponto quente as moléculas sensibilizadoras são quebradas, originando mais EROs. Esses eventos levam à inativação do microrganismo e danos ao biofilme. Fonte: Autoria própria.

### 1.6 Inativação Sonofotodinâmica

Uma nova abordagem que combina a aplicação de ultrassom e luz para ativar o FS, conhecida como inativação sonofotodinâmica (SPDI), ou terapia sonofotodinâmica antimicrobiana (SPDI), tem mostrado resultados mais eficazes do que a aplicação isolada de tratamentos. A figura 1.4 representa a inativação Sonofotodinâmica em biofilme de *Candida albicans*.

A vantagem do tratamento combinado baseia-se na união dos efeitos sonodinâmicos (SDI) e fotodinâmicos (PDI). A SPDT busca aliar todos os benefícios da PDT e SDT, com duas fontes de energia, há a possibilidade de atingir tecidos que apenas a PDT não é capaz, bem

como desagregar moléculas através da ação mecânica do ultrassom, auxiliar na dispersão da matriz do biofilme (ALVES et al; 2021). A Figura 1.4 ilustra a aplicação de SPDI em um biofilme de *C. albicans*.



**Figura 1.4** Inativação sonofotodinâmica. Biofilme de *C. albicans* recebendo tratamento simultâneo de sono e fotodinâmica. Os mecanismos de ação de ambas as terapias ocorrem simultaneamente. A luz ativa o PS gerando reações tipo I e tipo II, que produzem ROS. Adicionalmente, a aplicação do ultrassom produz efeitos sonoquímicos e sonomecânicos, gerando mais ROS e também forças mecânicas, respectivamente. Esses eventos danificam o microrganismo e seu biofilme, contribuindo para o efeito de inativação. Fonte: Autoria própria.

### 1.7 Curcumina e SDS

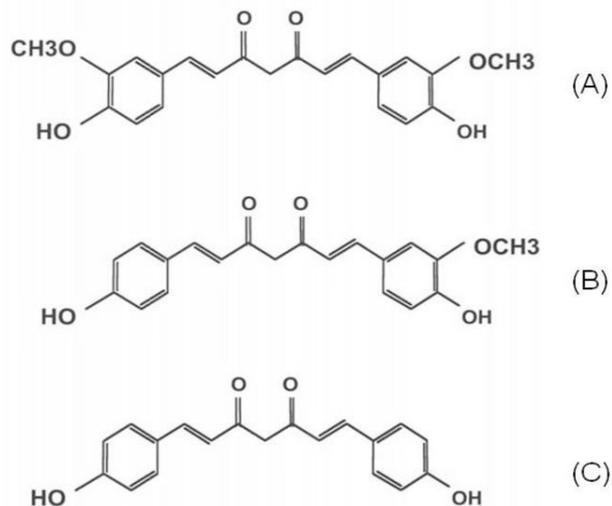
Os fotossensibilizadores (FS) são moléculas orgânicas capazes de interagir com a radiação eletromagnética em regiões do espectro que vão desde o ultravioleta (UV, 200-40 nm), até o início infravermelho próximo (1000nm). No estado excitado, essas moléculas podem realizar diferentes processos de transferência de energia, podem promover a excitação de outros substratos, de oxigênio molecular e a formação de espécies radiculares. Os FS capazes de absorver energia na região do visível, em geral, são excitados a níveis de energia adequados para transferir fótons e permitir a formação de espécies reativas de oxigênio (BAGNATO et al; 2017).

Dentre os FSs utilizados para mediar estes tratamentos destaca-se a curcumina, que é uma molécula extraída das raízes da *Curcuma longa L* (cúrcuma) (Figura 1.5). Possui atividade anticancerígena estudada há décadas, tendo um dos mecanismos de ação para inibir a proliferação de células tumorais. Devido a sua segurança comprovada para humanos, desde seu consumo comestível em alguns países, esta molécula mostra-se uma boa alternativa no tratamento de uma variedade de doenças, e protocolos terapêuticos que vão desde câncer, à controle de infecções causadas por vários microrganismos patogênicos. Além disso, a curcumina também mostrou grande potencial como fotossensibilizador em PDI, devido a sua capacidade de absorver a luz azul e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) (DIAS et al; 2020).



**Figura 1.5.** *Curcuma Longa* - Açafrão-da-terra. Fonte: Brasil Escola, 2020.

A cúrcuma apresenta três principais pigmentos em sua composição: curcumina, bisdemetoxicurumina, e demetoxicurcumina, no entanto o primeiro é o mais abundante na raiz (GARBUIO, 2021). A Figura 1.6 apresenta a estrutura molecular desses curcuminóides.



**Figura 1.6.** Estrutura molecular dos curcuminóides. (a) curcumina, (b) demetoxicurcumina e (c) bisdemetoxicurcumina. Fonte: MAZZARINO, 2013.

Atualmente a Curcumina (Cur) tem atraído considerável atenção devido as suas várias propriedades biológicas relacionadas, tais como, antibacteriana, anti-inflamatória, e antioxidante. Recentemente, os derivados da cúrcuma, conhecidos como pigmentos curcuminóides, vêm demonstrando alto potencial na inativação fotodinâmica de microrganismos. Estudos mostram que a curcumina absorve luz na região azul, variando entre os comprimentos de onda de 400 a 480 nm (PASCHOAL et al; 2013). No entanto, há alguns fatores a serem destacados, a curcumina apresenta baixa solubilidade em meios aquosos, e também, há uma dificuldade da sua incorporação no meio intracelular, pois possui uma estrutura molecular grande (HU, 2015).

Entretanto, este FS apresenta baixa solubilidade no meio aquoso, assim, para aumentar a eficácia dos tratamentos, uma possibilidade é associá-lo a um surfactante, como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Os surfactantes são compostos orgânicos que contêm na mesma molécula dois grupos, um solúvel em água (grupo polar ou hidrofílico), e o outro é insolúvel em água (apolar ou hidrofóbico) (ALVES, et al; 2021) e são frequentemente usados na PDT para melhorar a solubilidade do PS (ALVES, et al; 2021).

O presente trabalho buscou avaliar os tratamentos (PDI, SDI e SPDI), mediados pela curcumina como fotossensibilizador na inativação de biofilmes de *Candida albicans*, e analisar os parâmetros de luz e ultrassom na inativação sonofotodinâmica.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os tratamentos (PDI, SDI e SPDI) mediados pela curcumina como fotossensibilizador, com a adição do SDS como surfactante, na inativação de biofilmes de *Candida albicans*.

### **2.2 Objetivo Específico**

Analisar os parâmetros de ultrassom reduzindo-se os valores de intensidade mantendo-se a dose de luz fixa.

Analisar os parâmetros da luz reduzindo-se a dose de luz e mantendo-se a intensidade de ultrassom fixa.

