



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE  
TECNOLOGIA



**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**“EFEITOS DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA E SUA COMBINAÇÃO COM  
ANTIBIÓTICOS CONTRA *Streptococcus spp.*”**

**Isabella Salgado Gonçalves\***

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de DOUTORA em  
Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal de São  
Carlos

***Orientador:***

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

**\*bolsista CAPES (No. 88887.663608/2022-001)**

**São Carlos - SP  
2025**

ISABELLA SALGADO GONÇALVES

**“EFEITOS DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA E SUA COMBINAÇÃO COM  
ANTIBIÓTICOS CONTRA *Streptococcus spp*”**

Monografia da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

BANCA EXAMINADORA

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

*Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Paiva de Sousa*  
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

*Dr<sup>a</sup>. Fernanda Alves Dias de Sousa*  
Universidade de São Paulo - USP

*Dr. Lucas Danilo Dias*  
Universidade Evangélica de Goiás

*Dr<sup>a</sup>. Thaila Quatrini Corrêa*  
Universidade de São Paulo - USP

São Carlos  
2025

À minha família, por todo amor e suporte.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, estiveram presentes na minha vida durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, pela oportunidade e orientação. À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kate Cristina Blanco, pela coorientação e auxílio durante a pesquisa. À Dr<sup>a</sup> Jennifer Machado Soares por toda a ajuda e paciência. Às pessoas do Instituto de Física da Universidade de São Paulo que colaboraram.

À minha família e amigos pelo amor, suporte, paciência e cuidado concedidos durante toda a minha trajetória, me dando força e motivação para persistir.

A Deus e à toda a espiritualidade que me acompanha e me dá forças para continuar a cada dia.

Aos profissionais de saúde que se dedicaram ao meu cuidado para que eu pudesse enfrentar todos os desafios e finalizar este trabalho.

Aos órgãos de fomento que financiaram esta pesquisa: o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF – FAPESP 2013/07276-1, 2014/50857-1) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 465360/2014-9).

GONÇALVES, I. S. **EFEITOS DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA E SUA COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS CONTRA *Streptococcus* spp.** 2025. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, 2025.

## RESUMO

A resistência antimicrobiana é uma crescente preocupação na saúde global, que compromete a eficácia de tratamentos convencionais, levando à necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, a inativação fotodinâmica (IFD) surge como uma técnica promissora, por sua elevada capacidade de eliminação de microrganismos. O presente estudo teve como objetivo avaliar protocolos de inativação de bactérias do gênero *Streptococcus* através da IFD mediada por curcumina (CUR), bem como investigar os efeitos de sua combinação com diferentes antibióticos (ATBs), além de avaliar a capacidade da técnica em alterar a suscetibilidade das bactérias aos ATBs. Foi analisado o efeito da IFD sobre cepas sensíveis e resistentes, utilizando diferentes concentrações de CUR. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida para a amoxicilina (AMO), ceftriaxona (CEF) e eritromicina (ERI). Foi realizada uma curva de tempo de morte com os três ATBs isolados e também com a subsequente aplicação de IFD após 3h, 6h, 9h e 12h após a incubação com os ATBs, em diferentes concentrações de CUR. Por fim, foram aplicados ciclos consecutivos de IFD sobre as bactérias, com o objetivo de identificar alterações nos valores de CIM. Os resultados mostraram que a IFD mediada por CUR é uma técnica eficaz contra *Streptococcus*, sendo capaz de eliminar inclusive cepas resistentes. A aplicação posterior de IFD à incubação com ATBs potencializou o efeito antimicrobiano de AMO e CEF contra *S. pneumoniae* após 9 horas de incubação, aumentando até em 2,8 log UFC/mL a atividade antimicrobiana em relação à CEF isolada. A aplicação consecutiva de IFD reduziu o valor de CIM de AMO em 2 vezes para *S. pneumoniae* e em 128 vezes para *S. pyogenes*. Ainda que parâmetros devam ser mais profundamente investigados, os achados desta pesquisa sugerem que a IFD mediada por CUR pode potencializar a eficácia dos tratamentos antimicrobianos existentes, destacando-se como uma estratégia alternativa ou adjuvante eficaz contra importantes patógenos, podendo contribuir no combate à resistência antimicrobiana.

**Palavras-chave:** resistência antimicrobiana, inativação fotodinâmica, *Streptococcus*, suscetibilidade antimicrobiana

GONÇALVES, I. S. **EFFECTS OF PHOTODYNAMIC INACTIVATION AND ITS COMBINATION WITH ANTIBIOTICS AGAINST *Streptococcus* spp.** 2025. Thesis (Ph.D. in Biotechnology) – Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, 2025.

## **ABSTRACT**

Antimicrobial resistance is an escalating concern in global health, undermining the effectiveness of conventional treatments and necessitating the development of new therapeutic strategies. In this context, photodynamic inactivation (PDI) emerges as a promising technique due to its high microbial elimination capacity. This study aimed to evaluate PDI protocols for inactivating bacteria of the *Streptococcus* genus mediated by curcumin (CUR), as well as to investigate the effects of combining it with different antibiotics (ATBs), and to assess the technique's ability to alter bacterial susceptibility to ATBs. The effect of PDI on both sensitive and resistant strains was analyzed using different CUR concentrations. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for amoxicillin (AMO), ceftriaxone (CEF), and erythromycin (ERI). A time-kill curve was performed with these three ATBs, followed by the subsequent application of PDI after 3h, 6h, 9h, and 12h of incubation with the ATBs, at different CUR concentrations. Finally, consecutive cycles of PDI were applied to the bacteria to identify changes in MIC values. The results showed that CUR-mediated PDI is an effective technique against *Streptococcus*, capable of eliminating even resistant strains. Subsequent application of PDI after incubation with ATBs enhanced the antimicrobial effect of AMO and CEF against *S. pneumoniae* after 9 hours of incubation, increasing the antimicrobial activity by up to 2.8 log CFU/mL relative to CEF alone. Consecutive application of PDI reduced the MIC of AMO by half for *S. pneumoniae* and by a factor of 128 for *S. pyogenes*. Although parameters should be further investigated, the findings of this research suggest that CUR-mediated PDI can enhance the efficacy of existing antimicrobial treatments, standing out as an effective alternative or adjunctive strategy against major pathogens and potentially contributing to the fight against antimicrobial resistance.

**Key-words:** antimicrobial resistance, photodynamic inactivation, *Streptococcus*, antimicrobial susceptibility

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMO	Amoxicilina
ATB	Antibiótico
ATBT	Antibioticoterapia
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CEF	Ceftriaxona
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CUR	Curcumina
ERI	Eritromicina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
GAS	Group A <i>Streptococcus</i>
IFD	Inativação fotodinâmica
MH	Mueller Hinton
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAC	Pneumonia Adquirida na Comunidade
PBP	Proteína de ligação à penicilina
PBS	Phosphate buffered saline
RAM	Resistência antimicrobiana
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades formadoras de colônia

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem representativa de bactérias do gênero <i>Streptococcus</i> .....	11
Figura 2 - Fotografia de cultura de <i>Streptococcus pyogenes</i> em ágar sangue demonstrando β-hemólise.....	12
Figura 3 - Fotografia de cultura de <i>Streptococcus pneumoniae</i> em ágar sangue demonstrando α-hemólise.....	15
Figura 4 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos..	18
Figura 5 - Mecanismos de resistência das bactérias aos antimicrobianos.....	23
Figura 6 - Mecanismo de ação da inativação fotodinâmica. ....	26
Figura 7 - Concentração inibitória mínima.....	31
Figura 8 - Fotografia da irradiação das amostras durante o processo de inativação fotodinâmica..	32
Figura 9 - Ilustração esquemática do experimento de combinação de antimicrobianos com IFD.	35
Figura 10 - Esquema das etapas de ciclos consecutivos de inativação fotodinâmica sobre suspensões de <i>S. pneumoniae</i> e <i>S. pyogenes</i> . ....	37
Figura 11 - Resultados de inativação fotodinâmica (IFD) utilizando diferentes concentrações de curcumina (CUR) e dose de luz de 6,4 J/cm <sup>2</sup> .....	42
Figura 12 - Curva de tempo de morte das bactérias <i>S. pneumoniae</i> (A) e <i>S. pyogenes</i> (B) após exposição aos antimicrobianos. ....	46
Figura 13 - Relação da quantidade de bactérias sobreviventes (log UFC/mL) em função do tempo (horas).....	49
Figura 14 - Relação da quantidade de bactérias sobreviventes (log UFC/mL) em função do tempo (horas).....	51
Figura 15 - Diferença dos valores de redução bacteriana entre os tratamentos isolados com AMO, CEF e ERI e os tratamentos combinados com IFD, com curcumina na concentração de 0,5 e 2,5 μM .....	53
Figura 16 - Efeitos de ciclos consecutivos de IFD sobre a CIM de <i>S. pneumoniae</i> para amoxicilina (AMO) utilizando duas doses de luz distintas .....	62
Figura 17 - Efeitos de ciclos consecutivos de IFD sobre a CIM de <i>S. pyogenes</i> para amoxicilina (AMO) utilizando duas doses de luz distintas.....	63
Figura 18 - Curva de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> ATCC® 700904 (A) e <i>S. pyogenes</i> (B) ao longo de 8 horas.....	67

## SUMÁRIO

1	Capítulo 1 - Introdução.....	10
1.1	Bactérias do gênero <i>Streptococcus</i> .....	10
1.1.1	<i>Streptococcus pyogenes</i> .....	11
1.1.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	14
1.2	Antimicrobianos.....	17
1.3	Resistência antimicrobiana .....	21
1.4	Inativação Fotodinâmica.....	24
1.5	Objetivos.....	28
1.5.1	Gerais.....	28
1.5.2	Específicos.....	28
2	Capítulo 2 – Materiais e Métodos .....	29
2.1	Microrganismos .....	29
2.2	Determinação do nível de sensibilidade aos antimicrobianos .....	29
2.3	Parâmetros ideais de Inativação fotodinâmica.....	31
2.4	Curva de tempo de morte em resposta a antibióticos .....	33
2.5	Efeitos da combinação de inativação fotodinâmica com antibióticos .....	33
2.6	Impacto de ciclos consecutivos de IFD na suscetibilidade bacteriana aos antibióticos .	35
2.6.1	Determinação da curva de crescimento microbiano após ciclos consecutivos de IFD ...	37
3	Capítulo 3 - Resultados e Discussão .....	39
3.1	Perfil de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos .....	39
3.2	Inativação Fotodinâmica.....	40
3.3	Dinâmica de redução bacteriana ao longo do tempo .....	45
3.4	Combinação de inativação fotodinâmica com antibióticos .....	47
3.4.1	Investigação dos efeitos da aplicação posterior de IFD ao antibiótico isolado.....	47
3.5	Avaliação da suscetibilidade bacteriana aos antimicrobianos após ciclos de IFD .....	61
3.5.1	Curva de crescimento microbiano após ciclos consecutivos de IFD .....	66
4	Capítulo 4 - Conclusões.....	68
4.1	Perspectivas .....	69
	Referências .....	71

# 1 CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

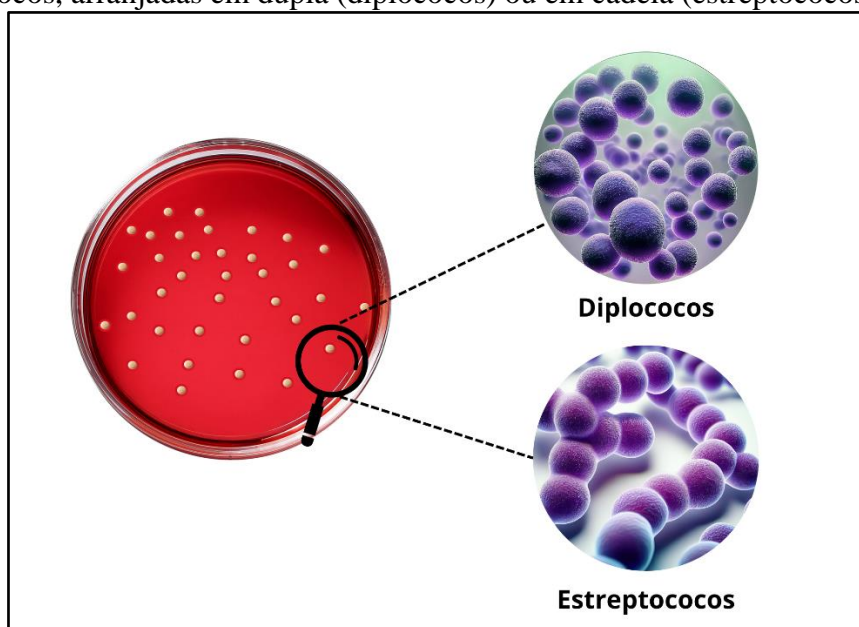
## 1.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Streptococcus*

*Streptococcus* é um gênero de bactérias que apresenta uma importância significativa na microbiologia médica devido à sua associação com uma variedade de doenças humanas. Algumas espécies de *Streptococcus* são patógenos conhecidos que causam condições que variam de infecções leves da pele a doenças graves como pneumonia, meningite, febre reumática e endocardite. A relevância do estudo dos mecanismos de resistência dessas bactérias está no aumento da resistência aos antimicrobianos, o que representa um desafio crescente no tratamento de infecções estreptocócicas (GIERKE, 2021; JASIM, 2021; PATTERSON, 1996).

Em microbiologia, é de fundamental importância conhecer a classificação que separa as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Esta característica se baseia na composição da parede celular destes microrganismos, que se encontra externamente às suas membranas citoplasmáticas, e sua relação com a coloração de Gram (MADIGAN, 2016). A parede celular das bactérias caracterizadas como Gram-positivas possui uma camada espessa e rígida de carboidratos e peptídeos, denominada peptidoglicano, que retém a coloração violeta escuro ou púrpura do Gram. As bactérias Gram-negativas possuem maior conteúdo lipídico em sua parede celular e, portanto, não são capazes de reter o corante violeta, perdendo a coloração primária e assim, são coradas pela fucsina para serem identificadas em vermelho ou rosa no microscópio (TORTORA, 2000; BEVERIDGE, 2001).

*Streptococcus* são bactérias Gram-positivas que se caracterizam por sua forma esférica ou oval, frequentemente encontradas em pares ou cadeias. “Cocos” são bactérias em forma de esfera que podem variar de 0,2 a 2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e de 2 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento; e o sufixo “estrepto” significa que estes cocos estão arranjados em um único plano e conectados uns aos outros aos pares ou em forma de cadeia, conforme ilustrado na Figura 1 (TORTORA, 2000).

Figura 1 – Imagem representativa de bactérias do gênero *Streptococcus*. Bactérias Gram-positivas em forma de cocos, arranjadas em dupla (diplococos) ou em cadeia (estreptococos).



Fonte: Própria.

Os *Streptococcus* não apresentam motilidade e não formam esporos, são catalase e oxidase-negativas e a grande maioria é anaeróbia facultativa, sendo alguns anaeróbios estritos. Essas bactérias são classificadas de acordo com a morfologia de suas colônias, tipo de hemólise, reações bioquímicas e, principalmente, em especificidade sorológica. Com base em suas propriedades de hemólise no ágar sangue, elas são divididas em três grupos, sendo: beta-hemolíticas, as que causam lise completa das hemácias, alfa-hemolíticas, as que degradam parcialmente as moléculas de hemoglobina, destruindo as células sanguíneas, e gama-hemolíticas, que não causam danos às hemácias (PATTERSON, 1996; BROUWER, 2023).

### 1.1.1 *Streptococcus pyogenes*

As bactérias da espécie *Streptococcus pyogenes* pertencem aos *Streptococcus* do grupo A (GAS, do inglês “Group A *Streptococcus*”), de acordo com o sistema de Lancefield, que se caracterizam por serem cocos que ocorrem em forma de cadeia (estreptococos),  $\beta$ -hemolíticos e anaeróbicos facultativos. A sua capacidade de causar  $\beta$ -hemólise se deve à produção de uma

exotoxina imunogênica denominada estreptolisina O (SLO), que se liga às membranas das células, formando poros que resultam na completa destruição celular (hemólise, no caso das hemácias) (BHAKDI, 1997). No ágar sangue, é possível observar a sua característica  $\beta$ -hemolítica, conforme a Figura 2.

Figura 2 - Fotografia de cultura de *Streptococcus pyogenes* em ágar sangue demonstrando  $\beta$ -hemólise. No ágar sangue, as colônias de *S. pyogenes* aparecem como pontos brancos acinzentados, ao redor dos quais é possível notar halos claros, indicativos de atividade hemolítica completa.



Fonte: Própria.

O crescimento ideal destes microrganismos ocorre a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> (5 a 10 %). *S. pyogenes*, assim como todos os GAS, são totalmente dependentes da fermentação de açúcares para crescimento e produção de energia. Além disso, necessitam de componentes específicos para sua multiplicação, sendo considerados microrganismos fastidiosos, ou seja, que possuem exigências nutricionais, como meios enriquecidos com sangue ou soro (GERA, 2013; FERRETTI, 2016).

Diferentemente de outros *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos, *S. pyogenes* tem os humanos como hospedeiro exclusivo, podendo ser encontrado naturalmente na pele e garganta de indivíduos saudáveis. Porém, ocasionalmente, podem causar uma grande variedade de doenças nos seres humanos. As infecções mais comumente causadas por essas bactérias são as faringites estreptocócicas, popularmente conhecidas como “dor de garganta”, e infecções na pele, como impetigo. Em crianças, é comum a infecção na garganta causada por *S. pyogenes* ser acompanhada por uma infecção na pele, conhecida como escarlatina. Em alguns casos, a infecção pode se agravar, causando otite média (infecção do ouvido médio), sinusite, pneumonia, meningite. Se as infecções

pelos GAS não forem tratadas corretamente e houver pré-disposição genética do indivíduo, a resposta imune à infecção pode gerar doenças autoimunes que atingem principalmente os rins (glomerulonefrite pós-estreptocócica), articulações, coração e sistema nervoso central (febre reumática) (JASIM, 2021; PATTERSON, 1996).

Quando essas bactérias infectam camadas mais profundas da pele, podem causar erisipela, celulite e até fasciíte necrosante, que é uma doença gravemente invasiva, que se espalha rapidamente e necessita de intervenção médica e cirúrgica imediata, resultando em uma elevada taxa de mortalidade. Raramente, em complicações de infecções invasivas, pode ocorrer a síndrome de choque tóxico estreptocócico (STSS), na qual ocorre a parada do funcionamento de órgãos internos devido às toxinas produzidas por estes estreptococos. Se eles atingirem a corrente sanguínea podem levar a infecção nos ossos e articulações, à septicemia e ao óbito (JASIM, 2021; PATTERSON, 1996).

As infecções causadas por *S. pyogenes* estão relacionadas a múltiplos fatores de virulência expressos por este microrganismo. Dentre eles, destacam-se a proteína M de superfície, que confere proteção frente ao sistema imunológico por dificultar a fagocitose pelas células de defesa, sendo fundamental para a sobrevivência da bactéria dentro do organismo hospedeiro. A proteína M varia consideravelmente entre as cepas de *S. pyogenes*, o que leva a uma grande diversidade de respostas imunológicas, variando a severidade de doenças causadas por esta bactéria, além de atuar como o principal marcador epidemiológico (CUNNINGHAM, 2000). Outro importante fator de virulência são as toxinas pirogênicas, ou eritrogênicas, que apresentam um papel crítica na modulação da resposta imune sistêmica. Elas são capazes de estimular um grande aumento da proliferação de linfócitos T, induzindo uma resposta imune exacerbada que resulta em inflamação e danos teciduais severos, resultando na síndrome do choque tóxico (PROFT, 2003).

A estreptolisina O, já citada brevemente acima, é outro importante indicador de virulência que contribui significativamente para a patogenicidade de *S. pyogenes*. A SLO tem a capacidade de degradar principalmente células sanguíneas e plaquetas, contribuindo com a disseminação de bactérias através dos tecidos a agravando os sintomas associados às infecções causadas por este patógeno (UCHIYAMA, 2015). É uma toxina secretada no meio extracelular que induz uma importante resposta imunológica, ativando a produção de grande quantidade de anticorpos contra estreptolisina O (ASLO), que são utilizados como principal marcador no diagnóstico de infecções recentes por estreptococos (LANGSHAW, 2023; UCHIYAMA, 2015) Por fim, a presença

abundante de enzimas desoxirribonucleases (DNases) é responsável pela destruição de células do sistema imunológico e de tecidos do hospedeiro, facilitando a comunicação entre os microrganismos e a disseminação da infecção (REMMINGTON, 2018).

A transmissão de *S. pyogenes* ocorre principalmente através do contato direto com secreções respiratórias de indivíduos infectados ou feridas abertas contaminadas. A transmissão destes microrganismos é facilitada em ambientes fechados e/ou cheios, podendo provocar surtos prevalentemente durante os meses mais frios. A prevalência de infecções por *S. pyogenes* no Brasil reflete os padrões globais, com elevada incidência de faringite, especialmente em crianças, e a alta incidência de complicações como febre reumática levam a maiores preocupações dos serviços de saúde (TELES, 2015). Estima-se que, globalmente, infecções causadas por GAS sejam responsáveis por mais de 500.000 mortes anualmente, sendo particularmente mais prevalentes em países de baixa e média renda (LUQUETTI, 2024).

