



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



**Inativação fotodinâmica da bactéria *Staphylococcus aureus*
resistente à meticilina: avaliação de doses fracionadas de luz e
fotossensibilizador curcumina**

Taina Cruz de Souza Cappellini

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

Coorientadora:

Dra. Alessandra Ramos Lima

bolsista CAPES - 88887.852963/2023-00

**São Carlos - SP
2025**

TAINA CRUZ DE SOUZA CAPPELLINI

**Inativação fotodinâmica da bactéria *Staphylococcus aureus*
resistente à meticilina: avaliação de doses fracionadas de luz e
fotossensibilizador curcumina**

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

Coorientador:

Dra. Alessandra Ramos Lima

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
Universidade de São Paulo – USP

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Universidade Federal de São Carlos- UFSCar

Prof. Dr. Lucas Danilo Dias
Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA

São Carlos

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Relatório de Defesa de Dissertação

Candidata: Taina Cruz de Souza Cappellini

Aos 25/02/2025, às 10:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: Inativação fotodinâmica da bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina: avaliação de doses fracionadas de luz e fotossensibilizador curcumina, apresentada pela candidata Taina Cruz de Souza Cappellini. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Prof. Dr. Lucas Danilo Dias

Função	Instituição	Conceito	Resultado Final
Presidente	USP	<u>Aprovado</u>	
Titular	UFSCar	<u>Aprovado</u>	
Titular	UniEVANGÉLI CA	<u>Aprovado</u>	<u>Aprovado</u>

Parecer da Comissão Julgadora*:

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Cláudia Regina Pastega, representante do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Representante do PPG: Cláudia Regina Pastega

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Prof. Dr. Lucas Danilo Dias

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Vanderlei Salvador Bagnato, Cristina Paiva de Sousa, Lucas Danilo Dias e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ao) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.



Documento assinado digitalmente
VANDERLEI SALVADOR BAGNATO
Data: 24/03/2025 13:44:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

(X) Não houve alteração no título () Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Taina Cruz de Souza Cappellini, realizada em 25/02/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (USP)

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar)



Documento assinado digitalmente
CRISTINA PAIVA DE SOUSA
Data: 24/03/2025 14:43:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lucas Danilo Dias (UniEVANGÉLICA)



Documento assinado digitalmente
LUCAS DANILO DIAS
Data: 25/02/2025 15:48:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade e realização de um sonho de fazer parte de duas universidades públicas (UFSCar e USP) e poder desenvolver o meu trabalho em locais com tanto a agregar e me fazer crescer profissionalmente. Além disso, agradeço a ele por me manter firme e não desistir mesmo após momentos difíceis.

Gostaria de agradecer a minha família, mais especificamente meu avô Ruy e minha tia Claudia, por tanto amor e apoio me dado, sem vocês não seria possível chegar até aqui.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato e minha coorientadora Dra. Alessandra R. Lima pela oportunidade de trabalhar com ambos, como também por toda ajuda e aprendizado, foi muito gratificante para mim.

Aos meus amigos de laboratório que estavam presente no meu dia a dia, me ajudando nos detalhes do meu trabalho e me fazendo rir, tornando toda a jornada mais leve.

Aos colegas do apoio técnico Gustavo e Richard (LIEPO) e Renato (LAT) que realizaram a montagem da célula experimental dos ensaios de análise de oxigênio, como também me auxiliaram em momentos experimentais.

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

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu eu do passado, que foi capaz de se manter em pé e seguir em frente, mesmo depois de várias pessoas me deixaram no chão.

Cappellini, Taina Cruz de Souza. **Inativação fotodinâmica de bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina: avaliação de doses fracionadas de luz e fotossensibilizador curcumina**. 2025. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2025.

RESUMO

O surgimento de bactérias resistentes na comunidade e em ambiente hospitalar pode ser consequência do uso excessivo e indevido dos antibióticos ao longo do tempo, colocando em risco a saúde da população mundial. Devido a resistência bacteriana, tem aumentado a busca de métodos alternativos para tratar infecções causadas por microrganismos. A inativação fotodinâmica (IFD) tornou-se foco de estudo para o tratamento de infecções bacterianas, que se baseia em uma substância fotossensível, luz e oxigênio molecular. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de diferentes concentrações do fotossensibilizador (FS) curcumina, juntamente com variações nas entregas da dose de luz para inativar a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), obtido por isolado clínico. Foi realizado o estudo da fotodegradação da curcumina nas concentrações de 10, 20 e 40 μM , iluminada com luz de 450 nm, com dose de 57,6 J/cm^2 , ao longo de 24 min, acompanhado por espectroscopia de absorção ultravioleta visível e fluorescência molecular. Além disso, também foi acompanhado o processo de internalização da curcumina (10 μM) por microscopia confocal pela MRSA por 20 min. Os ensaios de IFD com MRSA foram divididos em etapas, na primeira foi realizado a IFD convencional com diferentes concentrações (5, 10 e 15 μM) e iluminados em 450 nm nas doses de energia (5, 10 e 15 J/cm^2). Na segunda etapa, após otimização do resultado da IFD convencional, realizou a IFD fracionada fixando a concentração do FS em 10 μM e variando as doses de energia com intervalos de 10 e 30 minutos. Com isso, foram realizados experimentos por microscopia confocal de viabilidade celular da MRSA, após tratamento com IFD fracionada e intervalos de 30 min. Os experimentos de análise de concentração de oxigênio foram realizados por um eletrodo, monitorando a porcentagem de O_2 em solução de curcumina a 10 μM . Os resultados da IFD convencional demonstraram efetividade na inativação da bactéria MRSA nas concentrações de 5, 10 e 15 μM para as doses energia avaliadas. No entanto, a redução mais significativa foi de 3,41 e 4,34 logs e 3,51 e 4,95 logs para as concentrações 10 e 15 μM nas doses de 10 e 15 J/cm^2 com a IFD convencional, respectivamente. Na IFD fracionada, o resultado de maior significância foi de 5,67 logs de redução do microrganismo com a dose energia de 10 J/cm^2 fracionados com intervalos de 30 minutos, quando comparada a IFD convencional na dose contínua de 10 J/cm^2 . Houve também efetividade na dose de energia de 15 J/cm^2 com intervalos de 10 e 30 minutos, comparando-a com a convencional, com redução de 4,96 e 5,45 logs, respectivamente. Através da sonda dihidroetídio (DHE) analisou-se a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) da solução de curcumina, a partir da irradiação de forma contínua e fracionada com intervalos de 10 e 30 min. Foi concluído que o fracionamento das doses de energia demonstrou potencial para alcançar melhores resultados em comparação com a aplicação de doses contínuas, mostrando uma abordagem mais eficaz para a inativação da bactéria em estudos microbiológicos. No entanto, são necessários mais estudos para determinar parâmetros ideais que melhorem a eficiência do processo fotodinâmico.

Palavras-chave: inativação fotodinâmica, fotodegradação, fracionada, curcumina, bactérias resistentes, antibióticos.

Cappellini, Taina Cruz de Souza. **Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteria: evaluation of fractionated doses of light and photosensitizer curcumin**. 2025. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2025.

ABSTRACT

The emergence of resistant bacteria in the community and hospital environment may be a consequence of the excessive and improper use of antibiotics over time, putting the health of the world population at risk. Due to bacterial resistance, we have sought alternative methods to treat infections caused by microorganisms. Photodynamic inactivation (PDI) has become a focus of study for the treatment of bacterial infections, which is based on a photosensitive substance, light and molecular oxygen. The objective of this study was to evaluate the action of different concentrations of the photosensitizer (PS) curcumin, together with variations in the delivery of the light dose to inactivate the bacterium methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), obtained by clinical isolate. The study of the photodegradation of curcumin at concentrations of 10, 20 and 40 μM , illuminated with 450 nm light, with a dose of 57.6 J/cm^2 , over 24 min, was carried out, accompanied by ultraviolet-visible absorption spectroscopy and molecular fluorescence. In addition, the process of curcumin internalization (10 μM) by MRSA was also monitored by confocal microscopy for 20 min. The IFD assays with MRSA were divided into stages. In the first stage, a conventional IFD was performed with different concentrations (5, 10, and 15 μM) and illuminated at 450 nm at energy doses (5, 10, and 15 J/cm^2). In the second stage, after optimizing the result of the conventional IFD, a fractional IFD was performed by fixing the FS concentration at 10 μM and varying the energy doses at intervals of 10 and 30 minutes. Thus, confocal microscopy experiments of MRSA cell predictions were performed after treatment with fractional IFD and at intervals of 30 min. The oxygen concentration analysis experiments were performed by an electrode, monitoring a percentage of O_2 in a 10 μM curcumin solution. The results of conventional IFD demonstrated effectiveness in inactivating MRSA bacteria at concentrations of 5, 10, and 15 μM for the energy doses evaluated. However, the most significant reduction was 3.41 and 4.34 logs and 3.51 and 4.95 logs for concentrations of 10 and 15 μM at doses of 10 and 15 J/cm^2 with conventional IFD, respectively. In fractionated IFD, the most significant result was 5.67 logs of reduction of the microorganism with the energy dose of 10 J/cm^2 fractionated at 30-minute intervals, when compared to conventional IFD at the continuous dose of 10 J/cm^2 . There was also effectiveness at the energy dose of 15 J/cm^2 with intervals of 10 and 30 minutes, compared to the conventional one, with reductions of 4.96 and 5.45 logs, respectively. The formation of reactive oxygen species (ROS) in the curcumin solution was analyzed using the dihydroethidium (DHE) probe, after continuous and fractional irradiation at intervals of 10 and 30 min. It was concluded that the fractionation of energy doses demonstrated the potential to achieve better results compared to the application of continuous doses, showing a more effective approach for the inactivation of bacteria in microbiological studies. However, further studies are needed to determine the ideal parameters that improve the efficiency of the photodynamic process.

Keywords: photodynamic inactivation, photodegradation, fractional, curcumin, resistant bacteria, antibiotics.

Lista de abreviações e símbolos

ALA – Ácido α -aminolevulínico

ATP- Adenosina trifosfato

BHI – Brain Heart Infusion

Ciclo TCA – Ciclo tricarboxílico

CIS – Cruzamento de intersistemas

°C – Graus celsius

DHE – Dihidroetídio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

E⁺ - Etídio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FS – Fotossensibilizador

HAL – Hexaminoleuvilinato

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IFD – Inativação Fotodinâmica

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

J/cm² – Joule por centímetro quadrado

LAT – Laboratório de Apoio Técnico

LED – Diodo emissor de luz

LD – Live/Dead

MIC – Concentração inibitória mínima

MRGN - Bactérias gram-negativas multirresistentes

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

nm – Nanômetros

PI - Iodeto de propídio

PBP – Penicilin Binding Protein

PBS – Tampão fosfato-salino

RNA - Ácido ribonucleico

S₀ – Estado fundamental singleto

S₁ – Estado singleto excitado

tRNA - Ácido ribonucleico transportador

TDF – Terapia Fotodinâmica

T₁ – Estado tripleto excitado

UFC – Unidade formadora de colônias

UV-vis – Ultravioleta visível

VRE - *Enterococcus spp* resistente a vancomicina

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma de disponibilidade de antibióticos para a comunidade e o provável período de surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos. Os antibióticos citados são comumente utilizados para o tratamento de infecções, denominados penicilina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina, metilicina e gentamicina. As bactérias presentes na imagem são as mais comuns encontradas em infecções, sendo elas dos gêneros <i>Enterococcus</i> e <i>Genococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , VRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina), VRE (<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina), MRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina) e <i>Klebsiella pneumoniae</i> Fonte: Adaptada do autor Munir <i>et al.</i> , 2020.	13
Figura 2: Representação simplificada do Diagrama de Jablonski. O fotossensibilizador (FS) quando iluminado por uma luz visível sai de seu estado fundamental singleto (S_0) para seu estado de mais alta energia (S_1). Com isso, pode ocorrer o Cruzamento de Intersistemas (CIS), onde o FS passará de seu estado S_1 para o estado tripleto (T_1). Neste momento, a interação com o oxigênio pode ser de dois modos, do Tipo 1 em que será transferido elétrons, e por meio disso serão geradas as espécies reativas, ou do Tipo 2, que ocorre a transferência de energia, gerando como subproduto o oxigênio singleto. Fonte: Autoria própria (2024).	14
Figura 3: Estrutura química da curcumina obtida através do software MolView.	15
Figura 4 - As bactérias gram-positivas apresentam uma espessa camada de peptidoglicano, externamente à sua membrana plasmática formada por uma bicamada fosfolipídica. Fonte: Autoria própria (2024).	17
Figura 5: Representação simplificada de uma célula bacteriana, em que estão presentes seus componentes intracelulares, como DNA, parede celular, RNA, proteínas, ribossomos, membrana plasmática, plasmídeo e citoplasma. Estão presentes também alguns mecanismos de resistência desenvolvidos por bactérias, como bombas de efluxo, alterações no sítio de ação, alteração na permeabilidade da membrana e mecanismo enzimático. Abreviações: ATM: Antimicrobiano, DNA: Ácido Desoxirribonucleico e RNA: Ácido Ribonucleico. Autoria própria (2025).	22
Figura 6: Perfil espectral do LED de luz azul utilizado nos experimentos de IFD, fotodredação e EROs correspondente ao comprimento de onda de 450 nm.	26
Figura 7: Diagrama de desenvolvimento do processo de IFD. Autoria própria (2024). Abreviações: IFD: Inativação Fotodinâmica; Ex.: Exemplo; FS: Fotossensibilizador; EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.	35
Figura 8: Espectro de absorção e fluorescência da curcumina a 10, 20 e 40 μM , em função da dose de energia de 57,8 J/cm^2 na intensidade de 40 mW/cm^2 . A (a) apresenta a banda de absorção da curcumina nas concentrações de 40 μM , nos tempos 0, 14 e 24 min. A (b) apresenta a banda de fluorescência da curcumina nas concentrações de 40 μM , nos tempos 0, 14 e 24 min. A letra (c) representa a absorção da luz azul pela curcumina e sua degradação quando iluminada de 1 em 1 minuto, por 24 min. A letra (d) representa a fluorescência da curcumina e seu decaimento conforme foi iluminada de 1 em 1 minuto, por 24 minutos.	36
Figura 9: A Figura (a) representa o aumento da intensidade de fluorescência normalizada em função do tempo de exposição do FS a bactéria. Conforme a curcumina 10 μM entra na bactéria, há o aumento da fluorescência. As Figuras (b) e (c) referem-se a entrada de curcumina na célula e o acúmulo no meio do intracelular, por meio da captação de imagem de microscopia confocal. A Figura (b) representa o tempo inicial da internalização e Figura (c) o fim da internalização, após 20 min.	39
Figura 10: Redução de logs de MRSA no processo de IFD convencional em relação ao controle microbiano. Nas concentrações de 5, 10 e 15 μM de curcumina, aplicando as doses de energia de 5, 10 e 15 J/cm^2 contra a bactéria MRSA.	41
Figura 11: Processo de IFD fracionado com curcumina 10 μM , intervalos de 10 min e 30 min em logs de remoção de MRSA. O eixo X representa os tratamentos, em que os grupos 5+i, 5+i+5, 5+i+5+i e 5+i+5+i+5 são de modo fracionado. entre as doses de 5 J/cm^2 . O eixo Y representa a remoção de logs de MRSA. A letra “i” representa os intervalos de 10 min e os intervalos de 30 min.	44
Figura 12: Representação das terapias de inativação fotodinâmica de modo convencional e fracionado com a concentração de 10 μM de curcumina. O eixo Y representa a remoção de logs da bactéria MRSA em log (UFC/mL) e o eixo X representa as condições da entrega de luz contra este microrganismo, em que a letra “i” representa os intervalos de 10 e 30 min dados entre as doses na IFD fracionada. As linhas são referentes a IFD convencional e as colunas referem-se a IFD fracionada. As letras “a, b, c, d, e” representam semelhança entre estes resultados, estatisticamente.	49

Figura 13: Imagens de microscopia confocal de IFD fracionada com 30 min de intervalos na bactéria MRSA. Concentração de 10 μM de curcumina e aplicadas doses de luz de 5 J/cm^2 . (a) se refere ao grupo ao grupo controle, (b) à 5 J/cm^2 , (c) a 5+i, (d) a 5+i+5, (e) a 5+i+5+i, (f) a 5+i+5+i+5 e (f) à 5+i+5+i+5+i.	51
Figura 14: Representação gráfica de células viáveis e não viáveis após tratamento IFD fracionada, utilizando concentração de curcumina de 10 μM e aplicadas doses de luz de 5 J/cm^2 e intervalos de 30 min.	53
Figura 15: Monitoramento da concentração (mg/L) de oxigênio na amostra de curcumina (10 μM) por eletrodo. A Figura (a) se refere ao monitoramento de oxigênio ao longo de 30 min quando injetado nitrogênio na amostra. A Figura (b) representa a iluminação da solução de curcumina (10 μM), aplicada dose de 72 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 , monitorada de 2 em 2 min.	54
Figura 16: (a) Análise da medida de fluorescência da sonda DHE (20 μM) em água, excitação 500 e emissão 510 e (b) absorção UV-Vis em 345 nm. A solução foi iluminada de 1 em 1 minuto, por 25 minutos consecutivos, com a dose de luz de 2,4 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 .	56
Figura 17: Análise da geração de EROs por meio da sonda DHE (20 μM) e do FS curcumina (10 μM). (a) fluorescência emissão 610 nm corresponde a emissão de fluorescência da sonda DHE quando excitada em 500 nm e emitida em 510 nm e (b) absorbância 430 nm, corresponde a absorção de luz e degradação da molécula de curcumina. A iluminação foi realizada de 1 em 1 minuto por 25 minutos, com a dose de luz total de 60 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 .	57
Figura 18: Análise da geração de EROs em função do tempo de modo fracionado por meio da sonda fluorescente DHE (20 μM) e do FS curcumina (10 μM). (a) fluorescência emissão 610 nm corresponde a emissão de fluorescência da sonda DHE, excitada em 500 nm e emitida em 510 nm e (b) absorbância 430 nm, corresponde a absorção de luz e degradação da molécula de curcumina. A iluminação foi realizada em 5 etapas de 1 em 1 minuto por 5 minutos, com a dose de luz total de 60 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 e os intervalos foram divididas em 4 etapas de 10 minutos cada.	58
Figura 19: Análise da geração de EROs de modo fracionado por meio da sonda fluorescente DHE (20 μM) e do FS curcumina (10 μM). (a) fluorescência emissão 610 nm corresponde a emissão de fluorescência da sonda DHE, excitada em 500 nm e emitida em 510 nm e (b) absorbância 430 nm, corresponde a absorção de luz e degradação da molécula de curcumina. A iluminação foi realizada em 5 etapas de 1 em 1 minuto por 5 minutos, com a dose de luz total de 60 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 e os intervalos foram divididas em 4 etapas de 30 minutos cada.	60

Lista de Tabelas

Tabela 1: Representação da utilização de diferentes classes de antibióticos, exemplificando suas funções, espécies que podem ser inativadas, alvo do fármaco e danos causados ao microrganismo.....	18
Tabela 2: Condições experimentais para o ensaio de IFD convencional com FS curcumina: grupo, doses de energia, concentração do PS.	28
Tabela 3: Condições experimentais para o ensaio de IFD fracionada com FS curcumina: grupo, doses de energia, concentração do FS, doses fracionadas e intervalos de tempo.	29
Tabela 4: Grupos experimentais para análise de microscopia confocal da bactéria MRSA.	30
Tabela 5: Grupos tratamento e controle para as análises da geração de EROs do FS curcumina e sonda DHE.....	32
Tabela 6: Porcentagem de inativação de MRSA quando aplicada IFD fracionada com intervalos de tempos de 10 e 30 min.	46

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Estado da arte.....	13
2.1 Inativação Fotodinâmica: Definição e Mecanismos de Ação	13
2.2 Fotossensibilizador	14
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> e a patogenicidade	16
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4 Terapia Antimicrobiana: Antibióticos para Tratamento de Infecções Bacterianas	17
2.5 Resistência Bacteriana aos Antibióticos	19
2.6 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina: Mecanismos de resistência e a ameaça a saúde pública	23
2.7 Inativação fotodinâmica de MRSA	23
3. Objetivos	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. Materiais e métodos	26
4.1 Fotossensibilizador.....	26
4.2 Fonte de luz.....	26
4.3 Ativação do microrganismo em meio de cultura.....	26
4.4 Estudo de fotodegradação da curcumina	27
4.5 Inativação Fotodinâmica Convencional.....	27
4.6 Inativação Fotodinâmica Fracionada	28
4.7 Microscopia confocal de fluorescência.....	29
4.7.1. Análise de imagens de microscopia confocal.....	31
4.8 Análise de oxigênio dissolvido	31
4.9 Análise de Espécies Reativas de Oxigênio.....	32
4.10 Análise estatística	33
5. Resultados e Discussão.....	34
5.1 Desenvolvimento do estudo de IFD	34
5.2 Análise de fotodegradação da curcumina	36
5.3 Estudo da internalização do fotossensibilizador em MRSA	38
5.4 Inativação Fotodinâmica Convencional.....	40
5.5 Inativação Fotodinâmica Fracionada	44
5.6 Inativação fotodinâmica Convencional vs Fracionada.....	49
5.7 Análise de microscopia confocal	50

5.8 Avaliação de concentração de oxigênio	54
5.9 Análise da geração de espécies reativas de oxigênio	55
6. Conclusão	62
7. Perspectivas futuras	64
Referências	65

1. Introdução

As infecções bacterianas tem se tornado um problema de saúde que causam milhares de mortes no mundo. Inicialmente em 1928, o cientista Alexander Fleming descobriu a penicilina, ao observar que na cultura em que cultivava bactérias, houve a contaminação por um fungo. Esse fungo, pertencente ao gênero *Penicillium*, produzia substâncias antimicrobianas responsáveis pela inibição de outro microrganismo. A partir deste primeiro antibiótico, houve o desenvolvimento de outros antimicrobianos, gerando diferentes classes destes fármacos, a época foi nomeada como a “Era de ouro” (BRAGG et al., 2018; HAIDER, 2023).