## **Capítulo 3. Materiais e Métodos**

### **3.1 Fotossensibilizador**

A curcumina (Cur, PDT Pharma, Cravinhos, SP, Brasil) foi utilizada no presente estudo como fotossensibilizador. A quantia de 0,06g de pó foi pesada em um balão volumétrico de 10 mL, diluída em 10 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para obter a concentração final de 16 mM (solução estoque). Então, a solução de trabalho foi obtida diluindo-se a solução estoque em salina estéril até a concentração final de 80  $\mu$ M em um tubo falcon (obtendo-se a concentração final de DMSO de 0,5%). Em seguida, adicionou-se 0,01 g de SDS (LabSynth,

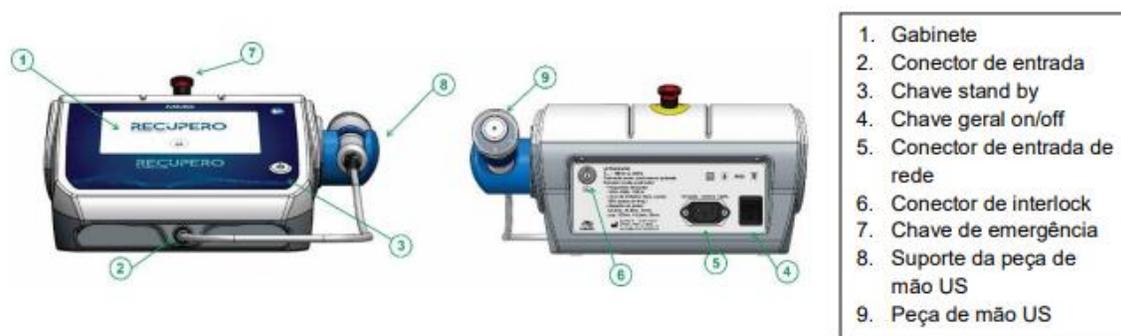
Diadema, Brasil) obtendo-se a concentração de 0,1% deste surfactante.

### 3.2 Fonte de luz e ultrassom

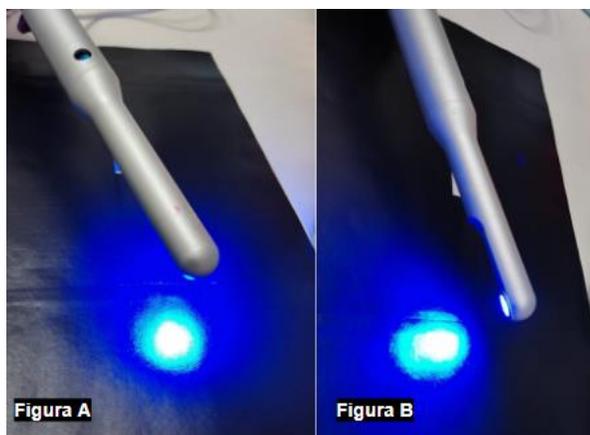
O Laboratório de Apoio Técnico (LAT), do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), desenvolveu um protótipo de luz LED azul (figura 2.1). Uma peça de mão com um diodo emissor de luz azul ( $\sim 455 \text{ nm}$ ) (LED, LXHLPR09, Luxeon III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA) foi projetada pelo Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil).

O Ultrassom Recupero desenvolvido pela empresa MMO (São Carlos-sp) foi utilizado no presente estudo (figura 2). É um equipamento fisioterapêutico com um laser de diodo ou semiconductor de baixa intensidade que está conjugado na peça de mão, no qual seu material consiste em alumínio.

É um equipamento portátil e prático, no qual sua intensidade vai de  $0$  à  $1 \text{ W/cm}^2$ , a ERA do transdutor possui um tamanho de  $2,6 \text{ cm}^2$ . O ciclo de trabalho do ultrassom pode ser trabalhado no modo pulsado ou modo contínuo. Possui um Display sensível ao toque de “touch screen” 7 polegadas.



**Figura 2.** Aparelho de ultrassom Recupero utilizado para a irradiação dos biofilmes de *C. albicans*. Elaborado pela empresa MMO Optics (São Carlos).



**Figura 2.1.** Aparelho de luz LED utilizado para iluminação dos biofilmes de *C. albicans*. Elaborado pelo Instituto de Física, USP – São Carlos (A/B).

### 3.3 Microrganismo e formação do biofilme

O microrganismo selecionado para este estudo foi uma cepa de *C. albicans* (ATCC 90028).

A cultura desse microrganismo foi armazenada em microtubos contendo meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) com glicerol a 50%, e congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização. Para o experimento, a levedura foi descongelada e reativada com uma alça de inoculação em uma placa contendo meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubadas em estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h.

Após 48 h, 8 colônias foram ressuspensas em um tubo falcon contendo 10 mL de TSB. O tubo falcon foi incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. Após a incubação, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  da suspensão foi diluída em 9,5 mL de TSB e incubada por 8h até a fase mid-log de crescimento. Em seguida, foi realizado o ajuste da concentração da suspensão fúngica em espectrofotômetro UV/VIS (Varian Cary 50, Agilent). Para isso, uma cubeta estéril com 2 mL de TSB foi posicionada no interior do espectrofotômetro ajustado para 540 nm e 0 de absorbância para fazer o “blank” (solução controle). Em seguida, uma outra cubeta com 2 mL contendo a suspensão celular preparada foi inserida no espectrofotômetro e, então, fechado para a leitura da concentração celular. Esse procedimento foi repetido até que a concentração celular fosse apontada pelo aparelho a um valor de absorbância de 0,5; que corresponde a concentração celular de  $10^7$  células/mL.

Para a formação do biofilme, 1 mL da suspensão foi transferida para placas de Cultura de poliestireno, contendo 24 poços. Estas placas foram incubadas a 37 °C em uma incubadora sob agitação (75 rpm) por 90 min para a fase de adesão das células fúngicas. Após os 90 minutos, a suspensão de microrganismos foi removida e os orifícios foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), para a remoção de células não aderidas. Em seguida, 1 mL de TSB foi adicionado aos poços e foram levados para serem incubados novamente na incubadora sob agitação (75 rpm) por 48h para a formação do biofilme. Após este período, a suspensão foi removida, os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

### **3.4 Aplicação dos tratamentos no biofilme**

Para a aplicação da SDT, os biofilmes foram incubados com 1 mL de Cur a 80 µM, com a adição do SDS a 0.01% e as placas foram incubadas no escuro por 20 min. Posteriormente, o transdutor do US foi aplicado sobre os biofilmes por 30 min (grupo SDT). Para o grupo controle, foi adicionado 1 mL da solução contendo salina e SDS e, em seguida, o US foi aplicado sobre os biofilmes por 30 min (Grupo Controle US) .