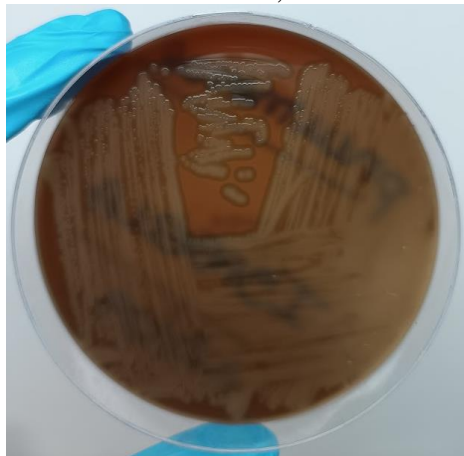
A principal forma de tratamento para as infecções por GAS é através do uso de antimicrobianos, sendo a penicilina ou a amoxicilina as escolhas preferenciais devido à sua eficácia em reduzir a duração dos sintomas, a probabilidade de transmissão e o desenvolvimento de complicações e sequelas, como a febre reumática e a glomerulonefrite pós-estreptocócica (CDC, 2024). Apesar de *S. pyogenes* normalmente apresentar sensibilidade às penicilinas, pode ocorrer falha no tratamento com esses antimicrobianos, sobretudo em infecções severas ou complicadas. Além disso, a crescente resistência antimicrobiana, principalmente aos macrolídeos, tetraciclina e clindamicinas, complica o manejo dessas infecções e torna necessário, muitas vezes, o uso combinado de pelo menos dois tipos de antimicrobianos diferentes e terapias adjuvantes (CDC, 2024; JOHNSON, 2021).

### **1.1.2 *Streptococcus pneumoniae***

As bactérias da espécie *Streptococcus pneumoniae*, também conhecidas como “pneumococos”, estão arranjadas aos pares (diplococos) ou em pequenas cadeias. São anaeróbicas facultativas, com crescimento ideal a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> (5 a 10 %) e  $\alpha$ -hemolíticas. A capacidade de *S. pneumoniae* de causar a lise parcial das hemácias ( $\alpha$ -hemólise) é devido à

produção da toxina pneumolisina, que causa oxidação da hemoglobina transformando-a em metemoglobina (McDEVITT, 2020). Esse processo resulta na coloração verde ao redor das colônias deste microrganismo no ágar sangue, conforme observa-se a Figura 3.

Figura 3 - Fotografia de cultura de *Streptococcus pneumoniae* em ágar sangue demonstrando  $\alpha$ -hemólise. No ágar sangue, as colônias de *S. pneumoniae* aparecem como formações translúcidas, ao redor das quais é possível notar uma zona esverdeada, indicativa de atividade hemolítica parcial.



Fonte: Própria.

Normalmente, *S. pneumoniae* coloniza o trato respiratório superior de indivíduos saudáveis, mais especificamente as superfícies da nasofaringe. Mas quando há uma alteração na microbiota normal ou uma falha na defesa do organismo hospedeiro, a presença dessas bactérias pode resultar em doenças (KADIOGLU, 2008; LI, 2023).

Os pneumococos são os principais agentes causadores da Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC), ou seja, pneumonias que se desenvolvem fora do ambiente hospitalar. Além disso, são um dos principais causadores de meningite. Se a infecção não for tratada logo nos primeiros sintomas, irá evoluir para febre sustentada e dor pleurítica, sinusite, otite, endocardite, artrite e peritonite. Quando essas bactérias atingem a corrente sanguínea causam bacteremia e podem levar à septicemia e ao óbito. Apesar do tratamento antimicrobiano, a pneumonia causada por *S. pneumoniae* apresenta uma taxa de mortalidade de 5 a 10 %, e a bacteremia pneumocócica atinge 30 % de mortalidade. Além disso, os pneumococos representam uma importante ameaça a indivíduos infectados por vírus, que predispõem a uma coinfeção por *S. pneumoniae*, aumentando o risco de pneumonia bacteriana (CHAMPOUX, 2004; GIERKE, 2021).

Dentro os principais fatores de virulência de *S. pneumoniae*, destaca-se a cápsula polissacarídica que envolve a célula bacteriana e a protege da atuação das células do sistema imunológico, desempenhando um papel crítico na patogenicidade deste microrganismo. A variação dos antígenos que compõem a cápsula permite que diferentes cepas evitem a imunidade do hospedeiro, facilitando a infecção (HENRICHSEN, 1995; MITCHELL, 2010). A cápsula auxilia na fixação e colonização da bactéria nas superfícies do organismo e também é o principal alvo das vacinas contra a pneumonia. Contudo, devido à grande variedade de tipos de cápsulas existentes, as vacinas necessitam ser constantemente atualizadas e exigem vigilância contínua, sendo um importante desafio para a medicina (MITCHELL, 2010; PATON, 2019). Além disso, esses microrganismos produzem uma toxina citotóxica importante denominada pneumolisina, citada brevemente acima, que apresenta a capacidade de formar poros na membrana das células hospedeiras, levando ao rompimento e à morte celular. Esse mecanismo danifica fisicamente as células do sistema imunológico, interfere na modulação da resposta imune, e contribui para a disseminação da bactéria e a gravidade das doenças (NISHIMOTO, 2020). Outros fatores de virulência como a proteína A de adesão pneumocócica, que facilita a adesão de *S. pneumoniae* às células epiteliais do sistema respiratório; e as enzimas hialuronidase e neuraminidase, que degradam componentes dos tecidos conjuntivos e expõem receptores que facilitam a adesão bacteriana, respectivamente, contribuem para a capacidade de invasão, disseminação e sobrevivência do patógeno no hospedeiro (HU, 2013; MITCHELL, 2010)

A transmissão de doenças causadas por esta bactéria ocorre principalmente através de gotículas respiratórias expelidas durante a fala, tosse ou espirro por indivíduos portadores ou infectados. Além disso, o contato direto com secreções respiratórias, superfícies ou objetos contaminados também podem facilitar a disseminação do patógeno (WEISER, 2018). Dessa forma, o risco de transmissão do microrganismo é agravado em ambientes fechados com ventilação inadequada, e aglomerações. Infecções virais concomitantes, como a gripe, podem predispor os indivíduos à colonização e infecção por *S. pneumoniae* (FERIGOLO, 2013).

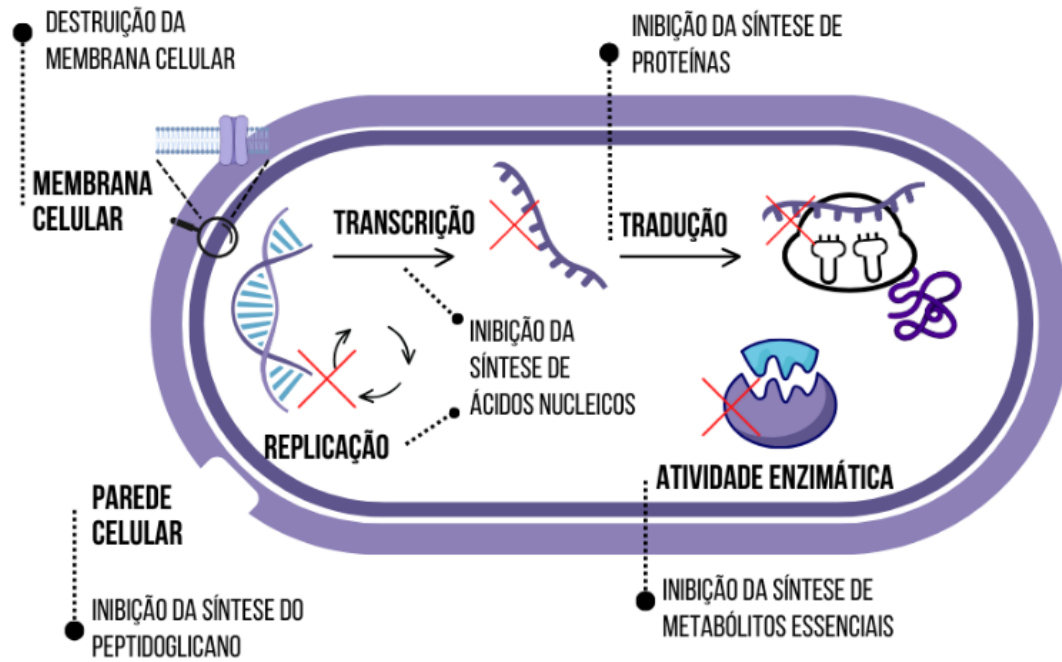
A ocorrência de infecções causadas por *S. pneumoniae* é bastante significativa globalmente, afetando principalmente crianças menores de cinco anos e idosos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que infecções pneumocócicas sejam responsáveis pela morte de 300.000 crianças abaixo de cinco anos anualmente ao redor do mundo, sobretudo em países em desenvolvimento. Apesar disso, a introdução de vacinas conjugadas pneumocócicas em 2000 tem

levado a uma redução notável nas taxas de infecções causadas por este microrganismo (CDC, 2024). O tratamento de infecções causadas por *S. pneumoniae* é realizado através do uso de antimicrobianos, como penicilinas e cefalosporinas. No entanto, o aumento das taxas de resistência antimicrobiana, principalmente aos macrolídeos e fluoroquinolonas, vem se tornando um problema significativo. Essa problemática leva a falhas nos tratamentos e torna necessário o uso de medicamentos mais caros ou mais tóxicos (JAIN, 2024; NUERMBERGER, 2004).

## 1.2 ANTIMICROBIANOS

Existem relatos de tratamentos de infecções semelhantes às estreptocócicas desde o século V a.C. Ao longo da história, foram utilizadas diversas substâncias e técnicas para tratar estas infecções, como administração de eméticos, purgantes, narcóticos e sangrias. Somente após 1928, quando o médico Alexander Fleming descobriu acidentalmente a penicilina, e posteriormente, em 1939, quando houve um progresso significativo na produção em larga escala do antibiótico, é que as infecções começaram a ser tratadas de forma mais eficaz (FERRETTI, 2016; HUTCHINGS, 2019). Os antimicrobianos (ATBs) são capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos através de diferentes mecanismos de ação, como inibição da síntese da parede celular; danos à membrana citoplasmática; inibição da síntese de ácidos nucleicos; inibição da síntese de proteínas e inibição de vias metabólicas (TORTORA, 2000; WALSH, 2000). Os mecanismos de ação dos antimicrobianos estão esquematizados na Figura 4.

Figura 4 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos. Alvos de ação dos antimicrobianos nas diferentes estruturas e componentes celulares da bactéria.



Fonte: Própria.

A inibição da síntese da parede celular pode ocorrer pela interação do anel  $\beta$ -lactâmico, presente em alguns antimicrobianos, com as enzimas transpeptidases bacterianas, ou proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Estas proteínas formam as ligações cruzadas das cadeias de peptidoglicanos, sendo fundamentais na síntese da parede celular. Ao interagir com as PBPs, os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos impedem a formação de uma parede celular com estrutura íntegra, o que resulta em instabilidade osmótica e consequente lise celular (KONG, 2010). Os ATBs  $\beta$ -lactâmicos são as penicilinas, como amoxicilina, ampicilina e oxacilina; cefalosporinas, como cefazolina, cefuroxima e ceftriaxona; e carbapenênicos, como imipenem e meropenem. Algumas bactérias podem produzir a enzima  $\beta$ -lactamase (mecanismo de resistência que será discutido à frente), que rompem o anel  $\beta$ -lactâmico, inativando a ação do antimicrobiano. Por essa razão, alguns agentes inibidores da  $\beta$ -lactamase, como o ácido clavulânico, podem ser administrados em conjunto com os  $\beta$ -lactâmicos para prevenir a resistência a esses antimicrobianos (KIM, 2023; TAMMA, 2017).

A síntese da parede celular também pode ser inibida pela ligação de glicopeptídeos, como a vancomicina e a bacitracina, ao terminal D-alanil-D-alanina dos precursores do peptidoglicano, impedindo a adição de novas unidades pela transpeptidase. Isso faz com que a estrutura da parede celular não seja sintetizada de forma íntegra e ocorra a morte celular (MARSHAL, 1997; ZENG, 2016).

Além da parede celular, a membrana citoplasmática (ou celular) também pode ser alvo dos antimicrobianos. As colistinas, ou polimixinas, são agentes catiônicos que interagem com os fosfolípídeos da membrana, levando a formação de poros que aumentam sua permeabilidade, e interferem nos canais e bombas iônicas, prejudicando a capacidade de regulação osmótica celular (LANDMAN, 2008; MOHAPATRA, 2021). Os ácidos nucleicos são outras moléculas alvo para o mecanismo de ação dos ATBs. Quinolonas, como o ciprofloxacino e o levofloxacino, por exemplo, são fármacos que agem sobre a topoisomerase IV e a topoisomerase II (DNA-girase), enzimas fundamentais na síntese de DNA bacteriano. A inibição dessas enzimas impede a replicação e a transcrição do DNA bacteriano, levando a bactéria à morte. O RNA também é afetado, quando antimicrobianos como a rifampicina bloqueiam o processo de transcrição ao interagirem com a subunidade  $\beta$  da enzima RNA-polimerase. A inibição da síntese de RNA bloqueia a síntese de proteínas essenciais para o funcionamento celular e leva as bactérias à morte (CHENG, 2013; WALSH, 2000).

Algumas classes de antimicrobianos interferem na síntese de proteínas através da interação com os ribossomos, estruturas fundamentais na tradução da informação genética para a produção de proteínas. Aminoglicosídeos, como a estreptomicina e a neomicina; tetraciclina, como a doxicilina, são importantes inibidores da síntese proteica. Eles interagem com a subunidade 30S dos ribossomos, alterando a incorporação de aminoácidos e provocando a produção de proteínas não funcionais para a sobrevivência das bactérias (KAPOOR, 2017; KRAUSE, 2016). Os macrolídeos, como a eritromicina, azitromicina e claritromicina, por sua vez, afetam o início da síntese proteica ao se ligarem à subunidade 50S do ribossomo, impedindo o alongamento da cadeia polipeptídica e, conseqüentemente, a produção de proteínas funcionais para que as bactérias possam sobreviver e se multiplicar (VÁZQUEZ-LASLOP, 2019).

Além disso, existem os antimicrobianos que interferem em vias metabólicas importantes para a bactéria, como as sulfonamidas e o trimetoprim. Ambos interferem em etapas distintas do metabolismo do ácido fólico, prejudicando sua biossíntese e reduzindo sua disponibilidade para a

síntese de bases nitrogenadas. Isso prejudica a produção de ácidos nucleicos e interfere na sobrevivência das bactérias (KAPOOR, 2017). Neste trabalho, foram utilizados os antimicrobianos amoxicilina, eritromicina e ceftriaxona, devido à relevância clínicas destes fármacos no tratamento de infecções causadas por *Streptococcus*. A Tabela 1 apresenta uma comparação entre as características e mecanismos de ação dos antimicrobianos estudados neste trabalho.

Tabela 1. Características dos antimicrobianos estudados. A tabela apresenta uma comparação entre os antimicrobianos amoxicilina, eritromicina e ceftriaxona, destacando suas classes, fórmula molecular e mecanismos de ação.

Antimicrobiano	Classe	Fórmula molecular	Mecanismo de Ação	Referência
Amoxicilina	Beta-lactâmico - Penicilina	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	Inibição da síntese do peptidoglicano, componente essencial da parede celular bacteriana. Ocorre através da ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBPs).	(AKHAVAN, 2023)
Eritromicina	Macrolídeo	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	Inibição da síntese proteica devido à ligação reversível ao ribossomo (subunidade 50S)	(FARZAM, 2023)
Ceftriaxona	Beta-lactâmico – Cefalosporina de 3ª geração	$C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$	Inibição da síntese do peptidoglicano, componente essencial da parede celular bacteriana. Ocorre através da ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBPs).	(RAWLS, 2014)

Fonte: Própria

### 1.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Apesar de ter revolucionado a medicina e a saúde humana, tornando possível o tratamento de infecções severas e a prevenção de complicações e da morte ao realizar procedimentos médicos invasivos ou cirúrgicos, a chamada “era de ouro” dos antimicrobianos durou poucos anos. Em 1942, pouco depois do início da introdução da penicilina no mercado, já foram relatados casos de resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* em pacientes hospitalizados. Os casos se espalharam rapidamente dos hospitais para as comunidades e, nos anos 1960, 80% das cepas de *S. aureus* eram resistentes à penicilina. À medida que eram desenvolvidos novos fármacos antimicrobianos, os microrganismos passavam a desenvolver resistência a eles, não respondendo mais aos tratamentos (NATHAN, 2014; LOBANOVSKA, 2017). Algumas das principais razões do surgimento e expansão do número de microrganismos resistentes são o uso excessivo e inadequado de antimicrobianos, tanto em clínicas e hospitais como na agropecuária; diagnósticos incorretos e falta; saneamento básico deficiente; e aumento da população e migração global (MARSHALL, 2011; ASLAM, 2018).

Desde suas primeiras manifestações, a resistência antimicrobiana (RAM) vem se tornando um dos principais problemas mundiais de saúde pública e socioeconômico, com tendência a causar 10 milhões de mortes por ano até 2050, sendo uma das principais ameaças à saúde humana (O’NEILL, 2016). Este quadro tende a se intensificar após a pandemia da doença de coronavírus (COVID-19), em 2019, que levou a um maior uso indevido e indiscriminado de antimicrobianos como forma de profilaxia e tratamento de infecções secundárias. Além disso, o aumento de internações hospitalares expande o risco de infecções associadas aos cuidados de saúde pela transmissão de microrganismos multirresistentes, levando a um maior uso de antimicrobianos e tornando o cenário ainda mais complexo (GETAHUN, 2020).

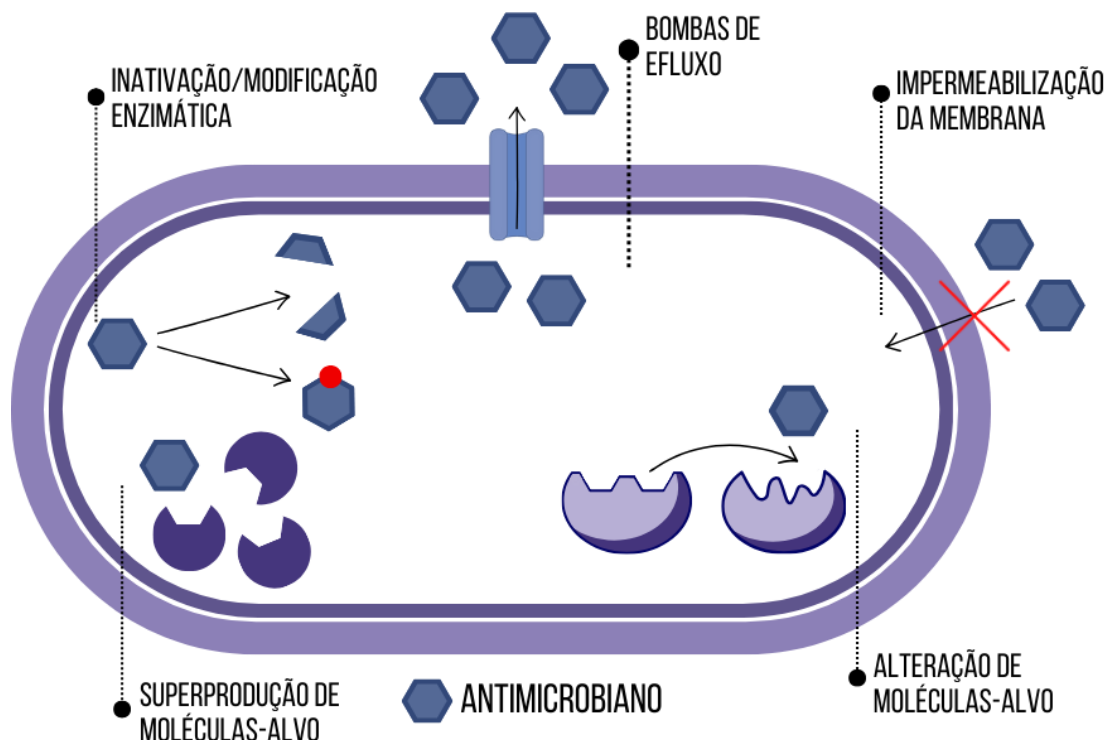
A resistência antimicrobiana representa uma ameaça significativa aos avanços da medicina moderna, complicando o tratamento de infecções e aumentando consideravelmente os riscos associados a diversos procedimentos médicos, como cirurgias e tratamentos quimioterápicos contra o câncer, por exemplo. Dessa forma, a RAM aumenta a necessidade de cuidados mais dispendiosos e intensivos, influenciando negativamente a produtividade de pacientes ou de seus cuidadores devido a internações hospitalares prolongadas e maiores necessidades de cuidados de saúde, o que

leva a um prejuízo socioeconômico. Além disso, a resistência microbiana aos ATBs também prejudica a produtividade na área agrícola, contribuindo com o impacto na economia. De modo geral, ela acarreta grandes custos econômicos, podendo levar a perdas anuais no produto interno bruto (PIB) de US\$ 1 trilhão a US\$ 3,4 trilhões até 2030, de acordo com o Banco Mundial (OMS, 2023).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos pode ser intrínseca, ou seja, natural do próprio microrganismo, e se caracteriza pela falta de sítios-alvo específicos para a ligação do fármaco, ou pela falta de permeabilidade devido às diferenças químicas e estruturais entre o ATB e a parede celular bacteriana. A RAM também pode ser adaptativa, a qual é induzida por fatores ambientais, como estresse, variação de pH do meio, e concentração de íons e de nutrientes, por exemplo. A resistência adaptativa é temporária, mas pode levar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência mais eficazes e permanentes. Por fim, existe o desenvolvimento de mecanismos de resistência adquirida, através dos quais uma bactéria naturalmente suscetível se torna resistente a um ou mais antimicrobianos, através de mutação genética espontânea ou transferência horizontal de genes. Esta transferência pode ocorrer por meio de um vírus bacteriófago; pela incorporação de fragmentos de DNA de uma bactéria morta no cromossomo de uma bactéria receptora viva; ou via conjugação de plasmídeo entre a bactéria doadora e a bactéria receptora (DAVIES, 2010; SOMMER, 2017).

