

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Avaliação do tempo de incubação do fotossensibilizador curcumina em**  
***Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa***  
**na Inativação Fotodinâmica**

**MESTRANDA:**

**Mariana Carreira Geralde**

**ORIENTADORES:**

**Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza**

**Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato**

**SÃO CARLOS – SP**

**ABRIL – 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP**

**Avaliação do tempo de incubação do fotossensibilizador curcumina em**  
***Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa***  
**na Inativação Fotodinâmica**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.**

**Mariana Carreira Geralde**

**ORIENTADORES:**

**Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza**

**Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato**

**SÃO CARLOS – SP**

**ABRIL – 2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G354at

Geralde, Mariana Carreira.

Avaliação do tempo de incubação do fotossensibilizador curcumina em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na inativação fotodinâmica / Mariana Carreira Geralde. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
56 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Tempo de incubação. 3. Curcumina. 4. Terapia fotodinâmica. 5. *Staphylococcus aureus*. 6. *Pseudomonas aeruginosa*. I. Título.


CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Mariana Carreira Geralde**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia


**Aprovado em: 02/04/2013**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza – Orientador  
(Universidade Federal de São Carlos)



---

Prof. Dr. Nivaldo A. Parizotto  
(Universidade Federal de São Carlos)



---

Prof.ª Dr.ª Alessandra Nara de Souza Rastelli  
(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/ Araraquara)

Viver é afinar o instrumento

De dentro prá fora

De fora prá dentro

A toda hora, todo momento

(...)

Tudo é uma questão de manter

A mente quieta

A espinha ereta

E o coração tranqüilo

(Serra do Luar - Walter Franco)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pela oportunidade, e principalmente por me dar todas as condições necessárias para que este trabalho pudesse ser concluído.

Agradeço a minha mãe Selma Carreira que com toda sua delicadeza, amor e dedicação me proporcionou a mais bela educação e valores, e que com todo o seu carinho me mostra a importância do amor verdadeiro. Sem ela eu não seria o que sou hoje. Mãe eu te amo!

Ao meu irmão Rodrigo Geralde que é mais que um irmão, melhor amigo e companheiro.

Ao meu namorado, noivo, amigo, parceiro e tudo mais Guilherme Palombo que sempre esteve ao meu lado me dando força para que eu não desistisse pelas tantas vezes que estremei.

Ao meu pai Walmir Geralde que sempre me auxiliou dando alicerce para a minha formação.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Clovis W. O. Souza e Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato que me abriram as portas do mundo científico, e que sem eles este trabalho não seria possível.

A minha amiga Thaila Corrêa companheira de laboratório, de academia, de clube, de saídas, de jantares, de churrascos, de desespero, de alegria, de tristeza, de risada descontrolada depois de horas de experimento, e de tudo mais. Obrigada babyzinha por ser meu braço direito e não me ter deixado desistir.

A Ivete Palombo e a Zélia Venézio que sempre colaboraram com o trabalho e principalmente pela força, remédios para picada de inseto, receitas, e tudo mais. Obrigada meninas!

Aos meus amigos Eliza Gentil e Augusto Passigatti que compreenderam minha ausência, mas nunca se esqueceram de mim.

A Dra. Natalia Inada, Profa. Dra. Lívia Dovigo e Profa. Dra. Cristina Kurachi por todo apoio científico que recebi. Sem elas não teria chegado aonde cheguei.

As pessoas do IFSC – USP que colaboraram para realização deste trabalho, sempre dando sugestões e auxiliando no que fosse preciso.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

A Claudia Pastega que, sempre com um sorriso no rosto, esteve pronta a me ajudar.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado e principalmente concluído.

## RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) vem auxiliar a medicina no tratamento de doenças, tanto de etiologia microbiana quanto tumoral. O princípio da TFD baseia-se em um fotossensibilizador (FS) que se fotoativado por luz em comprimento de onda específico, gera espécies reativas de oxigênio que induz a morte celular e/ou inativação de microrganismos (IFD – inativação fotodinâmica). O tempo de incubação ideal do fotossensibilizador, considerando as diferenças estruturais e metabólicas de cada microrganismo, é importante para eficácia da IFD. A curcumina, por ser um FS natural, vem ganhando espaço nas pesquisas científicas, tendo mostrado resultados satisfatórios no controle microbiológico quando associada com a IFD, porém ainda não existem estudos sobre a influência do tempo de incubação do FS com a célula bacteriana. O presente estudo teve como objetivo avaliar o tempo de incubação do FS curcumina na IFD, podendo assim auxiliar em futuras pesquisas determinando o tempo ideal para o contato do FS em bactérias de diferentes composições de parede: Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*). As amostras dos microrganismos foram cultivadas em caldo TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas a 37 °C por 24 horas. O FS foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para atingir a concentração estoque de 20 mM, posteriormente diluído para obter as concentrações finais. Foi utilizada fonte de luz no comprimento de onda 460 nm, e dose final de 30 J/cm<sup>2</sup>. Após as incubações com o FS e a irradiação, diluições decimais das amostras foram plaqueadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar) e incubadas a 37 °C por 48 horas; e realizada as contagens. A IFD reduziu aproximadamente 7 logs de *S. aureus* na concentração de 1 µM com tempo de incubação de 30 minutos, enquanto para *P. aeruginosa* houve redução de no máximo 2 logs com concentração de 50 µM com o mesmo tempo de incubação. Foram realizados testes onde se retirava o FS do meio antes da iluminação, porém com o processo não foi encontrado reduções como as obtidas sem o procedimento. Em geral, o melhor tempo de incubação foi o de 30 minutos em todas as concentrações de FS e em ambos os microrganismos.

Palavras-chave: tempo de incubação, curcumina, inativação fotodinâmica, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.



## ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) has been helping medicine in treatment infectious diseases and tumors. PDT's principle is based on a photosensitizer (PS) that is photoactivated by light at specific wavelength which generates reactive oxygen species that induces cell death and/or microorganism inactivation (PDI - photodynamic inactivation). The optimum incubation time of the photosensitizer, whereas the structural and metabolic differences of each microorganism, is important for the more efficient effect of PDI. Curcumin, being a natural PS, has been gaining ground in scientific research and has shown satisfactory results in microbiological control when associated with PDI, but there are no studies on the influence of incubation time of the PS with the bacterial cell. The present study aimed to evaluate the incubation time of curcumin on PS PDI and can therefore assist in determining future research the perfect time to contact the PS in bacteria of different wall compositions: Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*). Samples of microorganisms were cultured in TSB broth (Tryptic Soy Broth) and incubated at 37 °C for 24 hours. The PS was solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) to achieve concentrations of 20 mM stock, subsequently diluted to obtain the final concentrations. Light source was used at a wavelength of 460nm, and final dose of 30 J/cm<sup>2</sup>. After the incubations with the FS and irradiation decimal dilutions of the samples were plated on TSA medium (Tryptic Soy Agar) and incubated at 37 °C for 48 hours, and the counts performed. The PDI decreased approximately 7 logs *S. aureus* at a concentration of 1µM with incubation time of 30 minutes, while for *P. aeruginosa* was reduced by 2 logs with a maximum concentration of 50 µM with the same incubation time. Tests were conducted where PS withdrawing means before illumination, but the process was not found reductions as those obtained without the procedure. In general, the best incubation time was 30 minutes in all concentrations and for both microorganisms.