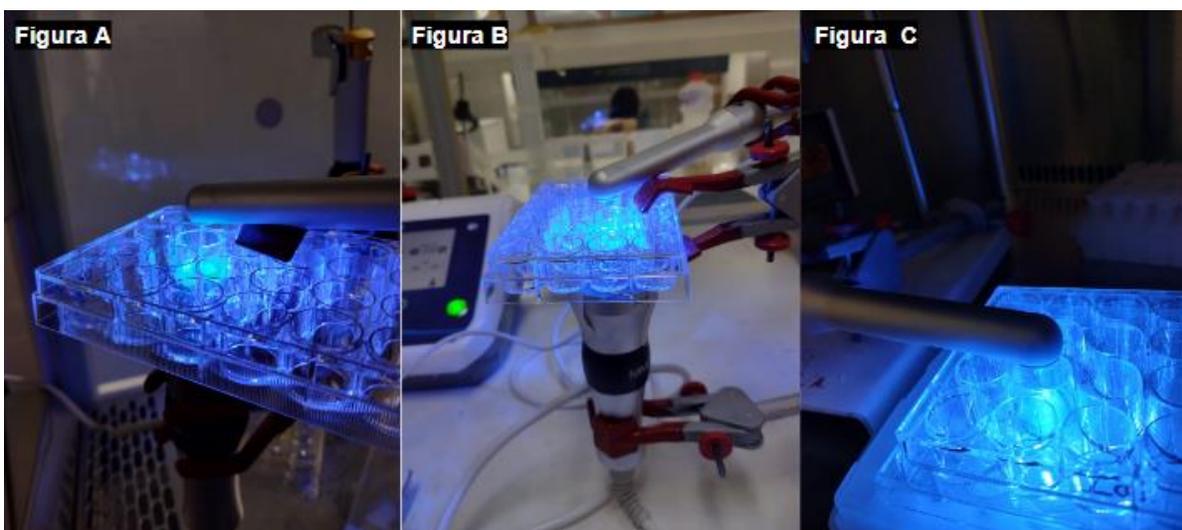
Para a PDT, os biofilmes foram incubados por 20 minutos com 1 mL de Cur a 80 µM com a adição do SDS e, em seguida, as placas foram irradiadas com a Caneta de luz LED azul por 30 min (grupo PDT). Para o grupo controle, foi adicionado 1 mL da solução contendo salina e SDS e, em seguida, a fonte de luz foi aplicada sobre os biofilmes por 30 min (Grupo Controle Luz) .

Também foram realizados testes com grupos PDT+SDT e SDT+PDT. Para o grupo PDT+SDT, os biofilmes foram incubados por 20 minutos com 1 mL de Cur a 80 µM com a adição do SDS e, em seguida, as placas foram irradiadas com a Caneta de luz LED azul por 15 min, em seguida, o transdutor do US foi aplicado sobre os biofilmes por 15 min (Grupo PDT+SDT). Para o grupo controle, foi adicionado 1 mL da solução contendo salina e SDS e, em seguida, a fonte de luz foi aplicada sobre os biofilmes por 15 min, posteriormente, o US foi aplicado sobre os biofilmes por 15 min (Grupos Luz+US).

Para o grupo SDT+PDT, os biofilmes foram incubados por 20 minutos com 1 mL de

Cur a 80  $\mu\text{M}$  com a adição do SDS e, em seguida, o transdutor do US foi aplicado sobre os biofilmes por 15 min, posteriormente, as placas foram irradiadas com a Caneta de luz LED azul por 15 min (Grupo SDT+PDT). Para o grupo controle, foi adicionado 1 mL da solução contendo salina e SDS e, em seguida, US foi aplicado sobre os biofilmes por 15 min, logo depois, a fonte de luz foi aplicada sobre os biofilmes por 15 min (Grupo US+Luz).

Finalmente, para a SPDT, amostras adicionais foram incubadas por 20 min com 1 mL da solução contendo Cur a 80  $\mu\text{M}$  com a adição do SDS e tanto a luz quanto o US foram aplicados simultaneamente nos mesmos parâmetros utilizados na PDT e SDT. Para o grupo controle, foi adicionado 1 mL da solução contendo salina e SDS, e tanto a luz quanto o US foram aplicados simultaneamente nos mesmos parâmetros utilizados para o tratamento SPDT.



**Figura 2.2.** Inativação Sonofotodinâmica (A/B). Inativação Fotodinâmica (C). Fonte: Autoria própria.

Ao término dos tratamentos, os biofilmes foram desprendidos do fundo da placa esfregando-se a ponteira da pipeta por 30 s. Em seguida, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi removida de cada poço e transferida para um eppendorf contendo 900  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril. Este eppendorf foi agitado vigorosamente e uma nova alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi removida do mesmo e colocada em outro eppendorf contendo 900  $\mu\text{L}$  de solução salina. Esse procedimento de diluição seriada foi realizado cinco vezes para cada amostra, obtendo-se diluições de  $10^0$  a  $10^5$ .

As cinco diluições seriadas foram plaqueadas em meio de cultura SDA e as placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C por 48 h na estufa. Em seguida, para determinar a viabilidade celular dos biofilmes, foram calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os tratamentos foram realizados em duplicata em três ocasiões separadas. A Tabela 3 mostra os parâmetros dos grupos de estudo.

**Tabela 3.** Parâmetros dos grupos de estudo.

<b>Grupos</b>	<b>Cur [80µM]</b>	<b>SDS 0,1%</b>	<b>Dose de Luz (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Intensidade de US (W/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>PDI</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>60</b>	<b>-</b>
<b>SDI</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>1</b>
<b>SPDI</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>60</b>	<b>1</b>
<b>SDI + PDI</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>60</b>	<b>1</b>
<b>PDI + SDI</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>60</b>	<b>1</b>
<b>Luz</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>60</b>	<b>-</b>
<b>US</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>1</b>
<b>Controle SPDI</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>60</b>	<b>1</b>
<b>Controle</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

### 3.5 Avaliação do parâmetros do US e Fonte de Luz

Após a avaliação dos maiores parâmetros de ultrassom e luz mencionados no item 3.4, os resultados foram investigados, e foram realizados testes reduzindo-se as doses de ultrassom e luz, de tal forma que pudesse ser obtido o limiar de cada processo, variando os parâmetros de cada equipamento. As condições de parâmetros estão descritas a seguir na tabela 3.1

**Tabela 3.1.** Parâmetros de ultrassom utilizados nesta etapa do estudo.

Grupos	Cur [80µM]	SDS 0,1%	Dose de Luz (J/cm <sup>2</sup> )	Intensidade de US (W/cm <sup>2</sup> )
Varição dos parâmetros de US para SPDI	+	+	60	1, 0.6, 0.3
Controle	-	+	60	1, 0.6, 0.3

Inicialmente, reduziu-se a intensidade do equipamento de ultrassom, em que foram avaliadas as intensidades de 0.3 e 0.6 W/cm<sup>2</sup>. Para a SPDT, as amostras foram incubadas por 20 min com 1 mL da solução contendo Cur a 80 µM com a adição do SDS e tanto a luz quanto o US foram aplicados simultaneamente, sendo o US aplicado na potência de 0.3 ou 0.6 W/cm<sup>2</sup>, mantendo-se a dose de luz fixa em 60 J/cm<sup>2</sup>. Para os grupos controles (Grupo Controle US 0.3 W/cm<sup>2</sup>+Luz e Grupo Controle US 0.6 W/cm<sup>2</sup>+Luz), foi adicionado 1 mL da solução contendo salina e SDS, e tanto a luz quanto o US foram aplicados simultaneamente nos mesmos parâmetros acima. O grupo Controle representou biofilmes que não receberam nenhum tipo de tratamento e fotossensibilizador.