A utilização de fármacos antimicrobianos trouxe uma solução temporária, que logo foi substituída por um problema alarmante. A resistência bacteriana tornou-se um problema de saúde pública global, devido à dificuldade de tratamento das infecções e o aumento constante de mortes. A pressão seletiva, que pode ser causada de forma natural ou artificial, ocasiona o surgimento de cepas de bactérias resistentes, devido ao desenvolvimento de genes de resistência por mutação ou indução. Com isso, a partir de uma única célula, que possui genes favoráveis a sobrevivência no ambiente, possibilita o surgimento de células filhas que também possuem o mesmo gene de resistência, como também a mesma pode adquirir fragmentos de DNA livres no ambiente ou receber genes de resistência por conjugação, possibilitando que a célula se torne resistente (HUO et al., 2024). De acordo com Willyard (2017), cerca de 700 mil mortes em escala global estão relacionadas a infecções bacterianas como resultado da presença de mecanismos de resistências aos antibióticos nas bactérias. Esse fato tende a piorar até o ano de 2050, pois esse número chegaria a cerca de 10 milhões de mortes devido a infecções por bactérias resistentes. Desde a descoberta da penicilina, os antibióticos passaram a ser usados em larga escala em humanos e na pecuária. Esse uso excessivo resultou no surgimento de cepas resistentes aos antibióticos atuais que dificultam o tratamento contra infecções (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020; HARBARTH et al., 2015).

O estudo conduzido pelo autor Neubeiser et al., (2020) em 32 hospitais da Alemanha teve como objetivo observar o controle de bactérias multirresistentes a antibióticos. Foram observados microrganismos como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus spp.* (*Enterococcus faecium*, como exemplo) resistente a vancomicina (VRE) e *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*) além de bactérias gram-negativas não

fermentativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. As bactérias gram-negativas eram resistentes a quatro grupos de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas e carbapenênicos) e classificadas como MRGN (bactérias gram-negativas multirresistentes), sendo 3-MRGN quando resistente a três dos quatro grupos e 4-MRGN quando resistente aos quatro grupos. Foram também considerados se as infecções ou colonizações foram adquiridas em meio hospitalar ou na comunidade. Dos 714.108 pacientes tratados nos 32 hospitais, as bactérias multirresistentes foram detectadas em 26.499 dos casos. Cerca de 1.136 destes pacientes adquiriram os microrganismos por meio do ambiente hospitalar e 235 vieram a óbito. Dentre as infecções causadas por bactérias multirresistentes, cerca de 42,4% foram infectados por 3-MRGN, seguindo de 32,7% MRSA, 20,4% VRE e 4,5% 4-MRGN, respectivamente.

Os resultados obtidos por Neubeiser et al., (2020) reforçam a importância do monitoramento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. Dentre as espécies que se tornaram resistentes aos antibióticos, as mais comuns encontradas em infecções são *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*, como gram-positivas. Além das, bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, que são gram-negativas (DU et al., 2017; SUN et al., 2017; VIVAS et al., 2019).

A **Figura 1**, adaptada de Munir et al., (2020), representa a possível disponibilidade de antibióticos comumente utilizados para tratamento de infecções bacterianas e a provável época em que algumas cepas de bactérias resistentes surgiram, como as famosas *S. aureus*, *Enterococcus*, *K. pneumoniae*, MRSA e VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina).

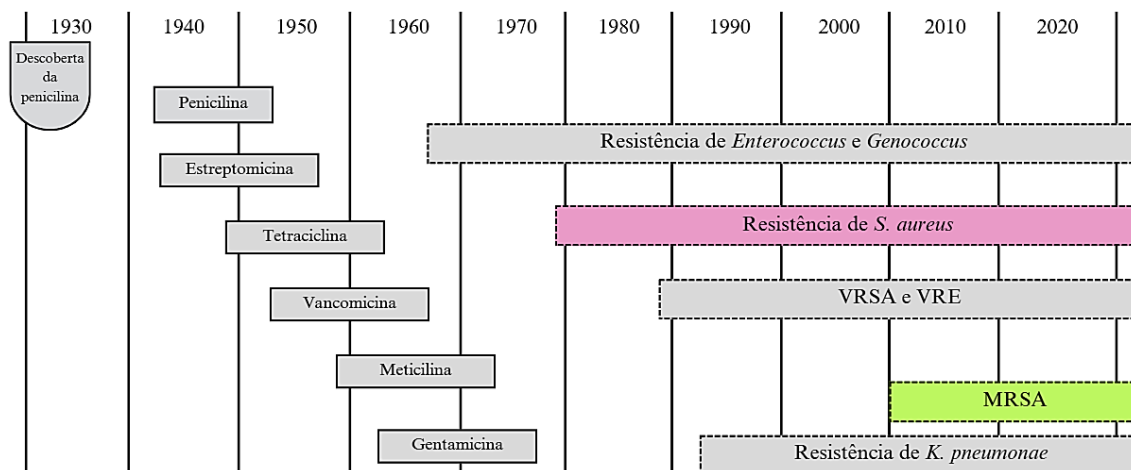


Figura 1: Fluxograma de disponibilidade de antibióticos para a comunidade e o provável período de surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos. Os antibióticos citados são comumente utilizados para o tratamento de infecções, denominados penicilina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina, metilina e gentamicina. As bactérias presentes na imagem são as mais comuns encontradas em infecções, sendo elas dos gêneros *Enterococcus* e *Genococcus*, *Staphylococcus aureus*, VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina), VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina), MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina) e *Klebsiella pneumoniae* Fonte: Adaptada do autor Munir et al., 2020.

2. Estado da arte

2.1 Inativação Fotodinâmica: Definição e Mecanismos de Ação

A inativação fotodinâmica (IFD) envolve processos físicos, químicos e biológicos. O princípio da IFD envolve a combinação de três elementos fundamentais fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular para que se inicie o processo fotodinâmico. O diagrama de Jablonski simplificado (**Figura 2**), mostra que a molécula do FS ao receber o estímulo vindo da luz de comprimento de onda adequado, é excitado, fazendo com que os elétrons passem do estado fundamental singleto (S_0) para o estado de maior energia singleto excitado (S_1). Os elétrons do estado S_1 tendem a retornar ao seu estado fundamental, seja por emissão de fluorescência ou liberação de calor por conversão interna (CI) (CORREIA et al., 2021; NICULESCU; GRUMEZESCU, 2021).

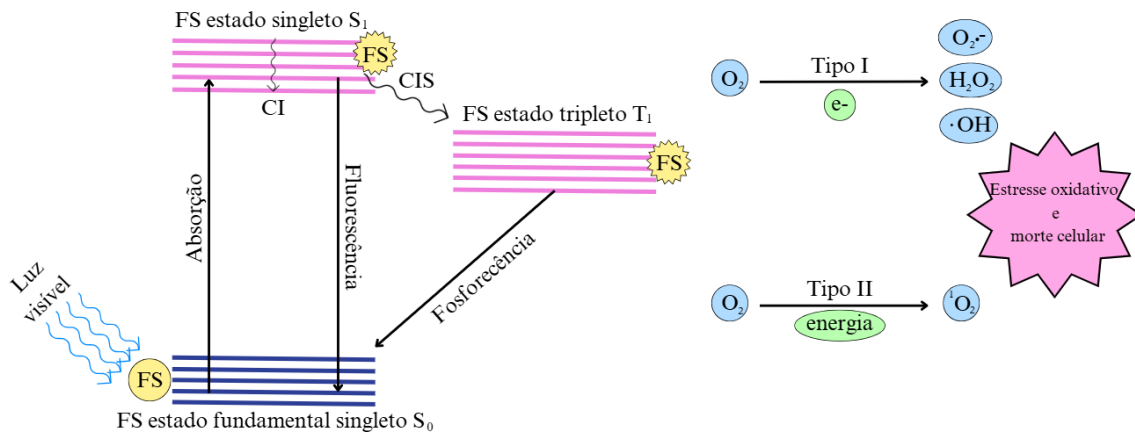


Figura 2: Representação simplificada do Diagrama de Jablonski. O fotossensibilizador (FS) quando iluminado por uma luz visível sai de seu estado fundamental singleto (S_0) para seu estado de mais alta energia (S_1). Com isso, pode ocorrer o Cruzamento de Intersistemas (CIS), onde o FS passará de seu estado S_1 para o estado tripleto (T_1). Neste momento, a interação com o oxigênio pode ser de dois modos, do Tipo I em que será transferido elétrons, e por meio disso serão geradas as espécies reativas, ou do Tipo 2, que ocorre a transferência de energia, gerando como subproduto o oxigênio singleto. Fonte: Autoria própria (2024).

Além disso, pode ocorrer o processo denominado Cruzamento de Intersistemas (CIS), onde ocorre a inversão de spins dos elétrons, fazendo com que a molécula passe do estado singleto excitado de maior energia (S_1) para o estado tripleto (T_1). Neste estado, o FS pode reagir com o oxigênio molecular, formando espécies reativas de oxigênio (EROs) através de via fotoquímica pelas reações denominadas do Tipo I ou do Tipo II (GUNAYDIN; GEDIK; AYAN, 2021; PRZYGODA et al., 2023).

Na reação do Tipo I, o FS no estado tripleto excitado transfere elétrons para o oxigênio molecular, gerando EROs, sendo comumente encontrados o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (DAJBROWSKI, 2017). A reação do Tipo II ocorre quando há a transferência de energia do FS no estado excitado para o oxigênio, gerando o oxigênio singleto, respectivamente. Ambas as vias resultam em produtos que possuem o potencial de causar estresse oxidativo nas células, ocasionando a morte celular. (GARCIA-DIAZ; HUANG; HAMBLIN, 2016).

2.2 Fotossensibilizador

Os fotossensibilizadores são moléculas capazes de absorver luz em um determinado comprimento de onda, fazendo com que seus elétrons sejam excitados e saiam de seu estado fundamental e passem para o estado de maior energia, chamado de singleto excitado. Nisso, alguns fotossensibilizadores conseguem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) ou oxigênio singleto sem que precise atingir o estado tripleto excitado e outros, necessitam do cruzamento de intersistemas (CSI) para que atinjam o estado

triplete excitado e interajam com o oxigênio, para que gerem EROs ou oxigênio singlete (ESCUDERO et al., 2021).

A curcumina é um fotossensibilizador que pode ser extraído do rizoma do açafrão-da-terra (*Cúrcuma longa*) (HOSSEINI; HOSSEINZADEH, 2018). Essa molécula apresenta uma vasta gama de benefícios devido suas ações antioxidantes, antivirais, anticancerígenas, antibacterianas, entre outros benefícios, justificando uso na culinária na região asiática e tem sido amplamente utilizada na medicina devido suas propriedades (GLIENKE et al., 2009; KUNNUMAKKARA et al., 2017; NGUYEN et al., 2014).

No entanto, a curcumina possui baixa solubilidade em água, apresentando agregados. Todavia, a curcumina possui maior solubilidade em solventes orgânicos (LV et al., 2022). Quimicamente, a curcumina é classificada como polifenol (**Figura 3**), caracterizada por possuir dois anéis aromáticos e grupos metoxi e fenólico, grupo 1,3-ceto-enol e duas ligações dupla na estrutura da molécula (YANG et al., 2017).

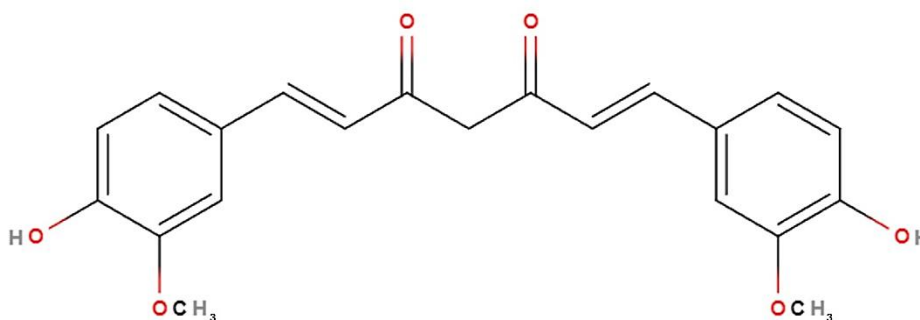


Figura 3: Estrutura química da curcumina obtida através do software MolView.

A ação antimicrobiana da curcumina foi relatada no estudo de Tyagi et al. (2015), que investigou a permeabilização de membrana nas bactérias *S. aureus* e *E. coli* através de técnicas de fluorescência e citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a bactéria *S. aureus* e *E. coli* apresentaram semelhança após o tratamento IFD com a curcumina, pois apresentaram a emissão de fluorescência, pois quando adicionado iodeto de propídio (PI), essa sonda só emite fluorescência quando entra no interior da célula pela ruptura de membrana e interage com os ácidos desoxirribonucleico (DNA), intercalando com suas bases. A entrada da sonda na célula indica que o tratamento apresentou danos a membrana bacteriana, portanto, demonstrando eficácia.

Entretanto, o autor Zheng et al. (2020) cita que a curcumina pode regular a expressão do gene bacteriano, inibindo sua resposta aos danos causados no DNA. Além de possuir, o potencial de inibição de divisão celular através da ligação nas microtubulinas

e interrompendo a participação do ácido ribonucleico (RNA) e a síntese proteica. Também pode atuar também nas proteínas associadas a membrana e permeabilidade de células bacterianas, tornando-as mais suscetíveis aos antibióticos.

A curcumina também apresenta potencial como agente FS, de acordo com Freitas et al. (2019), que avaliou em testes com as cepas de *S. aureus* MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível a meticilina), MRSA e ATCC, alterando a concentração de curcumina (15,6 µg/mL até 500 µg/mL) combinadas com doses de luz de 8 e 20J/cm². As concentrações altas como 500 µg/mL apresentaram toxicidade, portanto, foi escolhida a concentração de 100 µg/mL para o ensaio fotodinâmico. Os resultados demonstraram que, nessas condições, ambas doses de luz resultaram na inativação de cerca de 4 logs no crescimento bacteriano, apresentando eficácia na utilização de curcumina para a inativação de bactérias.

2.3 *Staphylococcus aureus* e a patogenicidade

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

A bactéria *S. aureus* pertence ao grupo de bactérias gram-positivas, que possuem uma membrana plasmática composta por uma bicamada fosfolipídica, responsável pela permeabilidade seletiva da célula, selecionando a entrada e saída de substâncias com o auxílio de proteínas presentes na bactéria. Além da membrana celular, as bactérias gram-positivas possuem uma parede celular externa (**Figura 4**). A parede celular possui a função de proteção da célula, sendo composta por peptidoglicano. A espessura e a composição da parede celular dividem as bactérias em dois grupos, as gram-positivas e as gram-negativas (HUANG et al., 2020; TUNJUNGPUTRI et al., 2017).

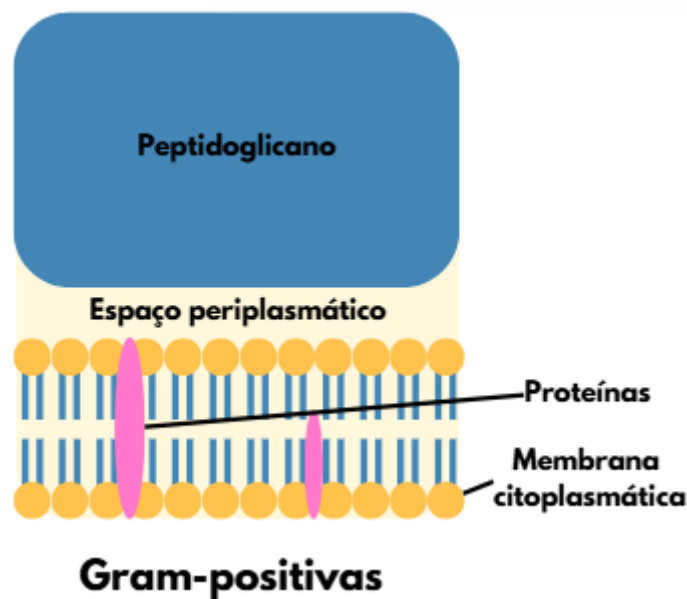


Figura 4 - As bactérias gram-positivas apresentam uma espessa camada de peptidoglicano, externamente à sua membrana plasmática formada por uma bicamada fosfolipídica. Fonte: Autoria própria (2024).

As bactérias gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa e composta por ácido teicóico, responsável por promover sítios de ligação para bacteriófagos, como também exercer a função de permeabilidade de íons. Entre a parede celular e a membrana plasmática há o espaço periplasmático, composto por ácido lipoteicóico que auxilia na entrada e saída de cátions devido a negatividade de sua carga (OLIVEIRA APWLC, 2022; SUMRALL et al., 2020).

2.4 Terapia Antimicrobiana: Antibióticos para Tratamento de Infecções Bacterianas

Os antibióticos, de maneira geral, atuam provocando a morte celular ou interrompendo o ciclo reprodutivo das bactérias. A resposta ao antibiótico depende dos seus mecanismos de ação na célula, a concentração utilizada e a sensibilidade da bactéria. Os antibióticos atuam em alvos específicos, causando danos celulares que levem a inativação do microrganismo. Alguns antibióticos interferem na síntese da parede celular, que é essencial para a proteção de seu conteúdo celular, devido seu meio ser hipertônico. Os danos causados nas paredes celulares podem ocasionar lise osmótica na bactéria (TAVARES, 2014)

Existem vários tipos de antibióticos que atuam de diferentes maneiras nas estruturas e metabolismos da célula bacteriana e algumas destas formas são mostradas na **Tabela 1:**

Tabela 1: Representação da utilização de diferentes classes de antibióticos, exemplificando suas funções, espécies que podem ser inativadas, alvo do fármaco e danos causados ao microrganismo.

Classe	Antimicrobiano	Espécies Inativadas	Alvo	Processos Afetados
Fluoroquilonas Inibidor da síntese de DNA	Ácido nalidíxico, Ciprofloxacina, Levofloxacina e Gemifloxacina	Gram-positivos e gram-negativos aeróbicos, algumas espécies de Gram-negativos anaeróbicos (<i>C. perfringes</i>) e <i>M. tuberculosis</i>	Topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV	Replicação de DNA, SOS resposta, divisão celular, geração de ATP, aglomerado Fe-S síntese, formação de EROs
Trimetoprim-sulfametoxazol Inibidor da síntese de DNA	Cotrimoxazol (combinação entre trimetoprima e sulfametoxazol)	Gram-positivos e gram-negativos aeróbicos	Inibidor da síntese de ácido tetrahidrofólico	Biossíntese de nucleotídeos e replicação de DNA
Rifamicinas Inibidor da síntese de RNA	Rifamicinas, rifampicina e rifapentina	Gram-positivos, gram-negativos e <i>M. tuberculosis</i>	Dependente de DNA, RNA polimerase	Transcrição de RNA, replicação de DNA e SOS resposta
Beta-lactâmicos Inibidores da síntese da parede celular	Penicilinas (penicilina, ampicilina, oxacilina), cefalosporinas (cefazolina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepima) e cabapenêmicos (imipenem)	Espécies aeróbicas e anaeróbicas de gram-positivos e gram-negativos	Ligação a proteínas de penicilina	Síntese da parede celular, divisão celular, atividade de autolisina (regulamento por LytSR-VncRS sistema de dois componentes), síntese de cluster Fe-S, formação de EROs, SOS resposta, ciclo TCA
Glicopeptídeo e glicolipopeptídeo Inibidores da síntese da parede celular	Vancomicina e teicoplanina	Gram-positivos	Unidades de peptidoglicano (terminal d-Ala-d-Ala dipeptídeo)	Síntese da parede celular, transglicosilação, transpeptidação e ativação de autolisina (VncRS sistema de dois componentes)
Lipopeptídeos Inibidores da síntese da parede celular	Daptomicina e polimixina B	Gram-positivos (daptomicina), gram-negativos (polimixinas)	Membrana celular	Síntese da parede celular
Aminoglicosídeos Inibidores da síntese de proteínas	Gentamicina, tobramicina, estreptomicina e canamicina	Gram-positivos e gram-negativos aeróbicos e <i>M. tuberculosis</i>	Unidade ribossômica 30S	Tradução de proteínas (tradução incorreta por tRNA incompatibilidade), SOS resposta, ciclo TCA, Fe-S síntese de cluster, formação de EROs
Tetraciclínas Inibidores da síntese de proteínas	Tetraciclina e doxiciclina	Gram-positivos e gram-	Unidade ribossômica 30S	Tradução de proteínas (através da inibição de ligação

		negativos aeróbicos		de aminoacil tRNA para ribossomo)
Macrolídeos Inibidores da síntese de proteínas	Eritromicina e azitromicina	Aeróbicos e anaeróbicos gram-positivos e gram- negativos	Unidade ribossômica 50S	Tradução de proteínas (através da inibição de alongamento e etapas de translocação) e depleção de tRNA livre
Estreptograminas Inibidores da síntese de proteínas	Pristinamicina, dalfopristina e quinupristina	Aeróbico e anaeróbico gram-positivos e gram- negativos	Unidade ribossômica 50S	Tradução de proteínas (através da inibição de iniciação, alongamento e translocação) e esgotamento de tRNA livre
Fenicóis Inibidores da síntese de proteínas	Cloranfenicol	Alguns gram- positivos e gram- negativos, incluindo <i>B.</i> <i>fragilis</i> , <i>N.</i> <i>meningitidis</i> , <i>H. influenzae</i> e <i>S. pneumoniae</i>	Unidade ribossômica 50S	Tradução de proteínas (através da inibição de etapa de alongamento)

Autor: Adaptado de Kohanski; Dwyer; Collins (2010).

Abreviações: DNA: Ácido Desoxirribonucleico; SOS: Resposta SOS; ATP: Adenosina Trifosfato; Fe-S: Síntese de ferro-enxofre; EROs: Espécies Reativas de Oxigênio; RNA: Ácido Ribonucleico; LytSR-VncRS: Sistema de Regulação de Respostas a Stress e Sistema de Regulação Associado a Sequências Repetitivas ou Elementos de Stress; TCA: Ciclo do Ácido Cítrico; d-Ala: ácido D-alanina; VncRS: Sistema de Regulação de Transcrição de Genes Regulado por Stress; tRNA: RNA de transferência

2.5 Resistência Bacteriana aos Antibióticos

A estrutura química do antibiótico é crucial, pois define seus mecanismos de ação e alvos específicos, permitindo que antibióticos diferentes possuam o mesmo alvo e atuem sobre a mesma bactéria. O entendimento desta questão evitaria um evento denominado de resistência cruzada que ocorre quando se utiliza dois fármacos para o mesmo tratamento sendo eles do mesmo grupo químico ou sendo substituídos, conseqüentemente a bactéria poderá desenvolver resistência ao tratamento. Os antibióticos possuem a função de causar danos que conseqüentemente causem a morte ou interrompam o ciclo reprodutivo do microorganismo (TAVARES, 2014).