Keywords: incubation time, curcumin, photodynamic inactivation, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representativo da estrutura química da molécula da curcumina. ....	20
Figura 2 – Representativo estrutural da parede celular da bactéria Gram-positiva.....	22
Figura 3 – Representativo estrutural da parede celular da bactéria Gram-negativa.....	25
Figura 4 – Avaliação dos tempos de incubação - <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
Figura 5 – Controle do fotossensibilizador curcumina - <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
Figura 6 – Avaliação dos tempos de incubação - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
Figura 7 – Controle do fotossensibilizador curcumina - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
Figura 8 – Retirada do fotossensibilizador curcumina antes da iluminação - <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
Figura 9 – Retirada do fotossensibilizador curcumina antes da iluminação - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	37
Figura 10 – Porcentagem de sobrevivência de <i>Staphylococcus aureus</i> na IFD com sal de curcumina nas concentrações de 400, 500 e 800 µg/mL.....	47
Figura 11 – Porcentagem de sobrevivência de <i>Staphylococcus aureus</i> na IFD com sal de curcumina nas concentrações de 300 µg/mL com tempos de incubação .....	48
Figura 12 – Retirada do fotossensibilizador sal de curcumina na concentração de 300 µg/mL com tempos de incubação.....	49
Figura 13 – Porcentagem de sobrevivência de <i>Staphylococcus aureus</i> na IFD com sal de curcumina nas concentrações de 25 e 50 µg/mL.....	50
Figura 14 – Porcentagem de sobrevivência de <i>Staphylococcus aureus</i> na IFD com sal de curcumina nas concentrações de 12, 25 e 50 µg/mL com tempos de incubação .....	51

Figura 15 – Retirada do fotossensibilizador sal de curcumina nas concentrações de 12, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  com tempos de incubação.....52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações do fotossensibilizador curcumina utilizados .....29

Tabela 2 – Teste de Tukey para múltiplas comparações - *Staphylococcus aureus* .....55

Tabela 3 – Teste de Tukey para múltiplas comparações - *Pseudomonas aeruginosa* .....56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
aPDT	Antibacterial photodynamic therapy
AM	Azul de metileno
ALA	Ácido aminolevulínico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ExoS	Exoenzima S
ExoU	Exoenzima U
FS	Fotossensibilizador
FSs	Fotossensibilizadores
IFD	Inativação fotodinâmica
IFD(+)	Grupo inativação fotodinâmica
LED	Light emitting diode (diodos emissores de luz)
L0FS0	Grupo controle
L0FS(+)	Grupo controle do fotossensibilizador
L30FS0	Grupo controle da luz
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
PACT	Photodynamic antimicrobial chemotherapy
PAD	Photoactivated disinfection
PDD	Photodynamic disinfection
PDI	Photodynamic inactivation
PDT	Photodynamic therapy
PS	Photosensitizer
pH	Potencial hidrogeniônico
PMBN	Polycationic peptide polimixina B nanopeptide
RGB	Red, Green, Blue
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TFD	Terapia fotodinâmica
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
UFC	Unidade formadora de colônia
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UFC/g	Unidade formadora de colônia por grama

°C	Grau Celsius
g	Gramma
mg	Miligramma
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
M	Molar
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
μg/mL	Microgramma por mililitro
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatt por centímetro quadrado

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
3.1. Inativação Fotodinâmica.....	18
3.2. Curcumina.....	20
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1. Preparo das Amostras.....	28
4.2. Fotossensibilizador.....	28
4.3. Fonte de Luz e Fluência.....	29
4.4. Grupos de Estudo.....	29
4.5. Efeito da IFD na ausência do FS no meio.....	30
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
5.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33
5.3. Efeito da IFD na ausência do FS no meio .....	36

<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>
<b>10. APÊNDICE 1.....</b>	<b>47</b>
<b>11. APÊNDICE 2.....</b>	<b>54</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Oscar Raab demonstrou há cerca de cem anos que a interação de luz, em comprimento de onda adequado, com um composto atóxico (corante ou droga fotossensibilizadora) e oxigênio, resultava em espécies reativas, como o oxigênio singleto, que induziam a inviabilização e morte de microrganismos (fungos, bactérias, vírus e protozoários) (BAGNATO, 2008; KHARKWAL *et al.*, 2011). Há relatos do uso da técnica terapia fotodinâmica (TFD) bem antes da segunda guerra mundial, mas com a grande familiarização das penicilinas e outras drogas antibióticas (WAINWRIGHT, 2002), houve uma diminuição do interesse da proposta de Raab.