Ao término dos tratamentos, da mesma forma que no item 3.4, foi realizado o teste de viabilidade celular (UFC/mL). Para isso, os biofilmes foram desprendidos do fundo da placa esfregando-se a ponteira da pipeta por 30 s. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi removida de cada poço e transferida para um eppendorf contendo 900 µL de solução salina estéril. Este eppendorf foi agitado vigorosamente e uma nova alíquota de 100 µL foi removida do mesmo e colocada em outro eppendorf contendo 900 µL de solução salina. Esse procedimento de diluição seriada foi realizado cinco vezes para cada amostra, obtendo-se diluições de 10<sup>0</sup> a 10<sup>5</sup>.

As cinco diluições seriadas foram plaqueadas em meio de cultura SDA e as placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C por 48 h na estufa. Em seguida, para determinar a viabilidade celular dos biofilmes, foram calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os tratamentos foram realizados em duplicata em três ocasiões separadas.

**Tabela 1.2** Parâmetros de luz utilizados nesta etapa do estudo.

Grupos	Cur [80µM]	SDS 0,1%	Dose de Luz (J/cm <sup>2</sup> )	Intensidade de US (W/cm <sup>2</sup> )
<b>Varição dos parâmetros de Luz para SPDI</b>	+	+	<b>60, 40, 20</b>	<b>1</b>
<b>Controle</b>	-	+	<b>60, 40, 20</b>	<b>1</b>

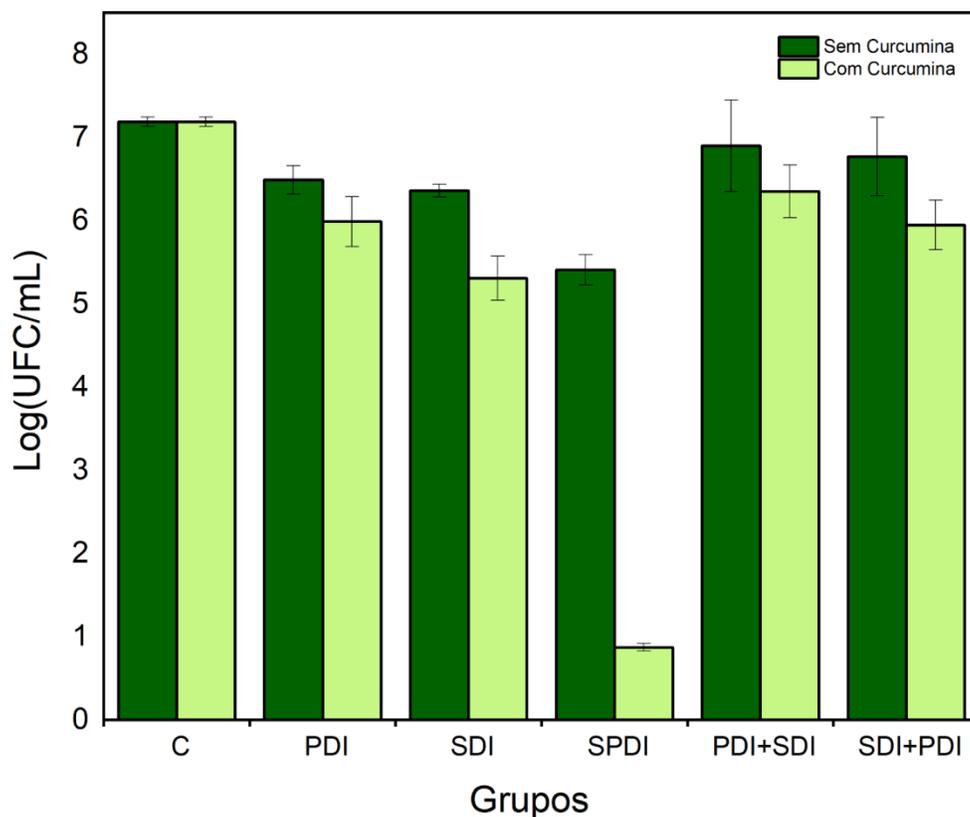
Reduziu-se a dose de luz da caneta de luz LED, em que foram avaliadas as doses de 20 e 40 J/cm<sup>2</sup>. Para a SPDT, as amostras foram incubadas por 20 min com 1 mL da solução contendo Cur a 80 µM com a adição do SDS e tanto a luz quanto o US foram aplicados simultaneamente, sendo a luz aplicada nas doses de 20 e 40 J/cm<sup>2</sup>, mantendo-se o ultrassom na intensidade de 1 W/cm<sup>2</sup>. Para os grupos controles, foi adicionado 1 mL da solução contendo salina e SDS, e tanto a luz quanto o US foram aplicados simultaneamente nos mesmos parâmetros acima. O grupo Controle representou biofilmes que não receberam nenhum tipo de tratamento.

Ao término dos tratamentos, da mesma forma que no item 3.4, foi realizado o teste de viabilidade celular (UFC/mL). Para isso, os biofilmes foram desprendidos do fundo da placa esfregando-se a ponteira da pipeta por 30 s. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi removida de cada poço e transferida para um eppendorf contendo 900 µL de solução salina estéril. Este eppendorf foi agitado vigorosamente e uma nova alíquota de 100 µL foi removida do mesmo e colocada em outro eppendorf contendo 900 µL de solução salina. Esse procedimento de diluição seriada foi realizado cinco vezes para cada amostra, obtendo-se diluições de 10<sup>0</sup> a 10<sup>5</sup>.

As cinco diluições seriadas foram plaqueadas em meio de cultura SDA e as placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C por 48 h na estufa. Em seguida, para determinar a viabilidade celular dos biofilmes, foram calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os tratamentos foram realizados em duplicata em três ocasiões separadas.

Foi realizada análise estatística utilizando ANOVA seguida de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) para comparar o grupo controle com os grupos tratados.

#### Capítulo 4 . Resultados e Discussão



**Figura 3.** Valores médios e desvio padrão de Log(UFC/mL) dos grupos Controle, SDT, PDT e SPDT tratados na presença de Curcumina e SDS e valores médios e desvio padrão de Log(UFC/mL) dos grupos PDT+SDT, SDT+PDT e seus controles tratados na presença de Curcumina e SDS.

A principal ideia deste trabalho é a verificação da combinação e possíveis processos para efeitos cooperativos, baseado no modelo empírico. Observou-se que, dentre os tratamentos realizados, o mais eficaz foi a SPDI ( $p=0$ ), seguida pela SDI ( $p=2,36292E-6$ ) e PDI ( $p=0,00281$ ), assim como mostra a figura 3. Quando os tratamentos foram aplicados na presença de Curcumina e SDS, a SPDI, PDI e SDI foram capazes de reduzir a viabilidade em

6,0; 1,2; 2,0 log, respectivamente, em comparação com o biofilme controle. Os resultados mostraram uma diferença significativa nos valores de UFC/mL para os grupos submetidos à SPDI, PDI e SDI em comparação com os grupos controle (Controle, US, Luz e Luz+US).

Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura em que o tratamento com SPDI foi mais eficaz em reduzir a viabilidade celular de microrganismos. ALVES *et al.* em 2018, realizaram estudos com o fotossensibilizador Rosa Bengala e Photodithazine para a inativação de biofilmes de *Candida albicans*. O estudo realizado mostrou que a SPDI foi mais eficaz na inativação dos biofilmes, do que na aplicação isolada da PDI ou SDI. Os autores utilizaram o US nos parâmetros de 1MHz, em uma intensidade de 2,5 W/cm<sup>2</sup>, em um ciclo pulsado de 50%, com uma frequência de 100 Hz, por 5 min. Para a fonte de luz LED vermelha, utilizaram 25 J/cm<sup>2</sup>.

ALVES *et al.* em 2021, compararam a eficácia dos métodos PDI, SDI e SPDI mediadas pela Curcumina contra o biofilme de *S. aureus*. Além disso, os autores também avaliaram estratégias para melhorar esses tratamentos, como, por exemplo, o uso de iodeto de potássio (KI) com curcumina, o uso de SDS em combinação com o FS e um pré-tratamento com ultrassom. Foi demonstrado que o SPDI foi mais eficaz do que PDI e SDI. O SDS alcançou as reduções de viabilidade mais significativas, seguido pelo KI e pré-tratamento com ultrassom.

MELO *et al.*, 2021 mostrou a eficácia da SPDI contra biofilmes de *S. mutans*, usando a curcumina como FS. Eles utilizaram uma fonte de luz azul com dose de 15 J/cm<sup>2</sup>. Os autores deste estudo também avaliaram a geração de espécies reativas de oxigênio utilizando uma sonda de fluorescência. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a SPDT apresentou uma redução considerável na viabilidade bacteriana, quando os autores compararam com os grupos PDI e SDI.

Portanto, estes achados sugerem que a capacidade do tratamento combinado é importante para a dispersão, absorção e ativação do sensibilizador e, conseqüentemente, para a eficácia do tratamento, e uma maior redução da viabilidade do biofilme. A SPDT busca aliar todos os benefícios da PDT e SDT, com duas fontes de energia, há a possibilidade de auxiliar na dispersão da matriz do biofilme, além de todos os outros benefícios já citados.

Apesar dos resultados apresentados estarem de acordo com a literatura, há fatos importantes a serem destacados. Comparando os grupos Luz e PDI, verifica-se que a diminuição do crescimento do biofilme com a ação da terapia fotodinâmica é aproximadamente 0,5 log. Ao compararmos com os grupos US e SDT, a redução passa a ser 2 log. No entanto, ao compararmos luz+US com o grupo SPDT, observamos quase 4,5 log de diminuição.

Em uma primeira aproximação, poderíamos escrever que a diminuição microbiana é dada por:

$$DM = \frac{0,5 \Delta t (PDT)}{0,5H} + \frac{1 \Delta t (SDT)}{0,5H}$$

Sendo  $\Delta t (PDT)$  o tempo de aplicação da PDT e  $\Delta t (SDT)$  o tempo de aplicação de ultrassom. Isto corresponderia ao efeito combinado quando aplica-se  $\Delta t = \frac{1}{4} h$  (15 minutos), temos:  $DM = \frac{1}{4} + 0,5 = 0,75 \log$ . Isto está longe dos 4,5 log observados. Desta forma, a adição de um termo sinérgico ( $\eta$ ) é necessário. Ou seja, o efeito combinado não é apenas aditivo.

$$DM = \Delta t (PDT) + 2 \Delta t (SDT) + \eta \Delta t (PDT) \times \Delta t (SDT)$$

Pelo resultado  $\eta = 60$  unidades aproximadamente. Este valor representa um enorme efeito sinérgico que vai muito além de pequenas variações dos efeitos individuais. Em princípio a PDT potencializa o SDT e o SDT potencializa a PDT.

Um pouco dos conceitos introduzidos de forma simples na sessão anterior podem ser apurados quando realizados os tratamentos em sequência.

Ao realizarmos a PDT+SDT nesta sequência, com 0,25h (15 minutos) de aplicação de cada nas condições estabelecidas e vice-versa, encontramos que a PDT+SDT leva a  $DM \sim 0,5 \log$ , enquanto a SDT+PDT leva a  $DM \sim 0,75$ .

Se aplicarmos o conceito introduzido temos que:

$$DM1(\text{ Primeiros 15 min})= 0,25 (\Delta t (\text{PDT}) + 0 + 0$$

$$DM1 (\text{ Segundo 15 min})= 0 + 0,25 ( 2 \Delta t \text{ SDT}) + 0$$

$$DM(\text{total}) = 0,25 + 0,5 = 0,75.$$

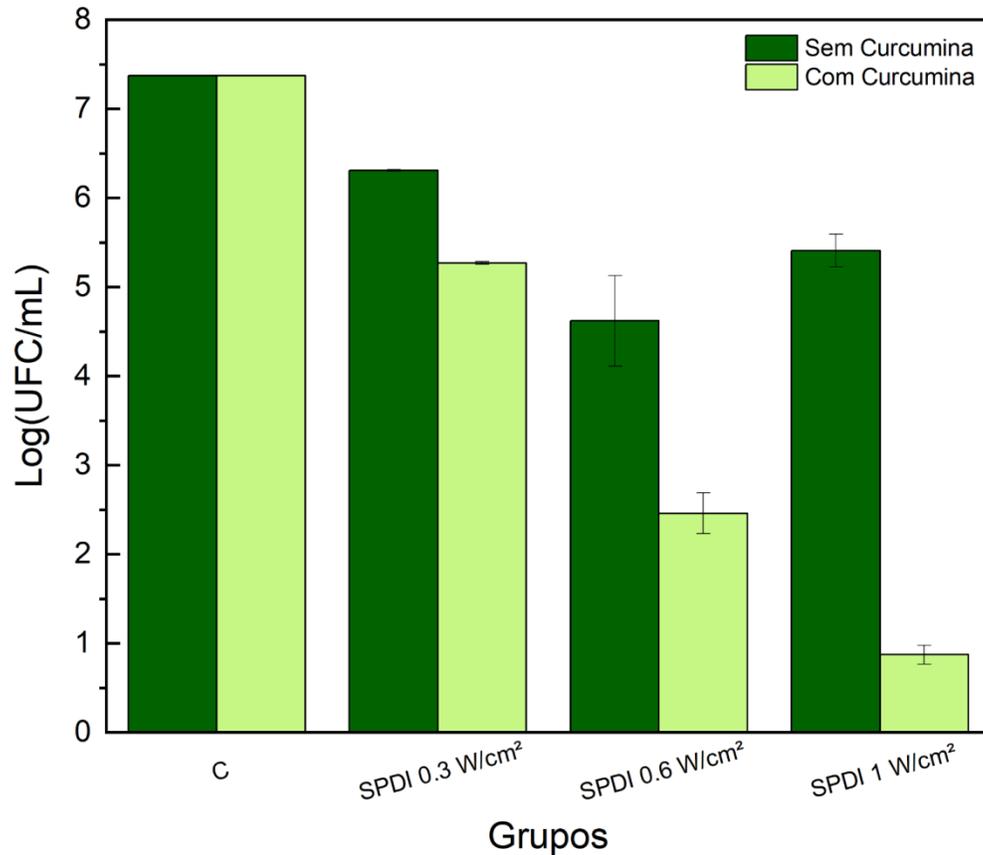
Portanto, para a SDT+PDT teríamos com a aplicação da fórmula