Alguns fatores podem contribuir para a resistência bacteriana, como: (i) prescrição e ingestão excessiva e inadequada de antimicrobianos, (ii) superlotação em hospitais gerando acúmulo de diferentes microrganismos no local (iii) uso indiscriminado de antimicrobianos na indústria agroalimentar. A presença de microrganismos resistentes em

ambientes hospitalares pode impactar os procedimentos cirúrgicos realizados no local, como cesarianas, transplantes de órgãos e quimioterapias. A transmissão de bactérias resistentes entre pacientes pode ser ocasionada pelos cuidados realizados no ambiente hospitalar, onde profissionais de saúde podem atuar como vetores, transmitindo o microrganismo resistente entre pacientes (CABRAL; AG, 2019).

Os beta-lactâmicos são uma classe de antibióticos que atuam inibindo a síntese da parede celular. Durante a de formação da parede celular, ocorre a união de cadeias polissacarídicas por ligação entrecruzada de cadeias pentapeptídicas. Este processo denominado transpeptidação é responsável pela realização da parede de peptidoglicano momento em que antibióticos da classe beta-lactâmicos atuam. Esta classe de antibióticos se liga ao receptor de ação (PBP), inibindo a formação da parede, ocasionando em uma célula com crescimento defeituoso, que conseqüentemente ocorre a lise (CHO; UEHARA; BERNHARDT, 2014; TAVARES, 2014).

Todavia, as bactérias gram-negativas além de conseguirem barrar a ação de componentes químicos com sua membrana externa, possuem o potencial de inativação de antimicrobianos beta-lactâmicos devido a presença de enzimas beta-lactamases no espaço periplasmático, tornando-as resistentes aos beta-lactâmicos (KIM et al., 2020).

As bactérias podem adquirir resistência aos antimicrobianos por meio de duas vias, por mutação ou por adquirir genes de resistência de outras bactérias por meio da transferência horizontal, que pode ocorrer de três modos. O primeiro seria por meio da transformação, onde há a recombinação genética de fragmentos de DNA de uma bactéria morta, que serão recolhidos e utilizados por uma nova bactéria, sendo assim, ela adquire seus genes de resistência. O segundo modo seria por meio de transdução, onde há a transferência de materiais genéticos entre bactérias através de um bacteriófago. O terceiro modo ocorre por meio da conjugação, onde a partir das fimbrias que se ligam fisicamente em outra bactéria, há a transferência dos genes de resistência. (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020; HOLMES et al., 2016; MUNITA; ARIAS, 2016).

Alguns antibióticos atuam na interrupção da parede celular, mas mecanismos foram desenvolvidos para interrupção dessa ação, tendo como exemplo a inativação dos antibióticos beta-lactâmicos, que ocorre por meio do desenvolvimento de enzimas beta-lactamases, que inativam o fármaco por meio da quebra da ligação amida do anel beta-lactâmico. A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos se tornou tão predominante devido ao desenvolvimento de genes de resistência que são facilmente transferidos de

microrganismo para microrganismo (AGARWAL; TIWARI; VARADWAJ, 2023; CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Outro exemplo seriam os antibióticos aminoglicosídeos, os antibióticos desta classe possuem como alvo interferir na síntese proteica do microrganismo. O processo de síntese proteica ocorre inicialmente a partir de uma molécula de DNA que será transcrita em uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) com auxílio da enzima RNA-polimerase. Esta sequência transcrita será traduzida por ribossomos presentes na célula. Com o auxílio do RNA transportador (tRNA) que se liga na base de códons a partir de sua própria base de anticódons, o mRNA será transportado até o ribossomo que realiza a leitura genética da fita de RNA, traduzindo-a e liberando aminoácidos, que formam uma cadeia polipeptídica, originando as proteínas. Entretanto, os aminoglicosídeos podem ser inativados por meio de enzimas modificadoras atuam na acetilação, fosforilação e adenilação dos aminoglicosídeos (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

As bombas de efluxo também são características de mecanismos de resistência bacteriana. São influenciadas por proteínas de membranas que utilizam a via de hidrólise de ATP (Adenosina Trifosfato) para expulsar os fármacos do interior da bactéria. Alguns antibióticos mais comuns que são expulsos por bombas de efluxo são as fluoroquinolonas, penicilinas, macrolídeos, polimixina B e tetraciclina (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018; LI et al., 2023).

Ocorre-se também modificações nos alvos dos antimicrobianos, impedindo que se ligue ao sítio. Como exemplo, há a modificação do ácido lipoteicoico em bactérias gram-positivas, ocasionando resistência a polimixina B. Em bactérias gram-negativas, os locais de modificação do sítio alvo estão localizados em LPSs (LI et al., 2023; SAARDOVER et al., 2012).

Ao adquirirem diversos genes, as bactérias podem sintetizar paredes celulares alteradas, onde não possuem mais os locais onde os antimicrobianos se conectam para inativação do microrganismo, para que se possa diminuir a absorção do medicamento. Algumas realizam mutações em seu interior, dificultando o acesso dos antimicrobianos ao alvo por meio da regulação negativa dos genes de porina (TENOVER, 2006).

Pode-se ocorrer a formação de biofilmes com intuito de se protegerem de tanto da ação do sistema imunológico contra elas, quanto a ação de agentes antimicrobianos. Os biofilmes são formados por uma camada espessa, formadas por polissacarídeos, proteínas e DNA de forma que dificulte o acesso de tais agentes às bactérias presentes dentro dele. A presença de diversas bactérias no mesmo local facilita a transferência horizontal de

genes, o que proporcionaria para as bactérias sensíveis os genes de resistência com muito mais facilidade (C REYGAERT, 2018; MAH, 2012; SOTO, 2013; VAN ACKER; VAN DIJCK; COENYE, 2014).

Outro meio que se ocorre a inativação dos antibióticos é por meio da hidrólise. Esta ocorre por meio de enzimas que necessitam apenas da água como seu co-substrato, o que as permite que estas enzimas atuem nas ligações químicas hidrolíticas presentes nestes fármacos, rompendo estas ligações e inativando o medicamento. Alguns exemplos são as enzimas enterases, capazes de inativar os antibióticos macrolídeos ou beta-lactamases que rompem a ligação amida do anel beta-lactâmico, inativando o fármaco (KAUFMAN, 2011; WRIGHT, 2005).

Além disso, as bactérias são capazes de realizar uma ação denominada enxameação. A enxameação é a migração de um grupo de bactérias, movimentando-se através de seus flagelos, que permitem a formação de biofilmes e vivência conjunta com outras bactérias presentes no ambiente mais rapidamente, podendo ocasionar na transferência de genes, facilitando a resistência aos antibióticos (RÜTSCHLIN; BÖTTCHER, 2020).

As células bacterianas podem apresentar diversos mecanismos de resistência contra antibióticos, como visto na **Figura 5**, que representa uma célula bacteriana simplificada, em que é possível observar alguns dos mecanismos de resistência desenvolvidos por bactérias.

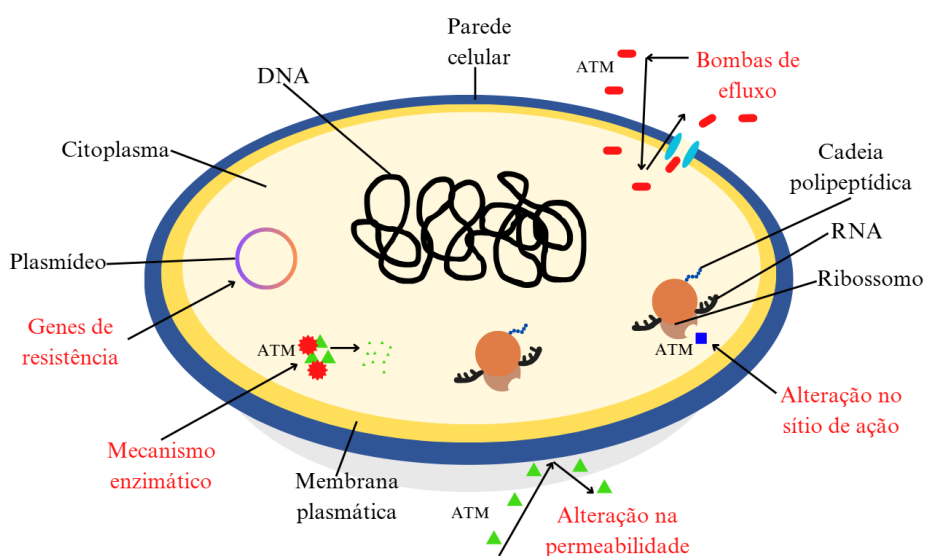


Figura 5: Representação simplificada de uma célula bacteriana, em que estão presentes seus componentes intracelulares, como DNA, parede celular, RNA, proteínas, ribossomos, membrana plasmática, plasmídeo e citoplasma. Estão presentes também alguns mecanismos de resistência desenvolvidos por bactérias, como bombas de efluxo, alterações no sítio de ação, alteração na permeabilidade da membrana e mecanismo enzimático. Abreviações: ATM: Antimicrobiano, DNA: Ácido Desoxirribonucleico e RNA: Ácido Ribonucleico. Autoria própria (2025).

2.6 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: Mecanismos de resistência e a ameaça a saúde pública

A bactéria *S. aureus* é uma das causas mais comuns de infecções bacterianas, sendo presentes tanto em ambientes hospitalares, corpo humano, alimentos e superfícies contaminadas. A resistência de *S. aureus* é devido a troca genética de genes resistentes via horizontal, através da transferência de plasmídeo para outras bactérias, o que explica o quão rápido os microrganismos se tornam resistentes (ILUZ et al., 2018).

As infecções causadas pelas bactérias desta espécie eram tratadas com penicilina, até o momento em que desenvolveram o mecanismo de resistência, em que houve o surgimento de beta-lactamases, enzimas capazes de causar danos ao fármaco, causando a sua inativação. Devido a este problema, foi desenvolvido um novo antimicrobiano resistente as enzimas beta-lactamases, chamado meticilina. O uso indevido, junto a necessidade em larga escala de fármacos que tratassem infecções, resultou no surgimento de microrganismos resistentes as meticilinas (HIRAMATSU et al., 2001; VIVAS et al., 2019).

Com a disponibilidade da meticilina para uso de tratamento de infecções, as bactérias passaram a desenvolver o mecanismo de resistência a esse fármaco, em que dessa vez ao invés de realizar a quebra do anel beta-lactâmico por hidrólise (penicilina), realiza a mudança do alvo do medicamento (meticilina), devido a expressão de uma proteína denominada PBP2a, que é um mecanismo de resistência de amplo espectro capaz de bloquear a ligação de beta-lactâmicos (CRAFT et al., 2019).

As infecções por *S. aureus*, principalmente se forem meticilina-resistentes, são classificadas como graves e difíceis de tratar, além de serem responsáveis por lesões cutâneas, casos de pneumonia, meningite, endocardite, septicemia e podendo causar a morte do paciente acometida com a infecção (SCHLIEVERT et al., 2010; TOGNERI et al., 2017). As bactérias do tipo MRSA são um grande problema de saúde pública. Quando comparada a *S. aureus* sensível à meticilina, infecções causadas por MRSA tem maior chance de internações mais longas e risco de mortalidade (LIU et al., 2021; MORGENSTERN et al., 2016).

2.7 Inativação fotodinâmica de MRSA

O surgimento de cepas resistentes a antibióticos, como a MRSA, demonstra a importância e necessidade de um método alternativo para o controle da bactéria. Portanto, a IFD a base de um FS, luz e oxigênio surge como uma alternativa promissora, devido a

sua simplicidade e eficácia podem ser a resposta para este problema de saúde global (PUCELIK; DAŁBROWSKI, 2022).

Estudos recentes avaliaram a ação da curcumina na IFD da bactéria MRSA, como o autor Batista de Andrade Neto et al., (2021) que observou como seria a ação da curcumina em cepas clínicas de MRSA e qual seria seu efeito associado a oxacilina. Foram testadas as concentrações de curcumina na faixa de 1,95-1000 µg/mL e de oxacilina a 0,125-64 µg/mL. Foi avaliado se haveria interações entre os fármacos, caracterizando como sinérgico, parcialmente sinérgico, aditiva, indiferente ou antagônico. Os resultados indicaram que a curcumina não apenas inativou cepas clínicas de MRSA, como também aumentou a permeabilidade da membrana para entrada do antibiótico. Além disso, foi visto pelo teste TUNEL que a curcumina causou danos ao DNA, diminuiu a viabilidade celular de biofilmes de MRSA. Portanto, esse FS foi capaz de apresentar efeitos sinérgicos e aditivos junto ao antibiótico oxacilina.

Outro estudo avaliou a ação da curcumina em microemulsões (30 µg/mL) e luz de 430 nm, com doses de 14 J/cm², observou-se que foi capaz de inativar >5 logs de MRSA. Todavia, quando aplicadas duas sessões de IFD, houve a redução de >7 logs (CRUGEIRA et al., 2023).

O autor Ribeiro et al., (2022) buscou avaliar a ação da curcumina e luz azul em biofilme da bactéria MRSA. No estudo, houve a aplicação da dose de luz de 50 J/cm² na concentração 80 µg/mL, que resultou na redução de >2 logs de inativação bacteriana, indicando que a IFD seria capaz de inativar bactérias resistentes a antibióticos, possibilitando um novo tratamento para infecções bacterianas.

A aplicação de IFD foi documentada para tratamento de infecções bacterianas em modelos *ex vivo*, como documentado pelo autor (MUNIZ et al., 2021), que aplicou o tratamento em infecções de MRSA, em orelhas de camundongos. Utilizando 100 µg de curcumina com doses de luz de 13,5 J/cm². A partir do recolhimento de amostras de linfonodo drenante e das orelhas tratadas dos animais, observou-se que no grupo com aplicação de IFD houve a redução da carga bacteriana, atingindo *p*-valor < 0,05.

A IFD tem sido estudada para o tratamento de infecções da bactéria MRSA, demonstrando avanço na técnica e uma esperança de tratamento para essa cepa resistente. O avanço em estudos permite o aprimoramento e otimização de protocolos *in vitro*, com o intuito de buscar os melhores parâmetros a serem utilizados para aplicações clínicas de infecções bacterianas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação da curcumina contra a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), com a inativação fotodinâmica convencional e a fracionamento de doses de luz.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar do comportamento de fotodegradação da curcumina via espectroscopia de absorção no ultravioleta visível e fluorescência molecular.
- Determinar a melhor concentração entre 5, 10 e 15 μM e dose de energia de 5, 10 e 15 J/cm^2 para a inativação fotodinâmica convencional da bactéria MRSA.
- Avaliar os efeitos dos fracionamentos das doses de energia de 10 e 15 J/cm^2 com intervalos de 10 e 30 minutos na inativação fotodinâmica da MRSA.
- Analisar confocal do comportamento da bactéria MRSA frente a IFD fracionada.
- Avaliar a concentração de oxigênio em experimentos de IFD.
- Avaliar a formação de espécies reativas de oxigênio na inativação fotodinâmica convencional e fracionada por via indireta.

4. Materiais e métodos

4.1 Fotossensibilizador

O pó sintético de curcumina foi obtido comercialmente (PDT Pharma®, Brasil) e, considerando sua agregação devido à hidrofobicidade em meio aquoso, a solubilização foi realizada primeiramente em etanol (99,9%) (DIAS et al., 2020; HEGER et al., 2014). Em seguida realizou as diluições adicionais para as concentrações de trabalho em água destilada esterilizada, seguindo protocolos semelhantes que levam a uma concentração final de etanol insignificante (%) para a maior concentração 15 μ M.

A solução de fotossensibilizador foi iluminada com o auxílio de uma Biotable®, composto por luzes de LED de 450 nm e 55 mW/cm², desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico (LAT) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), São Paulo, Brasil.

4.2 Fonte de luz

A **Figura 6** refere-se a medida do espectro do diodo emissor de luz (LED) azul em 450 nm utilizado nos experimentos de IFD, fotodegradação e análise de geração de EROs, correspondente ao comprimento de onda necessário para irradiação da curcumina.

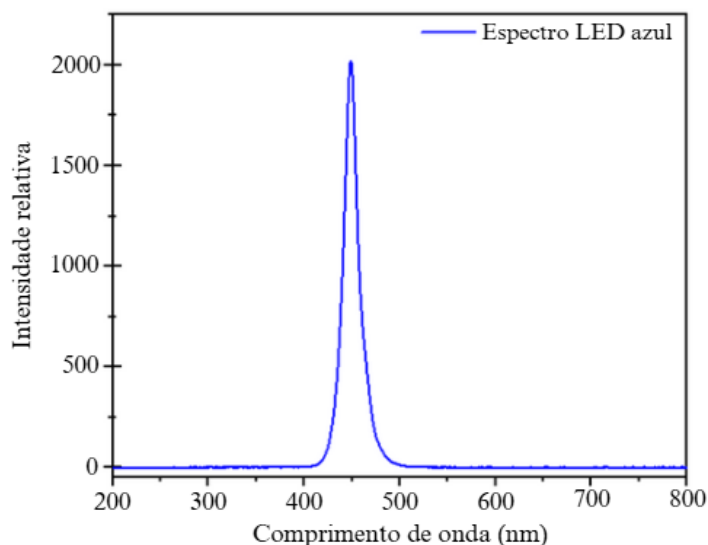


Figura 6: Perfil espectral do LED de luz azul utilizado nos experimentos de IFD, fotodegradação e EROs correspondente ao comprimento de onda de 450 nm.

4.3 Ativação do microrganismo em meio de cultura

Inicialmente foi preparado o crescimento da bactéria MRSA (isolado clínico). A bactéria foi transferida de um meio de conservação do microrganismo do congelador ultrafrio, contendo 60% de MRSA e 40% de glicerol, para uma placa contendo meio de

cultura BHI Ágar (*Brain Heart Infusion*) (marca Kasvi). A placa foi cultivada até a fase de mid-log em uma incubadora B.O.D (marca Eletrolab) por 24 horas.

O preparo do inóculo do microrganismo foi realizado a partir da ressuspensão direta de colônias isoladas de MRSA, semeadas no meio de cultura BHI Ágar (*Brain Heart Infusion*). Foram selecionadas cerca de 3 a 5 colônias isoladas e introduzidas em um tubo falcon contendo 10 mL de Tampão Fosfato-Salino (PBS, pH 7,4) e homogeneizadas. Houve o monitoramento da densidade óptica (600 nm, Espectrofotômetro Bel Photonics) para que as suspensões de trabalho de bactérias estivessem em entre 10^7 – 10^8 UFC/mL para experimentos de IFD.

Após os ensaios, a quantificação foi realizada a partir de cinco diluições seriadas (em PBS), e transferidos 10 µL da amostra para placas de Ágar BHI, cultivadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente, para que as contagens estivessem disponíveis em UFC mL⁻¹.

4.4 Estudo de fotodegradação da curcumina

Para a fotodegradação da curcumina foi preparado uma solução estoque na concentração de 1085 µM em etanol. A partir da solução estoque, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 10, 20 e 40 µM de curcumina em água destilada.

O processo de fotodegradação foi realizado utilizando um sistema de irradiação com LED de 450 nm na intensidade 40 mW/cm², aplicada a dose de 2,4 J/cm² a cada minuto de irradiação. Amostra de 2 mL da curcumina na concentração de trabalho foi adicionada em uma cubeta de quartzo de quatro faces polidas, caminho óptico de 10 mm. Essa amostra foi mantida em agitação constante durante a fotodegradação da curcumina.

O monitoramento da fotodegradação foi realizado em função do tempo durante 24 minutos, totalizando uma dose de 57,8 J/cm², através de espectroscopia de absorção no ultravioleta visível na região de 200 a 800 nm. As medidas de fluorescência molecular foram realizadas utilizando o equipamento Cary Eclipse (Varian), em que foi monitorada com excitação em 430 nm e emissão em a partir de 440 nm (SAITO NOGUEIRA et al., 2020). O experimento de fotodegradação foi realizado em triplicata.

4.5 Inativação Fotodinâmica Convencional

O primeiro bloco de experimentos consistiu em uma triagem de doses de energia e concentrações de FS visando fixar uma condição subletal para comparar o IFD

convencional ao efeito de doses de luz fracionadas. As concentrações foram definidas com base em trabalhos que apresentaram inativação total para a MRSA, sendo 25 e 50 μM (MELO et al., 2023). Em seguida realizou uma triagem considerando combinações de 5, 10 e 15 J/cm^2 e 5, 10 e 15 μM de curcumina, mostrado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Condições experimentais para o ensaio de IFD convencional com FS curcumina: grupo, doses de energia, concentração do PS.

Grupo	Dose (J/cm^2)	Concentração (μM)
1	5	5, 10, 15
2	10	5, 10, 15
3	15	5, 10, 15

Os ensaios foram realizados *in-vitro* em uma placa de 24 poços contendo a solução de FS e o microrganismo (50:50). A placa foi conduzida para a incubadora B.O.D (marca Eletrolab), permanecendo por 20 minutos no escuro a 37°C . Em seguida, a placa foi iluminada pelo equipamento Biotable® de 450nm de $55\text{mW}/\text{cm}^2$ por cerca de 90, 180 e 272 segundos sob as doses de energias determinadas (5, 10 e 15 J/cm^2) e com as concentrações de curcumina escolhidas (5, 10 e 15 μM).

Após a iluminação da IFD tradicional, foram realizadas diluições seriadas em PBS e transferidas para placas de ágar BHI, cultivadas em incubadora a 37°C , para a contagens de unidade formadoras de colônias ($\text{UFC}/\text{mL}^{-1}$) após 24 h.

4.6 Inativação Fotodinâmica Fracionada

Os experimentos de IFD com doses fracionadas foram realizados com irradiação de luz com comprimento de onda de 450 nm, após a incubação da bactéria com o FS por 20 min. em temperatura de 37°C . As doses de energia aplicadas foram de 5, 10 e 15 J/cm^2 , com intervalos variados. Para os ensaios, foram divididos diferentes grupos, sendo eles grupos com IFD convencional e IFD fracionada, dos quais são descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Condições experimentais para o ensaio de IFD fracionada com FS curcumina: grupo, doses de energia, concentração do FS, doses fracionadas e intervalos de tempo.