Com o aumento das infecções hospitalares devido às multiplicações de bactérias resistentes a antibióticos e com o aumento de pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) surgiu a necessidade de alternativas terapêuticas voltando assim com a ideia da IFD (inativação fotodinâmica) (BAGNATO, 2008).

São muitos os termos encontrados na literatura para descrever a TFD, como por exemplo, PACT do inglês photodynamic antimicrobial chemotherapy, PDT do inglês photodynamic therapy, PAD do inglês photoactivated disinfection, PDD do inglês photodynamic disinfection, PDI do inglês photodynamic inactivation, aPDT do inglês antibacterial photodynamic therapy, entre outros. Neste trabalho foi escolhido o termo IFD (inativação fotodinâmica, em inglês PDI) que se refere à inativação de microrganismos, enquanto o termo TFD é citado quando se refere às células mamíferas e tumorais (BAGNATO, 2008; CASSIDY *et al.*, 2009; HAUKVIK *et al.*, 2009; STREET *et al.*, 2009; KHARKWAL *et al.*, 2011, DOVIGO *et al.*, 2011).

O fotossensibilizador (FS), quando ativado pela luz visível, pode reagir com as moléculas da sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à formação de radicais livres (reação tipo I) ou por transferência do excesso de energia ao oxigênio molecular (reação tipo II), ocasionando a produção do oxigênio singleto. As duas reações podem levar à morte celular ou à destruição do tecido. Por esse motivo é praticamente improvável que microrganismos adquiram resistência à IFD (BAGNATO, 2008; MANTAREVA *et al.*, 2011).

O metabolismo respiratório é a principal fonte de energia de células em condições aeróbicas, dando origem a ânion tóxico e oxigênio singleto. As células eucarióticas são capazes de produzir e liberar espécies de oxigênio reativas como resposta à fagocitose. O aumento dessas espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto, é consequência

também de um estresse celular, com a adição de antibióticos e agentes externos. Este oxigênio singlete é considerado um oxidante de macromoléculas biológicas, e pode interagir com citoplasma e componentes nucleares levando à morte celular e mutagênese por reagir com lipídios, proteínas e DNA (ADN, em português: ácido desoxirribonucléico; ou DNA, em inglês: deoxyribonucleic acid) (BECERRA *et al.*, 2004; MUELLER, *et al.*, 2009).

A TFD vem sendo usada também no controle e combate de pequenos tumores superficiais. Ao se introduzir o FS no paciente, o mesmo se acumula preferencialmente nas células tumorais, que têm como característica alta taxa de reprodução. Posteriormente, com a irradiação do laser no tecido acometido, a luz ativa a droga fotossensível gerando oxigênios tóxicos (oxigênio singlete) que alteram e necrosam o tumor, levando à cura. Em alguns casos quando a cirurgia é necessária por conta do tamanho ou local onde o tumor se encontra, é recomendado que se utilize a TFD como método pré-cirúrgico para promover a diminuição do tumor (STERNBERG e DOLPHIN, 1996).

A curcumina, composto fotossensibilizante utilizado neste trabalho, é um pigmento amarelo-alaranjado que pode ser sintetizado quimicamente ou extraído do rizoma da *Curcuma longa L.* (BRUZELL *et al.*, 2005; HAUKVIK, 2009; DOVIGO *et al.*, 2011). Tem sido descrito na literatura que a curcumina possui inúmeros efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios, imunomoduladores, entre outros, e que quando usada como droga fotossensibilizadora, ao ser fotoativada causa grandes danos podendo levar à morte celular (DAHL *et al.*, 1989; BRUZELL *et al.*, 2005; DOVIGO *et al.*, 2011).