$$DM(\text{total})2 = 0,25 + 0,5 = 0,75.$$

Pelo gráfico da figura 3, podemos observar que a PDT+SDT ( $p= 0,00381$ ) é levemente inferior ao grupo SDT+PDT ( $p= 6,20285E-5$ ). Isto demonstra que o modelo é apenas aproximado, mostrando que os danos causados pela SDT podem facilitar um pouco a PDT, mas o vice-versa pode não corresponder. O experimento, no entanto, mostra que o sinergismo vem principalmente da simultaneidade de PDT e SDT.

Além dos resultados observados pelo modelo empírico, um outro fator que podemos observar é a incorporação da curcumina no biofilme e efeito seu promissor como sonossensibilizador. Os eventos mecânicos proporcionados pelo US também atacam as estruturas celulares, principalmente a membrana plasmática, levando à sonoporação (aparecimento de poros transitórios na membrana), fazendo com que a incorporação da curcumina ocorra de forma eficiente no meio intracelular.

O ultrassom e a luz podem ser tóxicas à células e ao biofilme, uma vez que efeitos físicos de cavitação podem variar a permeabilidade da membrana celular, bem como lisar células e dispersar biofilme, a energia cedida pela luz e pelas bolhas de alta energia já podem produzir radicais oxidativos, que em um longo tempo de exposição pode ser capaz de diminuir a população microbiana. Por fim, ao adicionar o fotossensibilizador mostra a potencialização do tratamento, bem como a potencialização de todos os efeitos citados.

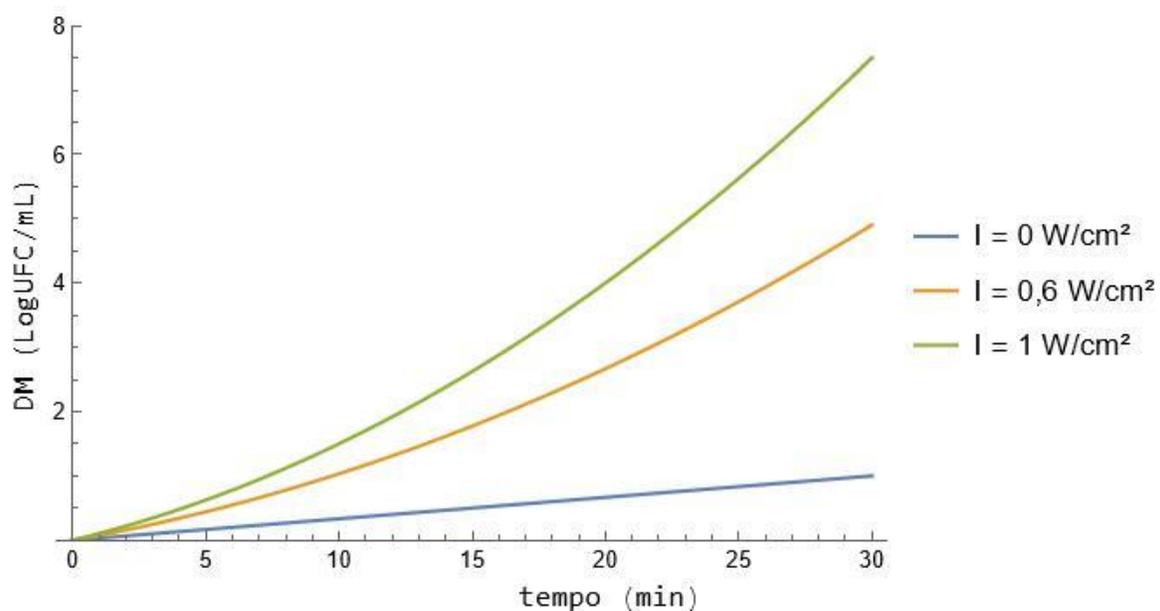


**Figura 3.1.** Valores médios e desvio padrão de Log(UFC/mL) na avaliação dos parâmetros do US na eficácia da SPDI.

Os resultados do experimento que está representado na figura 3.1 servem para a melhoria do modelo. Podemos usar o fato que os gráficos em escalas decimais logarítmicas (décadas de diminuição microbiana) revelou que em relação ao grupo controle, indo de 0.3 W/cm<sup>2</sup> de US para 0.6 W/cm<sup>2</sup>, a redução dobrou para um modelo linear com a potência de US. Isto torna a DM em décadas de redução para 60 J/cm<sup>2</sup> de PDT.

$$DM = \frac{\Delta t (PDT = 60J)}{\Delta t (Total)} + \frac{2 \Delta t (US)}{\Delta t (Total)} \times \frac{Potência (W)}{1W} + \frac{\eta \times \Delta t (PDT = 60J) \times \Delta t (US)}{\Delta t (Total)} \times \frac{Potência (W)}{1W}$$

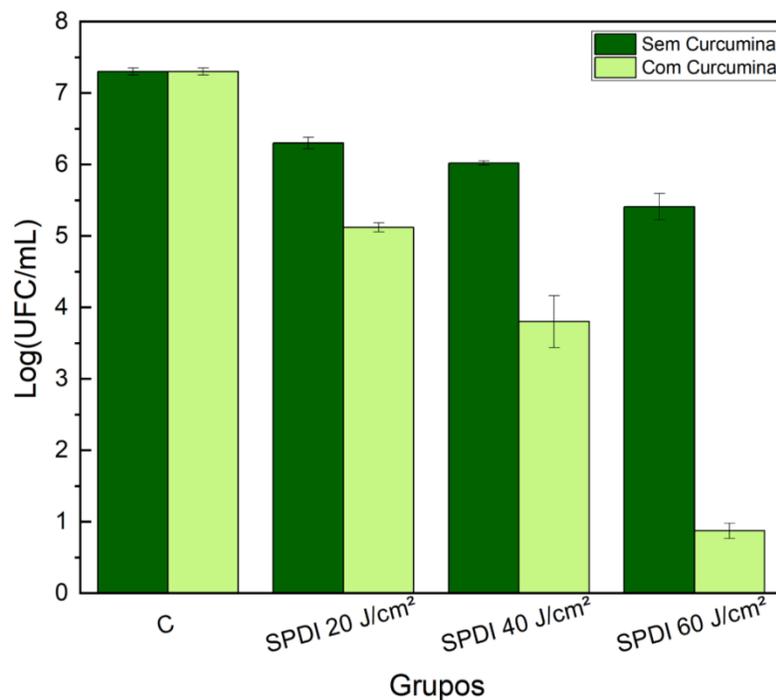
A equação foi feita a partir do modelo empírico e seu resultado. É apenas uma aproximação, no qual a DM (diminuição microbiana) ela é dependente de um tempo total de aplicação de tratamento, de uma intensidade de ultrassom, de um tempo de PDI e de uma dose fixa de luz. Na equação, o fator  $\eta$  representa sinergismo, que acontece quando luz e ultrassom são aplicados simultaneamente.