Grupo	Dose (J/cm ²)	Concentração (µM)	Doses Fracionadas	Intervalos (min)
1	5	10	1	10 min após a IFD
2	5+5	10	1	10 min durante a IFD
3	5+5	10	2	10 min durante e após IFD
4	5+5+5	10	2	10 min durante IFD
5	5	10	1	30 min após IFD
6	5+5	10	1	30 min durante IFD
7	5+5	10	2	30 min durante e após IFD
8	5+5+5	10	2	30 min durante IFD

Para a IFD fracionada os intervalos (nomeados de i) escolhidos foram de 10, 30 e 45 min, respectivamente. Os intervalos separam as doses de 5 J/cm², portanto, as doses eram aplicadas e em seguida havia intervalos entre elas, durante e após o processo de IFD. O grupo 1 representa 10 min após a aplicação de 5 J/cm². O grupo 2 aplicou a dose, deu o intervalo de 10 min e aplicou novamente a dose, totalizando 10 J/cm², semelhante ao grupo 3, que após a última dose houve o intervalo de 10 min antes que continuasse o processo de finalização do experimento, em busca de avaliar se com estes intervalos as EROs continuariam agindo no microrganismo e se sim, se os resultados da IFD convencional e IFD fracionada seriam distintos. Por fim, no grupo 4 foram aplicadas três doses de 5 J/cm² com intervalos de 10 min entre elas. Para os grupos 5, 6, 7 e 8, os intervalos foram ajustados para 30 min e a metodologia de aplicação de doses foi semelhante aos grupos de 10 min.

4.7 Microscopia confocal de fluorescência

Para análise do meio microscópico da interação entre a curcumina e a bactéria, associado ao processo da ação da IFD, foram realizadas análises de microscopia confocal. O preparo da bactéria ocorreu a partir da ressuspensão direta do microrganismo, que estava sendo cultivado em uma placa contendo BHI (*Brain Heart Infusion*) Ágar (marca Kasvi) até a fase mid-log na incubadora B.O.D (Eletrolab) por 24 horas. Foram selecionadas de 3 a 5 colônias e introduzidas na solução Tampão Fosfato-Salino (PBS, pH 7,4) e homogenizadas. A partir disso, foi realizada a medida de densidade óptica em

600 nm (Espectrofotômetro Bel Photonics), para que da população bacteriana estivesse em uma escala de 10^7 – 10^8 UFC mL⁻¹.

A bactéria MRSA foi submetida a concentração de 10 µM, com pulsos de luz de 5 J/cm² fracionados e intervalos de 30 min, entre as doses de luz. As análises de microscopia confocal foram realizadas através do microscópio confocal de varredura (Zeiss LSM780, Jena, Alemanha), com a presença de um laser Chameleon (Ti, Coherent, Santa Clara, CA, EUA), utilizando fonte de excitação de dois fótons (2P), com lente objetiva Plan-Apochromat (20x) e região de 800 nm. As imagens foram coletadas utilizando o modo canal, em que os pixels de cada fluorescência emitida nos testes de viabilidade (verde e vermelha) foram selecionados de dois comprimentos de onda, para que fosse possível a observação de células viáveis e não viáveis.

Para os ensaios de internalização e viabilidade celular, a bactéria foi submetida a solução de curcumina e acompanhado o processo de internalização por meio do microscópio confocal. Os grupos experimentais são destacados na **Tabela 4**:

Tabela 4: Grupos experimentais para análise de microscopia confocal da bactéria MRSA.

Grupos	Classificação Ensaio	Concentração (µM)	Dose de luz (J/cm ²)	Intervalo (min)
1	Internalização Curcumina	10 µM de curcumina	-	-
2	Controle microrganismo	LD	-	-
3	5+i	10 µM de curcumina e LD	5 J/cm ²	30 min de intervalo após iluminação
4	5+i+5	10 µM de curcumina e LD	10 J/cm ²	30 min de intervalo entre as doses
5	5+i+5+i+5	10 µM de curcumina e LD	10 J/cm ²	30 min de intervalo entre as doses
6	5+i+5+i+5+i	10 µM de curcumina e LD	15 J/cm ²	30 min de intervalo entre as doses e 15 min após última dose

A viabilidade celular da bactéria foi analisada a partir do corante Live/Dead (LD). O corante possui os componentes calceína-AM e iodeto de propídio (IP), responsáveis pela emissão de fluorescência das cores verdes e vermelhas, respectivamente. Esses

marcadores permitem a identificação de células metabolicamente ativas e inativas (LIU et al., 2022).

4.7.1. Análise de imagens de microscopia confocal

As imagens de microscopia confocal foram analisadas a partir do software Python, em que foram criadas funções que possibilitaram a contagem do percentual de pixels referentes as emissões de fluorescência verde e vermelha, emitidas pelo corante Live/Dead nas análises de viabilidade celular após tratamento IFD.

Inicialmente, as imagens eram convertidas para HSV (com componentes matiz, saturação e valor) e definidos os limites inferiores e superiores para a fluorescência verde e vermelho. Logo após, foi criado um filtro que fosse capaz de extrair áreas de acordo com os limites estabelecidos, mantendo apenas os pixels desejados. A partir disso, é calculado o percentual de pixels desejados sobre todos os pixels da imagem.

4.8 Análise de oxigênio dissolvido

Os ensaios de análise da concentração de oxigênio em amostra de curcumina foram realizadas a partir do acompanhamento de um eletrodo DO-9100 (Backlights). Para os ensaios foi construído um modelo de célula experimental por meio de impressão 3D, de material PLA e equipamento utilizado denominado Impressora 3D (Creality, Ender 3 V3 SE). O material 3D foi incluído no interior de um Becker de 100 mL, permitindo que estivessem fixos o eletrodo e uma agulha, responsável por introduzir gás nitrogênio na amostra, em momentos que foi necessário testes em meio anaeróbico.

O modelo de célula experimental foi produzido para que fosse possível avaliar a concentração de oxigênio em solução de curcumina em períodos com e sem iluminação. Devido ao espaço limitado de uma cubeta de quartzo, foi necessário a construção de uma nova célula, capaz de encaixar em um recipiente de vidro que permitisse a passagem de luz, como também possibilitasse a medida de oxigênio por eletrodo e introdução de nitrogênio na amostra, fazendo com que ambos os equipamentos estivessem fixos no recipiente.

A simulação da IFD fracionada com intervalos de 30 min ocorreu a partir de soluções de curcumina de 60 mL, na concentração de 10 μ M. Para ensaios em meio anaeróbico, a solução era inserida no Becker e nele havia a presença do eletrodo e a agulha que liberou o gás nitrogênio. Ao longo de 30 min, foi monitorado o decaimento da concentração de oxigênio no meio, coletando os resultados de 2 em 2 min, sob agitação.

Todavia, para ensaios em meio aeróbico, não foi necessária a presença de nitrogênio na amostra. A concentração de oxigênio da solução de curcumina foi monitorada por cerca de 30 min, sob agitação e iluminação por luz azul de 450 nm, intensidade de 55 mW/cm² e dose de luz de 72 J/cm², para que fossem coletadas medidas a cada 2 min.

4.9 Análise de Espécies Reativas de Oxigênio

Para que fosse possível compreender o processo de IFD convencional e fracionada foi realizado o experimento de análise de geração de produção de EROs. Para as análises de EROs foi utilizada a sonda dihidroetídio (DHE). Ao ser oxidada pelas EROs, a sonda se transforma em etídio (E⁺), que é responsável por gerar a fluorescência, o que permite a quantificação das espécies geradas durante o processo de irradiação da curcumina (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005a). O DHE quando oxidado, emite fluorescência nas regiões entre 575 e 625 nm. A intensidade máxima de fluorescência em 610 nm foi fixada para as análises de fluorescência dos perfis do espectro (CAIRES et al., 2020, 2024; PODSEDNIK; XU; LI, 2024).

Para os ensaios de fotodegradação utilizou-se um sistema com arranjo experimental diferente no qual permitiu agitação magnética durante o processo de irradiação. Nesse sistema foi utilizado o mesmo LED 450 nm da Biotable®, o que permitiu atingir a intensidade de 40 mW/cm².

Para análise da geração de EROs, foram divididos quatro grupos testando os parâmetros utilizados na IFD e grupo o controle da sonda (DHE), mostrado na **Tabela 5**.

Tabela 5: Grupos tratamento e controle para as análises da geração de EROs do FS curcumina e sonda DHE.

Grupos	Classificação	Concentração (µM)	Dose de luz (J/cm ²)	Iluminação	Intervalo (min)
1	Curcumina e DHE	10 µM de curcumina; 20µM de DHE	2,4 J/cm ² por min de iluminação	1 em 1 minuto de modo convencional	-
2	Curcumina e DHE	10 µM de curcumina; 20µM de DHE	2,4 J/cm ² por min de iluminação	1 em 1 minuto de modo fracionado	10 min de intervalo a cada 5 min de iluminação
3	Curcumina e DHE	10 µM de curcumina; 20µM de DHE	2,4 J/cm ² por min de iluminação	1 em 1 minuto de modo fracionado	30 min de intervalo a cada 5 min de iluminação
4	DHE	20 µM de DHE	2,4 J/cm ² por min de iluminação	1 em 1 minuto de modo convencional	-

As análises foram realizadas com a sonda DHE com a concentração estoque de 20 mM, solubilizado em metanol e a concentração de trabalho foi de 20 μ M (CAIRES; LIMA; ABELHA, 2023). Em uma cubeta de quartzo de quatro faces polidas com caminho óptico de 10 mm, foram inseridos 1979,5 μ L de água destilada, 2 μ L da solução de DHE e 18,5 μ L da solução de curcumina diluída em etanol na concentração de 10 μ M, semelhante aos experimentos de IFD.

A iluminação da cubeta ocorreu por meio de LED azul (450 nm), com doses de 2,4 J/cm², totalizando 60 J/cm², na intensidade 40 mW/cm², sob agitação constante, em função do tempo de irradiação. O monitoramento da formação de EROs ocorreu de 1 em 1 minuto, via espectroscopia de fluorescência molecular. Os parâmetros de excitação e emissão foram: excitação: 500 nm emissão: 600 – 700 nm, as fendas do equipamento foram ajustadas para excitação: 10 nm e emissão: 10 nm e 800 volts. Este processo foi repetido em todos os grupos testados, mesmo quando presente os intervalos. A análise de fluorescência foi realizada em um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian).

Em conjunto as análises de emissão de fluorescência da sonda DHE, foi realizado o monitoramento do espectro de absorção da amostra. As medidas ocorreram de 1 em 1 min pelo equipamento espectrofotômetro UV-Vis (Varian Cary 50). Os parâmetros de absorção das amostras ocorreram entre 200 e 800 nm. O processo foi repetido em todos os grupos experimentais com aplicação de luz ou em intervalos escuros.

4.10 Análise estatística

Para quantificação estatística de dados obtidos no processo de IFD, com o auxílio do software Origin 2018, os dados foram submetidos ao teste de normalidade por meio do teste L de Lilliefors (com intervalo de confiança de 95%). Para a análise de variação estatística, foram realizados dos testes ANOVA (Two-way) de uma variável e o teste de Tukey ($p > 0,05$).

5. Resultados e Discussão

5.1 Desenvolvimento do estudo de IFD

Para determinar os melhores parâmetros de aplicação de IFD na bactéria MRSA, observa-se na **Figura 7** o diagrama do desenvolvimento do protocolo. Os experimentos foram realizados para que indicassem quais seriam as condições ideais, avaliando a interação entre FS e bactéria alvo e qual seria o comportamento da molécula em solução e no interior da bactéria. E também, se haveria entrada do FS na bactéria ou se poderia gerar agregação das moléculas.

Para isso, foram realizados experimentos de fotodegradação e internalização da curcumina, permitindo observar o comportamento do FS sob iluminação e a curcumina na presença da bactéria. Após esse processo, iniciou-se os experimentos de IFD, realizando diferentes entregas de doses de luz em concentrações distintas do FS. A iluminação da curcumina gera EROs, que, devido à alta reatividade pode ocasionar a oxidação das células bacterianas, como também das próprias moléculas de FS presentes na solução. Portanto, a eficiência e comportamento de todos os processos são dependentes do tempo de exposição, sendo determinante para os resultados finais de cada cenário.

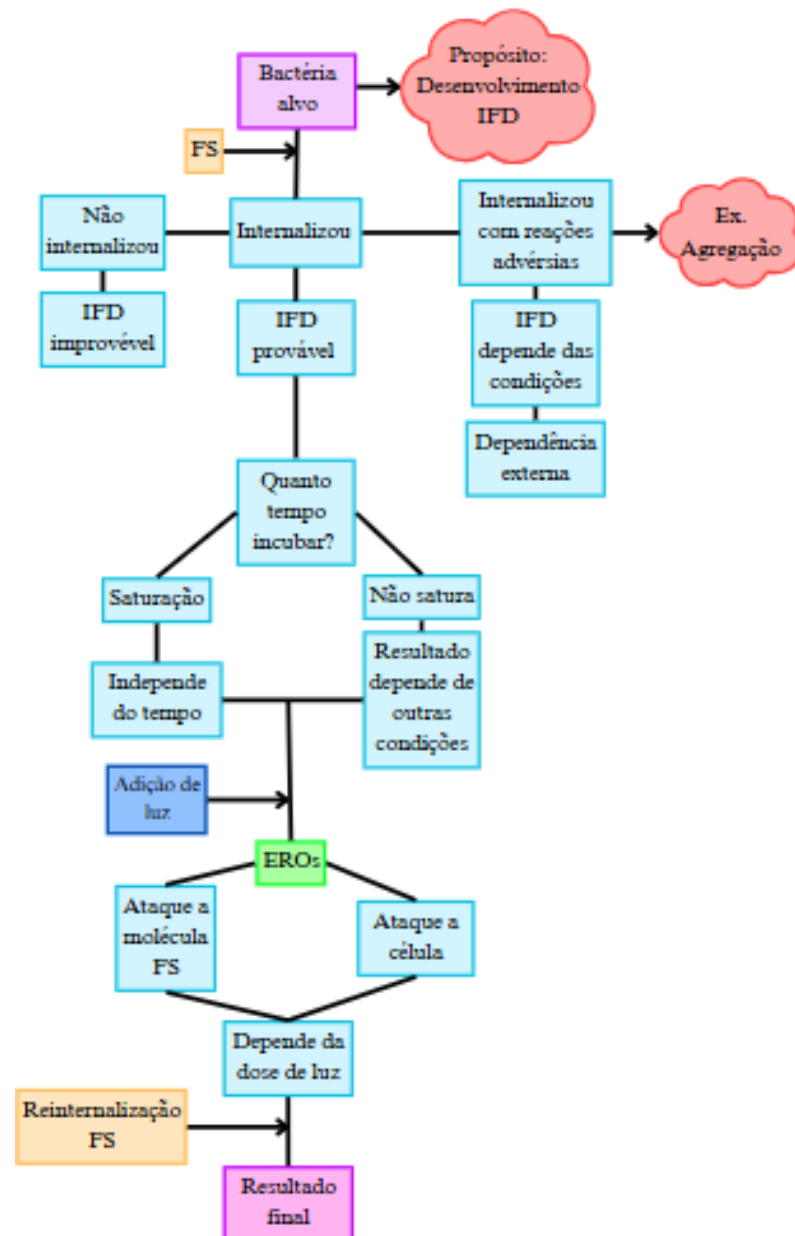


Figura 7: Diagrama de desenvolvimento do processo de IFD. Autoria própria (2024). Abreviações: IFD: Inativação Fotodinâmica; Ex.: Exemplo; FS: Fotossensibilizador; EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.

5.2 Análise de fotodegradação da curcumina

Com o intuito de avaliar o comportamento da curcumina sob iluminação da luz azul em função do tempo e como ocorreria a degradação da molécula, foram realizados os experimentos de fotodegradação da curcumina, acompanhando simultaneamente o consumo do FS e oxigênio. A investigação do comportamento da fotodegradação da curcumina foi conduzida com base na absorção UV-Vis e fluorescência molecular. O monitoramento da degradação foi realizado durante 24 min de irradiação com luz azul (450 nm), aplicando doses de energia de $57,8 \text{ J/cm}^2$, em determinados intervalos de tempos e doses de energia. Os espectros de absorção e fluorescência da curcumina pelo tempo de irradiação estão apresentados na **Figura 8 (a), (b), (c) e (d)**.

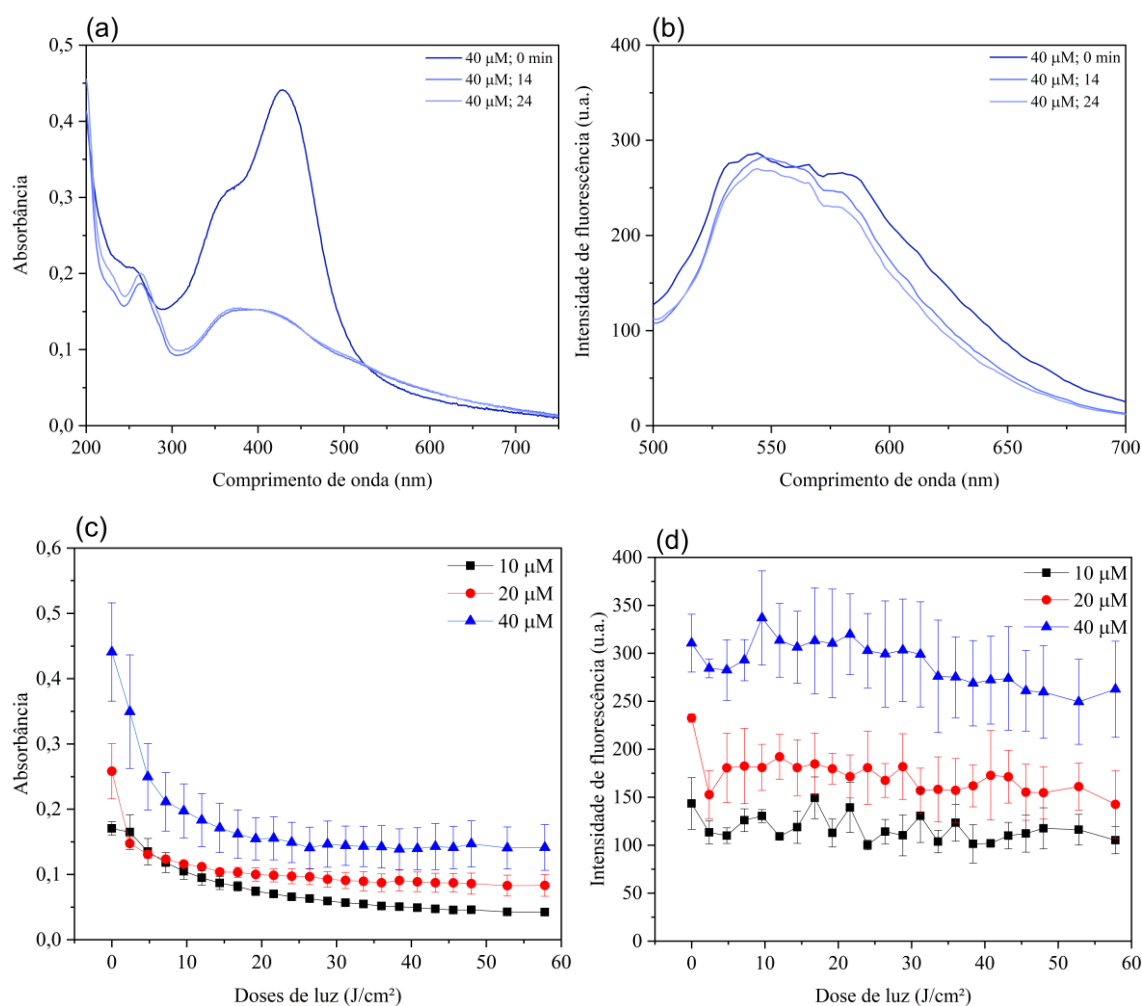


Figura 8: Espectro de absorção e fluorescência da curcumina a 10, 20 e $40 \mu\text{M}$, em função da dose de energia de $57,8 \text{ J/cm}^2$ na intensidade de 40 mW/cm^2 . A (a) apresenta a banda de absorção da curcumina nas concentrações de $40 \mu\text{M}$, nos tempos 0, 14 e 24 min. A (b) apresenta a banda de fluorescência da curcumina nas concentrações de $40 \mu\text{M}$, nos tempos 0, 14 e 24 min. A letra (c) representa a absorção da luz azul pela curcumina e sua degradação quando iluminada de 1 em 1 minuto, por 24 min. A letra (d) representa a fluorescência da curcumina e seu decaimento conforme foi iluminada de 1 em 1 minuto, por 24 minutos.

Para a **Figura 8 (a)** e **(b)** foi escolhida a concentração de 40 μM para a demonstração da tendência de degradação da molécula de curcumina ao longo da iluminação de 24 min. Nota-se que na **Figura 8 (a)** que a irradiação não provocou mudanças significativas nas principais bandas de absorção da molécula em torno das regiões de 430 nm e a **Figura 8 (b)** mostra o decaimento da intensidade de fluorescência da solução ao longo do tempo de iluminação.

A **Figura 8 (c)** representa o espectro de absorção da molécula de curcumina nas concentrações de 10, 20 e 40 μM . As análises foram realizadas por meio da iluminação da amostra de 1 em 1 minuto, durante 24 min consecutivos. Conforme ocorre a iluminação, é possível notar a degradação da molécula quando selecionado o comprimento de onda de 430 nm na região azul do espectro de absorção UV-Vis, pois conforme a curcumina é iluminada, ocorre sua degradação devido a sua interação com o oxigênio e a geração de EROs (GUPTA; ALI; VERMA, 2024; HINGSE; DIGOLE; ANNAPURE, 2014; VELHO; REBELO; MACEDO, 2023).

Os resultados mostram que a degradação da solução de curcumina em diferentes concentrações ocorre uma rápida degradação até a dose energia de 57,8 J/cm^2 para a geração de EROs. Isso poderia indicar que até que alcance essa dose antes que a curva se estabilize, pode ser o ponto chave, devido a maior geração de EROs que oxidariam células bacterianas. Esses resultados mostram que mesmo utilizando uma dose de energia 57,8 J/cm^2 ao longo de 24 min, a curcumina apresenta produto de degradação, porém não é consumida totalmente, pois a presença de agregados de curcumina poderiam dificultar a sua degradação e sua liberdade de interação com o oxigênio molecular (HAN et al., 2022).