As características genéticas naturais ou adquiridas das bactérias interferem diretamente na ação dos ATBs. Para cada mecanismo de ação dos antimicrobianos, os microrganismos podem possuir ou adquirir mecanismos de resistência. Os principais mecanismos de resistência que impedem os antimicrobianos de agir sobre as bactérias estão ilustrados de maneira resumida na Figura 5 e estão relacionados a: destruição molecular do antimicrobiano; modificação ou inativação enzimática do ATB; mutação na molécula-alvo ou modificação dos sítios de ação; aumento da expressão de moléculas alvo, diminuindo a capacidade do ATB; diminuição da permeabilidade da parede celular, bloqueando a entrada do ATB; aumento da expressão de bombas de efluxo, que expulsam o ATB para fora da célula bacteriana; e formação de biofilme (WALSH, 2000; SOMMER, 2017; DARBY, 2023).

Figura 5 - Mecanismos de resistência das bactérias aos antimicrobianos.



Fonte: Própria.

O crescente aumento global de bactérias resistentes aos medicamentos de uso padrão somado ao declínio do desenvolvimento de novas classes de fármacos antimicrobianos representam uma séria ameaça à medicina moderna e à saúde pública, podendo levar o mundo a uma era pós-antimicrobianos, em que infecções comuns poderão voltar a matar. As indústrias farmacêuticas estão cada vez mais diminuindo os esforços para a descoberta de novos agentes antibacterianos devido ao custo elevado e à alta complexidade envolvidos no processo de pesquisa e desenvolvimento. Essa problemática levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a adotar um plano de ação global, em 2015, propondo objetivos para atenuar a crise de resistência antimicrobiana, tais como: conscientização e educação para uma melhor compreensão da RAM; reforçar a vigilância e investigação para contribuir com a base de conhecimento e evidências; instaurar medidas eficazes de saneamento e higiene como forma de reduzir a incidência de infecções; otimizar a utilização dos medicamentos antimicrobianos já implementados na saúde humana e animal; investimento de recursos de maneira inteligente e sustentável em novos

medicamentos, técnicas diagnósticas, vacinas e outras intervenções, considerando as necessidades de todas as nações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015; SALAM, 2023).

Nesse contexto, é crucial realizar um esforço global para conter o aumento da RAM e investir em novas estratégias eficazes e economicamente viáveis no combate aos microrganismos. Uma alternativa promissora estudada é a inativação de microrganismos através de reações fotodinâmicas (IFD), que tem demonstrado resultados positivos e promissores.

#### 1.4 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

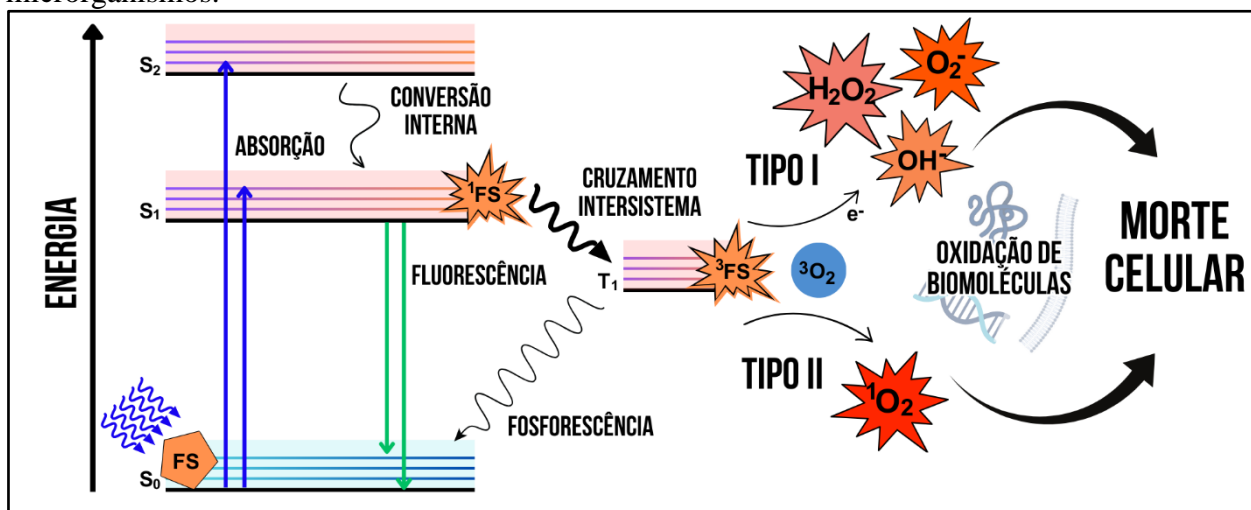
A luz é utilizada há milhares de anos com fins terapêuticos por diversas civilizações ao redor do mundo, que muitas vezes associavam a exposição à luz solar como forma de tratamento para doenças de pele. Após a invenção das lâmpadas de quartzo, no século XIX, elas passaram a ser utilizadas em algumas ocasiões para simular a luz solar e auxiliar, por exemplo, a recuperação de soldados feridos na Primeira Guerra Mundial. Tratamentos com luz para cicatrização de feridas também ganharam força após a construção do primeiro laser, em 1960, pelo físico Theodore Maiman (ACKROYD, 2001; LEE, 2020).

Porém, antes disso, no início do século XX, o pesquisador e estudante de Medicina, Oscar Raab, observou acidentalmente um maior efeito citotóxico dos corantes acridina e eosina sobre uma cultura de protozoário na presença de luz branca. Com base em outros estudos da interação entre a luz e matéria, foi proposto o mecanismo da ocorrência de transferência de energia da luz para estas moléculas fotossensíveis, gerando produtos tóxicos. Em 1907, von Tappeiner, orientador de Raab, e Jodlbauer comprovaram a necessidade de oxigênio para a ocorrência das reações fotodinâmicas e introduziram o termo ação fotodinâmica (ACKROYD, 2001; CIEPLIK, 2018). Desde então, evoluíram-se as pesquisas em terapia fotodinâmica (IFD), que vêm demonstrando sucesso principalmente no tratamento de tumores e cânceres, com altas taxas de cura e poucos efeitos colaterais (PLAETZER, 2013). No caso da IFD aplicada na inativação de microrganismos, recebe a denominação de inativação fotodinâmica (IFD), inativação fotodinâmica antimicrobiana (IFDa) ou terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) (CASTANO, 2004).

O mecanismo de ação da IFD é baseado em processos fotofísicos e fotoquímicos que ocorrem a partir da associação de agentes fotossensibilizadores (FS), oxigênio molecular ( $O_2$ ), e luz no comprimento de onda correspondente à banda de absorção do FS. Ao absorver os fótons emitidos pela fonte de luz, os elétrons presentes nas moléculas dos FS, em seu estado fundamental ( $S_0$ ), entram em um estado energicamente excitado (estado singlete,  $S_1$ ), que é instável e possui tempo de vida curta, na ordem de grandeza de nanosegundos. Neste estado, muitas moléculas podem decair retornando ao estado inicial com emissão de luz (fluorescência) ou calor (conversão interna), mas algumas podem passar por cruzamento intersistemas, entrando em um estado tripleto excitado ( $T_1$ ), que possui menor energia em relação a  $S_1$ , porém com tempo de vida mais longo, na ordem de microsegundos e, portanto, mais estável. Ainda no estado tripleto, os elétrons do FS pode decair novamente para  $S_1$ , emitindo fosforescência (KASHEF, 2017; LEE, 2020).

O FS, que deve estar internalizado ou na superfície das células, quando se encontra no estado tripleto excitado pode transferir os elétrons absorvidos para biomoléculas fundamentais para os microrganismos, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Nestas reações, denominadas reações do Tipo I, são formados íons radicais que reagem com o oxigênio molecular e produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e/ou hidroxilas ( $OH^\cdot$ ), que oxidam as biomoléculas, danificando as células e levando os microrganismos à morte. Nas reações do Tipo II ocorre a transferência da energia do FS, em  $T_1$ , para o oxigênio em seu estado tripleto fundamental ( $^3O_2$ ), resultando na produção de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), que possui tempo de vida curto e baixa difusão, porém é altamente reativo, sendo capaz de destruir as biomoléculas ao seu redor (VATANSEVER, 2013; WAINWRIGHT, 2017). As reações fotodinâmicas do Tipo I e II estão relacionadas com a mudança nos níveis de energia das moléculas do FS, que estão representados no diagrama de Jablonski esquematizado na Figura 6. Ambas as reações ocorrem simultaneamente no microambiente contendo o FS, quando se faz a irradiação de luz no comprimento de onda correspondente. Ambas possuem alta capacidade de destruição de microrganismos através do estresse oxidativo, que ocorre quando há um aumento exacerbado da concentração de EROs nas células, tornando insuficiente sua ação antioxidante. A taxa com que cada tipo de reação pode ocorrer depende da quantidade e natureza de FS e do meio em que a IFD é aplicada (LIU, 2015; HAMBLIN, 2016).

Figura 6 - Mecanismo de ação da inativação fotodinâmica. A ilustração demonstra, a partir do diagrama de Jablonski, como as reações fotodinâmicas do Tipo I e II levam à morte das células e microrganismos.



Fonte: Própria.

A IFD apresenta algumas vantagens em relação à antibioticoterapia, o que tem motivado os pesquisadores no campo a concentrarem esforços para estabelecê-la como uma técnica padronizada e eficaz no tratamento de diversas infecções. Algumas dessas vantagens estão relacionadas à alta especificidade no local de ação devido à maior atração dos FS pelas células-alvo em comparação com as células não-alvo; inatividade dos FS quando não irradiados; e reações limitadas ao local da área irradiada (DIAS, 2020). Esses fatores tornam a IFD uma técnica com praticamente ausência de toxicidade sistêmica. Além disso, não há registro de indução de desenvolvimento de resistência dos microrganismos ao mecanismo da IFD. A não-toxicidade do FS no escuro diminui a necessidade das bactérias de desenvolverem mecanismos de defesa. O estresse oxidativo proveniente das reações fotodinâmicas é exacerbado, sendo a defesa celular antioxidante devido as reações metabólicas insuficientes. Além disso, diferentemente dos antimicrobianos, a IFD atinge simultaneamente diversas estruturas celulares e rotas metabólicas por meio da formação de EROs. Isso danifica severamente os microrganismos, impedindo sua capacidade de sobrevivência e adaptabilidade entre gerações (LIU, 2015; CIEPLIK, 2018).

A eficácia da IFD está relacionada com a escolha de um FS e à aplicação de luz adequada. Um FS ideal para a IFD deve apresentar características como elevada fototoxicidade com baixa ou nenhuma toxicidade no escuro, alto rendimento quântico de espécies reativas, afinidade

preferencial por microrganismos em relação às células do hospedeiro, farmacocinética adequada e capacidade de se internalizar nas bactérias ou se ligar à parede celular (TIM, 2015).

A composição da parede celular é um fator crucial na escolha do FS adequado para cada tipo de bactéria. As Gram-positivas são mais suscetíveis a FS aniônicos e neutros devido à camada espessa de peptidoglicano em sua parede externa, enquanto as Gram-negativas apresentam menor capacidade de internalizar agentes externos devido à sua membrana externa adicional e à barreira de lipopolissacarídeos (LIU, 2015). Neste trabalho, o fotossensibilizador utilizado foi a curcumina (CUR), que é um pigmento amarelo natural proveniente da raiz da planta *Curcuma longa*. É um composto polifenólico que absorve luz visível em torno de 450 nm. A curcumina apresenta boa afinidade com bactérias Gram-positivas e demonstra ser bastante eficaz na eliminação destes microrganismos através da IFD (LIU, 2015; WAINWRIGHT, 2017).

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inativação fotodinâmica (IFD) *in vitro* em bactérias do gênero *Streptococcus*, visando torna-las mais suscetíveis à ação de antimicrobianos, além de investigar os efeitos da combinação de antibioticoterapia com aplicações posteriores de IFD.

### 1.5.2 Específicos

- a) Determinar o grau de resistência/sensibilidade de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* para amoxicilina (penicilina), eritromicina (macrolídeos) e ceftriaxona (cefalosporina), por meio da concentração inibitória mínima (CIM);
- b) Estabelecer parâmetros ideais de IFD para as bactérias *S. pyogenes* e *S. pneumoniae*;
- c) Analisar o comportamento de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* frente aos antibióticos (ATBs) através do tempo, por meio da obtenção da curva do tempo de morte;
- d) Analisar os efeitos da combinação de IFD mediada por diferentes concentrações de curcumina com ATBs sobre *S. pneumoniae* ao longo do tempo;
- e) Avaliar o impacto de ciclos consecutivos de IFD na suscetibilidade de cepas resistentes de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* a antimicrobianos, visando reduzir os valores de CIM e otimizar a eficácia da terapia antimicrobiana;
- f) Avaliar a persistência dos efeitos de ciclos consecutivos de IFD em *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* através de curvas de crescimento, para investigar alterações na taxa de crescimento e viabilidade bacteriana.

## 2 CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas bactérias do gênero *Streptococcus*, *S. pneumoniae* ATCC® (American Type Culture Collection, USA) 49619 e ATCC® 700904; e *S. pyogenes* (isolado clínico de paciente diagnosticado com faringotonsilite em pesquisa clínica). Para manter um estoque viável dos microrganismos, foram preparadas culturas para manter em congelamento. As culturas bacterianas, em sua fase log de crescimento, foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm e ressuspendidas em 9,5 mL de meio de congelamento estéril composto por TSB (*Tryptic Soy Broth*) e glicerol a 20 %. Depois, foram adicionados 500 µL de sangue de carneiro desfibrinado às suspensões bacterianas, e alíquotas de 300 µL foram transferidas para criotubos que ficaram armazenados em freezer -80 °C.

As bactérias foram retiradas do estoque congelado e reativadas em caldo BHI (do inglês *Brain Heart Infusion*). Para isso, 200 µL do estoque foram adicionados em 10 mL de BHI e a suspensão bacteriana foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> a 5 %, a 37 °C, por 4 a 5 horas, até atingir a fase log de crescimento, e assim serem utilizadas nos experimentos.

### 2.2 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

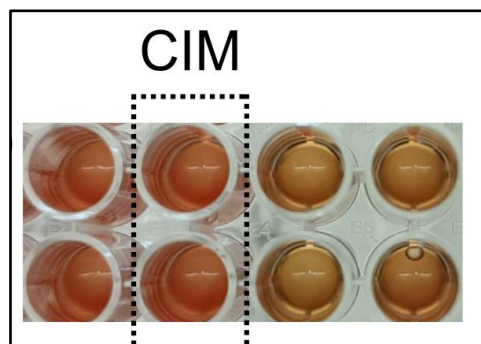
O nível de sensibilidade de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* aos antimicrobianos estudados foi avaliado por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*). Os antimicrobianos testados incluíram amoxicilina (AMO - penicilina), eritromicina (ERI - macrolídeo) e ceftriaxona (CEF – cefalosporina de 3ª geração), todos adquiridos da Sigma Aldrich®. A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, adaptado das diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). Os testes foram conduzidos com as duas cepas de *S. pneumoniae* e com a cepa de *S. pyogenes*. A interpretação dos valores de CIM foi baseada nos pontos de corte estabelecidos pelo *Brazilian*

*Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), conforme a atualização de 2023 (BRCAST, 2023).

Primeiramente, foram preparadas as soluções estoque dos antimicrobianos a uma concentração de 5 mg/mL, utilizando seus respectivos solventes, os quais: tampão fosfato (pH 6,0; 0,1 mol/L) para a AMO, etanol 95% para ERI, e água destilada para a CEF, segundo o CLSI (CLSI, 2003). Para o preparo das soluções de trabalho, as soluções-estoque de antimicrobianos foram diluídas em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MH) suplementado com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado, em concentrações 2x a concentração final desejada. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados, no primeiro poço de cada fileira a ser testada, 100 µL da solução do antimicrobiano em caldo MH + 5% sangue de carneiro com concentração 2x a concentração desejada. Nos poços seguintes, foram acrescentados somente 50 µL de caldo MH + 5% sangue de carneiro. Então, foi realizada uma diluição seriada de razão 2 do antimicrobiano a partir do primeiro poço em direção ao último da fileira (Ex.: A1-A12), de modo que cada poço ficou com 50 µL de solução total. Em seguida, foi preparada uma solução com 20% da suspensão bacteriana em caldo MH + 5 % de sangue de carneiro. Acrescentou-se 50 µL dessa solução nos poços já contendo o meio de cultura, de modo que cada poço terminou com 100 µL no total. Foram destinados poços na placa para os controles positivos (para confirmar a viabilidade da bactéria, no qual deve haver crescimento bacteriano) e negativos (para confirmar a esterilidade do meio de cultura e dos antimicrobianos, nos quais não deve haver crescimento bacteriano). As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 18 h a 24 h.

Após o período de incubação, os resultados foram analisados visualmente através da coloração do sangue. Se o sangue estivesse vermelho escuro ou vivo, significa que não houve crescimento bacteriano e a cor observada é devido à coloração do meio de cultura contendo o ATB. Mas se estivesse em uma tonalidade de vermelho próxima ao marrom ou esverdeada, significa que a bactéria cresceu no meio e degradou o sangue contido no poço. O valor de CIM foi definido como a menor concentração do ATB capaz de inibir o crescimento bacteriano, conforme observado na Figura 7.

Figura 7 - Concentração inibitória mínima. A determinação da CIM se faz através da observação da mudança de coloração do meio de cultura contendo bactérias vivas (vermelho terroso) e bactérias mortas (vermelho vivo). A menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do microrganismo (onde não se observa crescimento microbiano) é definida como CIM.



Fonte: Própria.

### 2.3 PARÂMETROS IDEAIS DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

Os microrganismos *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* foram padronizados a  $10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e submetidos a condições de IFD que resultaram na redução parcial ou total da população bacteriana. As doses de luz e a concentração do FS foram ajustados de modo a estabelecer parâmetros capazes de reduzir parcialmente o crescimento bacteriano, na faixa de 1 a 3 log UFC/mL.

A solução estoque de curcumina sintética (CUR – EMI Pharma®) foi preparada em álcool etílico a 5 mM e depois diluída em tampão fosfato-salino (PBS, do inglês “phosphate buffered saline”) em diferentes concentrações. Em uma placa de 24 poços, foram acrescentados 250  $\mu$ L da suspensão bacteriana em PBS e 250  $\mu$ L das soluções de curcumina nas diferentes concentrações, em cada poço. A placa foi incubada no escuro por 20 minutos para internalização da curcumina e, em seguida, exposta a irradiação por LED em um dispositivo denominado Biotable® (Figura 8), desenvolvido pelo Laboratório de Suporte Tecnológico (LAT) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP). O comprimento de onda irradiado foi escolhido de acordo com a máxima absorção de luz da curcumina, 450 nm. A dose de luz irradiada foi calculada de acordo com a potência da Biotable®, de 55 miliwatts, iluminando por 1 min e 56 s, totalizando uma irradiância de 6,4 J/cm<sup>2</sup>. A dose de luz é calculada de acordo com a Equação 1.

$$D = I \times t \quad (1)$$

Onde: D = dose de luz ou irradiância (Joule/cm<sup>2</sup>); t = tempo (segundos); I = intensidade de luz (Watts/cm<sup>2</sup>).

Foram testados os seguintes grupos: grupo controle geral (somente bactéria em PBS), controle escuro (bactéria + FS, sem luz – CUR5,0), controle luz (bactéria + luz, sem FS - LUZ) e grupos testes de IFD (bactéria + FS + luz), com FS em concentrações variando de 0,25 µM a 5 µM (IFD0,25, IFD0,5, IFD1,0, IFD2,5 e IFD5,0). Após irradiadas, as amostras foram diluídas serialmente em PBS (1:10) e plaqueadas em ágar sangue pela técnica da microgota (10 µL por gota). As placas foram incubadas em estufa CO<sub>2</sub> a 5 %, 37 °C, por 24 h e, então, foram contadas as colônias para a determinação de UFC/mL. OS experimentos foram realizados em triplicata biológica e A ANOVA unidirecional foi utilizada para análise estatística, seguida do teste *post hoc* de Tukey para determinar diferenças significativas entre os grupos de tratamento. Nos gráficos resultantes, diferentes letras acima das barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p < 0,05), proporcionando uma identificação visual rápida de tais diferenças.