**Figura 3.3.** Gráfico da dinâmica temporal variando as intensidades de ultrassom de acordo com a diminuição microbiana.

O gráfico 3.2 representa a dinâmica temporal baseado na equação acima. Entre os grupos SPDI, o aumento da intensidade do US, representa um aumento da inativação, de uma forma linear, como podemos observar no gráfico acima, ao diminuir os parâmetros de intensidade do ultrassom é possível observar a perda de eficiência no tratamento, como esperado, uma vez que há uma menor energia sendo inserida ao sistema. Para uma maior redução, nesses parâmetros só é possível obter na maior intensidade de ultrassom testada no grupo SPDI. Portanto, isto indica que essas intensidades maximizam os efeitos na presença da curcumina. Esses resultados podem sugerir que a força mecânica empregada pelo

ultrassom pode auxiliar no rompimento da matriz EPS, e que as unidades formadoras de colônias não representam mais células, apenas mais células dispersas como demonstraram Bharatula et al em 2020. Esses efeitos podem explicar o efeito sinérgico na intensidade do ultrassom no grupo SPDI. Gobbo et. al, em 2021 demonstraram uma maior efetividade do grupo SPDI em comparação aos tratamentos separados e seu controle L + US, em biofilme de *Streptococcus mutans* e curcumina, com redução de 3,8 logs de UFC/ml (SPDI) em relação ao controle escuro, em relação ao aumento de intensidade do ultrassom. Yasine et al em 2022, mostraram mais efeitos no biofilme de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em grupos SPDI com nanoformulações de curcumina em comparação com grupos controle ou com as terapias separadas. Eficácia de mais de 50% e 30% são obtidos para grupos SDPI de *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. O microscópio eletrônico de varredura também indica mais ruptura e desprendimento para esses grupos, levando a amostras mais finas.



**Figura 3.3** Valores médios e desvio padrão de Log(UFC/mL) na avaliação de parâmetros da dose de luz na eficácia da SPDI.

A figura 3.3 representa a diminuição da dose de luz para avaliar os parâmetros na eficácia da SPDI. Reduzindo a dose de luz, e mantendo os parâmetros do US, os resultados mostraram que com doses baixas a eficácia do tratamento diminui, e com doses maiores, temos maior eficácia, conseqüentemente, maior mortalidade microbiana. A hipótese de que apenas o ultrassom e a luz podem ser tóxicas à células e ao biofilme é sustentada, uma vez que efeitos físicos de cavitação podem variar a permeabilidade da membrana celular, bem como lisar células e dispersar biofilme, a energia cedida pela luz e pelas bolhas de alta energia já podem produzir radicais oxidativos na presença de um fotossensibilizador, e com maiores intensidades de dose de luz, pode ser capaz de diminuir ainda mais a população microbiana. Por fim, a comparação ao adicionar o fotossensibilizador mostra a potencialização do tratamento, bem como a potencialização de todos os efeitos citados.

## **Capítulo 5. Conclusões**

Em conclusão, a PDI é uma abordagem promissora e tem revelado bons resultados para a inativação antimicrobiana, no entanto, este tratamento tem algumas limitações, como a penetração da luz, principalmente quando os microrganismos estão organizados como biofilmes. O uso de ultrassom em vez de luz para excitar o FS (SDI), apareceu para superar as limitações da PDI, uma vez que as ondas de ultrassom apresentam maior efeito em atingir camadas mais profundas dos biofilmes. Além disso, o ultrassom tem a capacidade de romper o biofilme através de forças mecânicas. O presente estudo demonstrou que a SPDI alcançou a maior inativação, quando comparada com a PDI e SDI. Esses resultados reforçam e incentivam o uso desse tratamento para doenças microbianas, que combina propriedades mecânicas do US e com a capacidade da luz para ativar o FS. Além disso, o grupo SDI+PDI foi mais eficaz em comparação ao grupo PDI+SDI. Desta forma, é possível supor que a aplicação do US primeiro facilita a ação da PDI em seguida, resultando em morte celular.

Reduzindo-se os parâmetros de US e mantendo os de luz, os resultados mostraram que com doses baixas de US, diminui a efetividade do tratamento, e com doses maiores, a efetividade é maior, portanto, o US possui um papel fundamental na efetividade. Além desses

fatores, o trabalho desenvolveu uma equação baseada na diminuição microbiana, que é dependente da intensidade de ultrassom, tempo de aplicação, dose de luz, e tempo de aplicação da luz.

O presente trabalho também buscou avaliar o papel da luz na eficácia do tratamento, sendo assim, reduzindo a dose de luz, e mantendo os parâmetros do US, os resultados mostraram que com doses baixas a eficácia do tratamento diminuiu, e com doses maiores, temos maior eficácia, conseqüentemente, maior mortalidade microbiana.

Portanto, a inativação sonofotodinâmica tem uma melhor atividade contra o biofilme de *Candida albicans* em comparação com SDI e PDI. Pode sugerir a ação sinérgica de fotoquímicos e fotofísicos aos efeitos sonoquímicos e sonofísicos. Além disso, tem uma dose e intensidade de perfil responsivo ao ultrassom, mas existe um limite, assim como a dose de luz. Esses resultados sugerem que pode ser uma alternativa aos tratamentos convencionais e até mesmo para o controle da disseminação da resistência antimicrobiana.

Por isso, o uso da luz em combinação com o US é uma opção promissora alternativa para superar limitações da PDI e SDI. Esses aspectos reforçam e incentivam o uso e avaliação da SPDI para doenças microbianas.

## Referências

ALVES, Fernanda; PAVARINA, Ana; MIMA, Ewerton; MCHALE, Anthony; CALLAN, John. **Antimicrobial sonodynamic and photodynamic therapies against *Candida albicans***. *Biofouling*, v. 34, n. 4, p. 357-367, 2018.

ALVES, Fernanda; GUIMARÃES, Gabriela; INADA, Natália; PRATAVIEIRA, Sebastião; BAGNATO, Vanderlei; KURACHI, Cristina. **Strategies to Improve the Antimicrobial Efficacy of Photodynamic, Sonodynamic, and Sonophotodynamic Therapies**. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 53, n. 8, p. 1113-1121, 2021.

Alves, F.; Ayala, E. T. P.; Pratavieira, S. **Sonophotodynamic inactivation: the power of light and ultrasound in the battle against microorganisms**. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 7, 2021.

BAGNATO, Vanderlei; INADA, Natália; BLANCO, Kate. **Controle microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos, Compacta Gráfica Editora, 2017.