A **Figura 8 (b)** e **(d)** apresenta o espectro de fluorescência da curcumina durante sua degradação à medida que a dose de luz aumenta. Os resultados mostram que, conforme a solução é iluminada, ocorre a degradação da curcumina e uma consequente redução na fluorescência da molécula ao longo do tempo. Quando analisado no comprimento de onda de 540 nm (**Figura 8 (d)**), observa-se um decaimento progressivo e a diminuição da intensidade de fluorescência.

Os resultados da fotodegradação demonstraram que ainda há curcumina presente no sistema após 24 min de irradiação. Esses resultados indicam que a concentração de curcumina pode permanecer constante na solução externa durante os segundos de irradiação aplicados no experimento biológico. Além disso, a análise do espectro de absorbância revelou a presença de fotoprodutos de degradação nas regiões características

em 200 – 300 nm (**Figura 8 (a)**) que correspondem exatamente as bandas de absorção dos possíveis produtos, como por exemplo a vanilina e o ácido ferúlico.

Os resultados obtidos estão corroborando com a literatura. Conforme a curcumina é iluminada e interage com o oxigênio, ocorrem reações que levam à formação dos produtos de degradação ácido ferúlico e vanilina (LIMA et al., 2022; N. KUMAR; R. NAIR; B, 2023a; SCHNEIDER et al., 2015; SHEN; JI, 2012). O deslocamento do pico da banda da curcumina na região de 430 nm pode ser atribuído ao seu processo de degradação. Os fotoprodutos ácido ferúlico e vanilina apresentam picos característicos nas regiões de 320 nm e 312 nm, respectivamente (HINGSE; DIGOLE; ANNAPURE, 2014). Lima et al., (2024) investigou o comportamento da fotodegradação da curcumina na concentração de 10 μM , em que foram submetidas as doses de energia de 0, 5, 10, 25 e 50 J/cm^2 com luz azul. Os resultados sugerem que a fotodegradação é proporcionalmente dependente da dose de energia aplicada, influenciando a geração EROs.

5.3 Estudo da internalização do fotossensibilizador em MRSA

As imagens de microscopia confocal foram realizadas durante processo de internalização da curcumina na concentração 10 μM pela bactéria MRSA, a fim de observar a interação entre os dois fatores. A **Figura 9 (a)** nos apresenta o aumento da intensidade de fluorescência, devido a entrada de FS para o meio intracelular ao longo do período de 20 min. Imagens de fluorescência da curcumina na bactéria foram capturadas do início e do fim do processo, demonstrados na **Figura 9 (b)** e **(c)**. A microscopia confocal possibilita a imagem microscópica pelo foco de luz, capaz de varrer uma área, possibilitando a captação de fluorescência de uma amostra.

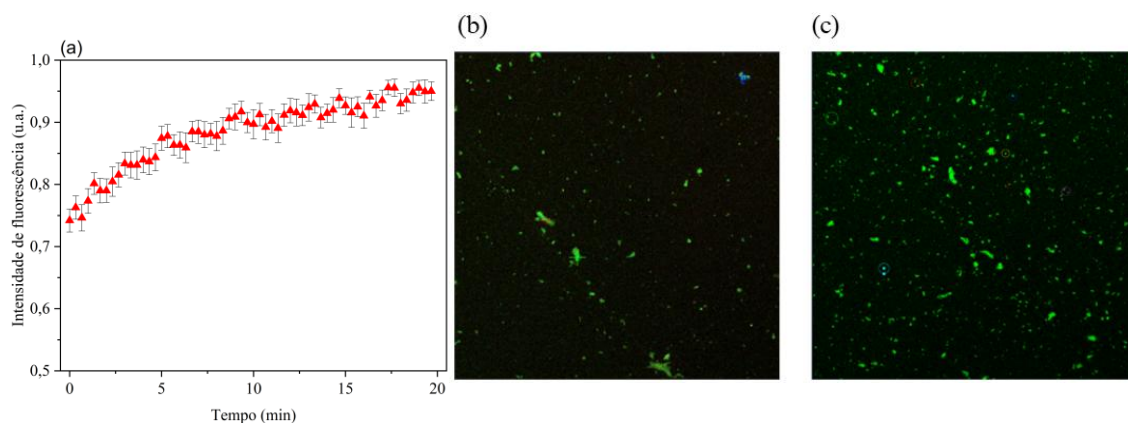


Figura 9: A Figura (a) representa o aumento da intensidade de fluorescência normalizada em função do tempo de exposição do FS a bactéria. Conforme a curcumina $10 \mu\text{M}$ entra na bactéria, há o aumento da fluorescência. As Figuras (b) e (c) referem-se a entrada de curcumina na célula e o acúmulo no meio do intracelular, por meio da captação de imagem de microscopia confocal. A Figura (b) representa o tempo inicial da internalização e Figura (c) o fim da internalização, após 20 min.

A **Figura 9 (a)** mostra o período de internalização da curcumina pela bactéria MRSA. Observa-se o aumento da intensidade de fluorescência na região de 540 nm , região característica de fluorescência da curcumina. O tempo zero se iniciou com cerca de 70% de fluorescência, pois há uma limitação da técnica para ajustes de parâmetros do microscópio. Entretanto, o FS já começa a ser absorvido desde o primeiro instante que é introduzido na amostra da bactéria MRSA. Portanto, foi considerado que a partir de 0,7 a intensidade de fluorescência seria o “background” do experimento. O aumento da fluorescência se deve na entrada de curcumina para o meio intracelular da bactéria, que ocorreu ao longo do tempo, apresentando uma tendência exponencial, que quando se aproxima da marca de 20 min, apresenta uma estabilização da curva, indicando ter alcançado um limite de concentração do FS dentro da célula.

Os resultados indicam que, ao expor as células a uma concentração de $10 \mu\text{M}$ de curcumina, são necessários aproximadamente 20 min para que o FS atinja sua máxima acumulação na bactéria. Nos primeiros 10 min de incubação, a fluorescência duplicou em relação ao valor inicial, sugerindo uma rápida internalização do FS. Embora a intensidade de fluorescência continue a aumentar nos minutos seguintes, a taxa de entrada do FS torna-se menos acentuada à medida que se aproxima do tempo de 20 minutos.

As **Figuras 9 (b) e (c)** demonstram que o aumento da fluorescência verde está relacionado ao acúmulo do FS dentro das células. Embora a curcumina esteja presente em todo o meio extracelular, a fluorescência detectada ocorre predominantemente atribuída à sua internalização pelas células, permitindo a avaliação do processo de captação. Dessa forma, apesar da emissão de fluorescência no meio extracelular, as

células bacterianas se destacam como regiões de maior intensidade fluorescente devido à marcação pelo FS o interior celular.

Os dados de internalização indicam que a taxa de entrada da curcumina nas células supera sua taxa de saída, uma vez que o aumento de fluorescência é proporcional a concentração utilizada. Observa-se que a estabilização da curva ocorre em torno de 20 min, sugerindo que a prolongação no tempo de incubação além desse período poderia resultar em saturação, reduzindo a taxa de entrada da curcumina ao 30 min. Dessa forma, os resultados indicam que o protocolo de IFD a ser empregado neste estudo fornece um tempo adequado para a integralização do FS. Além disso, sugere-se que a concentração utilizada seja suficiente para interagir tanto com células planctônicas quanto com agregados bacterianos, sem a necessidade de aguardar a completa saturação intracelular da curcumina para alcançar uma inativação eficaz.

5.4 Inativação Fotodinâmica Convencional

A avaliação da eficácia de um tratamento antimicrobiano requer a quantificação da redução da população microbiana em escala logarítmica. De acordo com o Pankey et al (2004), a redução de 3 logs UFC/mL é considerada um critério de eficiência, correspondendo a inativação de 99,9% da população microbiana original. Com base nesse parâmetro, neste estudo, o termo “eficiência significativa” será utilizado para descrever uma inativação mínima de três logs da bactéria MRSA.

Os resultados obtidos no processo de IFD convencional para a bactéria MRSA, com a curcumina nas concentrações de 5, 10 e 15 μM , irradiados nas doses de energia de 5, 10 e 15 J/cm^2 respectivamente, são mostrados na **Figura 10**. No eixo Y nota-se a redução de logs da bactéria em função das concentrações e dose de energia utilizada no processo de IFD.

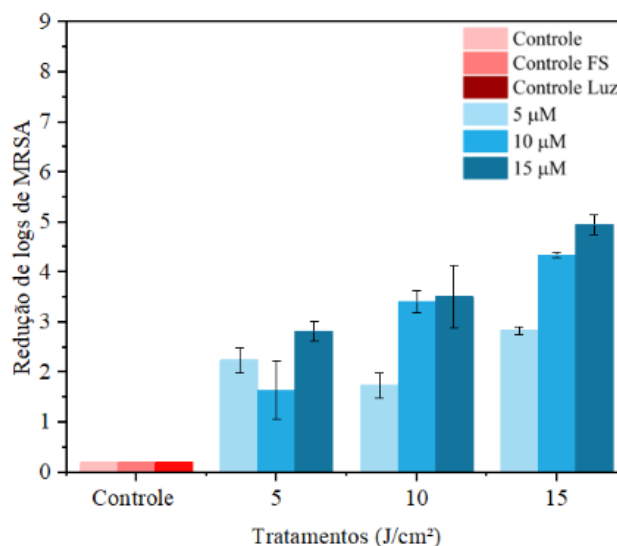


Figura 10: Redução de logs de MRSA no processo de IFD convencional em relação ao controle microbiano. Nas concentrações de 5, 10 e 15 µM de curcumina, aplicando as doses de energia de 5, 10 e 15 J/cm² contra a bactéria MRSA.

Nos resultados obtidos, nota-se que a concentração de 5 µM não apresentou eficiência significativa com nenhuma das três doses de energia 5, 10 e 15 J/cm² aplicadas, pois não alcançou boa eficiência na inativação do microrganismo, reduzindo apenas 2,24; 1,74 e 2,83 logs de MRSA, respectivamente. Com base na análise da **Figura 10**, concluiu-se que a concentração de 5 µM não foi suficiente para inativar a bactéria, para as doses de energia analisadas. Isso se deve a limitação de geração EROs relacionada a baixa concentração de curcumina para as condições de irradiação avaliada.

A concentração de 10 µM apresentou eficiência apenas com as doses de energia de 10 e 15 J/cm², reduzindo 3,41 e 4,34 logs respectivamente. Essas doses de energia foram suficientes e consideradas eficazes para inativação de microrganismos. A dose de energia de 5 J/cm² em combinação a concentração de 10 µM não apresentou efetividade significativa, reduzindo apenas 1,64 logs, pois possivelmente a dose de energia avaliada, não foi o suficiente para gerar EROs capazes de causar danos irreversíveis na célula bacteriana.

No entanto a concentração de 15 µM apresentou efeito fotobactericida apenas com as doses de energia de 10 e 15 J/cm², inativando cerca de 3,51 e 4,95 respectivamente. A concentração de 15 µM e 5 J/cm² não apresentaram resultados promissores, inativando apenas 2,82 logs do microrganismo, pois a dose de energia usada não foi suficiente para a fotoativar as moléculas de curcumina presente no meio reacional do alvo. Contudo, os resultados com as concentrações de 10 e 15 µM com doses de 10 e 15 J/cm² não apresentam diferenças estatísticas entre si. Esses são resultados são considerados significativos para a IFD convencional, inativando cerca de 3 a 4 logs da bactéria MRSA.

Esse comportamento de redução de crescimento bacteriano foi relato por Lima *et al* (2024) usando a técnica de IFD com o FS curcumina, microplástico e água em *S. aureus*. Foram avaliadas concentrações de 3, 5, 7 e 10 μM de curcumina e doses de luz de 5 J/cm^2 (*S. aureus*) e 50 J/cm^2 (para MRSA), sob luz azul. Os resultados da ação da curcumina mostraram que apesar da presença de microplásticos afetar a eficiência da inativação, houve redução de MRSA em sua maior concentração avaliada.

Sammarro Silva *et al.*, (2023) investigaram se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exerce um efeito sinérgico ou antagonista na IFD contra a bactéria *S. aureus* ATCC, utilizando curcumina como FS. No estudo, as bactérias foram incubadas por 20 min e submetidas a uma dose de energia de 5 J/cm^2 . Foram avaliadas diferentes concentrações de curcumina, sendo 5; 7,5; 10 e 12,5 e 15 μM sem a presença de H_2O_2 e 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5; μM na presença de H_2O_2 . Os resultados indicaram que a IFD utilizando apenas de curcumina promoveu uma redução de $\geq 7,127$ log da população bacteriana, crescente em função da concentração do FS.

Por outro lado, a alta taxa de inativação encontrada com a bactéria *S. aureus* ATCC não ocorre quando aplicada a MRSA, em que Sammarro Silva *et al.*, (2023b) só atingiu a inativação do microrganismo quando aplicada a dose de luz de 50 J/cm^2 e concentração de 10 μM de curcumina, adicionando um processo de pré oxidação com H_2O_2 (0,04%) antes da IFD. Os resultados mostram a redução de 7 logs de MRSA, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, que obteve os melhores resultados de inativação de MRSA apenas quando aumentada a dose de luz (IFD convencional). No entanto, para a IFD fracionada com intervalos de 30 min, não foram necessárias altas doses de energia, pois os grupos de 5, 10 e 15 J/cm^2 fracionado alcançaram resultados promissores de inativação, chegando a >5 logs de redução.

Além disso, há estudos que avaliam a atividade antimicrobiana da curcumina em biofilmes de MRSA, como citado pelo autor (BLANCO *et al.*, 2022), que submeteu curcumina a concentração de 5 mM a um biofilme dessa espécie. A partir disso, foram aplicadas doses de energia de 40 e 80 J/cm^2 . Como resultado, observou-se que após as aplicações de IFD foi possível atrasar o início da fase exponencial da população bacteriana, limitar a quantidade de bactérias e desacelerar a taxa de crescimento do microrganismo, demonstrando resultados promissores para o tratamento de infecções, como também desacelerar e modificar padrões de crescimento do biofilme de MRSA.

A análise dos resultados para as concentrações de 10 e 15 μM nas três doses de energia investigadas indica que não houve saturamento da formação de EROs para as

essas concentrações de FS. Dessa forma, a a inativação de MRSA, está diretamente relacionada ao aumento das doses de energia. Com base nesses achados, formulamos a hipótese que as doses de energia de 5, 10 e 15 J/cm² não são suficientes para atingir a saturação na produção de EROs. Assim, a aplicação doses de energia mais elevadas, associadas as concentrações de 10 e 15 µM, poder ser uma estratégia viável para potencializar a inativação bacteriana.

Almeida et al., (2017) investigaram o tratamento de infecções por MRSA em camundongos fêmeas. Os animais foram previamente infectados e, posteriormente, tratados com curcumina (1,5%), associada a irradiação com LED azul de 450 nm, uma de 54 J/cm² por 10 minutos. Os resultados a partir da coleta do material biológico do animal, demonstraram a redução da carga bacteriana no linfonodo drenado após o tratamento de IFD com curcumina, com redução de >5 logs da MRSA. Outro estudo teve o objetivo de avaliar a ação da curcumina atuando contra biofilmes de MRSA em cavidades ósseas bovinas. A bactéria foi inoculada com lesões ósseas para formação do biofilme, para que fossem tratadas com 1,5 g/L de curcumina à 2% de álcool etílico, aplicando a dose de 20,1 J/cm² a 450 nm. Os resultados demonstraram 3,6 logs de redução (UFC/mL) do biofilme formado por MRSA, apresentando efetividade no tratamento (ARAÚJO et al., 2018).

Ambos os estudos de Almeida *et al.*, 2017 e Araújo *et al* 2018, demonstraram efetividade na inativação da bactéria MRSA, mesmo com diferentes concentrações do FS curcumina. Quanto as doses de luz, a dose de 54 J/cm² resultou em maior inativação da bactéria do que a aplicação de 20,1 J/cm², isto pode indicar que mesmo com uma concentração menor, doses mais altas de energia poderiam resultar em mais eficiência na inativação da bactéria MRSA, semelhante aos dados obtidos neste estudo que mostram que doses maiores de energia geram maior inativação da bactéria do que maiores concentrações do FS.

Em busca de melhores parâmetros e otimização para a inativação da bactéria MRSA, este estudo propõe análise da entrega de luz de modo fracionado, visando compreender seu efeito sobre o FS curcumina e sua efetividade na geração de EROs. Estudos prévios na literatura indicam que a aplicação de doses fracionadas de luz na Terapia Fotodinâmica (TFD), resulta em melhores desfechos no tratamento de tumores, o que sugere que essa abordagem também pode potencializar a eficiência da inativação bacteriana.

5.5 Inativação Fotodinâmica Fracionada

Para a IFD com o entrega de doses fracionadas de luz, foi selecionada a concentração de 10 μM de curcumina. Essa escolha se deve à similaridade dos resultados obtidos para as concentrações de 10 e 15 μM nos experimentos de modo convencional contra a bactéria MRSA, priorizando a menor concentração que demonstrou eficácia.

A **Figura 11** representa a IFD fracionada, em que foram submetidas doses de energia de 5 J/cm^2 , com intervalos de 10 e 30 min entre as doses, para que alcançassem o total de 5, 10 e 15 J/cm^2 . Os resultados são apresentados de ambos os intervalos (10 e 30 min), que podem ser representados pela letra “i”. O eixo Y refere-se à redução de logs UFC/mL da bactéria MRSA em função dos tratamentos com diferentes entregas de doses de luz, localizados no eixo X.

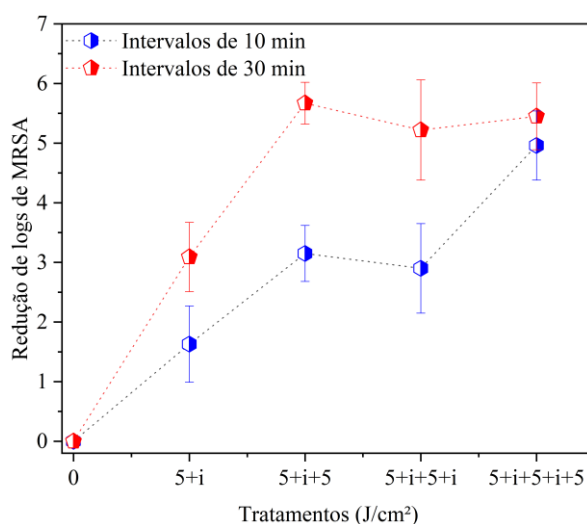


Figura 11: Processo de IFD fracionado com curcumina 10 μM , intervalos de 10 min e 30 min em logs de remoção de MRSA. O eixo X representa os tratamentos, em que os grupos 5+i, 5+i+5, 5+i+5+i e 5+i+5+i+5 são de modo fracionado, entre as doses de 5 J/cm^2 . O eixo Y representa a remoção de logs de MRSA. A letra “i” representa os intervalos de 10 min e os intervalos de 30 min.

Nos resultados com os intervalos de 10 min entre as aplicações de doses de energia, de 5 J/cm^2 fracionado, no primeiro ciclo (5+i) foi obtido 1,63 logs de redução da população microbiana em relação ao controle. No segundo ciclo (5+i+5 e 5+i+5+i), foram obtidos os valores de redução de população de 3,15 e 2,9 logs, correspondendo a um aumento de 1,52 e 1,27 logs em relação ao primeiro, respectivamente. É importante ressaltar que não há diferença estatística significativas entre os dois grupos. O resultado mais promissor foi obtido com a dose de energia de 15 J/cm^2 fracionada (5+i+5+i+5), que resultou em uma redução de 4,96 logs da população bacteriana, demonstrando uma redução adicional de 1,81 e 2,06 logs em relação aos os grupos de 10 J/cm^2 fracionados.

No fracionamento da IFD com intervalos de 30 min entre as aplicações das doses de energia, observou-se que a aplicação de 5 J/cm², seguida de um intervalo 30 min após a irradiação, apresentou eficiência na inativação bacteriana, reduzindo aproximadamente 3,09 logs da população bacteriana. As doses de energia 10 J/cm², com um intervalo de 30 min entre as aplicações sucessivas de luz, resultaram em reduções de cerca de 5,67 e 5,22 logs, representando um aumento de aproximadamente 2,58 e 2,13 logs em relação ao primeiro ciclo, respectivamente. Esses achados demonstraram que o uso da IFD fracionada apresentou maior atividade fotobactericida em comparação a IFD convencional. Além disso, a dose de energia de 15 J/cm² aplicada com intervalos de 30 min entre as exposições as doses de luz, foi capaz de inativar cerca de 5,45 logs da população bacteriana. No entanto, com intervalos prolongados, as doses de energia de 10 e 15 J/cm² apresentaram resultados estatisticamente similares, sem diferença estatística significativas entre os grupos.

Os resultados de fracionamento indicam que os grupos com menor intervalo (10 min) foram eficazes na inativação da bactéria MRSA, com exceção do grupo de 5 J/cm² com um intervalo, que não alcançou um resultado satisfatório. No entanto, as doses fracionadas 10 e 15 J/cm² nesse intervalo de tempo (10 min) foram suficientes para ativação da curcumina presente no meio, favorecendo a formação das EROs e promovendo a inativação de modo eficiente da população bacteriana.

Os melhores resultados de fracionamento de luz foram obtidos com intervalos maiores (30 min). Desde o primeiro grupo (5+i), observou-se eficiência na inativação da MRSA, atingindo a taxa de redução de 3 logs. Entretanto, os resultados mais promissores foram observados com a aplicação fracionado de 10 e 15 J/cm², sendo que a dose fracionada 10 J/cm² superou a eficácia da dose única de 15 J/cm² de modo convencional.

A **Figura 11** permite melhor visualização da diferença no ganho em escala logarítmica entre os dois métodos de fracionamento de luz, possibilitando a comparação entre suas taxas de inativação. O ciclo de 5 J/cm² com intervalo de 30 min resultou em inativação de cerca de 1,46 logs, superior ao mesmo ciclo com intervalo de 10 min. Para a dose de energia de 10 J/cm² fracionada, com um e dois intervalos de 30 min, observou-se um aumento de 2,52 e 2,32 logs, respectivamente, em relação aos ciclos com intervalos de 10 min. O ciclo de 15 J/cm² com dois intervalos apresentou uma diferença de apenas 0,49 logs entre os dois métodos, indicando semelhança nos resultados.