Figura 8 - Fotografia da irradiação das amostras durante o processo de inativação fotodinâmica. Suspensões bacterianas irradiadas em dispositivo Biotable®, utilizando luz azul com comprimento de onda de 450 nm para realização de IFD.



Fonte: Própria

## 2.4 CURVA DE TEMPO DE MORTE EM RESPOSTA A ANTIBIÓTICOS

Este experimento, baseado nos estudos de Keren (KEREN, 2004) e Nielsen (NIELSEN, 2007), foi importante para verificar o perfil de interação entre as bactérias e os ATBs. Os testes foram realizados com as bactérias *S. pneumoniae* (ATCC® 49619) e *S. pyogenes* com o objetivo de avaliar o comportamento das cepas frente aos antimicrobianos ao longo do tempo. Para isso, os inóculos bacterianos foram preparados a partir da ressuspensão de colônias de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* em meio BHI, e suas concentrações foram ajustadas para  $10^8$  UFC/mL. Em seguida, foram adicionados separadamente os antimicrobianos AMO, ERI e CEF às suspensões bacterianas. A concentração de ATB utilizada foi de 4 vezes maior que o valor da CIM para AMO e CEF (baseando-se no estudo de Nielsen, 2006), enquanto para a ERI foi adicionada a concentração estabelecida pelo BrCAST como ponto de corte, devido às limitações experimentais causadas pelo volume final de solvente. Dessa forma, para *S. pneumoniae*, foram adicionadas AMO, ERI e CEF a concentrações de  $1 \mu\text{g/mL}$ . Já para *S. pyogenes*, as concentrações utilizadas foram  $16.384 \mu\text{g/mL}$  (4x CIM) para AMO,  $0,25 \mu\text{g/mL}$  para ERI (ponto de corte BrCAST) e  $4 \mu\text{g/mL}$  para CEF (4x CIM).

As suspensões foram incubadas em agitador com rotação de 400 rpm dentro de estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , por 12 h. Este tempo foi determinado a partir de um primeiro teste piloto, em que foi verificada erradicação de *S. pneumoniae* em 12 h. Foi realizado o controle de crescimento das bactérias em tempo 0 h e depois eram retiradas alíquotas das suspensões incubadas com ATB em intervalos pré-determinados de 3 h. As alíquotas eram centrifugadas e ressuspendidas em PBS e, então, diluídas e plaqueadas em ágar sangue. Após 24 h de incubação em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , era realizada a contagem de colônias e o cálculo de UFC/mL.

## 2.5 EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM ANTIBIÓTICOS

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos agentes antimicrobianos quando combinados com IFD, foi realizada uma nova curva de morte da bactéria (Item 2.4), mas com adição de IFD

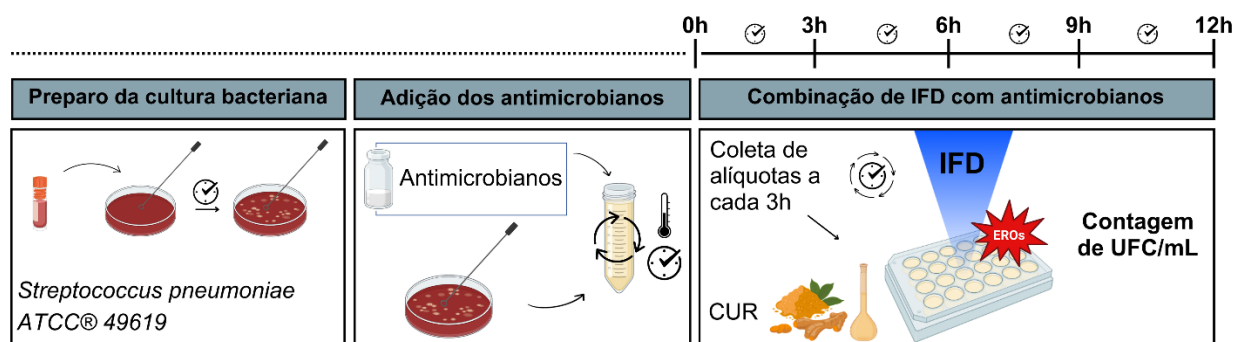
subsequente em intervalos de 3 horas após a exposição aos antibióticos. Esse estudo de combinação entre IFD e antibióticos foi conduzido exclusivamente com a bactéria *S. pneumoniae* (ATCC® 49619), concebido como um teste piloto. A escolha de um único microrganismo para este estudo foi estratégica para permitir maior controle sobre as variáveis experimentais e viabilizar uma análise detalhada e sistemática do efeito combinado de IFD e antimicrobianos. Resultados poderão futuramente embasar a expansão da metodologia, ampliando o escopo do estudo.

Assim como no Item 2.4, o inóculo bacteriano foi preparado em caldo BHI, na concentração de  $10^7$  a  $10^8$  log UFC/mL. Em seguida, foram acrescentados aos caldos as soluções de AMO, CEF e ERI a 1 µg/mL, separadamente, e as suspensões foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C, sob rotação de 400 rpm. A cada três horas, alíquotas da cultura bacteriana eram retiradas e lavadas através de centrifugação e ressuspensão em PBS. Parte dessas alíquotas era diluída e semeada em ágar sangue para posterior contagem de colônias e determinação do efeito dos antimicrobianos isolados sobre a bactéria. Outras partes dessas alíquotas eram incubadas com curcumina (CUR) nas concentrações de 0,5 e 2,5 µM, escolhidas com base nos resultados de IFD previamente obtidos. Após 20 minutos de incubação no escuro com o fotossensibilizador, as amostras eram irradiadas nos mesmos parâmetros descritos no Item 2.3, com dose de luz de 6,4 J/cm<sup>2</sup>. Posteriormente, era realizada a diluição e plaqueamento das amostras em ágar sangue. Após 24 horas de incubação em estufa CO<sub>2</sub> a 37 °C, era realizada a contagem das colônias, cálculo de UFC/mL e determinação dos efeitos de cada grupo sobre a redução de *S. pneumoniae*. Embora as medições tenham sido realizadas em intervalos específicos de 3 e 6 horas, os dados coletados nesses momentos são representativos para análise dos efeitos durante as primeiras 6 horas de incubação. As amostras foram coletadas pontualmente nesses tempos, não sendo monitoradas continuamente ao longo do período. Isso implica em uma interpretação baseada em evidências pontuais e não em uma tendência contínua.

Os grupos de tratamento avaliados foram: exposição da bactéria aos antimicrobianos isolados (AMO, CEF e ERI), exposição aos antibióticos seguida de IFD com 0,5 µM de curcumina (AMO+IFD0,5, CEF+IFD0,5 e ERI+IFD0,5), e exposição aos antibióticos, seguida de IFD com 2,5 µM de CUR (AMO+IFD2,5, CEF+IFD2,5 e ERI+IFD2,5). É esperado que a partir dos resultados, seja possível realizar uma análise de sinergismo e antagonismo entre os tratamentos, elucidando quais as combinações mais efetivas para a inativação do microrganismo. A importância desse estudo baseia-se principalmente no cenário de aumento de resistência antimicrobiana, já que

nesses casos os agentes antimicrobianos sozinhos podem ser inefetivos, e por isso a busca por estratégias alternativas e complementares está se ampliando. A Figura 9 ilustra a forma como esse experimento foi realizado.

Figura 9 - Ilustração esquemática do experimento de combinação de antimicrobianos com IFD.



Fonte: Própria.

## 2.6 IMPACTO DE CICLOS CONSECUTIVOS DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA NA SUSCETIBILIDADE BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS

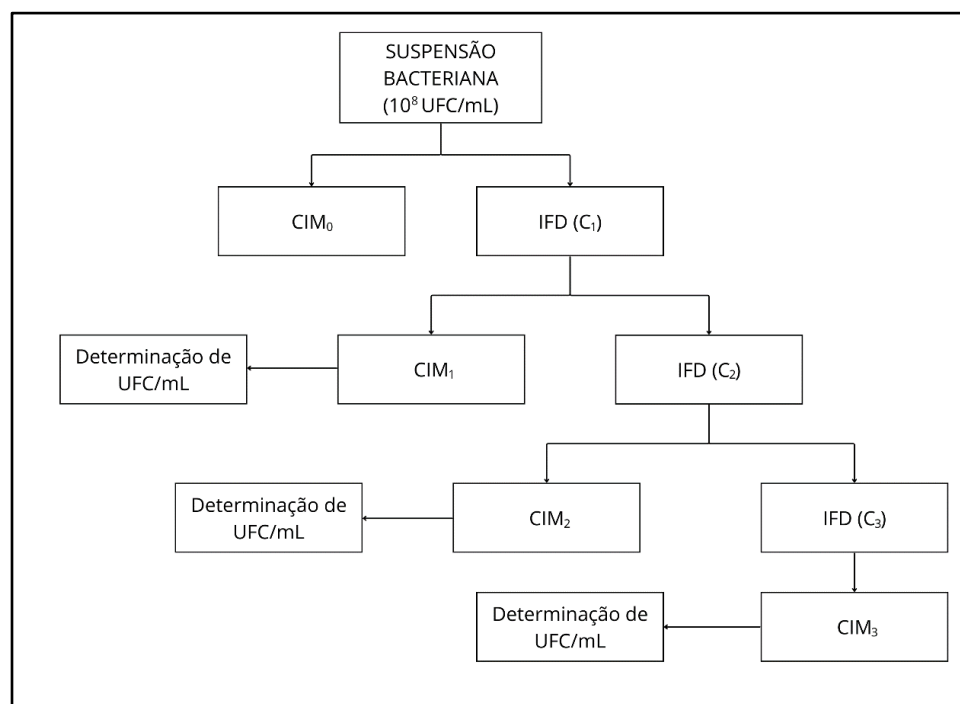
Com o objetivo de verificar a eficácia da IFD em aumentar a suscetibilidade das bactérias *S. pneumoniae* (ATCC® 700904) e *S. pyogenes* aos antimicrobianos, foram realizados experimentos envolvendo ciclos consecutivos de IFD. Essa abordagem busca explorar o potencial da IFD como estratégia adjuvante para reduzir a resistência antimicrobiana e otimizar a eficácia do tratamento antimicrobiano. Os resultados obtidos podem contribuir para o desenvolvimento de protocolos mais efetivos no combate a bactérias resistentes. Os valores de CIM para AMO e CEF foram previamente determinados por meio do método padronizado pelo CLSI (Item 2.2) e serviram como referência para esta etapa do estudo.

Partindo-se do estoque congelado, colônias de ambas as bactérias foram cultivadas em placas de ágar sangue por 24 h e, posteriormente, inoculadas em tampão fosfato (PBS), resultando em suspensões bacterianas contendo  $10^7$  a  $10^8$  UFC/mL. As suspensões bacterianas de cada espécie foram divididas em dois grupos: um grupo foi incubado com curcumina a  $0,5 \mu\text{M}$  por 20 minutos, seguido de exposição à luz azul para realização de IFD (Ciclo 1 – C<sub>1</sub>), enquanto o outro grupo foi

encaminhado para determinar a CIM<sub>0</sub>, sem aplicação prévia de IFD. Os experimentos foram realizados com duas doses diferentes de luz, sendo 6,4 J/cm<sup>2</sup> no primeiro teste e 12,8 J/cm<sup>2</sup> no segundo. Após o primeiro ciclo de IFD (C<sub>1</sub>), uma alíquota das suspensões foi coletada para a determinação de CIM (CIM<sub>1</sub>), enquanto o restante das suspensões foi submetido consecutivamente a um novo ciclo de IFD (C<sub>2</sub>), seguido de uma nova avaliação de CIM (CIM<sub>2</sub>). Esse processo foi repetido até o terceiro ciclo de IFD (C<sub>3</sub>). Após cada ciclo, as suspensões bacterianas eram centrifugadas e ressuspensas em volume menor de tampão fosfato (PBS) para concentrar a quantidade de bactérias e garantir que, durante a determinação da CIM, a concentração bacteriana permanecesse a mesma, ou similar, entre os ciclos (em torno de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/mL). Esse procedimento visou assegurar que possíveis reduções nos valores de CIM fossem atribuídas somente aos efeitos da IFD sobre a suscetibilidade bacteriana devido aos seus mecanismos fotodinâmicos, e não a uma quantidade insuficiente de microrganismo no teste.

Em seguida, as suspensões eram diluídas em série e plaqueadas em ágar sangue para determinar a concentração de UFC/mL, permitindo avaliar quantitativamente a inativação bacteriana após cada ciclo. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. A Figura 10 apresenta um esquema ilustrativo detalhando as etapas de aplicação dos ciclos de IFD e a metodologia aplicada.

Figura 10 - Esquema das etapas de ciclos consecutivos de inativação fotodinâmica sobre suspensões de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*.



Fonte: Própria

### 2.6.1 Determinação da curva de crescimento microbiano após ciclos consecutivos de IFD

Para analisar o comportamento bacteriano após a aplicação de três ciclos consecutivos de IFD (Item 2.6), realizou-se um experimento de curva de crescimento com *S. pneumoniae* (ATCC® 700904) e *S. pyogenes*. Após a aplicação dos ciclos de IFD, as culturas bacterianas foram estocadas em meio de congelamento composto por caldo Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro e 20% de glicerol. As cepas foram reativadas em ágar sangue e, depois, inoculadas em caldo Mueller-Hinton com 5% de sangue de carneiro, ajustando-se a concentração para  $10^7$  a  $10^8$  UFC/mL. Cada grupo foi distribuído em placas de 96 poços e incubado em leitor de microplacas para monitoramento do crescimento durante 8 horas.

Os experimentos foram realizados com os seguintes grupos experimentais: grupos controle – sem tratamento (*S. pneumoniae* ATCC® 700904 e *S. pyogenes*); grupos de tratamento com IFD de

*S. pneumoniae*: bactéria submetida a três ciclos consecutivos de IFD com dose de luz de 6,4 J/cm<sup>2</sup> (C3IFD 6,4 J/cm<sup>2</sup>), e bactéria submetida a três ciclos consecutivos de IFD com dose de luz de 12,8 J/cm<sup>2</sup> (C3IFD 12,8 J/cm<sup>2</sup>); grupo de tratamento com IFD de *S. pyogenes*: bactéria submetida a três ciclos consecutivos de IFD com dose de luz de 12,8 J/cm<sup>2</sup> (C3IFD 12,8 J/cm<sup>2</sup>). Cada grupo foi cultivado em meio de cultura adequado e submetido a análises para determinar o impacto dos ciclos de IFD no comportamento do crescimento bacteriano ao longo do tempo. Devido a dificuldades técnicas experimentais, os dados referentes à curva de crescimento de *S. pyogenes* após os ciclos de IFD com dose de luz de 6,4 J/cm<sup>2</sup> não foram obtidos. As complicações impediram a coleta de dados consistentes para essa condição específica. Portanto, este estudo apresenta somente os resultados para as curvas de crescimento de *S. pyogenes* submetidas a uma dose de luz de 12,8 J/cm<sup>2</sup>, além dos dados completos para *S. pneumoniae* nas duas doses de luz examinadas.

### 3 CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS AOS ANTIMICROBIANOS

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos da concentração inibitória mínima (CIM) testados para AMO, ERI e CEF nas bactérias *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. A CIM oferece uma estimativa da suscetibilidade de uma cepa bacteriana a um antimicrobiano que pode orientar a escolha do tratamento adequado (NIELSEN, 2007). Além disso, neste trabalho, a monitoração dos valores de CIM foram importantes para verificar uma possível alteração na suscetibilidade das bactérias aos ATBs, após serem submetidas à IFD.

Tabela 1. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* para os antimicrobianos amoxicilina, eritromicina e ceftriaxona, expressos em  $\mu\text{g/mL}$ , e os respectivos pontos de corte do BrCAST, para a classificação de cepa resistente.

Antimicrobiano	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	<i>S. pneumoniae</i> (ATCC® 49619)		<i>S. pneumoniae</i> (ATCC® 700904)		<i>S. pyogenes</i>	
	Resultado	BrCAST	Resultado	BrCAST	Resultado	BrCAST
Amoxicilina	0,0625	> 1,0	4	> 1,0	8192	> 0,25
Eritromicina	0,0625	> 0,25	16	> 0,25	4096	> 0,25
Ceftriaxona	0,0625	> 2	2	> 2	0,0156	> 0,5

Fonte: Própria.

A classificação das bactérias em “sensível” ou “resistente” foi determinada de acordo com os pontos de corte do BrCAST, 2023. Dessa forma, foi possível observar que a cepa ATCC® 49619 de *S. pneumoniae* foi classificada como sensível a AMO, ERI e CEF, apresentando valores de 0,0625  $\mu\text{g/mL}$  para todos os antimicrobianos. A cepa ATCC® 700904, como esperado, se mostrou resistente aos três antimicrobianos, com valores de CIM de 4, 16 e 2  $\mu\text{g/mL}$  para AMO, ERI e CEF, respectivamente. *S. pyogenes* apresentou resistência à AMO (8192  $\mu\text{g/mL}$ ) e ERI (4096  $\mu\text{g/mL}$ ), mas demonstrou sensibilidade à CEF (0,03125  $\mu\text{g/mL}$ ). Segundo o BrCAST, *S. pyogenes* é resistente a estes ATBs quando apresenta pontos de corte de CIM maiores que 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . Os

pontos de cortes, valores de CIM a partir dos quais a bactéria apresenta resistência aos antimicrobianos, para ambas as espécies estão contidas na Tabela.

*S. pyogenes* é naturalmente sensível aos antimicrobianos à base de penicilina, como a amoxicilina, ampicilina e oxacilina, por exemplo, sendo esse o tratamento de escolha para infecções causadas por GAS (BROUWER, 2023). Neste estudo, em que a bactéria foi isolada de uma amostra clínica de um paciente com faringotonsilite, a cepa foi classificada como resistente à AMO, ERI e CEF. Em casos de infecções complicadas com grande carga bacteriana, podem ser usados outros antimicrobianos como complemento à penicilina, como as cefalosporinas, como, por exemplo, a ceftriaxona. Em casos de hipersensibilidade do indivíduo à penicilina, os macrolídeos, como a eritromicina e a azitromicina, têm sido utilizados como alternativa. Porém, a resistência aos macrolídeos é comum em algumas regiões e pode surgir repentinamente devido ao consumo elevado de ATB pela população (HAND, 2019).

Para *S. pneumoniae* a ocorrência de resistência às penicilinas é mais comum devido a mutações que levam a alterações nas PBPs, que são os alvos dos antimicrobianos beta-lactâmicos, como a AMO (WALKER, 2014). A resistência de *S. pneumoniae* à penicilina varia ao longo dos anos e dos locais estudados, mas atualmente uma grande proporção dos pneumococos ao redor do mundo é suscetível a este antibiótico. Recentemente, a resistência aos macrolídeos, como a ERI e a tetraciclina tem sido relatada (SCHROEDER, 2016). Dado os números crescentes da disseminação de linhagens resistente ao redor do mundo, a *S. pneumoniae* está na lista de grau médio de prioridade da OMS para o desenvolvimento de novos tratamentos para combatê-la (TACCONELLI, 2018). Os resultados obtidos são referências para o desenvolvimento deste trabalho e esse experimento foi importante para avaliar o grau de resistência/sensibilidade das bactérias para os três antimicrobianos.

### 3.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

O estudo avaliou a eficácia da inativação fotodinâmica (IFD) utilizando curcumina (CUR) como fotossensibilizador em concentrações variando de 0,25 a 2,5  $\mu\text{M}$ , mantendo a dose de luz (450 nm) em 6,4  $\text{J}/\text{cm}^2$ , sobre *S. pneumoniae* ATCC® 49619 e um isolado clínico de *S. pyogenes*.

Os resultados, apresentados na Figura 11, demonstram a quantidade de microrganismos sobreviventes, expressos em log (UFC/mL). Observou-se que a redução de microrganismos apresentou um comportamento dependente da concentração de CUR. Os grupos controle, não tratados e tratados somente com luz, demonstram que a luz isolada não afeta a viabilidade bacteriana. Quando expostas somente a CUR (FS5,0), os grupos também não apresentaram redução na contagem de microrganismos, sugerindo que o fotossensibilizador é ineficaz contra os microrganismos na ausência de luz. Isso reitera a ausência do efeito não citotóxico da luz isolada na ausência de FS, bem como da CUR sem a ativação da luz, uma observação que é amplamente corroborada pela literatura (Dias, 2020; Soares, 2022). Esses dados sugerem que a redução da concentração microbiana nos grupos experimentais tratados com luz + CUR é decorrente de danos oxidativos provenientes da IFD.

Figura 11 - Resultados de inativação fotodinâmica (IFD) utilizando diferentes concentrações de curcumina (CUR) e dose de luz de 6,4 J/cm<sup>2</sup>. Células sobreviventes (esquerda) e redução logarítmica do crescimento expressos em log (UFC/mL) (direita) de *S. pneumoniae* (A) e *S. pyogenes* (B). A significância estatística, representada com as letras sobre as barras, indicam a diferença ou semelhança na eficácia entre os grupos de tratamento.



Fonte: Própria.