BAYONA, Juan; PALOP, Nuria; GARCIA, Carme; ESCRIVÁ, Begona; AVINÓ, Mercedes; GARCIA, Pilar; CARDOMNA, Concepción. **Impact of the SARS-CoV-2 Pandemic in Candidaemia, Invasive Aspergillosis and Antifungal Consumption in a Tertiary Hospital**. *J.Fungi*, v.7, n.6, p. 1-9, 2021.

BHARATULA, Lakshmi; MARSILI, Enrico; RICE, Scott; KWAN, James. **Influence of High Intensity Focused Ultrasound on the Microstructure and c-di-GMP Signaling of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms**. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020.

BONGOMIN, Felix; GAGO, Sara; OLADELE, Rita; DENNING, David. **Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision**. *Journal Fungi*, v.3, n.4, 2017.

BONNET, Raymond; MARTINEZ, Gabriel. **Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy**. Tetrahedron, v. 57, n.47, p. 9513-9547, 2001.

Brasil Escola, Curcuma Longa-Açafrão-da-terra. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/saude/curcuma.htm>>. Acesso em: 03/01/2023.

CAMPANHA, Nara Hellen. **Efeito da irradiação com microondas sobre células de Candida albicans**. 2005. 156 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2005. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/105500>>.

Choi, V.; Rajora, M. A.; Zheng, G. **Activation drugs with sound: mechanisms behind sonodynamic therapy and the role of nanomedicine**. Bioconjugate chemistry, v. 31, p. 967-989, 2020.

COSTERTON, JW; STEWART, Phillips; GREENBERG, E.P. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. Science, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DIAS, Lucas; BLANCO, Kate; TYNGA, Ivan; INADA, Natália; BAGNATO, Vanderlei. **Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy**. Journal of Photochemistry and Photobiology Photochemistry Reviews, v. 45, p. 2-29.

DONELLEY, Ryan; MCCARRON, Paul; TUNNEY, Michael. **Antifungal photodynamic therapy**. Microbiological Research, v. 163, p. 1-12, 2008.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. **Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms**. Clin. Microbiol. Rev. ,Washington, v. 15, n. 2, p.167-193, 2002.

FAN, L *et al.* **Sonodynamic antimicrobial chemotherapy: An emerging alternative strategy for microbial inactivation**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 75, 2021.

FLAMMING, Hans; WINGENDER, Jost. **The biofilm matrix**. Nature Review Microbiology, v.8, p.623-633, 2010.

GARBUIO, Matheus. **Co-cristalização da Curcumina com D-Mantinol: Caracterização, monitoramento da resistência e aplicações sobre larvas do Aedes aegypti**. Tese (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

GOBBO, Priscila; BESEGATO, João; BERNARDI, Adilson; BAGNATO, Vanderlei; RASTELLI, Alessandra. **Can sono-photodynamic therapy enhance the antibacterial effect of curcumin against *Streptococcus mutans* biofilm?**. Laser Physics Letters, v. 18, n. 10, 2021.

HAMBLIN, Michael. **Potential of antimicrobial photodynamic inactivation by organic salts**. Expert Review of Anti-infective Therapy, v.15, n.11, p. 1059- 1069, 2017.

HOENIGL, Martin; SEIDEL, Danila; SPRUTE, Rosanne; CUNHA, Cristina; OLIVEIRO, Matteo; GOLDMAN, Gustavo; IBRAHIM, Ashraf; CARVALHO, Agostinho. **COVID-19-associated fungal infections**. Nature Microbiology, v.7, p. 1127–1140, 2022.

HU, Kun et al. **Core–shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein–pectin nanoparticles**. Food chemistry, v. 182, p. 275-281, 2015.

KAINZ, Katharina; BAUER, Maria; MADEO, Frank; GUTIERREZ, Didac. **Fungal infections in humans: the silent crisis**. Microbial Cell, v.7, n.6, p. 143–145, 2020.

Kwiatkowski, S. et al. **Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations**. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 106, p. 1098-1107, 2018

LEE, Yunjin; PUUMALA, Emily; ROBBINS, Nicole; COWEN, Lea. **Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in Candida albicans and Beyond**. Chemical Reviews, v. 121, p. 3390–3411, 2021.

Martins, Y. A.; Pavan, T. Z.; Lopez, R. F. V. **Sonodynamic therapy: ultrasound parameters and in vitro experimental configurations**. International Journal of Pharmaceuticals, v. 610, 2021.

MAZZARINO, L., 2013. Disponível em <[https://www.researchgate.net/figure/Figura-8-Estrutura-quimica-dos-curcuminoides-curcumina-A-demetoxicurcumina-B-e\\_fig7\\_278644558](https://www.researchgate.net/figure/Figura-8-Estrutura-quimica-dos-curcuminoides-curcumina-A-demetoxicurcumina-B-e_fig7_278644558)>.

MELO, Priscila; BESEGATO, João; BERNARDI, Adilson; BAGNATO, Vanderlei; RASTELLI, Alessandra. **Can sono-photodynamic therapy enhance the antibacterial effect of curcumin against Streptococcus mutans biofilm?**. Laser Physics Letters, v. 18, p. 1-11, 2021.

PASCHOAL, M. A., et al. **Photodynamic potential of curcumin and blue LED against Streptococcus mutans in a planktonic culture**. Photodiagnosis and photodynamic therapy, v. 10, n. 3, p. 313-319, 2013.

RAMAGE Gordon; RAJENDRAN Ranjith; SHERRY Leighann; WILLIAMS Craig. **Fungal Biofilm Resistance**. International Journal of Microbiology, v.2012, p.14, 2009.

RENGENG Liu, QIANYU Zhang, YUEHONG Lang, ZHONGZHONG Peng, LIBO Li. **Sonodynamic therapy, a treatment developing from photodynamic therapy**. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. v.19, p.159-166, 2017.

SUZUKI, Luis Claudio. Desenvolvimento de biofilme formado por Candida albicans in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. 2009. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Matérias)- Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAUB, Amy. **Photodynamic therapy: other uses**. Dermatol Clinics, v.25, p.101-109, 2007.

VIEIRA, Ana Júlia; SANTOS, Jairo. **Mecanismos de resistência de Candida albicans aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina**. RBAC, v.49, n. 3, p. 235-238, 2017.

WALL, Gina; JAUREGUI, Daniel; BONIFACIO, Bruna; RIBOT, Jose; UPPULURI, Priya. **Candida albicans biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis**. Current Opinion in Microbiology, v. 52, p. 1-6, 2019.

WISCHHUSEN, J; PADILLA, F. **Ultrasound-target microbubble destruction (UTMD) for localized drug delivery into tumor tissue**. Biomedical Ultrasound, v. 20, p. 10-15, 2019.

YASINI, Zahra; ROGHANIZAD, Nasrin; FAZLYAB, Mahta; POURHAJIBAGHER, Maryam. **Ex vivo efficacy of sonodynamic antimicrobial chemotherapy for inhibition of Enterococcus faecalis and Candida albicans biofilm**. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 40, 2022.

Yasui, K. Acoustic Cavitation and Bubble Dynamics. Japan, 2018.