Os resultados obtidos com 5+i (30 min) podem ser correlacionados com os 5+i+5+i (10 min), uma vez que ambos apresentaram valores semelhantes de inativação.

Assim, uma dose menor de 5 J/cm² com um intervalo maior (30 min) foi tão eficaz quanto uma dose maior de 10 J/cm² com dois intervalos de 10 min. Por outro lado, os resultados de 15 J/cm² fracionados com intervalos de 10 e 30 min se mostraram equivalentes, indicando um máximo de eficiência nas condições avaliadas.

O melhor desempenho do grupo 5+i (30 min), em comparação com o grupo 5+i+5+i (10 min), pode ser atribuído ao tempo de espera, que compensa a menor dose de luz aplicada. No entanto, o grupo 5+i+5+i (10 min) ainda demonstrou eficiência na inativação da bacteriana, devido ao efeito cumulativo de danos das duas doses de luz de 5 J/cm², visto que com uma única dose não foi suficiente para obter resultado significativo.

Considerando que a redução logarítmica ocorre em uma escala de 10, é possível quantificar a redução da população bacteriana após um tratamento, permitindo a avaliação da eficácia da IFD contra a bactéria MRSA (**Tabela 6**).

Tabela 6: Porcentagem de inativação de MRSA quando aplicada IFD fracionada com intervalos de tempos de 10 e 30 min.

Redução Logarítmica	1 log ou 90%	2 logs ou 99%	3 logs ou 99,9%	4 logs ou 99,99%	5 logs ou 99,999%	6 logs ou 99,9999%
10 min	5+i	-	5+i+5	-	5+i+5+i+5	-
	-	-	5+i+5+i	-	-	-
30 min	-	-	5+i	-	5+i+5	-
	-	-	-	-	5+i+5+i	-
	-	-	-	-	5+i+5+i+5	-

Na literatura, diversos estudos investigaram o fracionamento de doses de luz para a inativação de microrganismos. Sampaio et al., (2020) avaliaram o efeito dos FS azul de metileno, clorina e6 e curcumina na inativação de *Enterococcus faecalis*, com a irradiação de forma contínua com intensidade menor quanto irradiação fracionada com maior intensidade de luminosa. O fracionamento foi realizado com períodos escuros de 60 segundos entre as aplicações. O azul de metileno promoveu redução completa da população bacteriana tanto com a aplicação de luz contínua a 100 J/cm² e concentração de 157 µM, quanto com a irradiação fracionada, na qual uma dose menor de 80 J/cm² na mesma concentração, também houve a redução completa do microrganismo.

Para a clorina e6, não houve redução bacteriana em diferentes concentrações e doses de luz. No entanto, quando a dose de 45 J/cm² foi fracionada na concentração de 84 µM, bem como na dose de 60 J/cm² com concentração de 20 µM, ocorreu a inativação completa da bactéria. No caso da curcumina, a redução total da bactéria foi observada a

partir da dose de 12,5 J/cm² com concentração de 33 µM. Entretanto, ao fracionar essas doses, a inativação completa só foi alcançada com uma concentração aumentada para 135 µM.

Outro estudo investigou o efeito da luz fracionada na inativação do biofilme da bactéria *Streptococcus mutans*. Os FS utilizados foram o azul de toluidina (3,26 µM), azul A (3,42 µM) e novo azul de metileno (2,87 µM), com aplicação de doses de 5 J/cm² de um laser de 630 nm. A irradiação contínua foi aplicada por 40 segundos, enquanto a fracionada consistiu em duas exposições de 20 segundos, separadas por um intervalo de 1 minuto. Os resultados indicaram >6 logs de redução da bactéria em sua forma planctônica e cerca de 4 logs de redução quando biofilme (MISBA; KHAN, 2018). O fracionamento de luz resultou em maior eficiência em comparação com a aplicação de luz contínua, corroborando os achados do presente estudo.

A análise dos dados sugere que, além do FS luz e do oxigênio, o tempo desempenha um papel fundamental na eficiência IFD. O tempo atua como fator principal para que a IFD aconteça com eficiência, pois sem tempos de espera em determinadas etapas do protocolo, a concentração do FS utilizado, a dose de luz ou concentração de oxigênio no meio não seriam suficientes para atingir resultados considerados eficazes. O tempo de espera influencia a interação entre bactéria e FS (internalização), o período de irradiação e os intervalos entre as doses na IFD fracionada, levantando a hipótese de reoxigenação do meio extracelular e intracelular, tornando dinâmico a interação entre os quatro fatores.

Os resultados de IFD fracionada, observou-se que os intervalos de tempo sem e com iluminação com o fracionamento entre as doses de luz tem influência significativa na eficácia da inativação. Durante a irradiação, tempos mais longos resultaram em maior eficiência bactericida. Entretanto, os intervalos entre as doses possivelmente favoreceram a reoxigenação do meio e facilitaram a difusão de oxigênio através da membrana plasmática da MRSA, além de prolongar a exposição da bactéria ao FS, permitindo novamente a internalização e penetração pela membrana.

A taxa de mortalidade da bactéria MRSA ocorre de maneira progressiva, pois, na presença do FS e sob iluminação, há geração de EROs que causam danos irreversíveis as estruturas celulares, levando a morte de milhares de células. Os ciclos de 5 J/cm² em combinação com diferentes apresentaram resultados eficientes, com exceção do ciclo de 5 J/cm² com intervalo de 10 min, que não demonstrou a mesma eficácia

O processo de reoxigenação, já documentado na literatura em aplicações de TFD com tumores, pode estar relacionado a reoxigenação da solução nos intervalos de 10 e 30 min da IFD fracionada (**Figura 11**). Durante a aplicação contínua de doses de luzes, o estoque de oxigênio na solução contendo bactéria e FS pode se esgotar progressivamente. No entanto, o fracionamento de doses de energia luminosa pode favorecer a reoxigenação do meio e restabelecer o processo de difusão de oxigênio pela membrana do microrganismo. Os resultados de IFD fracionada demonstraram maior eficácia devido à importância dos intervalos de recuperação do oxigênio disponível no local, visto que a IFD depende obrigatoriamente da presença de oxigênio para sua efetividade. Assim, como observado, os intervalos maiores (30 min), resultaram em uma inativação mais eficiente, enquanto os intervalos de 10 min podem ter sido insuficientes para uma reoxigenação adequada da solução e difusão de oxigênio através da membrana da bactéria.

A técnica de TFD é utilizada no tratamento de tumores como alternativa e ser associada a quimioterapia e radioterapia. Neste estudo, Estevez et al., (2010) utilizou a PDT como meio de tratamento para câncer de ovário em ratos, aplicando duas doses de luz diferentes no FS HAL (hexaminoleuvilinato), resultando na necrose do tumor por oxidação. O processo de fracionamento da luz poderia gerar uma reoxigenação do local durante os intervalos em escuro. Os resultados demonstraram que as doses fracionadas de luz induziram melhor a necrose do tumor em relação as doses contínuas de luz.

Outro estudo demonstrou que há eficácia na aplicação da TFD fracionada, onde foi utilizado o FS ácido δ -aminolevulínico (ALA) na pele de camundongos, tumores xenoenxertos e pele humana. Os resultados mostram que o fracionamento de doses de energia pode estar ligado ao processo de reoxigenação do tecido nos períodos nos quais há ausência de irradiação, (SCHOLZ et al., 2020). Os trabalhos relacionados a TFD fracionado apresentaram melhores resultados que a convencional. Tendo como hipótese principal o processo de reoxigenação do tecido. A resposta da TFD depende necessariamente da interação entre o agente fotossensibilizante, luz e a disponibilidade de oxigênio molecular. No contexto da TFD fracionada em tumores, o sistema biológico pode apresentar hipóxia. Esse fato ressalta que a reoxigênção é determinante para o aumento da eficácia do tratamento (LARUE et al., 2019).

Embora o tempo de incubação do FS curcumina na bactéria seja de 20 min, a molécula pode ser consumida gradualmente ao longo do processo de irradiação, criando um ambiente dinâmico em cada estágio do tratamento. Assim, é possível propor a

hipótese de que, após o primeiro ciclo de irradiação, há o consumo parcial da curcumina e um consumo significativo de oxigênio molecular presente nas bactérias. Após o período de espera que precede a segunda dose de energia luminosa, pode ocorrer o processo de reoxigenação, além de um possível reestabelecimento de curcumina no interior da célula bacteriana. Dessa forma, com os ciclos subsequentes, a geração de EROs pode ser sustentada devido á maior disponibilidade de oxigênio molecular (MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016).

5.6 Inativação fotodinâmica Convencional vs Fracionada

Para melhor comparação entre os protocolos de IFD, foram acrescentados todos os dados obtidos com a concentração de 10 μM de curcumina e as doses aplicadas na IFD convencional e IFD fracionada (**Figura 12**). O eixo X representa as condições de entrega de luz e o eixo Y representa a inativação da bactéria MRSA em logs a partir do cálculo de UFC/mL.

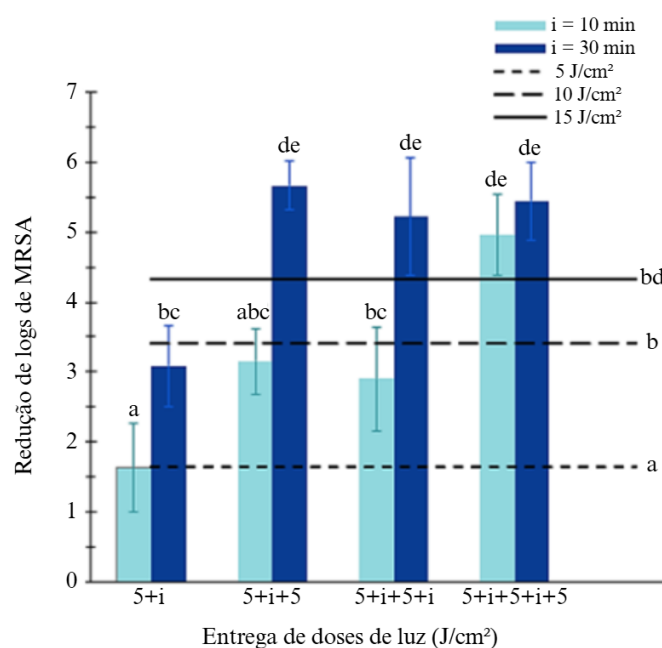


Figura 12: Representação das terapias de inativação fotodinâmica de modo convencional e fracionado com a concentração de 10 μM de curcumina. O eixo Y representa a remoção de logs da bactéria MRSA em log (UFC/mL) e o eixo X representa as condições da entrega de luz contra este microrganismo, em que a letra “i” representa os intervalos de 10 e 30 min dados entre as doses na IFD fracionada. As linhas são referentes a IFD convencional e as colunas referem-se a IFD fracionada. As letras “a, b, c, d, e” representam semelhança entre estes resultados, estatisticamente.

As linhas distribuídas ao longo do eixo X representam as doses de luz aplicadas tradicionalmente, sem intervalos, sendo elas 5, 10 e 15 J/cm^2 . As colunas representam as doses fracionadas, ou seja, com intervalos. Os intervalos testados foram de 10 e 30 min,

sendo aplicados entre doses de 5 J/cm². As letras retratam quais resultados são semelhantes entre si de acordo com o desvio padrão.

Na concentração de 10 µM, com diferentes doses de luz, observa-se que tanto a aplicação de 5 J/cm² de modo convencional quanto a aplicação de modo fracionado com intervalo de 10 min após a IFD apresentaram resultados semelhantes. Além disso, nenhum desses protocolos atingiu a redução mínima necessária para serem considerados eficazes. No entanto, a aplicação de 5 J/cm² com intervalo de 30 min demonstrou maior efetividade em comparação aos dois grupos anteriores, apresentando equivalência estatística aos resultados obtidos com 10 J/cm².

A aplicação contínua de 10 J/cm² foi capaz de inativar mais de 3 logs, indicando um efeito eficaz na inativação bacteriana. No entanto, ao comparar a irradiação contínua com o protocolo fracionado de 10 J/cm² com intervalo de 10 min, não apresentaram diferença estatística significativas. Embora esse protocolo tenha se mostrado eficaz, não obteve melhor resultado do que em uma dose de energia contínua.

Por outro lado, o intervalo mais longo de 30 min com doses de energia fracionadas de 10 J/cm², resultou em maior eficácia quando comparado a mesma dose de IFD convencional. A dose de energia de 15 J/cm² convencional demonstrou efetividade na inativação da bactéria, mas estatisticamente apresentou resultados similares a dose de energia de 10 J/cm² fracionada com intervalos de 30 min. Assim, os resultados indicam que os protocolos da IFD fracionada com 10 J/cm² e intervalos de 30 min, bem como os protocolos de 15 J/cm² fracionado com os intervalos de 10 e 30 min, foram mais eficazes do que a IFD convencional.

5.7 Análise de microscopia confocal

Para compreender melhor o efeito fotodinâmico com doses de luz fracionadas, foram realizadas capturas de imagens de microscopia confocal de fluorescência, analisando a viabilidade celular MRSA. No experimento, as células bacterianas foram submetidas as mesmas condições da IFD fracionada, com aplicação de pulsos de luz de 5 J/cm², concentração de 10 µM de curcumina e intervalos de 30 min entre as doses.

Para avaliar a viabilidade celular, foram utilizados dois corantes fluorescentes: calceína-AM e iodeto de propídio (IP). A calceína-AM emite fluorescência verde, indicando que as células estão metabolicamente ativas, pois para que emita a fluorescência, é necessário que ocorra a ação de enzimas esterases no meio intracelular contra o composto, transformando-o em calceína. Já o PI marca células metabolicamente

inativas, pois só é capaz de penetrar em células que tiveram sua membrana rompida/comprometida, onde se liga ao DNA, emitindo fluorescência vermelha (AQAWI et al., 2021).

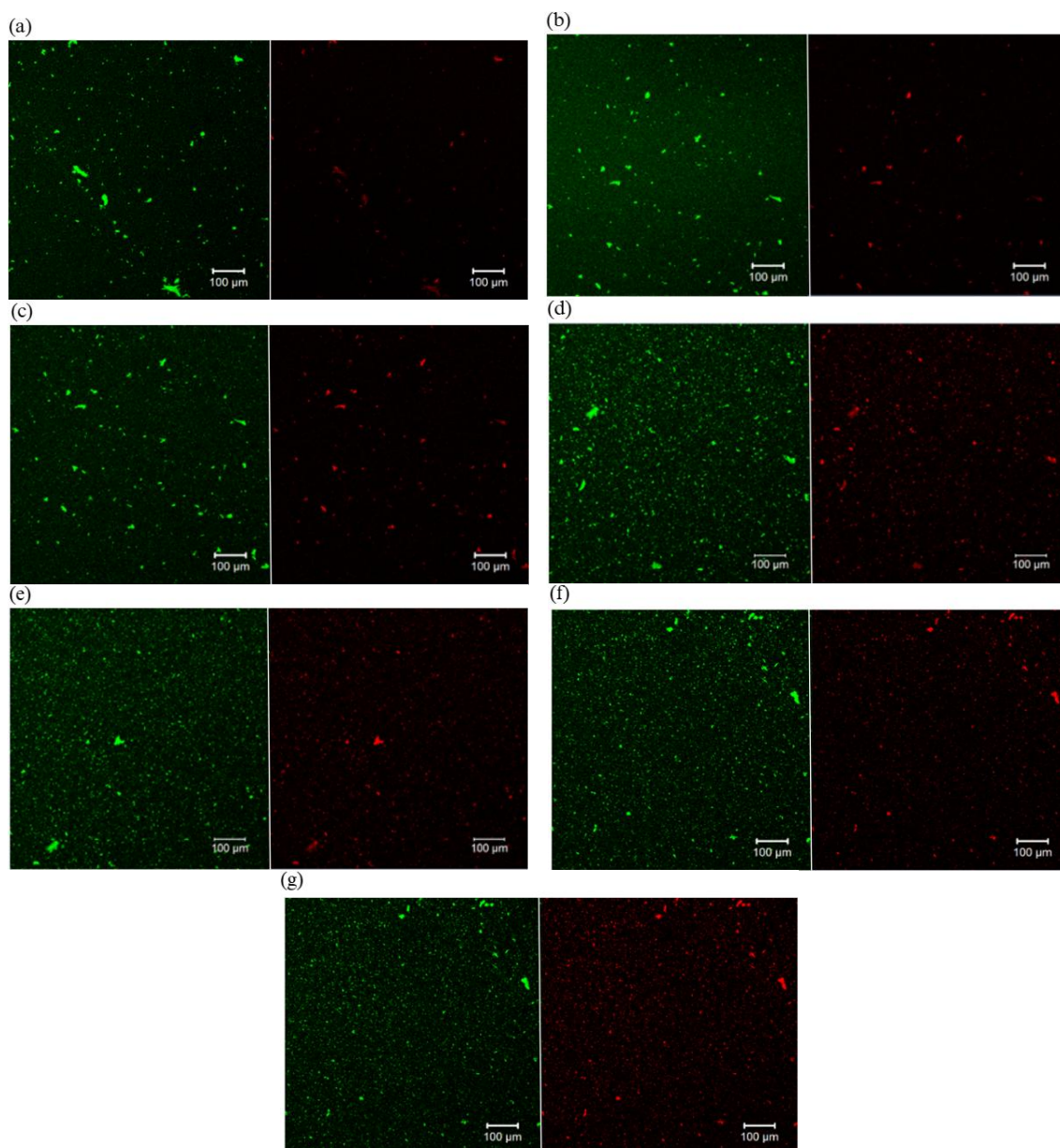


Figura 13: Imagens de microscopia confocal de IFD fracionada com 30 min de intervalos na bactéria MRSA. Concentração de $10 \mu\text{M}$ de curcumina e aplicadas doses de luz de 5 J/cm^2 . (a) se refere ao grupo ao grupo controle, (b) à 5 J/cm^2 , (c) a 5+i, (d) a 5+i+5, (e) a 5+i+5+i, (f) a 5+i+5+i+5 e (g) à 5+i+5+i+5+i.

Como observado na **Figura 13 (a), (b), (c), (d), (e), (f) e (g)**, é possível acompanhar a progressão do tratamento fotodinâmico ao longo das aplicações de luz. A **Figura 13 (a)** mostra o controle bacteriano, em que havia apenas a presença de curcumina ($10 \mu\text{M}$), calceína-AM e IP. A marcação fluorescente permitiu a visualização da viabilidade das células de MRSA, evidenciado que a maioria das células que permanecem viáveis, o que é esperado para uma população bacteriana não tratadas.

Com aplicação da dose de 5 J/cm², observa-se na **Figura 13 (b)** um aumento na fluorescência vermelha, indicando que o tratamento IFD ocasionou danos as células. Após um intervalo de 30 min, a **Figura 13 (c)** revela um aumento da intensidade da cor vermelha, indicando um número maior de células inviáveis. Esses achados corroboram com os resultados obtidos com a IFD convencional e IFD fracionada (5+i), ambas com curcumina a 10 µM com dose de 5 J/cm². A IFD convencional apresentou menor eficiência na inativação da bacteriana, com redução de apenas 1,64 logs. No entanto, com a introdução de um intervalo entre as aplicações de luz, houve um aumento na inativação, pois a IFD fracionada com intervalos de 30 min, o grupo (5+i) apresentou uma redução de aproximadamente 3,09 logs da população bacteriana.

Ao aumentar as doses de luz para 10 J/cm² (5+i+5), com um intervalo de 30 min entre as aplicações, na **Figura 13 (d)** observa-se um aumento ainda maior da intensidade de fluorescência vermelha. Esse efeito se intensifica quando intervalo é aplicado, como mostrado na **Figura 13 (e)**. O mesmo comportamento é observado para as doses de 15 J/cm² fracionada (5+i+5+i+5) e quando dado um intervalo de 15 min é introduzido, (5+i+5+i+5+i), resultado no aumento no número de células mortas (inviáveis) após o período de espera (**Figuras 13 (f) e (g)**). A cada pulso de luz aplicado e intervalo introduzido, há um aumento progressivo da mortalidade celular, similar aos resultados de resultados de IFD fracionada com intervalos de 30 min, onde os grupos tratados a partir de 10 J/cm² fracionado apresentaram uma redução superior a >5 logs.

Os resultados da análise qualitativa de viabilidade celular podem ser comparados a com estudos anteriores, nos quais a ação da curcumina sobre MRSA foi analisada por microscopia confocal após IFD. No estudo de Freitas et al., (2019b), a bactéria foi tratada com concentração de 100 µg/mL de curcumina e submetida as doses de 8 e 20 J/cm². Para a marcação foi inserido o corante Live/Dead, com a presença de SYTO-9 para visualização de células vivas (viáveis) e IP para células mortas (inviáveis). Os autores observaram danos celulares apenas para a amostra que receberam luz, confirmando que a curcumina não possui citotoxicidade no escuro, mas pode causar danos ao microrganismo, quando fotoativada. Além disso, verificou-se que a dose de 20 J/cm² resultou em uma taxa de maior inativação do que a dose de 8 J/cm², evidenciando que a eficácia do tratamento depende da concentração do FS e da dose de luz aplicada.

Para avaliar quantitativamente as imagens, foi realizada a análise de fluorescência verde e vermelha por cada grupo, permitindo a obtenção de dados que evidencia a tendência do tratamento. Como mostrado na **Figura 14**, observa-se que, a cada aplicação

de luz, há uma redução progressiva da fluorescência verde (indicativa de células viáveis) e um aumento da redução progressiva da fluorescência vermelha (indicativa de células inviáveis), confirmando o efeito acumulativo do tratamento fotodinâmico.

A **Figura 14** mostra a distribuição células bacterianas de MRSA que estão viáveis (metabolicamente ativas) e não viáveis (metabolicamente inativas) no eixo Y, correlacionadas ao protocolo de IFD fracionada com intervalos de 30 min após pulsos de luz de 5 J/cm². Para obtenção dos dados quantitativos, foram selecionados pixels com emissão de fluorescência acima do valor do valor mínimo 12, permitindo a análise da resposta do tratamento fotodinâmico à medida que as doses de luz e os intervalos entre as irradiações foram aplicados.