Os gráficos à esquerda mostram a viabilidade bacteriana (log CFU/mL) após o tratamento com diferentes concentrações de CUR sob uma dose fixa de luz de 6,4 J/cm<sup>2</sup>, revelando uma tendência de decréscimo na sobrevivência dos microrganismos à medida que a concentração de CUR aumenta. Esta observação confirma a eficácia crescente da IFD com o aumento da concentração deste fotossensibilizador. À direita, enfatiza-se a redução do crescimento bacteriano nas maiores concentrações de CUR, destacando a inativação bacteriana significativa nestas condições e salienta a importância da seleção adequada da concentração de FS para otimizar a eliminação de patógenos.

Os grupos tratados com IFD indicam que, para ambas as espécies, IFD0,25 e IFD0,5 mostram pouca ou nenhuma redução significativa, similar aos níveis de controle; IFD1,0 e IFD2,5 apresentam reduções moderadas e substanciais, de aproximadamente 1,5 e 4,5 log (UFC/mL) respectivamente, destacando uma diminuição efetiva na viabilidade bacteriana; IFD5,0 alcança erradicação completa do crescimento bacteriano, demonstrando a maior eficácia do tratamento. Esses achados demonstram uma relação direta entre a concentração de CUR e a efetividade da IFD, reiterando que a escolha precisa de CUR e a dosagem de luz são cruciais para o sucesso da IFD. Além disso, a corroboração entre as espécies demonstra que para o mesmo gênero é possível padronizar os mesmos parâmetros de IFD.

A curcumina, sem ativação por luz, não reduz significativamente as contagens bacterianas, confirmando que sua atividade antimicrobiana depende da fotoativação. Quando ativada por luz, a curcumina atua como um fotossensibilizador eficaz, gerando EROs, que causam danos diretos às paredes celulares e ao DNA bacteriano (DIAS, 2020; HOPE-ROBERTS, 2017). A utilização da CUR na IFD mostra grande potencial em situações de resistência bacteriana, pois a geração aumentada de EROs em concentrações mais altas pode causar danos celulares extensos, principalmente por alterar as membranas bacterianas facilitando a penetração de ATBs (DIAS, 2020; DOVIGO, 2011; TYAGI, 2015).

Yuan (2022) avaliou a eficácia antibacteriana da IFD mediada por curcumina contra *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva, demonstrando que a curcumina combinada com luz azul pode inativar significativamente a bactéria. O estudo também destacou que a IFD com curcumina causou danos à membrana celular, aumento dos níveis intracelulares de EROS e vazamento de constituintes intracelulares (YUAN, 2022). Essas investigações corroboram os achados desta pesquisa, indicando que a viabilidade bacteriana foi significativamente reduzida pela curcumina na presença de luz.

Apesar de apresentar resistência a duas classes diferentes de antimicrobianos, *S. pyogenes* foi erradicada através da IFD, o que demonstra o potencial desta técnica para inativar microrganismos mesmo que sejam resistentes a ATBs, podendo ser um importante adjuvante à antibioticoterapia. Ao promover a redução das unidades formadoras de colônias, a IFD pode aumentar a ação dos ATBs, ou até mesmo possibilitar que o sistema imunológico tenha maior controle sobre infecções (TIM, 2015).

Por causar majoritariamente infecções internas, usualmente estudos com *S. pneumoniae* abordam FS que absorvam em comprimentos de onda na região do vermelho e infravermelho. Um estudo experimental *in vitro* avaliou o efeito da IFD contra *S. pneumoniae* e avaliou a viabilidade de macrófagos alveolares utilizando a indocianina verde (ICG) como fotossensibilizador e fonte de luz infravermelha em 850 nm com dose de 30 J/cm<sup>2</sup>. Além da inativação das bactérias, foi obtida viabilidade de mais de 90% das células pulmonares, sugerindo a eficácia e segurança da técnica (LEITE, 2014). Baseando-se nesse trabalho, foi realizado pelo mesmo grupo de pesquisa um estudo experimental *in vivo* utilizando ICG e luz em 780 nm, iluminando de forma extracorpórea ratos infectados por *S. pneumoniae*. O estudo resultou em nenhuma recuperação de bactérias em 80% dos animais e uma taxa de sobrevivência de 100% deles nos grupos tratados, corroborando os resultados anteriores (GERALDE, 2017). Entretanto, a curcumina é também um FS de interesse clínico no tratamento da pneumonia bacteriana, conforme relatado por (ALIKIAII, 2021), que, ao revisar sistematicamente 17 trabalhos na literatura incluindo a *S. pneumoniae*, concluiu que a curcumina reduz a lesão pulmonar induzida pela pneumonia e sua gravidade, ao diminuir a infiltração de neutrófilos e a resposta imune em modelos pré-clínicos de pneumonia.

Os resultados encontrados para *S. pyogenes*, quando comparados com a literatura, indicam um alinhamento com estudos anteriores que exploraram IFD. Uma pesquisa mostrou que IFD com CUR pode ser eficaz contra cepas clínicas de *S. pyogenes* isoladas de pacientes com faringotonsilite, sem desenvolvimento significativo de resistência à IFD após múltiplos ciclos de tratamento (SOARES, 2020a). Além disso, foi observado que a capacidade de formação de biofilme foi reduzida, e a eficácia dos antimicrobianos se manteve pós-ciclos de IFD. Estes achados sugerem que a IFD poderia ser uma estratégia complementar útil no tratamento de infecções por *S. pyogenes*, reforçando o potencial terapêutico dessa abordagem (BLANCO, 2017). Estudos já demonstraram a boa capacidade da CUR de penetrar nas células de *S. pyogenes*, bem como sua boa atuação como FS na IFD para inativar essas bactérias, em diferentes formulações, alcançando uma redução de até aproximadamente 4 log (UFC/mL) (SOARES, 2020a, 2020b).

A CUR é um FS que apresenta boa eficácia contra microrganismos Gram-positivos na IFD, já demonstrada em diversos estudos, incluindo pesquisas clínicas (PASCHOAL, 2013; MANOIL, 2014; BLANCO, 2017). Além dos danos generalizados nos fosfolípidios, proteínas e ácidos nucleicos causados nas bactérias devido à geração de EROs pela IFD, foi observado que A IFD mediada por CUR regulou negativamente genes de virulência em *Listeria monocytogenes*, afetando

sua capacidade de aderir e invadir o hospedeiro, e escapar do sistema imune, reduzindo sua virulência (HUANG, 2020). Estudos mostram que ao combinar IFD-CUR com agentes antimicrobianos tradicionais, é possível obter um efeito antibacteriano potencializado, e aumento da sensibilidade de bactérias a antibióticos (PACKIAVATHY, 2014; ZHENG, 2020). Devido a essas propriedades, a CUR foi utilizada neste trabalho como fotossensibilizador para avaliar seu efeito na IFD sobre *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*, incluindo cepas resistentes, e para testar diferentes combinações com antibióticos. Além disso, seu uso foi escolhido para fins de comparação a outros trabalhos do mesmo grupo de pesquisa, e verificação da possibilidade de extrapolação dos resultados previamente obtidos para outras espécies de bactérias Gram-positivas (SOARES, 2023). Esses estudos abrem caminho para integrar a IFD com tratamentos antimicrobianos estabelecidos, oferecendo uma estratégia dual que pode superar as limitações impostas pela resistência aos antimicrobianos (WOZNIAK, 2018).

A partir dos resultados obtidos, foram escolhidas as concentrações de CUR a serem utilizadas nos experimentos seguintes, as quais apresentaram inativações parciais da população bacteriana, sem que houvesse redução total. A parcela sobrevivente das bactérias viabiliza a avaliação do efeito da IFD combinado com a ATB, apresentado a seguir. Dessa forma, foi padronizado o uso da CUR em 0,5  $\mu\text{M}$ , que reduziu aproximadamente 1,5 log (UFC/mL), e em 2,5  $\mu\text{M}$ , que reduziu em torno de 4,0 log (UFC/mL), em relação ao controle de ambas as bactérias.

### 3.3 DINÂMICA DE REDUÇÃO BACTERIANA AO LONGO DO TEMPO

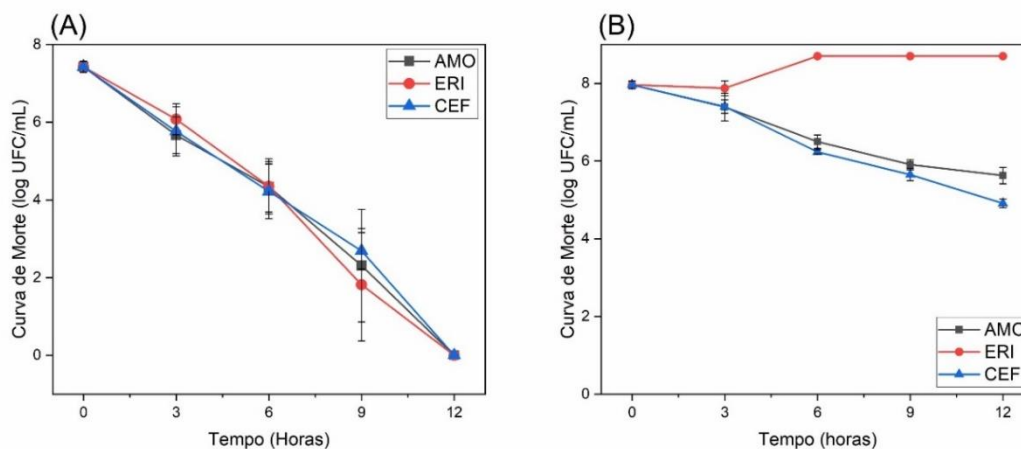
A avaliação da curva de morte foi empregada para *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* com o objetivo de compreender a dinâmica de redução bacteriana pela AMO, ERI e CEF ao longo do tempo. Esses dados serviram como base para a investigação dos efeitos potenciais de combinações entre a IFD e ATBT sobre os estreptococos. A partir da análise da taxa de morte, foi determinado o tempo que cada ATB leva para reduzir ou zerar a quantidade de bactérias, além de permitir a verificação de suscetibilidade das cepas em relação a cada ATB testado.

A Figura 12 apresenta curvas de tempo de morte para as bactérias *S. pneumoniae* ATCC 49619 (Fig. 12-A) e um isolado clínico de *S. pyogenes* (Fig. 12-B) expostas aos antimicrobianos

AMO, ERI e CEF. Para *S. pneumoniae*, todos os fármacos mostram uma diminuição eficaz no número de UFC/mL ao longo do tempo, indicando uma ação antimicrobiana eficiente. Quando as populações bacterianas são tratadas com processos físicos ou substâncias químicas (por exemplo, antimicrobianos), o comportamento normal delas é morrer em uma taxa constante (TORTORA, 2000), assim como foi observado com *S. pneumoniae*, cuja curva de concentração de bactéria ao longo do tempo apresentou um comportamento linear decrescente para todos os ATBs, demonstrando a sensibilidade desta bactéria aos fármacos avaliados. Esses dados confirmam os resultados encontrados para o MIC de *S. pneumoniae* (Tabela 1), em que os valores estavam abaixo do ponto de corte, indicando suscetibilidade aos antibióticos, que eliminaram completamente a bactéria em 12 horas (Fig. 12-A).

No caso de *S. pyogenes*, a ERI manteve um número estável de células até 3 h, a partir de onde os microrganismos aumentaram em quantidade (Fig. 12-B). Em 6 h, a contagem de UFC/mL se estabilizou, sugerindo uma possível resistência ou presença de células persistentes (BALABAN, 2019). A resistência observada está de acordo com os valores de CIM encontrados (Tabela 1). Em contraste, a AMO e a CEF mantiveram uma tendência decrescente de bactérias ao longo do tempo, indicando eficácia contínua, porém mais lenta em relação a *S. pneumoniae*. A variação nas respostas evidencia a dinâmica específica do ATB contra diferentes patógenos.

Figura 12 - Curva de tempo de morte das bactérias *S. pneumoniae* (A) e *S. pyogenes* (B) após exposição aos antimicrobianos: amoxicilina (AMO – 0,25 e 16384  $\mu\text{g/mL}$ ), eritromicina (ERI – 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) e ceftriaxona (CEF 0,25 e 4  $\mu\text{g/mL}$ ), com as respectivas concentrações em cada espécie.



Fonte: Própria.

### 3.4 COMBINAÇÃO DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA COM ANTIBIÓTICOS

#### 3.4.1 Investigação dos efeitos da aplicação posterior de inativação fotodinâmica ao antibiótico isolado

A combinação de fármacos antimicrobianos com outras técnicas que contribuam para a atividade antibacteriana representa uma estratégia promissora para superar o obstáculo da resistência aos antimicrobianos, que tem se intensificado globalmente desafiando os métodos tradicionais de tratamento (FENG, 2021). Nesse contexto, foi realizada a avaliação da eficácia da combinação de diferentes antibióticos com a IFD ao longo do tempo, sobre a bactéria *S. pneumoniae*, um patógeno de elevada importância clínica. Este estudo investigou qual a diferença do comportamento da bactéria ao ser exposta ao antibiótico isolado e ao ser submetida à IFD pós exposição ao ATB, avaliando a influência do tempo e das concentrações de fotossensibilizador na atividade antimicrobiana dos tratamentos combinados.

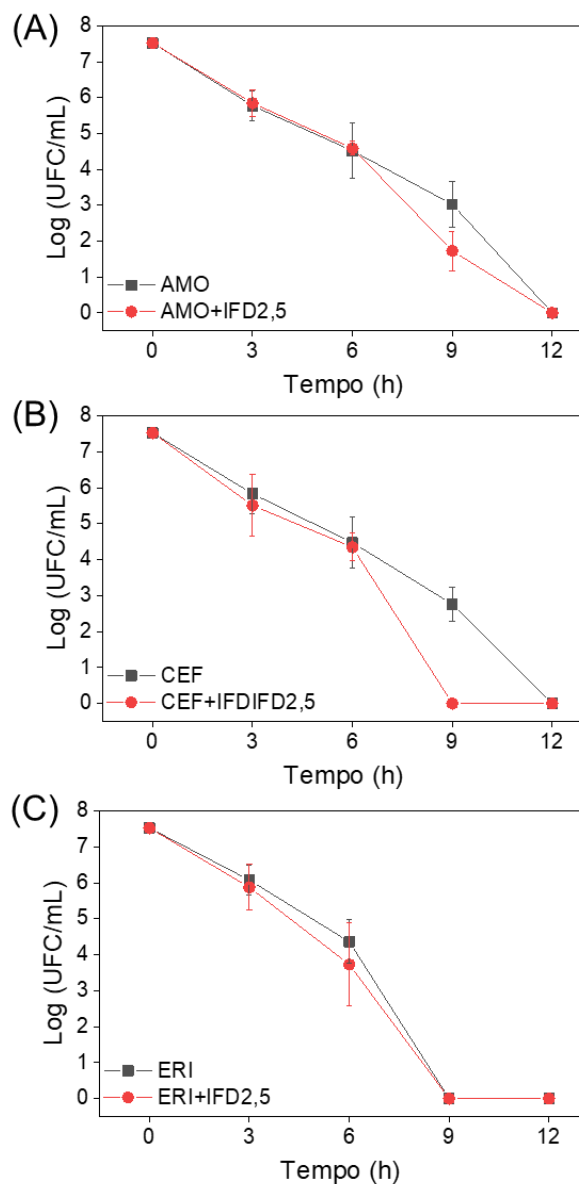
Dessa forma, foram analisadas quais as melhores formas de combinações de AMO, ERI e CEF com IFD administrada com duas concentrações diferentes de curcumina (CUR - 0,5 e 2,5  $\mu\text{M}$ ) e dose fixa de luz de 6,4  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Esses parâmetros foram obtidos através dos resultados de IFD (Item 3.2) e as concentrações de CUR foram selecionadas para alcançar doses subletais e uma inativação parcial da bactéria, que permitisse avaliar seu comportamento. O uso de diferentes concentrações de CUR na IFD permitem comparar como essas concentrações influenciam o resultado antimicrobiano final quando a IFD é combinada com os antibióticos. Essas informações poderão servir como uma base para a elaboração de um protocolo eficiente de combinação dos diferentes regimes de tratamento.

Aplicando-se IFD com 2,5  $\mu\text{M}$  de CUR após a incubação da bactéria com os antibióticos, foi observado um comportamento padrão, em que após 3h e 6h de exposição ao antibiótico, a aplicação posterior de IFD não apresentou acréscimo na redução bacteriana, mas após 9h, a adição da IFD contribuiu ampliando o efeito antimicrobiano em relação aos antibióticos isolados. Conforme a Figura 13, que mostra a relação da quantidade de bactéria (log UFC/mL) em função do tempo (horas), esse perfil mostrou um padrão independentemente do fármaco estudado. No

entanto, há uma ressalva para a ERI (Fig. 13-C), já que esse antibiótico eliminou completamente a bactéria em 9 horas, impossibilitando a análise do efeito combinado com IFD neste instante.

A Figura 13-A apresenta a sobrevivência de *S. pneumoniae* ao longo do tempo após incubação com AMO por 12 horas, e após subseqüentes aplicações de IFD com 2,5  $\mu$ M de CUR a cada 3 horas. Partindo-se de 7,5 log UFC/mL, é possível observar que até 6 horas não ocorre diferença na sobrevivência bacteriana com o tratamento combinado em relação ao tratamento com AMO isolada. No entanto, houve uma diferença significativa de 1,3 log UFC/mL na redução da bactéria quando se aplicou IFD após 9 horas de exposição ao antibiótico (AMO+IFD2,5). Em 12 horas, AMO isolada (AMO) foi capaz de eliminar completamente o microrganismo.

Figura 13 - Relação da quantidade de bactérias sobreviventes (log UFC/mL) em função do tempo (horas). Este gráfico apresenta uma comparação entre o efeito da amoxicilina (AMO - A), da ceftriaxona (CEF - B) e da eritromicina (ERI - C) isolados, e o efeito da aplicação subsequente de IFD a 2,5  $\mu$ M de CUR sobre a sobrevivência de *S. pneumoniae*.



Fonte: Própria.

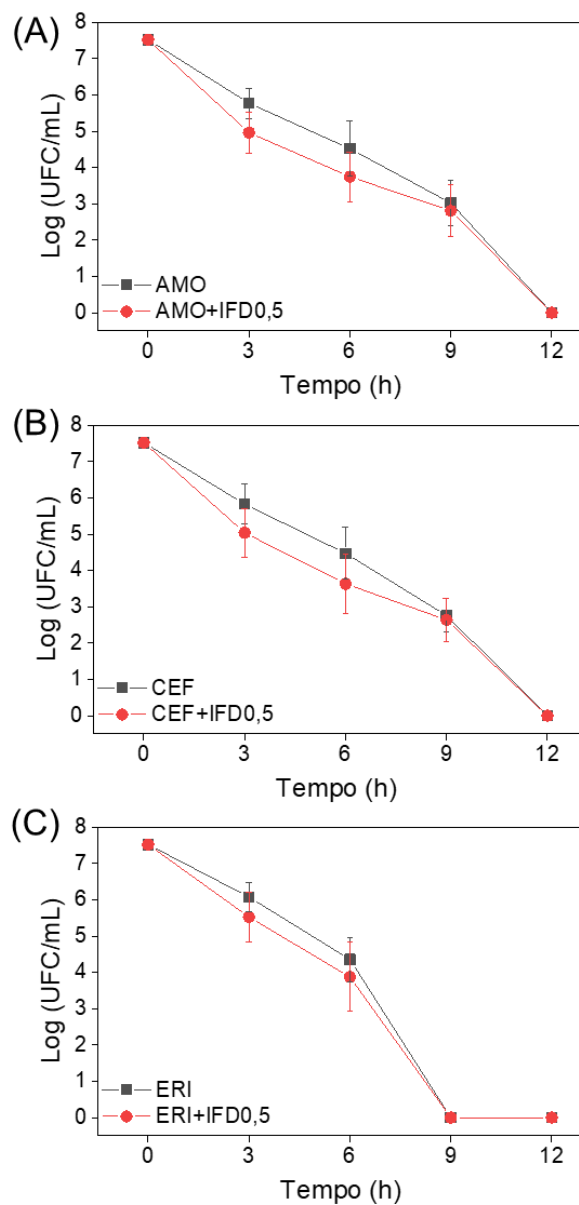
O comportamento obtido para a CEF, conforme observa-se na Figura 13-B, é semelhante ao comportamento observado para a AMO. Dessa forma, em 3h e 6h, a aplicação posterior de IFD com 2,5  $\mu$ M de CUR (CEF+IFD2,5) não apresentou diferença significativa na redução bacteriana em relação à CEF isolada (CEF). Porém, após 9 horas de exposição ao antibiótico, a adição de IFD

contribuiu significativamente para o efeito antimicrobiano, aumentando a redução em 2,8 log UFC/mL em relação à CEF isolada e eliminando completamente a bactéria neste instante. Esse resultado foi o mais eficaz dentre as combinações testadas nas condições avaliadas. Assim como a AMO, CEF isolada eliminou completamente *S. pneumoniae* em 12 horas. Dessa forma, a aplicação da IFD a 2,5 µM após 9 horas de incubação com CEF reduz o tempo necessário para eliminar o microrganismo em 3 horas, evidenciando a eficácia dessa combinação.