O tempo de contato do FS com o microrganismo é de grande valor para que a IFD seja efetivamente positiva, pois dependendo da terapêutica pode-se moldar a o tratamento, ou seja, para uma necessidade de baixa concentração de FS aumenta-se o tempo de incubação, assim como se for preciso um tempo de incubação menor utiliza-se concentração maior de FS.

Assim, este estudo propôs avaliar o tempo ideal de contato da curcumina com a célula bacteriana, considerando as diferenças estruturais de parede e o metabolismo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a fim de elaborar uma metodologia padrão de suma importância para pesquisas futuras. Por isso a escolha dos microrganismos *Staphylococcus aureus* como modelo de bactéria Gram-positiva e *Pseudomonas aeruginosa* de Gram-negativa.

## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do tempo de incubação (tempo de contato) do FS curcumina em *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva, e *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa, na IFD. Considerando as diferenças estruturais dos microrganismos estudados.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Inativação Fotodinâmica (IFD)

Em 1900, Oscar Raab observou que a toxicidade do cloridrato de acridina contra *Paramecium caudatum* foi dependente da quantidade de luz e que foi um incidente em seu experimento, publicando assim o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos (MAISCH, 2007; BAGNATO, 2008).

Um dos mais novos avanços no tratamento de diferentes patologias de origem microbiana, viral, fúngica e inflamatória é a aplicação da inativação fotodinâmica (IFD) como atividade antimicrobiana (BAGNATO, 2008).

As bactérias se multiplicam muito rapidamente e uma mutação que ajude um único microrganismo a sobreviver na presença de um antibiótico se tornará predominante na população microbiana (SALMON-DIVION *et al.*, 2004). Com o aumento de bactérias resistentes aos antibióticos, tem havido um interesse em terapias antimicrobianas alternativas. A IFD é uma alternativa de tratamento para estes patógenos e tem tido um retorno promissor como tratamento de infecções resistentes a múltiplas drogas. Ainda não há relatos de microrganismos tornando-se resistentes a IFD, mesmo com numerosas tentativas de induzir resistência por ciclos repetidos da técnica com doses semiletais e crescimento microbiano (KHARKWAL *et al.*, 2011).

A IFD de microrganismos é baseada no conceito de que um corante, conhecido como fotossensibilizador (FS), deve ser localizado preferencialmente na bactéria, e não nas células ou tecidos circundantes, para posteriormente ser ativado por baixas doses de luz visível em adequado comprimento de onda, para não haver efeito tóxico nas células (MAISCH, 2007). A técnica consiste na utilização de uma luz ativando um corante (fotossensibilizador) para obter o efeito citotóxico (O'RIORDAN *et al.*, 2007).

A ação do FS pode ser de duas maneiras: (i) o FS ativado pode reagir com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou de hidrogênio, levando assim à produção de radicais livres (reação tipo I) ou (ii) por transferência do excesso de energia ao oxigênio molecular distribuído pelo sistema vascular (reação tipo II), levando à produção do oxigênio singleto,  $^1\text{O}_2$ , altamente oxidante (BAGNATO, 2008; MANTAREVA *et al.*, 2011).

A formação desse oxigênio singleto nada mais é que a transformação de um oxigênio tripleto para singleto. Ou seja, um oxigênio tripleto possui dois elétrons desemparelhados nos seus orbitais moleculares. Quando em contato com uma molécula orgânica

(fotossensibilizador) e luz, ocorre a inversão do spin de um dos elétrons transformando-o em um oxigênio singleto, que possui dois elétrons emparelhados no mesmo orbital ou em orbitais diferentes, sendo assim uma molécula extremamente reativa. O oxigênio singleto pode ser gerado através da reação de água oxigenada ( $H_2O_2$ ) com hipoclorito de sódio (NaOCl) ou, no caso da IFD, pela transferência de energia de uma molécula excitada por uma luz visível ou ultravioleta (RONSEIN, 2006).