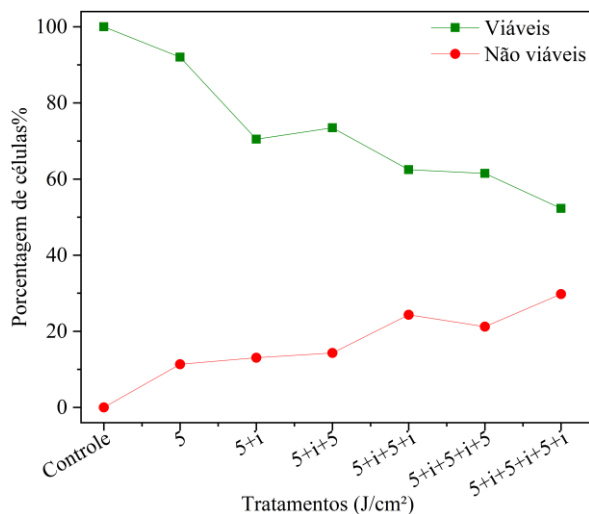


Figura 14: Representação gráfica de células viáveis e não viáveis após tratamento IFD fracionada, utilizando concentração de curcumina de 10 µM e aplicadas doses de luz de 5 J/cm² e intervalos de 30 min.

A **Figura 14** mostra, a aplicação da primeira dose de luz (5 J/cm²) que resultou na redução da porcentagem de células viáveis e em um aumento no número de células inviáveis. Após um intervalo de 30 min, observou-se uma redução adicional das células de células viáveis e um leve aumento da população de células mortas. A aplicação consecutiva de doses de luz contra a bactéria MRSA resultou em um aumento progressivo da inativação bacteriana, corroborando os achados da IFD fracionada com intervalos de 30 min. Esse efeito está diretamente relacionado à geração de EROs, que desempenham um papel central no processo de IFD.

Ao analisar a fluorescência vermelha, correspondente as células inviáveis, verifica-se que a aplicação de única dose de 5 J/cm² foi capaz de inativar cerca de aproximadamente 11% da população bacteriana. Quando um intervalo de 30 min foi

introduzido após essa dose, a inativação aumentou para 13%. Com a aplicação de 10 J/cm² fracionado (5+i+5), observou-se inativação de cerca de 14% da população bacteriana. No entanto, quando um intervalo foi adicionado após as doses, a inativação aumentou para 24%. Para a dose de 15 J/cm², a inativação inicial foi de 21%, enquanto a introdução de um intervalo elevou esse valor para 29%.

Esses resultados indicam que a introdução de intervalos entre as doses de luz promove um aumento da intensidade de fluorescência da cor vermelha e diminuição da fluorescência verde, sugerindo que a morte celular não ocorre de maneira imediata após a aplicação da IFD.

Os danos induzidos pelos pulsos de luz podem desencadear processos celulares que culminam na inativação ao longo do tempo. Isso é evidenciado pelo fato de que os grupos que intervalos apresentaram maior inativação em comparação aqueles analisados logo após o processo de aplicação de luz.

5.8 Avaliação de concentração de oxigênio

Para a confirmar da hipótese levantada neste estudo, foi realizado o monitoramento da concentração de oxigênio em uma solução de curcumina a 10 µM, acompanhando o decaimento da concentração de oxigênio (mg/L) ao longo do tempo (**Figura 15**). Como controle, foi utilizado um eletrodo de oxigênio para monitorar a depleção do gás ao longo de 30 min, enquanto nitrogênio era injetado na amostra.

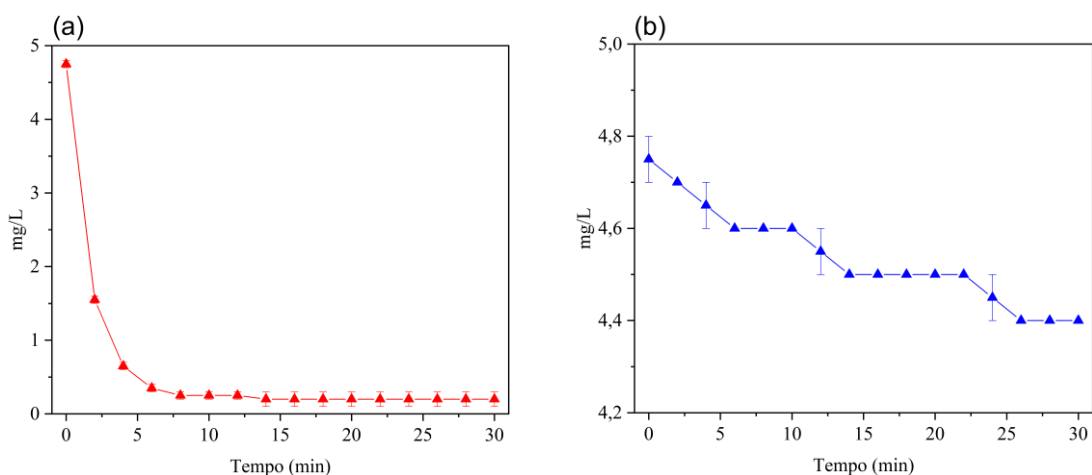


Figura 15: Monitoramento da concentração (mg/L) de oxigênio na amostra de curcumina (10 µM) por eletrodo. A Figura (a) se refere ao monitoramento de oxigênio ao longo de 30 min quando injetado nitrogênio na amostra. A Figura (b) representa a iluminação da solução de curcumina (10 µM), aplicada dose de 72 J/cm², na intensidade de 40 mW/cm², monitorada de 2 em 2 min.

A **Figura 15 (a)**, observa-se a redução progressiva da concentração de oxigênio na solução de curcumina quando submetida à injeção de nitrogênio. Os valores foram

coletados a cada 2 min e monitorado. A concentração inicial se iniciou com de 4,75 mg/L. Em apenas 7 min, a estabilização da curva foi alcançada, indicando um rápido decaimento de oxigênio na amostra, atingido valores inferiores. Essa estabilização sugere que a solução atingiu o limite de oxigênio disponível, sem a possibilidade de reposição do gás dissolvido

Na Figura **15 (b)**, é mostrado o monitoramento da concentração de oxigênio na solução de curcumina iluminada, sem injeção de nitrogênio. A amostra foi submetida a uma iluminação ao longo de 30 min, com dose total de 72 J/cm² e uma intensidade de 40 mW/cm², com coletas a cada 2 min. Ao longo da irradiação, observou-se um declínio na concentração de oxigênio, que iniciou em aproximadamente 4,75 mg/L e reduziu progressivamente até atingir a marca de 4,4 mg/L. Esse comportamento indica que o oxigênio molecular foi consumido durante a ativação da curcumina, corroborando o fato de que a formação de EROs, requer a utilização de O₂.

Os resultados obtidos pelo eletrodo de pelo eletrodo sustentam a hipótese de que a IFD contínua consome estaria consumindo todo o oxigênio presente na amostra e pode limitar a eficiência da inativação de MRSA. No entanto, a IFD fracionada com intervalos de 30 min apresentou maiores taxas de inativação, possivelmente devido a reoxigenação do meio e a difusão de oxigênio para o interior das células bacterianas. Além disso, os intervalos entre as aplicações de luz podem ter favorecido a incorporação intracelular da curcumina não agregada, justificando o porquê menores doses de luz alcançaram resultados tão promissores quanto maiores doses de energia aplicadas.

5.9 Análise da geração de espécies reativas de oxigênio

Este estudo teve como objetivo compreender o processo de IFD sob diferentes condições de iluminação, comparando a aplicação de doses contínuas e fracionadas. Para isso, utilizou-se a sonda fluorescente DHE, que permite monitorar a geração de EROs em períodos específicos de iluminação. A curcumina foi irradiada tanto na forma contínua quanto fracionada para avaliar a dinâmica da geração de EROs. Durante os períodos de iluminação, as espécies reativas oxidam a sonda fluorescente, resultando na formação do produto oxidado E⁺, o que explica o aumento da intensidade de fluorescência. Por outro lado, nos intervalos de 10 e 30 min, quando não houve iluminação, não ocorreu a geração de EROs. Nesses períodos, observou-se a estabilização da fluorescência e absorção indicando que a formação de EROs depende da exposição a luz. Além disso, a estabilização da intensidade de fluorescência e absorção da curcumina indica que, na

ausência de iluminação, o FS não apresenta toxicidade, reforçando sua segurança quando não ativado por luz.

As **Figuras 16 (a) e (b)** mostram os resultados da iluminação da solução de DHE (20 μM) em água destilada, monitorados a cada 1 em 1 min, ao longo de 25 min.

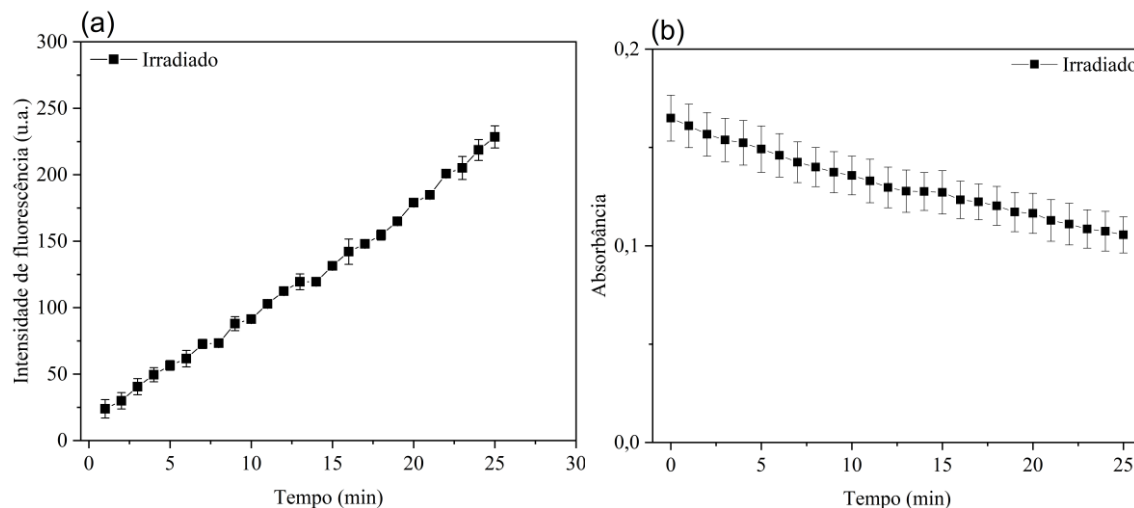


Figura 16: (a) Análise da medida de fluorescência da sonda DHE (20 μM) em água, excitação 500 e emissão 510 e (b) absorção UV-Vis em 345 nm. A solução foi iluminada de 1 em 1 minuto, por 25 minutos consecutivos, com a dose de luz de 2,4 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 .

Os experimentos de análise de fluorescência foram realizados simultaneamente ao monitoramento da banda de absorção no UV-Vis da molécula DHE. Quando selecionado o comprimento de onda de 610 nm na **Figura 16 (a)**, observou-se um aumento da intensidade de fluorescência em função do tempo para o produto de degradação do DHE, o etídio. O aumento da intensidade de fluorescência pode estar relacionado ao processo de hidrólise na solução, em que ocorre quebra das moléculas de água (H_2O), restando OH^- e H^+ . Os produtos da hidrólise podem ser responsáveis por causar oxidação na sonda DHE, pois uma das principais espécies geradas no processo de IFD é o radical OH^\cdot , favorecendo a conversão de DHE em E^+ que é fluorescente. A **Figura 16 (b)** mostra a o espectro de absorção da molécula DHE no comprimento de onda de 345 nm, região onde a molécula absorve a luz. À medida que a sonda foi oxidada pelos produtos de hidrólise, observou-se uma redução da absorção no UV-Vis, indicando a degradação da DHE. Esse processo também resultou na formação do produto E^+ , evidenciando surgimento de novos picos de absorção nas regiões de 285 e 480 nm (ZHENG et al., 2023).

As **Figuras 17 (a) e (b)** mostram os resultados da formação de EROs para irradiação contínua, como ocorre no processo de IFD convencional.

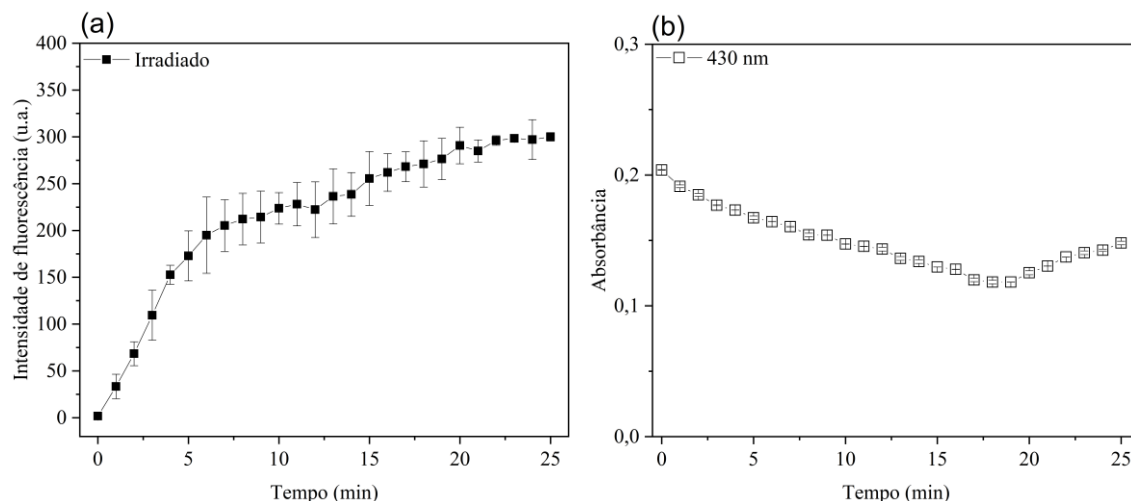


Figura 17: Análise da geração de EROs por meio da sonda DHE (20 μM) e do FS curcumina (10 μM). (a) fluorescência emissão 610 nm corresponde a emissão de fluorescência da sonda DHE quando excitada em 500 nm e emitida em 510 nm e (b) absorbância 430 nm, corresponde a absorção de luz e degradação da molécula de curcumina. A iluminação foi realizada de 1 em 1 minuto por 25 minutos, com a dose de luz total de 60 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 .

A curcumina juntamente com a sonda foram irradiadas durante 25 min e monitorado a formação de EROs a cada 1 min via espectroscopia de fluorescência e absorção UV-vis. Os resultados mostram o aumento da intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação, o que pode ser correlacionado com a formação de EROs. À medida que o FS é irradiado sofre degradação e formação espécies reativas que interage com a molécula da sonda de DHE, formando o produto oxidado E^+ fluorescente.

Durante o processo de irradiação, houve aumento da intensidade de fluorescência captada em função do tempo (**Figura 17 (a)**). A sonda DHE foi oxidada pelos produtos de reação entre FS e oxigênio, pois o aumento da intensidade de fluorescência gerada está relacionado a geração de EROs que oxidaram a sonda e formando o etídio, portanto, quanto mais espécies estão geradas com a iluminação do FS, maior será a intensidade de fluorescência emitida pelo E^+ .

Quando selecionado o comprimento de onda de 610 nm, observou-se nos primeiros cinco minutos de irradiação que a emissão de fluorescência aumentou de forma crescente e rápida, indicando alta taxa de geração de espécies e apresentando uma tendência exponencial da curva. A estabilização da curva inicia-se em cerca de 20 min de irradiação, que pode estar relacionada ao esgotamento de recursos para a geração de EROs, como também da sonda DHE na solução.

Paralelamente à análise do aumento da intensidade de fluorescência, foram realizadas medidas simultâneas de absorção da curcumina durante a iluminação da amostra. Como mostrado na **Figura 17 (b)**, ao monitorar o comprimento de onda de 430

nm, região em que a curcumina absorve a luz, observou-se um decaimento do espectro de absorção da molécula. Esse fenômeno é atribuído a fotodegradação da curcumina, resultando na geração de EROs e na formação dos produtos ácido ferúlico e vanilina (BHATIA et al., 2016; N. KUMAR; R. NAIR; B, 2023b). No entanto, após, amostra alcança a marca de 20 minutos de irradiação, verificou-se uma recuperação no espectro de absorção, sugerindo a presença de agregados na solução. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que, nesse estágio, que a absorção da solução não apresenta mais linearidade com a concentração, indicando possível reorganização molecular da curcumina na matriz de solvente.

Para avaliar a influência aplicação fracionada de luz na geração de EROs, foram realizados experimentos com cinco etapas de irradiações e quatro etapas de intervalos de 10 e 30 minutos no escuro. As **Figuras 18 (a) e (b)** mostram os resultados obtidos a partir da iluminação fracionada solução de curcumina (10 μM) e da sonda DHE (20 μM).

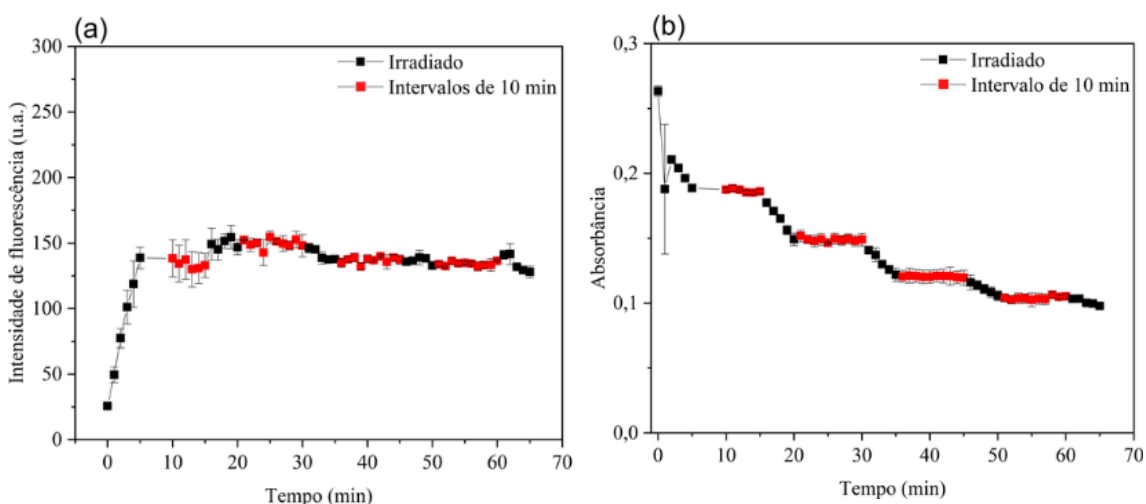


Figura 18: Análise da geração de EROs em função do tempo de modo fracionado por meio da sonda fluorescente DHE (20 μM) e do FS curcumina (10 μM). (a) fluorescência emissão 610 nm corresponde a emissão de fluorescência da sonda DHE, excitada em 500 nm e emitida em 510 nm e (b) absorbância 430 nm, corresponde a absorção de luz e degradação da molécula de curcumina. A iluminação foi realizada em 5 etapas de 1 em 1 minuto por 5 minutos, com a dose de luz total de 60 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 e os intervalos foram divididas em 4 etapas de 10 minutos cada.

A irradiação da amostra foi realizada em ciclos de 5 min de iluminação contínua, com monitoramento de fluorescência e absorção UV-Vis a cada 1 minuto. Após esse tempo, a amostra permaneceu em intervalo de 10 min no escuro, no qual fluorescência e absorção UV-Vis foi monitorada continuamente. Esse ciclo todo foi repetido ao longo de cinco etapas de irradiação, intercaladas com quatro etapas de intervalos de 10 min sem irradiação.

Os resultados da geração de EROs de modo fracionado com intervalos de 10 min, mostrados na **Figura 18 (a)**, observou-se um aumento da intensidade de fluorescência, podendo ser atribuída a oxidação da sonda DHE pelas espécies geradas, como consequência da do processo de irradiação. Com a seleção do comprimento de onda de 610 nm, verificou-se que os primeiros 5 min de iluminação apresentaram um rápido aumento da intensidade de fluorescência, indicando uma alta geração de espécies reativas.

A partir do primeiro intervalo, os resultados sugerem uma tendência exponencial, possivelmente indicando uma limitação nos recursos da solução, ainda com fluorescência na sua iluminação, subsequente. Além disso, observou-se que mesmo após a estabilização da intensidade de fluorescência, não há um decaimento significativo na fluorescência emitida pela sonda, sugerindo a formação de EROs ocorre predominantemente durante o processo de irradiação. Durante os intervalos de 10 min no escuro, há a estabilização da intensidade de fluorescência, indicando que não houve formação de EROs nesse período. No entanto, ao retomar irradiação, verificou-se um novo aumento na intensidade de fluorescência, confirmando a retomada da geração de espécies reativas.

Na **Figura 18 (b)** mostra as medidas de absorção UV-Vis, foi selecionado o comprimento de onda de 430 nm, a fim de observar o comportamento da curcumina, como também da geração de EROs em períodos de iluminação e escuros. O espectro de absorção revela que, durante a iluminação, a curcumina interage com o oxigênio, gerando a EROs. Esse processo resulta em um decaimento na absorção, indicando degradação da curcumina. Por outro lado, nos períodos em que a amostra permaneceu no escuro, não houve degradação significativa da curcumina, bem como não se observou produção de espécies reativas, confirmando que o processo de geração de EROs está diretamente dependente da exposição à luz.

Os resultados obtidos a partir da iluminação da solução curcumina (10 μM) e a sonda DHE (20 μM) de modo fracionado são mostrados na **Figura 19 (a)** e **(b)**. A irradiação da solução foi realizada com a aplicação contínua de luz por 5 minutos e monitoramento da fluorescência a cada 1 minuto. O monitoramento do intervalo foi realizado de 5 em 5 minutos, por 30 minutos. Quando finalizada o intervalo, era dada a continuidade na iluminação da amostra, repetindo as mesmas etapas. Nesse ciclo, houve 5 etapas de irradiação e 4 etapas de intervalos de 30 minutos cada.