Como mencionado anteriormente, o perfil de sobrevivência da bactéria exposta à ERI e sua combinação com IFD sobre a bactéria, apresentado na Figura 13-C, assemelha-se ao comportamento obtido com AMO e CEF, com a exceção de que as combinações não apresentaram efeito significativo. Em 3h e 6h não ocorreu aumento significativo na redução bacteriana quando se aplicou IFD posteriormente à incubação do microrganismo com o antibiótico (ERI+IFD2,5). Em 9 horas, instante em que a maior diferença foi observada para os outros antibióticos, a ERI isolada já havia eliminado completamente *S. pneumoniae*. Isso impossibilitou uma análise do efeito da adição de IFD nesta concentração, bem como uma comparação do comportamento com AMO e CEF neste instante de tempo.

Os mesmos experimentos foram conduzidos com CUR na concentração de 0,5 µM, revelando um padrão de resposta inverso ao observado com 2,5 µM. Diferentemente do que foi observado com a maior concentração do fotossensibilizador, a IFD com 0,5 µM de CUR potencializou a redução bacteriana nas primeiras 3 e 6 horas em comparação aos antibióticos isolados, mas não demonstrou diferença significativa após 9 horas de tratamento. Esses resultados são mostrados na Figura 14. A Figura 14-A ilustra a sobrevivência bacteriana, expressa em log UFC/mL, em função do tempo (horas), após a exposição da bactéria à AMO seguida de aplicação de IFD a 0,5 µM (AMO+IFD0,5) a cada 3 horas durante um período de 12 horas. Em 3h e 6h, a redução microbiana foi discretamente aumentada, em torno de 0,8 log UFC/mL, quando aplicou-se a IFD posteriormente à incubação com AMO. Em 9 horas, não houve diferença significativa entre a combinação testada e o antibiótico isolado.

Figura 14 - Relação da quantidade de bactérias sobreviventes (log UFC/mL) em função do tempo (horas). Os gráficos apresentam uma comparação entre o efeito da amoxicilina (AMO - A), da ceftriaxona (CEF - B) e da eritromicina (ERI - C) isolados e o efeito da aplicação subsequente de IFD a 0,5  $\mu$ M de CUR (AMO+IFD0,5) sobre a sobrevivência de *S. pneumoniae*.



Fonte: Própria.

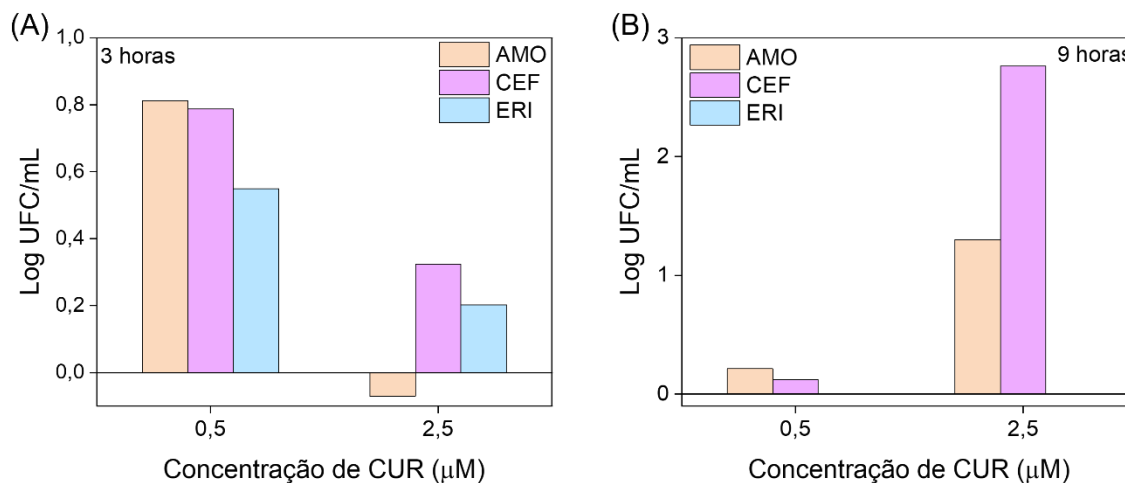
A sobrevivência bacteriana após os tratamentos com CEF e IFD (CEF+IFD0,5) ao longo de 12 horas é mostrada na Figura 14-B. É possível observar que o perfil de sobrevivência é similar ao perfil encontrado para AMO (Fig. 14-A). Assim como AMO, em 3h e 6h a aplicação posterior de IFD à bactéria incubada com CEF aumentou a redução bacteriana em 0,8 log UFC/mL em

relação ao tratamento com antibiótico isolado. Da mesma forma, em 9 horas não ocorreu diferença significativa na sobrevivência da bactéria após o tratamento isolado e combinado. Essa semelhança no comportamento da bactéria após os tratamentos com AMO e CEF podem estar relacionados com o mecanismo de ação destes antimicrobianos, que atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana, como já discutido anteriormente.

Diferentemente dos resultados encontrados para AMO e CEF, a combinação de IFD utilizando 0,5  $\mu\text{M}$  de CUR com ERI não demonstrou diferença significativa sobre a redução bacteriana nas primeiras 6 horas, quando comparada ao efeito da ERI utilizada isoladamente, nas condições testadas, conforme ilustrado na Figura 14 - C. Como já mencionado, em 9 horas a ERI isolada eliminou completamente a bactéria, inviabilizando a análise dos efeitos do tratamento combinado neste instante. A diferença do perfil observado para ERI em relação aos outros antibióticos pode estar relacionada com o mecanismo de ação de ERI. Como este antibiótico age no ribossomo da bactéria e não atinge a parede celular, é possível que os seus efeitos não tenham contribuído com a IFD por não causarem uma maior permeabilidade à CUR.

Com o intuito de quantificar a contribuição da IFD na potencialização dos efeitos dos antibióticos isolados e auxiliar no entendimento de possíveis efeitos combinatórios, a Figura 15 foi elaborada. Os quadros (A) e (B) indicam, em log UFC/mL, a diferença dos valores de redução bacteriana entre os tratamentos combinados de IFD, realizado com duas concentrações de curcumina (0,5 e 2,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente), em relação à redução obtida pelos antibióticos isolados nos instantes estudados de 3h e 9h. Os gráficos auxiliam na compreensão dos efeitos da aplicação subsequente de IFD, permitindo visualizar em que medida essa combinação apresenta benefícios para os tratamentos em relação à redução bacteriana.

Figura 15 - Diferença dos valores de redução bacteriana entre os tratamentos isolados com AMO, CEF e ERI e os tratamentos combinados com IFD, com curcumina na concentração de 0,5 e 2,5  $\mu\text{M}$ . (A) Diferença na redução bacteriana entre os tratamentos obtida após 3 horas de incubação com os antibióticos. (B) Diferença na redução bacteriana entre os tratamentos obtida após 9 horas de incubação com os antibióticos.



Fonte: Própria.

Os resultados apresentados nos gráficos confirmam a diferença do impacto da IFD sobre a redução bacteriana entre as duas concentrações de curcumina nos períodos inicial e final do tratamento. Como já mencionado, enquanto em 3 horas a viabilidade bacteriana é diminuída pela aplicação posterior de IFD ao antibiótico, com concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de CUR, em 9 horas a IFD nessa mesma concentração não apresentou diferença significativa em relação ao antibiótico isolado. No momento inicial de 3 horas (Fig. 15-A) e com a menor concentração de curcumina, a IFD apresentou um aumento significativo na redução bacteriana, de 0,8 log UFC/mL, ao ser aplicada após a exposição à AMO e CEF, em relação aos antibióticos isolados. No tratamento combinado com ERI, no entanto, a aplicação posterior de IFD não contribuiu significativamente para a morte da bactéria. Ainda em 3 horas, a IFD aplicada com concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  de CUR não incrementou efeito antimicrobiano aos três antibióticos testados. No entanto, em 9 horas esse comportamento se inverte (Fig. 15-B). Com a aplicação de IFD a 0,5  $\mu\text{M}$  nesse instante, não ocorreu aumento na redução de viabilidade bacteriana, mas com 2,5  $\mu\text{M}$  de CUR, a diferença entre os valores de redução dos tratamentos combinados é bastante significativa. A combinação da IFD na maior concentração de CUR com AMO aumentou em 1,3 log UFC/mL e com CEF aumentou em 2,8 log UFC/mL em relação aos antibióticos isolados. Para a ERI, não foi possível analisar o

efeito da combinação com IFD devido à eliminação prévia do microrganismo em 9 horas. Esses dados apontam para um efeito potencializado com a aplicação posterior de IFD a 2,5  $\mu\text{M}$  com AMO e CEF, mas especialmente com CEF, em que o aumento no efeito antimicrobiano foi mais pronunciado. Os resultados apontam para uma melhoria significativa na rapidez da resposta do antibiótico quando combinado com a IFD. A análise sugere que a integração da IFD pode potencializar a ação do antibiótico, dependendo das condições e dos antimicrobianos testados, reforçando a ideia de um comportamento sinérgico de acordo com o ponto temporal. Os dados também confirmam a ação fundamental da concentração de curcumina para a eficácia dos tratamentos.

O conjunto dos resultados (Figuras 13-15) mostra que foi encontrado um padrão comportamental de redução bacteriana ao acrescentar aplicações subsequentes de IFD à incubação com os antibióticos ao longo do tempo, considerando principalmente AMO e CEF: a IFD com 2,5  $\mu\text{M}$  de CUR mostrou adicionar efeito antibacteriano significativo somente após 9 horas de incubação com os antibióticos, sem mostrar efeito adicional nas primeiras 6 horas. Por outro lado, a IFD com 0,5  $\mu\text{M}$  de CUR intensificou o efeito antibacteriano nos instantes 3h e 6h, mas não demonstrou vantagens adicionais após 9 horas. Desse modo, a análise da combinação dos diferentes ATBs avaliados com as duas concentrações de CUR na IFD sugere que a integração da IFD pode intensificar a ação do antibiótico, dependendo do mecanismo de ação dos ATBs e o tempo de tratamento. Os dados também confirmam a ação fundamental da concentração de CUR para a eficácia dos tratamentos.

Baseando-se nos resultados obtidos e nos dados da literatura, são propostas algumas hipóteses para explicar os fenômenos observados. Uma das hipóteses consideradas sugere uma correlação entre a concentração de CUR e a ausência de aumento na ação antimicrobiana da IFD a 2,5  $\mu\text{M}$  nas primeiras 6 horas após a incubação com os antibióticos, enquanto observa-se um efeito adicional dessas combinações (AMO+IFD2,5 e CEF+IFD2,5) em 9 horas. Pode ter ocorrido uma agregação das moléculas de CUR internalizadas, devido à presença do antibiótico previamente internalizado. Estudos anteriores demonstraram que a presença de antimicrobianos no interior celular pode facilitar a internalização de fotossensibilizadores e, conseqüentemente, sua concentração dentro da célula bacteriana (Freitas, 2017; Soares *et al.*, 2022). Uma concentração elevada de curcumina poderia ter induzido a agregação das moléculas de CUR, diminuindo sua disponibilidade para interagir com a luz e o oxigênio molecular. Conseqüentemente, isso poderia

reduzir a formação de EROs, comprometendo a eficácia da IFD (HAZRA, 2014). Concentrações mais elevadas de CUR também podem reduzir o efeito da IFD devido a reações das moléculas fotossensibilizadoras com outros componentes celulares (MELO, 2023). Ainda que elevadas concentrações de curcumina possam ter diminuído a eficácia da IFD nas primeiras horas de incubação com o antibiótico, infere-se que a ação do antibiótico sobre a bactéria em 9 horas tenha promovido melhora na ação da IFD por ter promovido alterações na permeabilidade da parede celular bacteriana, vide Fig. 15-B. Esse comprometimento estrutural pode ter aumentado a suscetibilidade da bactéria aos danos oxidativos da IFD, resultando em uma redução bacteriana mais pronunciada do que aquela observada com o uso isolado dos antibióticos. A interação sinérgica entre CUR e antimicrobianos que atuam na parede celular, como AMO e CEF, pode romper as defesas bacterianas de forma mais eficaz do que quando utilizados isoladamente.

Outra hipótese que pode ser levantada a partir desta pesquisa é que, tanto as espécies reativas geradas pela IFD, como a própria CUR podem ter interagido com as moléculas dos antimicrobianos presentes no interior das células bacterianas, resultando em sua degradação ou alteração estrutural e impedindo sua ação efetiva. Já foram demonstrados na literatura efeitos negativos da CUR sobre a ação de ATBs (MARATHE, 2013). Esse possível prejuízo da eficácia do antibiótico devido à IFD compensaria o efeito antimicrobiano esperado da combinação, resultando em reduções bacterianas equivalentes entre os grupos com e sem aplicação de IFD. Nesta hipótese, moléculas de antibióticos reagiriam com a IFD de forma compensatória nas primeiras seis horas de incubação, sem alterar o resultado final nestes instantes. Se essa hipótese for verdadeira, ela indicaria uma limitação no uso combinado de IFD e antibióticos específicos, especialmente se o antimicrobiano for suscetível a degradação por EROs ou outros mecanismos ativados pela IFD (WANG, 2020).

Considerando AMO e CEF isolados, no instante de 9 horas ambos reduziram a população bacteriana significativamente. Essa redução prévia indica que, possivelmente, o tempo de exposição aos antibióticos aumentou a sensibilidade da bactéria à IFD devido aos danos de suas estruturas celulares ou por indução de um estado subletal que aumentou a suscetibilidade aos danos oxidativos da IFD aplicada subsequentemente. Consequentemente, essa interação resultou em uma redução bacteriana mais pronunciada do que aquela observada com o uso isolado dos antibióticos, demonstrando um efeito sinérgico significativo na fase tardia do tratamento. Considerando que AMO e CEF atuam impedindo a construção da parede celular bacteriana (AKHAVAN, 2023;

RAWLS, 2014), é possível que sua ação prévia tenha facilitado a internalização da curcumina no instante de 9 horas, contribuindo também com a eficácia da IFD. A interação entre a curcumina e os antimicrobianos que atuam na parede celular pode romper as defesas bacterianas de forma mais eficaz do que quando usados isoladamente (SOARES, 2022).

Como a bactéria já estava mais suscetível após 9 horas de incubação com o antibiótico, as questões envolvendo agregação de CUR intracelular passou a ser menos relevante e a diferença entre o efeito do ATB isolado e combinado com IFD foi maior. Nesse contexto, infere-se que em tempos mais longos, o efeito acumulado do antibiótico sobre a bactéria tenha reduzido a viabilidade bacteriana a um nível que facilitou a ação fotodinâmica, tornando a IFD mais eficiente em complementar o efeito do antibiótico. Dessa forma, a aplicação posterior da IFD sobre a bactéria já exposta aos antibióticos, nestas condições (Fig. 15-B), acelerou a morte microbiana, demonstrando um efeito potencializado. Ao mesmo tempo em que este tratamento combinado aumenta a eficácia antimicrobiana em termos de horas, é possível propor que o acréscimo da IFD ao antimicrobiano possa reduzir a concentração de antibiótico necessária para matar a mesma quantidade de bactérias.

Entretanto, é válido observar que nas primeiras horas de tratamento (Figura 14 e Figura 15-A) as menores concentrações (0,5  $\mu\text{M}$ ) apresentam maiores reduções da carga bacteriana, possivelmente devido à agregação molecular de CUR ao utilizar 2,5  $\mu\text{M}$  (Figura 13 e Figura 15-B). A 0,5  $\mu\text{M}$ , a melhor solubilização da CUR dentro da célula pode ter aumentado sua disponibilidade para a ação fotodinâmica, tornando a IFD mais eficaz em 3 e 6 horas de tratamento. Por outro lado, a falta de adição no efeito antimicrobiano em 9 horas pela IFD a 0,5  $\mu\text{M}$  pode estar relacionada justamente com a menor ação da IFD nesta concentração, observada nos testes preliminares de IFD. A concentração mais baixa pode não ter sido suficiente para adicionar efeito antimicrobiano detectável no instante de 9 horas, em que a bactéria já estava extensivamente danificada ou alterada. Além disso, é possível que a bactéria danificada pelo antibiótico após 9 horas, possa liberar compostos intracelulares ou alterar o pH interno, criando um microambiente que afeta diretamente a curcumina em concentrações distintas (HAUKVIK, 2009; HEGER, 2014). Pode ser que a concentração mais baixa, de 0,5  $\mu\text{M}$ , seja mais sensível a esses fatores e tenha sua eficácia reduzida. Dessa forma, os resultados encontrados evidenciam uma diferença na dinâmica da sensibilidade bacteriana ao ser incubada com os antibióticos, e a ação da IFD sobre a bactéria nos diferentes momentos pós incubação. A IFD a 2,5  $\mu\text{M}$  foi mais eficaz após 9 horas, enquanto a

0,5  $\mu\text{M}$  teve maior efeito nas primeiras 6 horas. Essa diferença pode estar relacionada à interação entre os antibióticos, a IFD e a concentração de CUR intracelular ao longo do tempo.

Esses achados indicam que a eficácia da IFD em combinação com antibióticos é altamente influenciada pela concentração do fotossensibilizador utilizado, e de sua disponibilização molecular. Esses fenômenos mostraram que há uma elevada complexidade no processo de combinação de IFD com antibióticos e é imprescindível avaliar mais profundamente a influência dos parâmetros de IFD, como a concentração de fotossensibilizador, o tipo de antibiótico e forma de combinar esses elementos, para elaborar um protocolo eficiente de IFD que seja capaz de reduzir uma maior quantidade de microrganismo em menos tempo, ou utilizando menor concentração de antibiótico.

Existem muitos estudos na literatura que confirmam a elevada influência de diversos fatores nas combinações de IFD com antimicrobianos. Esses fatores estão relacionados com as diferentes classes de fotossensibilizadores, bem como suas concentrações; diferentes tipos e concentrações de antimicrobianos; cepas bacterianas; doses de luz; e ordem de aplicação dos tratamentos.

Um estudo avaliou a combinação de um peptídeo antimicrobiano com IFD utilizando diferentes fotossensibilizadores como o azul de metileno (MB), clorina-e6 (Ce6) e CUR, mostra os efeitos distintos na redução bacteriana, na internalização de FS e na geração de espécies reativas de oxigênio, bem como a relação entre esses fenômenos. Na combinação de IFD mediada por MB, ocorreu uma maior internalização do FS pela célula bacteriana e foi alcançada eliminação total da bactéria, sugerindo que neste caso o aumento da internalização do FS contribuiu positivamente para a redução bacteriana. A presença do peptídeo no interior celular também aumentou a internalização de CUR, porém o efeito na redução bacteriana não foi significativo. Diferentemente, a internalização de Ce6 foi menor na presença do peptídeo, mas a combinação ainda resultou em uma redução bacteriana eficaz. Isso indica que o efeito sinérgico dos tratamentos não necessariamente está relacionado com a internalização das moléculas de FS (FREITAS, 2017). Ainda, não foi observada alteração na geração de EROs pela IFD na presença do peptídeo antimicrobiano, indicando que o efeito sinérgico observado pode estar relacionado com outros mecanismos, como o aumento da permeabilidade da membrana bacteriana e maior concentração intracelular dos agentes antimicrobianos.

Avaliando-se combinações sobre cepas de *S. aureus*, obteve-se um efeito sinérgico da IFD mediada por porfirina com o antibiótico oxacilina, com aumento da redução da carga bacteriana e

diminuição dos valores de MIC. Porém, o efeito sobre a bactéria foi indiferente nas combinações com vancomicina, gentamicina e rifampicina nas condições avaliadas (ILUZ, 2018). Esses achados mostram como a IFD interage de forma diversa com diferentes tipos de antibióticos e como a escolha correta da combinação afeta o resultado final da viabilidade bacteriana. Diferentemente, o presente estudo obteve resultados de comportamento semelhante da bactéria frente às combinações com os três antibióticos testados. O aumento na permeabilidade da membrana celular da bactéria provocado pela IFD é um dos principais mecanismos atribuídos à melhora da ação antimicrobiana ao se combinar IFD com antimicrobianos. Ao desestabilizar as estruturas externas das bactérias, a entrada de antibióticos no interior celular é facilitada, bem como a ação de ATB que atuam na parede ou membrana celular. Além do aumento na permeabilidade da membrana celular e os danos generalizados causados pela IFD, alguns dos mecanismos de sinergia propostos por estes e outros autores envolvem a degradação de plasmídeos que carregam genes de resistência, bem como a redução da expressão de genes relacionados à resistência, tornando as bactérias mais suscetíveis à ação do antibiótico; inativação de proteínas e enzimas modificadoras de fármacos, impedindo que a bactéria degrade o ATB; alteração na estrutura e expressão de enzimas relacionadas à ligação com os antibióticos, aumentando a afinidade e a internalização dessas moléculas; e danificação das bombas de efluxo, que expulsam os antibióticos de dentro da célula bacteriana (ALMEIDA, 2014; BOLUKI, 2017; CASSIDY, 2010; ILUZ, 2018).

A revisão bibliográfica elaborada por Feng *et al.* (2021) encontrou, até a data do estudo, 87 tipos de combinações de IFD com diferentes classes de FS e ATB (FENG, 2021). Analisando-se trabalhos publicados, é possível notar uma elevada diversidade de resposta nas combinações entre IFD e antimicrobianos, indicando que essas respostas são específicas para cada parâmetro e condição testada e que ainda não há um protocolo bem estabelecido de combinação de IFD e antimicrobianos. Muitas pesquisas mostram efeitos sinérgicos, antagônicos e indiferentes ao se combinar estas duas terapias. A maioria dos trabalhos realizam a aplicação de IFD anteriormente à exposição do microrganismo ao antibiótico, e alguns trabalhos incubam simultaneamente o fotossensibilizador com o antibiótico para aplicar um tratamento simultâneo. Poucos trabalhos encontrados na literatura aplicam a IFD após a exposição do microrganismo ao antibiótico. Dessa forma, esta pesquisa contribui com a literatura por oferecer informações sobre o efeito de combinar a IFD com antibióticos, aplicando a IFD posteriormente ao tratamento com antibiótico. Assim,

serve como base para a comparação com outras formas de combinação e permite a elaboração de um protocolo eficiente, otimizando o uso desses tratamentos na eliminação de microrganismos.

Para avaliar qual o tratamento combinado mais eficaz na redução bacteriana, é preciso considerar critérios como a rapidez e eficácia da resposta, e a consistência do efeito ao longo do tempo. Embora as combinações com IFD a 2,5  $\mu\text{M}$  apresentem um efeito mais pronunciado sobre a redução bacteriana em 9 horas, as combinações com IFD a 0,5  $\mu\text{M}$  apresentaram uma redução mais gradual, porém consistente ao longo do tempo. Apesar da menor intensidade, a redução progressiva pode ser benéfica em tratamentos no qual uma resposta estável é desejada. Por outro lado, combinações com IFD a 2,5  $\mu\text{M}$  se mostram mais eficazes ao atingir a maior redução bacteriana dentre as combinações testadas em relação ao antimicrobiano isolado, especificamente em 9 horas. Este resultado sugere que, quando o objetivo é alcançar uma inativação mais abrupta e intensa dos microrganismos, a combinação de antibióticos com IFD em maior concentração de CUR pode oferecer vantagens significativas, quando aplicada no momento ideal. A escolha do melhor tratamento dependerá do equilíbrio entre tempo de exposição e efeito desejado, podendo ser ajustada conforme a infecção e o antibiótico utilizado.

Enquanto AMO e CEF apresentaram potenciais efeitos sinérgicos, especialmente ao aplicar IFD a 2,5  $\mu\text{M}$  posteriormente à incubação com os antibióticos, ERI não apresentou diferença entre os tratamentos isolados ou combinados em nenhuma condição ou tempo testado. A possível falta de sinergia com ERI pode ocorrer porque a geração de ROS pela IFD pode não interferir significativamente na síntese proteica bacteriana. Além disso, é possível que o estresse oxidativo induzido pela IFD desencadeie uma resposta adaptativa nas bactérias, como a produção de proteínas de choque térmico, que podem ajudar a mitigar o impacto da ERI. Essas diferenças sugerem que a combinação de IFD com antimicrobianos deve ser adaptada de acordo com o mecanismo de ação de cada fármaco. Antimicrobianos que atuam na parede celular tendem a ser mais eficazes quando combinados com IFD, enquanto aqueles que atuam dentro da célula, como ERI, podem exigir abordagens diferentes para otimizar sua eficácia (FENG, 2021; SOARES, 2022).

Uma pesquisa recente investigou os efeitos de combinação da IFD em diferentes doses de luz com antibióticos sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Primeiramente o microrganismo foi exposto aos antibióticos, depois submetido à IFD e novamente incubado. Os resultados mostraram um efeito sinérgico da CEF com a IFD em diferentes doses de luz, destacando um efeito

mais pronunciado com maiores concentrações de antibiótico. Esse fenômeno foi atribuído à resposta da bactéria ao estresse oxidativo gerado pela IFD. Quando há uma maior produção de EROs pela IFD, podem ser desencadeados mecanismos de defesa na bactéria, como bombas de efluxo e sistema de reparo da membrana, prejudicando os efeitos dos antibióticos. Quando a geração de espécies reativas é menor, o estresse oxidativo pode não ser suficiente para ativar estes mecanismos e os efeitos das EROs sobre a membrana e parede celular facilitam a ação do antibiótico, principalmente no caso de antibióticos que agem sobre a parede celular, como a CEF (ZANGIROLAMI, 2024).

Este estudo buscou determinar um protocolo preciso para a aplicação da IFD após a exposição aos antimicrobianos, considerando aspectos como tempo e concentração. Os resultados indicam que o efeito combinatório da IFD varia conforme o antibiótico, o momento da aplicação da luz e a concentração de CUR. A combinação com AMO e CEF foi mais eficaz em períodos curtos com CUR baixa, enquanto CUR alta mostrou melhor efeito em períodos longos. Assim, a personalização do protocolo, ajustando os parâmetros da IFD e a escolha do antibiótico, é essencial para otimizar os resultados terapêuticos. Embora os resultados sejam promissores, a aplicação clínica desses achados requer a consideração de diversos fatores, como otimização dos parâmetros de IFD, incluindo a concentração de CUR, os parâmetros de exposição à luz e o tempo de tratamento, para maximizar a eficácia, garantindo a segurança do paciente. A variabilidade nos efeitos combinatórios observados entre diferentes antimicrobianos sugere que os protocolos de IFD podem precisar ser ajustados com base no antibiótico específico utilizado. Pesquisas adicionais são necessárias para compreender os mecanismos subjacentes pelos quais a IFD melhora a atividade antibiótica, seja por meio de danos diretos às células bacterianas, aumento da permeabilidade das membranas bacterianas ou outras vias, o que determinará a melhor forma de integrar a IFD aos regimes de tratamento existentes. No entanto, o estudo ressalta o potencial do uso da IFD em combinação com antimicrobianos convencionais para melhorar os efeitos antibacterianos contra *S. pneumoniae*.

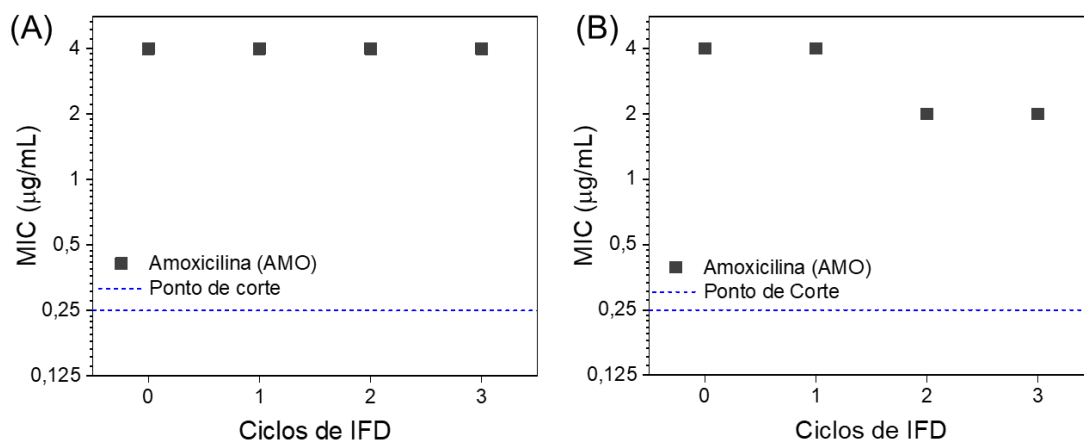
### 3.5 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS APÓS CICLOS DE INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

A resistência aos antimicrobianos representa um dos desafios mais significativos na medicina contemporânea, impulsionando a busca por terapias alternativas capazes de superar ou complementar os tratamentos convencionais (SMITH, 2023). Entre essas abordagens, a IFD surge como uma promissora estratégia antimicrobiana, que não apenas oferece uma alternativa aos tratamentos antimicrobianos convencionais, mas também se apresenta como uma técnica adjuvante que pode potencializar e auxiliar na eficácia da antibioticoterapia (CHAHINE et al., 2021).

Neste contexto, o presente estudo explora os efeitos dos ciclos consecutivos de IFD na viabilidade de bactérias resistentes das espécies *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* e sua subsequente suscetibilidade a agentes antimicrobianos. Através da análise de curvas de sobrevivência e determinação da CIM, foi avaliado como diferentes doses de luz influenciam a capacidade bacteriana de sobreviver e se adaptar após tratamentos repetidos de IFD. Este estudo foi baseado no trabalho de Soares (2022), que investigou o efeito de cinco ciclos de IFD aplicados a cada 6h no valor de CIM de cepas resistentes de *S. aureus* (SOARES, 2022). A presente pesquisa, no entanto, aplicou três ciclos consecutivos de IFD sobre cepas resistentes de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*, sem incubação intercalada, evitando que as bactérias tivessem tempo para se multiplicar novamente e possivelmente se recuperarem dos danos causados pela IFD.

A Figura 16 apresenta os valores de CIM de *S. pneumoniae* ATCC® 700904 para AMO após cada ciclo de IFD (1, 2 e 3) realizada com 0,5  $\mu\text{M}$  de curcumina (CUR), e duas diferentes doses de luz: (A) 6,4  $\text{J}/\text{cm}^2$  e (B) 12,8  $\text{J}/\text{cm}^2$ . O ciclo zero corresponde ao valor de CIM inicial das cepas.

Figura 16 - Efeitos de ciclos consecutivos de IFD sobre a CIM de *S. pneumoniae* para amoxicilina (AMO) utilizando duas doses de luz distintas. (A) aplicação de IFD com dose de luz de 6,4 J/cm<sup>2</sup>; (B) dose de luz de 12,8 J/cm<sup>2</sup>. Os gráficos incluem os valores de ponto de corte determinados pelo BRCast, destacando os limites interpretativos para resistência bacteriana.



Fonte: Própria.

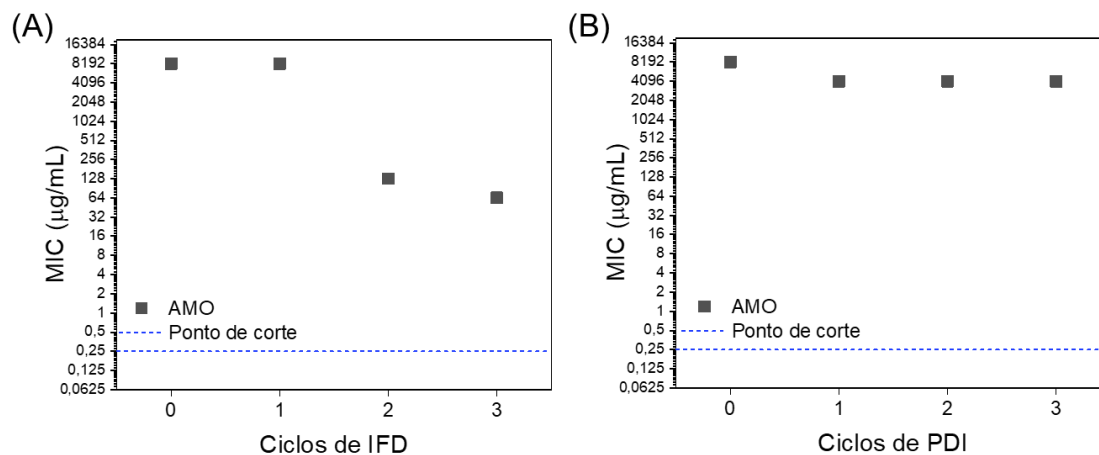
Ao aplicar a menor dose de luz (6,4 J/cm<sup>2</sup>) não foi observada alteração no valor de CIM. Assim, o experimento foi repetido aplicando-se a IFD com o dobro da dose de luz (12,8 J/cm<sup>2</sup>), no qual foi verificada uma redução de duas vezes o valor de CIM para AMO. Ou seja, a CIM inicial de AMO foi de 4 µg/mL, reduzindo para 2 µg/mL a partir do segundo ciclo ao aplicar 12,8 J/cm<sup>2</sup>. Os valores obtidos para a ceftriaxona (CEF) não foram mostrados em gráficos porque permaneceram inalterados em relação aos valores iniciais de 2 µg/mL para *S. pneumoniae* (resistente) e 0,015 µg/mL para *S. pyogenes* (sensível). Independentemente da dose de luz, os ciclos aplicados não foram capazes de alterar a sensibilidade das bactérias à CEF.

Embora a CIM para AMO tenha sido reduzida em duas vezes, o valor alcançado não ultrapassou o valor do ponto de corte, indicando que a bactéria continuou resistente a esse antibiótico mesmo após os três ciclos consecutivos de IFD com 12,8 J/cm<sup>2</sup>. No entanto, a redução observada nos valores de CIM é um resultado promissor, demonstrando a capacidade da IFD em influenciar na suscetibilidade dos microrganismos aos ATBs. Esse efeito pode estar relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana bacteriana, facilitando a penetração do antimicrobiano e tornando a bactéria mais suscetível à ação do antibiótico. Além disso, a IFD pode modular genes de virulência e resistência, impactando a resposta heterogênea da população ao tratamento (SOARES, 2024; MAISCH, 2015). Tal mecanismo implica que a IFD não somente inativa

diretamente as bactérias por danos induzidos por EROs, mas também pode modular a defesa das células bacteriana, tornando-as mais suscetíveis à ação dos antimicrobianos (KASHEF, 2017; POURHAJIBAGHER, 2016). Essa hipótese reflete uma compreensão mais detalhada dos possíveis efeitos combinatórios da IFD com antimicrobianos, proporcionando um caminho para investigações futuras sobre como essa técnica pode ser utilizada para combater ou auxiliar na problemática da resistência antimicrobiana de forma mais eficaz. Além disso, a possibilidade de reduzir a quantidade de ATB necessária para erradicar a bactéria é significativa, podendo a IFD atuar como uma técnica adjuvante que prolonga a eficácia clínica dos antimicrobianos existentes.

Assim como na Figura 16, a Figura 17 apresenta os resultados de sobrevivência de *S. pyogenes* e seus valores de CIM para AMO após cada ciclo de IFD com as duas doses de luz testadas, sendo (A) 6,4 J/cm<sup>2</sup> e (B) 12,8 J/cm<sup>2</sup>. Ressalta-se que os valores obtidos para CEF não foram incluídos nos gráficos porque não apresentaram alterações nos valores de CIM, independentemente da quantidade de ciclos e da dose de luz aplicada.

Figura 17 - Efeitos de ciclos consecutivos de IFD sobre a CIM de *S. pyogenes* para amoxicilina (AMO) utilizando duas doses de luz distintas. (A) aplicação de IFD com dose de luz de 6,4 J/cm<sup>2</sup>; (B) dose de luz de 12,8 J/cm<sup>2</sup>. Os gráficos incluem os valores de ponto de corte determinados pelo BRCast, destacando os limites interpretativos para resistência bacteriana.



Fonte: Própria.

Os gráficos apresentam os valores de CIM para AMO, nos quais é possível observar resultados distintos para as diferentes doses de luz aplicadas. Para a menor dose de luz (6,4 J/cm<sup>2</sup>), houve uma diminuição significativa da CIM para AMO de 8192 µg/mL para 64 µg/mL, sendo uma

redução expressiva de 128 vezes o valor inicial. Em contraste, a maior dose de luz (12,8 J/cm<sup>2</sup>) resultou numa diminuição mais modesta, para 4192 µg/mL, representando uma redução de 2 vezes o valor inicial. Em ambas as condições de luz, os valores de CIM para CEF mantiveram-se estáveis em 0,0156 µg/mL, sem nenhuma alteração observada. Este fenômeno sugere que a interação entre a intensidade da luz e a resposta bacteriana não é linear e depende de um equilíbrio delicado entre dano e ativação de mecanismos de defesa.

Uma possível explicação para a maior diminuição do valor de CIM de *S. pyogenes* para AMO com menor dose de luz consiste em uma provável produção ótima de EROs em doses de luz mais baixas. Assim como em *S. pneumoniae*, a IFD pode ter aumentado a permeabilidade da membrana bacteriana, facilitando a entrada do antibiótico e potencializando seu efeito. As espécies reativas podem ter sido produzidas em quantidades ideais para danificar componentes bacterianos sem induzir mecanismos de reparo.

Por outro lado, doses mais altas podem levar à produção excessiva de EROs, causando danos severos que ativam respostas de defesa bacterianas, reduzindo a eficácia da IFD (ALMEIDA, 2020). Além disso, doses menores de luz aplicadas em ciclos consecutivos podem permitir que as bactérias permaneçam em um estado vulnerável por mais tempo, aumentando a suscetibilidade aos antimicrobianos (WOZNIAK, 2018). Esses achados sugerem que, em ambas as espécies bacterianas, a otimização da dose de luz na IFD é essencial para equilibrar a produção de EROs e evitar a ativação de mecanismos de resistência bacteriana.

Outra hipótese baseia-se na resposta heterogênea de uma população bacteriana a processos físicos, químico e biológicos, por exemplo o estresse oxidativo. Soares *et al.* (2024) discute como a IFD afeta a heterogeneidade das populações bacterianas, e suas respostas ao estresse oxidativo induzido pela IFD, sugerindo que diferentes subpopulações podem responder de maneira distinta ao tratamento da IFD e de ATBs (SOARES, 2024). Além disso, outra perspectiva aborda a suscetibilidade das bactérias ao estresse oxidativo e estratégias potenciais para o desenvolvimento de resistência induzida pela IFD. O estudo sugere que doses mais altas de IFD podem aumentar a pressão seletiva, promovendo a expressão de genes de resistência em subpopulações bacterianas (MAISCH, 2015). Esses resultados reforçam que a otimização da dose de luz na IFD é crucial para maximizar a redução da CIM de *S. pyogenes*, equilibrando a produção de EROs e evitando a ativação de mecanismos de resistência bacteriana.

A diferença encontrada nos resultados de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* aos ciclos consecutivos de IFD com diferentes doses de luz indicam que a resposta à diferença na suscetibilidade aos antibióticos pela IFD pode depender da espécie bacteriana e suas diferenças biológicas intrínsecas e mecanismos de resposta ao estresse oxidativo. Algumas características que podem ter contribuído para esses diferentes resultados são as diferenças da estrutura celular e da membrana dessas bactérias. A cápsula polissacarídica espessa de *S. pneumoniae* pode ter dificultado a penetração do fotossensibilizador e a subsequente geração de EROs em doses menores de luz (FERNEBRO, 2004). Já em doses maiores, a quantidade de EROs gerados pode ter sido suficiente para superar essa barreira, causando danos significativos e aumentando a suscetibilidade aos antimicrobianos. Neste contexto, *S. pyogenes* pode apresentar menor resistência aos danos oxidativos, tornando-se mais suscetível à IFD com menores doses de luz, em relação à *S. pneumoniae*.

Além da presença da cápsula, *S. pneumoniae* possui um sistema de resposta ao estresse oxidativo bastante desenvolvido, com mecanismos que permitem tolerar e neutralizar os efeitos de EROs (HERNANDEZ-MORFA, 2023). Isso sugere que concentrações mais baixas de EROs, que seriam geradas por menores doses de luz na IFD, podem não ser suficientes para superar essas defesas. A capacidade de *S. pneumoniae* de produzir peróxido de hidrogênio e utilizá-lo como mecanismo de defesa contra outros microrganismos pode ser extrapolada para inferir que a bactéria tem estratégias adaptativas para lidar com ambientes ricos em EROs (HERNANDEZ-MORFA, 2023). Esses achados reforçam a hipótese de que doses mais elevadas de luz são necessárias para superar os mecanismos de defesa antioxidante de *S. pneumoniae*. Assim, a necessidade de doses maiores de luz para *S. pneumoniae*, em comparação com *S. pyogenes*, pode estar diretamente relacionada à complexidade e à eficiência de seus sistemas de defesa antioxidante. Esses resultados fornecem uma base biológica para a variação observada nas respostas das duas espécies bacterianas à IFD.

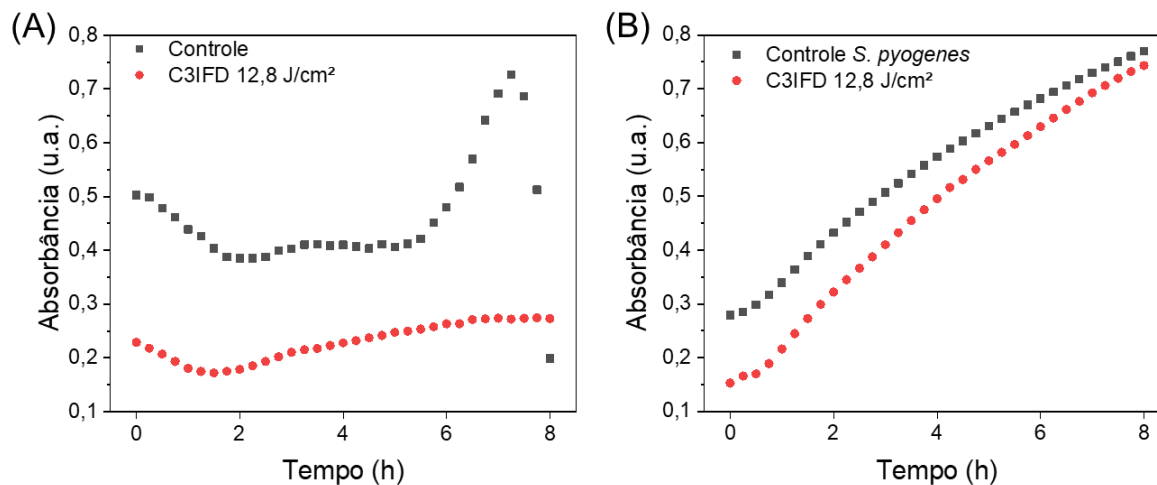
### 3.5.1 Curva de crescimento microbiano após ciclos consecutivos de IFD

As curvas de crescimento bacteriano, demonstradas nas Figura 18, revelam a dinâmica de crescimento de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* após a exposição a ciclos consecutivos de IFD sob a maior dose de luz (12,8 J/cm<sup>2</sup>). Os dados de absorvância ao longo do tempo permitem uma comparação entre o tratamento e o controle, refletindo diretamente a influência da IFD na viabilidade bacteriana.