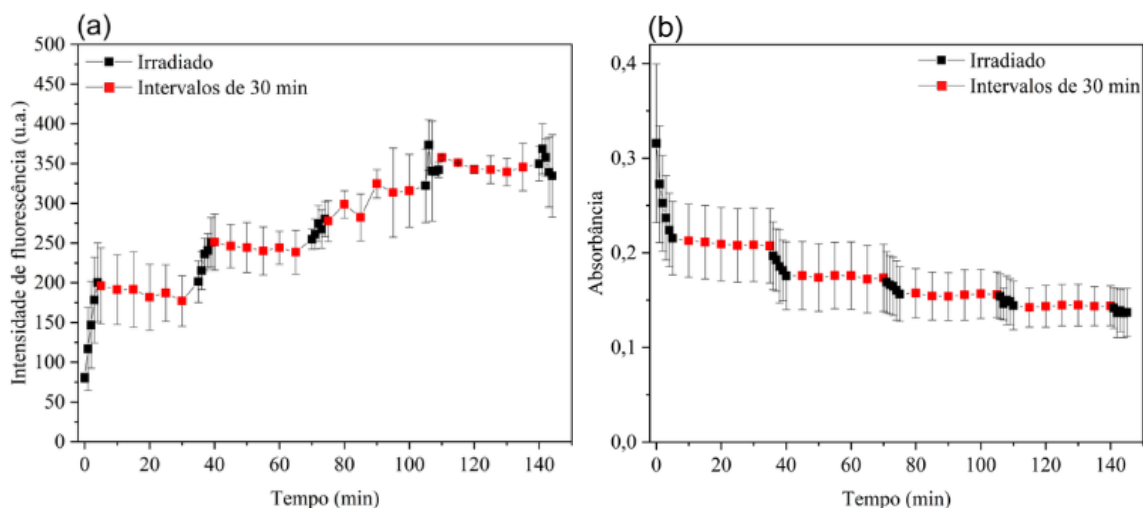


Figura 19: Análise da geração de EROs de modo fracionado por meio da sonda fluorescente DHE (20 μM) e do FS curcumina (10 μM). (a) fluorescência emissão 610 nm corresponde a emissão de fluorescência da sonda DHE, excitada em 500 nm e emitida em 510 nm e (b) absorvância 430 nm, corresponde a absorção de luz e degradação da molécula de curcumina. A iluminação foi realizada em 5 etapas de 1 em 1 minuto por 5 minutos, com a dose de luz total de 60 J/cm^2 , na intensidade de 40 mW/cm^2 e os intervalos foram divididas em 4 etapas de 30 minutos cada.

Os resultados **Figura 19 (a)**, mostram que houve um rápido aumento da fluorescência nos primeiros 5 min. de iluminação, indicando alta geração de EROs nos primeiros minutos. Conforme foram realizados os intervalos de 30 min, observou-se que houve uma tendência exponencial no comprimento de onda de 610 nm, aumentando a intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação. Durante os intervalos não tiveram um aumento significativo na intensidade de fluorescência.

No entanto, quando inicia um novo ciclo de irradiação a fluorescência aumenta, indicando aumento da taxa de geração de mais EROs. A curva apresenta uma tendência exponencial, não ocorreu estabilização na intensidade de fluorescência emitida. Isto pode indicar que se continuasse a irradiação nos intervalos de 30 min haveria um crescente aumento da intensidade de fluorescência gerando cada vez mais EROs até que se fossem esgotados os recursos de curcumina e DHE na solução, que resultaria na diminuição da fluorescência. No entanto a quantidade de DHE pode ser limitante, sendo todo consumido durante o processo de degradação e formando a espécie E^+ fluorescente.

A partir do espectro de absorção da curcumina visto na **Figura 19 (b)**, verificou-se que há a degradação do FS a cada etapa de iluminação, evidenciando a geração de EROs. No entanto, durante os períodos escuros, há uma estabilização do decaimento de absorção da molécula, pois não está ocorrendo sua degradação e nem geração de EROs.

O aumento da fluorescência durante o processo de irradiação interrompido (IFD convencional) demonstra que a curcumina gera EROs quando irradiada com luz em 450

nm. Esse resultado está em concordância com Liang et al., (2021), que realizou teste de análise da geração de EROs em células HepG2, coradas com sonda DHE após o tratamento com curcumina, foi possível observar por meio da microscopia de fluorescência como a curcumina após ser iluminada gerou as EROs que induziram a morte celular e piroptose nas células.

Desse modo, os resultados reforçam a importância do fracionamento, devido à fenômenos que são dependentes da ação do tempo. Observou-se que intervalos entre as doses de luz permitiram uma maior a internalização da curcumina pelas células bacterianas que, durante a exposição a luz, pode o aumentar a geração de EROs e consequentes danos no meio intracelular. Além disso, os maiores tempos de exposição a luz resultaram em maior eficácia na inativação bacteriana, como demonstrando nos resultados de IFD convencional. Embora diferentes combinações de concentrações tenham sido avaliadas, os melhores resultados foram obtidos com doses de luz mais altas. Por fim, os protocolos de luz fracionadas demonstraram que ativação da curcumina pode ser eficiente mesmo com doses menores (5 J/cm^2), promovendo a reoxigenação do meio e permitindo a visualização de células inviáveis (mortas) após a aplicação de IFD, como observado pela microscopia confocal.

6. Conclusão

O processo de IFD tem sido uma estratégia promissora para o tratamento de infecções bacterianas, impulsionando a busca contínua por FS eficazes, doses de luz otimizadas e condições experimentais que maximizem a eficiência da ação fotodinâmica. Neste estudo, foram explorados parâmetros de aplicação da IFD e os resultados indicam que a **curcumina apresenta potencial significativo para a geração EROs**, devido à sua **fotodegradação quando iluminada**. Além disso, observou-se sua **capacidade de ultrapassar a membrana celular da bactéria MRSA**, conforme demonstrado pela **microscopia confocal**, tornando-se um FS promissor para aplicações em IFD.

Com base nesses achados, foram conduzidas as análises de IFD convencional de modo convencional e fracionado. A IFD convencional com as maiores concentrações (10 e 15 μM) e maiores doses de luz (10 e 15 J/cm^2) apresentaram eficiência na inativação da bactéria MRSA, inativando cerca de 3,41 logs (10 μM e 10 J/cm^2), 4,34 logs (10 μM e 15 J/cm^2), 3,51 (15 μM e 10 J/cm^2) e 4,95 (15 μM e 15 J/cm^2).

A partir desses resultados, foi testada a estratégia do fracionamento de doses com a concentração de 10 μM , que apresentaram resultados ainda mais promissores com 15 J/cm^2 fracionado com intervalos de 10 minutos e 10 e 15 J/cm^2 com intervalos de 30 minutos, sobressaindo dos resultados de IFD convencional, inativando cerca de 4,96, 5,5 e 5,45 logs, respectivamente.

Além disso, a análise de viabilidade celular da MRSA após tratamento IFD com fracionamento de doses de intervalos de 30 min, vemos que os danos causados as bactérias não resultam apenas em mortes imediatas, mas também em mortes posteriores, o que mais uma vez justifica que o fracionamento de luz permite melhores resultados de inativação.

Para verificar a hipótese que ocorria a reoxigenação nos intervalos de 30 min, foram realizados experimentos que analisaram a concentração de oxigênio em solução curcumina, que foi iluminada ao longo do tempo. A análise com eletrodo de oxigênio demonstrou uma redução progressiva na disponibilidade de oxigênio no meio, sugerindo que a IFD convencional pode ter sua eficiência limitada pelo consumo direto de O_2 .

A fim de compreender a diferença dos resultados com aplicações de luz contínuas e fracionadas, foram realizados experimentos de análise da geração de EROs com sonda fluorescente, permitindo a avaliação da observação da geração de espécies reativas em diferentes entregas de doses de luz. Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que os intervalos de reoxigenação desempenham um papel crucial na otimização da IFD,

tornando-se uma estratégia mais eficaz do que a aplicação contínua de doses de luz. Isso sugere que o processo de difusão de oxigênio para o interior da bactéria, criando um ambiente dinâmico, favorecendo a geração sustentada de EROs e resultando em maior eficiência no tratamento. Assim, os achados deste estudo evidenciam que a eficácia da IFD não depende apenas da dose de luz e da concentração do FS, mas também da dinâmica temporal do processo, confirmando que a otimização dos intervalos de irradiação pode potencializar a resposta fotodinâmica.

7. Perspectivas futuras

A inativação fotodinâmica com doses de luz fracionadas apresentou resultados promissores para o controle da bactéria resistente MRSA. O aprimoramento do protocolo de IFD possibilita o controle de infecções por bactérias resistentes, e com isso, nos proporciona perspectivas de tratamento alternativo a antibioticoterapia.

O fracionamento de doses pode ser utilizado em estudos clínicos, em que poderia permitir o processo de reoxigenação na região da infecção, semelhante as ocasiões relatadas na Terapia Fotodinâmica de tumores. A presença da curcumina na área infectada em períodos de intervalos proporciona novamente a entrada de curcumina não degradada no interior da bactéria, possibilitando melhores resultados quando aplicadas novas doses de luz.

Foi necessário o aprimoramento da técnica *in vitro*, buscando melhores resultados de inativação fotodinâmica, que após alcançados, podem ser aplicados em estudos *in vivo*, afim de avaliar as melhores condições testadas anteriormente em novos cenários de inativação fotodinâmica.

Referências

AGARWAL, V.; TIWARI, A.; VARADWAJ, P. An Extensive Review on β -lactamase Enzymes and their Inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 783–808, fev. 2023.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003–2020, 1 ago. 2018.

ALMEIDA, P. P. et al. Photodynamic therapy controls of *Staphylococcus aureus* intradermal infection in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1337–1342, 23 ago. 2017.

AQAWI, M. et al. Anti-Bacterial Properties of Cannabigerol Toward *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 22 abr. 2021.

ARAÚJO, T. S. D. et al. Reduced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation in bone cavities by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 219–223, mar. 2018.

BATISTA DE ANDRADE NETO, J. et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p. 104892, jun. 2021.

BHATIA, N. K. et al. Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggregation behaviour of curcumin in aqueous binary mixtures of ethanol. **RSC Advances**, v. 6, n. 105, p. 103275–103288, 2016.

BLANCO, K. et al. **Controlling bacterial biofilms growth through photodynamic action.** , 14 dez. 2022.

BRAGG, R. R. et al. Potential Treatment Options in a Post-antibiotic Era. Em: [s.l: s.n.]. p. 51–61.

C REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.

CABRAL, J.; AG, R. Blue Light Disinfection in Hospital Infection Control: Advantages, Drawbacks, and Pitfalls. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 58, 7 maio 2019.

CAIRES, A. R. L.; LIMA, T. H. N.; ABELHA, T. F. Conjugated polymer nanoparticles with tunable antibacterial photodynamic capability. **Materials Advances**, v. 4, n. 7, p. 1664–1670, 2023.

CAIRES, C. S. A. et al. Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by a Natural Food Colorant (E-141ii). **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4464, 29 set. 2020.

CAIRES, C. S. A. et al. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using Giemsa dye as a photosensitizer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 45, p. 103952, fev. 2024.

CHO, H.; UEHARA, T.; BERNHARDT, T. G. Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1300–1311, dez. 2014.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 1, p. 26–40, 28 jan. 2020.

CORREIA, J. H. et al. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1332, 25 ago. 2021.

CRAFT, K. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **MedChemComm**, v. 10, n. 8, p. 1231–1241, 2019.

CRUGEIRA, P. J. L. et al. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* by ecological antibacterial solutions associating LED (λ 450 \pm 10 nm) with curcumin and olive leaf extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 238, p. 112626, jan. 2023.

DĄBROWSKI, J. M. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. Em: [s.l: s.n.]. p. 343–394.

DIAS, L. D. et al. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 45, p. 100384, dez. 2020.

DU, W. et al. New insight on antimicrobial therapy adjustment strategies for gram-negative bacterial infection. **Medicine**, v. 96, n. 13, p. e6439, mar. 2017.

ESCUADERO, A. et al. Photodynamic therapy: photosensitizers and nanostructures. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 5, n. 10, p. 3788–3812, 2021.

ESTEVEZ, J. P. et al. Continuous or fractionated photodynamic therapy? Comparison of three PDT schemes for ovarian peritoneal micrometastasis treatment in a rat model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 4, p. 251–257, dez. 2010.

FREITAS, M. A. et al. Bacterial Viability After Antimicrobial Photodynamic Therapy with Curcumin on Multiresistant *Staphylococcus Aureus*. **Future Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 739–748, 4 jun. 2019a.

FREITAS, M. A. et al. Bacterial Viability After Antimicrobial Photodynamic Therapy with Curcumin on Multiresistant *Staphylococcus Aureus*. **Future Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 739–748, 4 jun. 2019b.

GARCIA-DIAZ, M.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. **Methods**, v. 109, p. 158–166, out. 2016.

GLIENKE, W. et al. Wilms' tumour gene 1 (WT1) as a target in curcumin treatment of pancreatic cancer cells. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 5, p. 874–880, mar. 2009.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, n. 2–3, p. 45–80, dez. 2005.

GUNAYDIN, G.; GEDIK, M. E.; AYAN, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 10 jun. 2021.

GUPTA, R.; ALI, H.; VERMA, N. Detection of vanillin in food products over Cu - laser induced graphene nanocomposite using the combined electrochemistry and UV–Vis spectroscopy principles. **Microchemical Journal**, v. 199, p. 109984, abr. 2024.

HAIDER, R. Penicillin and the Antibiotics Revolution Global History. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, p. 55–62, 22 mar. 2023.

HAN, J. et al. Mechanistic insight into gel-induced aggregation of amorphous curcumin during dissolution process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106083, mar. 2022.

HARBARTH, S. et al. Antimicrobial resistance: one world, one fight! **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 4, n. 1, p. 49, 18 dez. 2015.

HEGER, M. et al. The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 222–307, 24 jan. 2014.

HINGSE, S. S.; DIGOLE, S. B.; ANNAPURE, U. S. Method development for simultaneous detection of ferulic acid and vanillin using high-performance thin layer chromatography. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 21, 1 dez. 2014.

HIRAMATSU, K. et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 486–493, out. 2001.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, jan. 2016.

HOSSEINI, A.; HOSSEINZADEH, H. Antidotal or protective effects of *Curcuma longa* (turmeric) and its active ingredient, curcumin, against natural and chemical toxicities: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 411–421, mar. 2018.

HUANG, M. et al. Differences in cellular damage induced by dielectric barrier discharge plasma between *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. **Bioelectrochemistry**, v. 132, p. 107445, abr. 2020.

HUO, M. et al. Co-selection mechanism for bacterial resistance to major chemical pollutants in the environment. **Science of The Total Environment**, v. 912, p. 169223, fev. 2024.

ILUZ, N. et al. The synergistic effect of PDT and oxacillin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 50, n. 5, p. 535–551, 15 jul. 2018.

KAUFMAN, G. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. **Nursing Standard**, v. 25, n. 42, p. 49–55, 22 jun. 2011.

KIM, S. W. et al. The Importance of Porins and β -Lactamase in Outer Membrane Vesicles on the Hydrolysis of β -Lactam Antibiotics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2822, 17 abr. 2020.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423–435, 4 jun. 2010.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1325–1348, 21 jun. 2017.

LARUE, L. et al. Fighting Hypoxia to Improve PDT. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 4, p. 163, 30 out. 2019.

LI, T. et al. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health. **Science of The Total Environment**, v. 860, p. 160461, fev. 2023.

LIANG, W.-F. et al. Curcumin Activates ROS Signaling to Promote Pyroptosis in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. **In Vivo**, v. 35, n. 1, p. 249–257, 2021.

LIMA, A. R. et al. Environmentally Safe Photodynamic Control of *Aedes aegypti* Using Sunlight-Activated Synthetic Curcumin: Photodegradation, Aquatic Ecotoxicity, and Field Trial. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5699, 4 set. 2022.

LIMA, A. R. et al. Impact of PVC microplastics in photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and MRSA. **Water Science & Technology**, v. 89, n. 8, p. 2105–2117, 15 abr. 2024.

LIU, W. et al. NIR-emitting carbon dots for discriminative imaging and photo-inactivation of pathogenic bacteria. **Chemical Engineering Journal**, v. 450, p. 137384, dez. 2022.

LIU, W.-T. et al. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, p. 104915, jul. 2021.

LV, R. et al. Comprehensive understanding on solubility and solvation performance of curcumin (form I) in aqueous co-solvent blends. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 167, p. 106718, abr. 2022.

MAH, T.-F. Biofilm-Specific Antibiotic Resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1061–1072, 6 set. 2012.

MELO, N. J. DE et al. Natural versus synthetic curcuminoids as photosensitizers: Photobleaching and antimicrobial photodynamic therapy evaluation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103495, jun. 2023.

MISBA, L.; KHAN, A. U. Enhanced Photodynamic Therapy using Light Fractionation Against *Streptococcus Mutans* biofilm: Type I and type II Mechanism. **Future Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 437–454, 22 mar. 2018.

MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, maio 2016.

MORGENSTERN, M. et al. Antibiotic Resistance of Commensal *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in an International Cohort of Surgeons: A Prospective Point-Prevalence Study. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148437, 3 fev. 2016.

MUNIR, M. U. et al. <p>Recent Advances in Nanotechnology-Aided Materials in Combating Microbial Resistance and Functioning as Antibiotics Substitutes</p>. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 15, p. 7329–7358, out. 2020.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Em: **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2016. p. 481–511.

MUNIZ, I. P. R. et al. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin controls intradermal infection by *Staphylococcus aureus* in mice with type 1 diabetes mellitus: a pilot study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 224, p. 112325, nov. 2021.

N. KUMAR, S.; R. NAIR, H.; B, P. K. Comparative analysis of anti-oxidant potential of vanillin and ferulic acid invitro. **Food and Humanity**, v. 1, p. 1206–1212, dez. 2023a.

N. KUMAR, S.; R. NAIR, H.; B, P. K. Comparative analysis of anti-oxidant potential of vanillin and ferulic acid invitro. **Food and Humanity**, v. 1, p. 1206–1212, dez. 2023b.

NEUBEISER, A. et al. Mortality attributable to hospital acquired infections with multidrug-resistant bacteria in a large group of German hospitals. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 204–210, fev. 2020.

NGUYEN, A. T.-B. et al. Physico-chemical state influences in vitro release profile of curcumin from pectin beads. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 290–298, set. 2014.

NICULESCU, A.-G.; GRUMEZESCU, A. M. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. **Applied Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3626, 17 abr. 2021.

OLIVEIRA APWLC. **Microbiologia para profissionais de saúde: bacteriologia, virologia, micologia e parasitologia**. [s.l.: s.n.].

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 15 mar. 2004.

PODSEDNIK, A.; XU, H. N.; LI, L. Z. Passage dependence of NADH redox status and reactive oxygen species level in vitro in triple-negative breast cancer cell lines with different invasiveness. **Translational Breast Cancer Research**, v. 5, p. 27–27, out. 2024.

PRZYGODA, M. et al. Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16890, 29 nov. 2023.

PUCELIK, B.; DĄBROWSKI, J. M. Photodynamic inactivation (PDI) as a promising alternative to current pharmaceuticals for the treatment of resistant microorganisms. Em: [s.l.: s.n.]. p. 65–108.

RIBEIRO, I. DE P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 37, p. 102729, mar. 2022.

RÜTSCHLIN, S.; BÖTTCHER, T. Inhibitors of Bacterial Swarming Behavior. **Chemistry – A European Journal**, v. 26, n. 5, p. 964–979, 22 jan. 2020.

SAAR-DOVER, R. et al. D-Alanylation of Lipoteichoic Acids Confers Resistance to Cationic Peptides in Group B *Streptococcus* by Increasing the Cell Wall Density. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002891, 6 set. 2012.

SAITO NOGUEIRA, M. et al. **Optimization of curcumin formulations for fluorescence-based applications**. (B. L. Ibey, N. Linz, Eds.) *Optical Interactions with Tissue and Cells XXXI*. **Anais...SPIE**, 31 mar. 2020.

SAMMARRO SILVA, K. J. et al. Hydrogen peroxide as an additive to curcumin on the photodynamic inactivation of bacteria: a preliminary study. **Laser Physics**, v. 33, n. 8, p. 085601, 1 ago. 2023a.

SAMMARRO SILVA, K. J. et al. Hydrogen peroxide preoxidation as a strategy for enhanced antimicrobial photodynamic action against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Water and Health**, v. 21, n. 12, p. 1922–1932, 1 dez. 2023b.

SAMPAIO, L. S. et al. Influence of light intensity and irradiation mode on methylene blue, chlorin-e6 and curcumin-mediated photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101925, set. 2020.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 1, p. 39–49, jan. 2010.

SCHNEIDER, C. et al. Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7606–7614, 9 set. 2015.

SCHOLZ, M. et al. Imaging of hypoxia, oxygen consumption and recovery in vivo during ALA-photodynamic therapy using delayed fluorescence of Protoporphyrin IX. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101790, jun. 2020.

SHEN, L.; JI, H.-F. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 3, p. 138–144, mar. 2012.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223–229, 27 abr. 2013.

SUMRALL, E. T. et al. Galactosylated wall teichoic acid, but not lipoteichoic acid, retains InlB on the surface of serovar 4b *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 638–649, 17 mar. 2020.

SUN, Y. et al. Predation Efficacy of *Bdellovibrio bacteriovorus* on Multidrug-Resistant Clinical Pathogens and Their Corresponding Biofilms. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 70, n. 5, p. 485–489, 2017.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. [s.l.: s.n.].

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. S3–S10, jun. 2006.

TOGNERI, A. M. et al. Estudio de las infecciones por *Staphylococcus aureus* en un hospital general de agudos (2002-2013). **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 1, p. 24–31, jan. 2017.

TUNJUNGPUTRI, R. N. et al. Higher platelet reactivity and platelet-monocyte complex formation in Gram-positive sepsis compared to Gram-negative sepsis. **Platelets**, v. 28, n. 6, p. 595–601, 18 ago. 2017.

TYAGI, P. et al. Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121313, 26 mar. 2015.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 326–333, jun. 2014.

VELHO, P.; REBELO, C. S.; MACEDO, E. A. Extraction of Gallic Acid and Ferulic Acid for Application in Hair Supplements. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2369, 4 mar. 2023.

VIVAS, R. et al. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 6, p. 890–908, jul. 2019.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature**, v. 543, n. 7643, p. 15–15, 2 mar. 2017.

WRIGHT, G. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 29 jul. 2005.

YANG, H. et al. Structure–Activity Relationship of Curcumin: Role of the Methoxy Group in Anti-inflammatory and Anticolitis Effects of Curcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4509–4515, 7 jun. 2017.

ZHENG, D. et al. Antibacterial Mechanism of Curcumin: A Review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 8, 27 ago. 2020.

ZHENG, J. et al. An Activatable Prodrug Nanosystem for Ultrasound-Driven Multimodal Tumor Therapy and Metastasis Inhibition. **Advanced Materials**, v. 35, n. 47, 15 nov. 2023.