Para *S. pneumoniae* (Figura 18-A), observa-se que o grupo controle apresenta um aumento significativo na absorvância, atingindo um pico por volta das 7 horas antes de um subsequente declínio. Em contraste, o grupo tratado com IFD na dose de 12,8 J/cm<sup>2</sup> demonstra uma curva de crescimento achatada, indicando um perfil de viabilidade reduzida ao longo de todo o experimento. Por outro lado, *S. pyogenes* (Figura 18 - B) exibe um padrão de crescimento tratado similar ao controle, com ambos os grupos alcançando valores de absorvância comparáveis após 8 horas. Esse comportamento é consistente com os resultados previamente discutidos, nos quais se observou uma diminuição menos pronunciada na sobrevivência bacteriana e uma alteração mínima nos valores de CIM foram observadas para esta espécie sob a dose de luz de 12,8 J/cm<sup>2</sup>.

Estes resultados evidenciam a correlação entre a intensidade da luz utilizada na IFD e o impacto subsequente na dinâmica de crescimento e na susceptibilidade antimicrobiana das bactérias estudadas. Tais achados destacam a importância de ajustar as condições de IFD não apenas para maximizar o efeito antibacteriano, mas também para compreender como diferentes patógenos respondem de maneira variável a este tratamento.

Figura 18 - Curva de crescimento de *S. pneumoniae* ATCC® 700904 (A) e *S. pyogenes* (B) ao longo de 8 horas. Os gráficos demonstram a comparação do controle não tratado com os microrganismos submetidos a três ciclos consecutivos de IFD (C3IFD 12,8 J/cm<sup>2</sup>). A absorbância (u.a.) foi monitorada para avaliar o impacto dos tratamentos no crescimento bacteriano em relação ao controle.



Fonte: Própria.

## 4 CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES

A resistência antimicrobiana continua a ser um desafio significativo no cenário da saúde global, diminuindo a eficácia dos tratamentos convencionais e pressionando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, a inativação fotodinâmica (IFD) tem emergido como uma técnica promissora devido à sua capacidade de reduzir a carga microbiana, inclusive de cepas resistentes. Este estudo investigou a eficácia da IFD mediada por curcumina na inativação de bactérias do gênero *Streptococcus*, e os efeitos de sua combinação com diferentes antibióticos (ATBs). Os resultados indicam que a IFD, especialmente quando combinada com ATBs, pode ampliar significativamente a eficácia dos tratamentos existentes, demonstrando uma potencialização da atividade antimicrobiana em algumas condições temporais, além de uma redução expressiva nos valores de concentração inibitória mínima (CIM) para os antibióticos testados.

A combinação de IFD com antibióticos revela-se uma abordagem valiosa por seu potencial em contornar mecanismos de resistência que têm limitado o desenvolvimento de novos antibióticos. No entanto, as interações entre IFD e antibióticos são complexas e não necessariamente incrementais. Os resultados demonstram que o efeito sinérgico obtido pela aplicação conjunta não é previsível linearmente, pois depende de múltiplos fatores. Estes incluem a concentração de curcumina, o tempo de incubação com o fotossensibilizador, a dose de luz utilizada, a concentração e o tipo do antibiótico, bem como o momento de sua administração. Cada um destes parâmetros pode afetar significativamente a eficácia da IFD e, por conseguinte, a suscetibilidade bacteriana aos tratamentos.

Portanto, para entender completamente o potencial da IFD combinada com antibióticos, é crucial uma análise detalhada de como cada variável influencia os resultados e como essas variáveis interagem entre si. Este estudo contribui para o campo ao explorar a complexidade dessas interações em um contexto experimental, oferecendo insights sobre as configurações mais eficazes para a aplicação da IFD. Assim, enquanto avançamos no entendimento desses mecanismos complexos e multidimensionais, o presente trabalho reforça o potencial da IFD como uma estratégia alternativa ou adjuvante no combate à resistência antimicrobiana, sugerindo caminhos

promissores para futuras investigações que podem ampliar a eficácia dos regimes de tratamento existentes.

#### 4.1 PERSPECTIVAS

Para avançar no entendimento das interações entre IFD e antibióticos, é essencial explorar a fundo o fenômeno de agregação e a dinâmica de internalização da curcumina em contextos de combinação com ATBs. Uma melhor compreensão desses processos pode revelar a concentração ótima de curcumina para maximizar a eficácia da IFD sem comprometer a atividade dos antibióticos. Além disso, é crucial investigar a estabilidade química dos antibióticos sob condições de IFD, a fim de assegurar que a combinação seja efetivamente benéfica e não prejudique a integridade dos tratamentos.

Futuras pesquisas deveriam incluir estudos detalhados sobre a estabilidade dos antimicrobianos após a exposição à IFD, focando especialmente na possível degradação química dos antibióticos durante os primeiros momentos críticos do tratamento combinado. Avaliar a interação entre CUR e os antibióticos em diferentes momentos e condições poderia esclarecer se a redução da atividade antimicrobiana é devida a alterações físico-químicas induzidas pela IFD ou a mecanismos biológicos de defesa bacteriana.

Além disso, seria relevante explorar o impacto das condições microambientais e da permeabilidade das membranas bacterianas alteradas pela IFD. Estudos que empreguem microscopia confocal para analisar a distribuição e a concentração intracelular de curcumina podem elucidar como a agregação e a solubilidade influenciam a geração de EROs e a eficácia geral da IFD. Essa abordagem integrada permitirá determinar se as limitações observadas com concentrações mais baixas de curcumina em momentos posteriores do tratamento resultam de barreiras físicas, químicas ou biológicas, ou de uma combinação desses fatores.

Finalmente, é essencial considerar a implementação de um design experimental multidimensional que leve em conta variáveis como tempo de exposição, concentração de fotossensibilizador, dose de luz, tipo de antibiótico e suas concentrações. Estudos futuros deveriam avaliar a eficácia e a sinergia dessas variáveis em um espectro mais amplo de condições, para

otimizar os protocolos de tratamento combinado e potencialmente revolucionar o manejo da resistência antimicrobiana. Esses esforços podem abrir novos caminhos para a utilização estratégica da IFD como uma abordagem promissora aos regimes terapêuticos existentes, especialmente diante da crescente ameaça da resistência a antibióticos.

## REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656, 2001.
- AKHAVAN, B.; KHANNA, N.; VIJHANI, P. **Amoxicillin**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482250/>>.
- ALIKIAI, B. et al. Evaluation of the effect of curcumin on pneumonia: A systematic review of preclinical studies. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 4, p. 1939–1952, 2021.
- ALMEIDA, A. Photodynamic therapy in the inactivation of microorganisms. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, 2020.
- ALMEIDA, J. et al. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: Influence of residual antibiotics. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 13, n. 4, p. 626–633, 2014.
- ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.
- BALABAN, N. Q. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 441–448, 2019.
- BEVERIDGE, T. J. Use of the Gram stain in microbiology. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 76, n. 3, p. 111–118, 2001.
- BHAKDI, S. et al. **Streptolysin (Streptococcus pyogenes)**. (R. Rappuoli, C. Montecucco, Eds.) **Guidebook to Protein Toxins and Their Use in Cell Biology** Oxford University Press, , 29 maio 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/oso/9780198599555.003.0002>>
- BLANCO, K. C. et al. Treatment of recurrent pharyngotonsillitis by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 138–139, 2017.
- BOLUKI, E. et al. Antimicrobial activity of photodynamic therapy in combination with colistin against a pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patient. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 1–5, 2017.
- BRCAS. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. p. 1–63, 2023.
- BROUWER, S. et al. Pathogenesis , epidemiology and control of Group A *Streptococcus*

infection. v. 21, n. July, 2023.

CASSIDY, C. M.; DONNELLY, R. F.; TUNNEY, M. M. Effect of sub-lethal challenge with Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility of clinical bacterial isolates. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 99, n. 1, p. 62–66, 2010.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.

CHAHINE, E. B. et al. Antibiotic Approvals in the Last Decade: Are We Keeping Up With Resistance? **Annals of Pharmacotherapy**, v. 56, n. 4, p. 441–462, 14 jul. 2021.

CHAMPOUX, J. J. et al. **Sherris Medical Microbiology**. 4. ed. [s.l.] McGraw Companies, 2004.

CHENG, G. et al. Antibacterial action of quinolones: From target to network. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 555–562, 2013.

CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571–589, 2018.

CLSI. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : Norma Aprovada - Sexta Edição**. Wayne: [s.n.].

CUNNINGHAM, M. Pathogenesis of group A streptococcal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, p. 42, 2000.

DARBY, E. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280–295, 2023.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

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, 2020.

DOVIGO, L. N. et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 895–903, 2011.

FARZAM, K.; NESSEL, T.; QUICK, J. **Erythromycin**. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532249/>>.

FENG, Y. et al. Photodynamic and antibiotic therapy in combination against bacterial infections:

- efficacy, determinants, mechanisms, and future perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 177, p. 113941, 2021.
- FERIGOLO, L. P.; PEREZ, V. P. Fatores Bacterianos de Virulência Associados a Pneumonias e Doenças Invasivas Pelo *Streptococcus pneumoniae*. **Revista Fasem Ciências**, v. 4, n. 2, p. 53–66, 2013.
- FERNEBRO, J. et al. Capsular Expression in *Streptococcus pneumoniae* Negatively Affects Spontaneous and Antibiotic-Induced Lysis and Contributes to Antibiotic Tolerance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 2, p. 328–338, 15 jan. 2004.
- FERRETTI, J. J.; STEVENS, D. L.; FISCHETTI, V. A. **Streptococcus pyogenes**. Oklahoma: University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016.
- FREITAS, M. A. et al. TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO SOBRE CEPA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 329, 2017.
- GERA, K.; MCIVER, K. S. Laboratory growth and maintenance of *streptococcus pyogenes* (The Group A *Streptococcus*, GAS). **Current Protocols in Microbiology**, n. SUPPL.30, p. 1–14, 2013.
- GERALDE, M. C. et al. Pneumonia treatment by photodynamic therapy with extracorporeal illumination - an experimental model. **Physiological Reports**, v. 5, n. 5, p. 1–7, 2017.
- GETAHUN, H. et al. Tackling antimicrobial resistance in the community. **Bull World Health Organ**, v. 98, p. 442- 442A, 2020.
- GIERKE, R.; WODI, A. P.; KOBAYASHI, M. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. In: HALL, E. et al. (Eds.). **Pinkbook**. 14. ed. Washington D.C.: Public Health Foundation, 2021. p. 255–274.
- HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67–73, 2016.
- HAND, R. M.; SNELLING, T. L.; CARAPETIS, J. R. Group A *Streptococcus*. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**, n. January, p. 429–438, 2019.
- HAUKVIK, T. et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v. 64, n. 10, p. 666–673, 2009.
- HAZRA, M. K.; ROY, S.; BAGCHI, B. Hydrophobic hydration driven self-assembly of curcumin in water: Similarities to nucleation and growth under large metastability, and an

- analysis of water dynamics at heterogeneous surfaces. **Journal of Chemical Physics**, v. 141, n. 18, 2014.
- HEGER, M. et al. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancers. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 222–307, 2014.
- HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2759–2762, 1995.
- HERNANDEZ-MORFA, M. et al. The oxidative stress response of *Streptococcus pneumoniae*: its contribution to both extracellular and intracellular survival. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, n. September, p. 1–17, 2023.
- HOPE-ROBERTS, M.; HOROBIN, R. W. A review of curcumin as a biological stain and as a self-visualizing pharmaceutical agent. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 92, n. 5, p. 315–323, 2017.
- HU, D. K. et al. Roles of virulence genes (PsaA and CpsA) on the invasion of *Streptococcus pneumoniae* into blood system. **European Journal of Medical Research**, v. 18, n. 1, p. 2–7, 2013.
- HUANG, J. et al. Enhanced antibacterial and antibiofilm functions of the curcumin-mediated photodynamic inactivation against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 108, n. July 2019, p. 106886, 2020.
- HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. Figure 1, p. 72–80, 2019.
- 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, 2018.
- JAIN, S. S. et al. Current trends in development and manufacturing of higher-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine and its challenges. **Biologicals**, v. 87, n. July, p. 101784, 2024.
- JASIM, S. A.; HATEM, Z. A.; MOHAMMED, Z. A. Virulence Factors and Clinical Features of *Streptococcus Pyogenes* : Overview. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 603–614, 2021.
- JOHNSON, A. F.; LAROCK, C. N. Antibiotic Treatment, Mechanisms for Failure, and Adjunctive Therapies for Infections by Group A *Streptococcus*. **Frontiers in Microbiology**, v.

12, n. November, p. 1–9, 2021.

KADIOGLU, A. et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 288–301, 2008.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300–305, 2017.

KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, v. 31, n. April, p. 31–42, 2017.

KEREN, I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p. 13–18, 2004.

KIM, D. et al. Structural Insights for  $\beta$ -Lactam Antibiotics. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 31, n. 2, p. 141–147, 2023.

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. **Apmis**, v. 118, n. 1, p. 1–36, 2010.

KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides : An Overview. p. 1–18, 2016.

LANDMAN, D. et al. Polymyxins revisited. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 449–465, 2008.

LANGSHAW, E. L. et al. Streptolysin O Deficiency in *Streptococcus pyogenes* MIT1 covR/S Mutant Strain Attenuates Virulence in In Vitro and In Vivo Infection Models. **mBio**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2023.

LEE, C. N. et al. Daylight Photodynamic Therapy: An Update. **Molecules**, v. 25, n. 21, 2020.

LEITE, I. S. et al. Photodynamic inactivation of microorganisms which cause pulmonary diseases with infrared light: an in vitro study . **Endoscopic Microscopy IX; and Optical Techniques in Pulmonary Medicine**, v. 8927, p. 89271A, 2014.

LI, L. et al. Epidemiological characteristics and antibiotic resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*: An updated review. **Microbiological Research**, v. 266, n. September 2022, p. 127221, 2023.

LIU, Y. et al. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, v. 1, n. 3, p. 140–167, 2015.

- LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 135–145, 2017.
- LUQUETTI, C. et al. PNEUMONIA EM CRIANÇAS: EPIDEMIOLOGIA, PATOGÊNESE E ETIOLOGIA. **Ciências da Saúde**, v. 28, 2024.
- MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. [s.l.] Pearson Education, 2016.
- MARATHE, S. A. et al. Curcumin reduces the antimicrobial activity of ciprofloxacin against: *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 139–152, 2013.
- MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718–733, 2011.
- MARSHALL, C. G. et al. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 12, p. 6480–6483, 1997.
- MCDEVITT, E. et al. Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* Results in Alpha-hemolysis by Oxidation of Oxy-hemoglobin to Met-hemoglobin. **mSphere**, v. 5, n. 6, p. 1–7, 2020.
- 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, 2023.
- MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 5, p. 411–418, 2010.
- MOHAPATRA, S. S.; DWIBEDY, S. K.; PADHY, I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 3, 2021.
- NATHAN, C.; CARS, O. Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 19, p. 689–691, 2014.
- NIELSEN, E. I. et al. Semimechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of activity of antibacterial agents from time-kill curve experiments. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 128–136, 2007.
- NISHIMOTO, A. T.; ROSCH, J. W.; TUOMANEN, E. I. Pneumolysin: Pathogenesis and

- Therapeutic Target. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. July, p. 1–10, 2020.
- NUERMBERGER, E. L.; BISHAI, W. R. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*: What does the future hold? **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. SUPPL. 4, p. 363–371, 2004.
- O'NEILL, J. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS. **Archives of Pharmacy Practice**, p. 80, 2016.
- PACKIAVATHY, I. A. S. V. et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. **Food Chemistry**, v. 148, p. 453–460, 2014.
- PATON, J. C.; TRAPPETTI, C. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. **Gram-Positive Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 304–315, 2019.
- PATTERSON, M. J. *Streptococcus*. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4. ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- PLAETZER, K. et al. New Applications of Photodynamic Therapy in Biomedicine and Biotechnology. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–3, 2013.
- POURHAJIBAGHER, M. et al. Sub-lethal doses of photodynamic therapy affect biofilm formation ability and metabolic activity of *Enterococcus faecalis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 159–166, 2016.
- PREVENTION, C. FOR D. C. AND. **Pneumococcal Disease Surveillance and Trends**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pneumococcal/php/surveillance/index.html>>.
- PROFT, T.; FRASER, J. Bacterial superantigens. **Clin Exp Immunol**, v. 133, n. 3, p. 7, 2003.
- RAWLS, S. M. Antibiotics,  $\beta$ -Lactam. **Encyclopedia of the Neurological Sciences**, v. 1, p. 207–209, 2014.
- REMMINGTON, A.; TURNER, C. E. The DNases of pathogenic lancefield streptococci. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 3, p. 242–250, 2018.
- SALAM, M. A. et al. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. **Healthcare (Switzerland)**, v. 11, n. 13, p. 1–20, 2023.
- SCHROEDER, M. R.; STEPHENS, D. S. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–9, 2016.
- SMITH, W. P. J. et al. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 519–534, 2023.
- SOARES, J. M. et al. Evolution of surviving *Streptococcus pyogenes* from pharyngotonsillitis

- patients submit to multiple cycles of antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 210, n. May, p. 111985, 2020a.
- SOARES, J. M. et al. Optimization for microbial incorporation and efficiency of photodynamic therapy using variation on curcumin formulation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, n. January, p. 101652, 2020b.
- SOARES, J. M. et al. Physicochemical mechanisms of bacterial response in the photodynamic potentiation of antibiotic effects. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2022.
- SOARES, J. M. et al. Recovering the susceptibility of antibiotic-resistant bacteria using photooxidative damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 39, p. 7, 2023.
- SOARES, J. M. et al. Photodynamic inactivation and its effects on the heterogeneity of bacterial resistance. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2024.
- SOMMER, M. O. A. et al. Prediction of antibiotic resistance: Time for a new preclinical paradigm? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 689–696, 2017.
- TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.
- TAMMA, P. D.; VILLEGAS, M. V. Use of  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitors for extended-spectrum- $\beta$ -lactamase infections: Defining the right patient population. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 15–17, 2017.
- TELES, M. F. et al. PREVALÊNCIA DE STREPTOCOCCUS PYOGENES EM OROFARINGE DE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS: revisão de literatura Mauro. **C&D-Revista Eletrônica da Fainor**, v. 8, n. 1, p. 38–53, 2015.
- TIM, M. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, p. 2–10, 2015.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia (10a. ed.)**. [s.l.] Grupo A - Artmed, 2000.
- TYAGI, P. et al. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.
- UCHIYAMA, S. et al. Streptolysin O rapidly impairs neutrophil oxidative burst and antibacterial responses to Group A Streptococcus. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. NOV, p. 1–10, 2015.

- VATANSEVER, F. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 6, p. 955–989, 2013.
- VÁZQUEZ-LASLOP, N.; MANKIN, A. S. How macrolide antibiotics work Nora. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 9, p. 668–684, 2019.
- WAINWRIGHT, TIM MAISCH, SANTI NONELL, KRISTJAN PLAETZER, ADELAIDE ALMEIDA, GEORGE P TEGOS, M. R. H. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? n. January, p. 19–21, 2017.
- WALKER, M. J. et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 264–301, 2014.
- WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775–781, 2000.
- WANG, J.; ZHUAN, R. Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: An overview. **Science of the Total Environment**, v. 701, p. 135023, 2020.
- WEISER, J. N.; FERREIRA, D. M.; PATON, J. C. invasion. **Nat Rev Microbiol**, v. 16, n. 6, p. 355–367, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan on antimicrobial resistance. **World Health Organization**, p. 1–28, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 18 dez. 2023.
- WOZNIAK, A.; GRINHOLC, M. Combined antimicrobial activity of photodynamic inactivation and antimicrobials-state of the art. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, 2018.
- YUAN, Y. et al. Antibacterial Efficacy and Mechanisms of Curcumin-Based Photodynamic Treatment against Staphylococcus aureus and Its Application in Juices. **Molecules**, v. 27, n. 20, 2022.
- ZANGIROLAMI, A. C. et al. Combined Antibiotic and Photodynamic Therapies in Pseudomonas aeruginosa: From Synergy to Antagonism. **Antibiotics**, v. 13, n. 12, 2024.
- ZENG, D. et al. Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1–16, 2016.
- ZHENG, D. et al. Antibacterial Mechanism of Curcumin: A Review. **Chemistry and**

**Biodiversity**, v. 17, n. 8, 2020.