Embora a técnica seja conhecida há mais de 100 anos, o seu uso para tratar infecções não foi muito desenvolvido. Pode ser, em parte, devido à dificuldade de controlar a eficácia da IFD em modelos de infecções em animais. O método padrão de quantificação das cargas bacterianas em modelos de infecções envolve o sacrifício do animal, a remoção e homogeneização do tecido e realização de diluições seriadas para fornecer o número de UFC/g (unidade formadora de colônia por grama) de tecido (HUANG *et al.*, 2010). Por isso a necessidade de maiores estudos para potencializar e melhorar a IFD.

Estudos destinados a comparar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas têm mostrado melhores resultados sobre bactérias Gram-positivas, pelas dificuldades do FS penetrar nas células bacterianas Gram-negativas (CALIN *et al.*, 2009). Este fato se explica por conta da parede celular das espécies Gram-positivas ser formada por uma camada porosa de peptidoglicano e ácido lipoteicóico, permitindo assim que o FS possa atravessá-la. O envelope da célula bacteriana Gram-negativa é constituído por uma membrana citoplasmática interior e uma membrana externa, que são separadas pelo peptidoglicano e o periplasma. A membrana exterior forma uma barreira física e funcional entre a célula e seu ambiente. Na membrana exterior, diferentes proteínas estão presentes, algumas das quais funcionam como poros para permitir a passagem de nutrientes, enquanto outras têm uma função enzimática ou estão envolvidas na manutenção da integridade estrutural da membrana externa e da forma da bactéria (HAMBLIN *et al.*, 2004).

HAMBLIN *et al.* (2004) demonstraram que por meio da utilização do PMBN (do inglês, polycationic péptide polimixina B nonapeptide), era possível aumentar a permeabilidade da membrana externa das espécies Gram-negativas e permitir que os FSs (fotossensibilizadores) que são normalmente excluídos da célula, penetrassem em um local onde as espécies reativas de oxigênio, geradas mediante iluminação, causariam danos fatais à célula.

Portanto, a IFD é considerada um tratamento alternativo para infecções causadas por diversos agentes microbianos e vem ganhando espaço no meio das pesquisas científicas por apresentar resultados promissores. São necessários estudos que avaliem, mas principalmente

potencializem a IFD para diminuir o tempo de tratamento, a quantidade de luz exposta, a concentração do FS e as repetições de tratamento. O tempo de contado ideal do FS, por exemplo, pode diminuir sua concentração necessária para ter o mesmo efeito atingido com concentrações maiores.

### 3.2. Curcumina

A cúrcuma (composto de coloração amarelo), também conhecida como açafrão, açafrão da terra, gengibre dourado emangarataia, é a planta de nome científico *Curcuma longa* L., pertencente à família Zingiberaceae. Trata-se de um arbusto perene, nativo do sul e sudoeste asiático e extensivamente cultivado na Índia, principalmente em Madras, Bengal e Bombay, e também na China, Taiwan, Japão, Burma, Indonésia e no continente Africano (BRUZELL *et al.*, 2005, ALMEIDA, 2006).

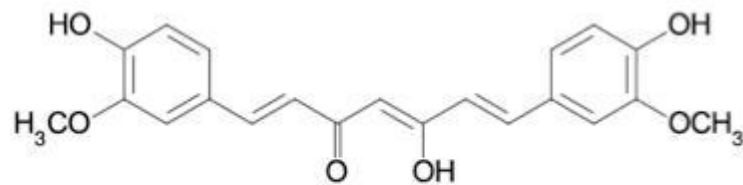


Figura 1: Representativo da estrutura química da molécula da curcumina (TEITEN *et al.*, 2010).

A curcumina tem o pico de absorção máximo no comprimento de onda de 429 nm, seu espectro de fluorescência é de 434 nm de excitação e 520 nm de emissão apresentando fluorescência amarela sob luz ultravioleta (ALMEIDA, 2006).

Tem sido sugerido que a curcumina possui efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios, antiaterogênico, imunomoduladores, além de propriedades anticancerígenas que poderiam ser otimizados com a sua iluminação em comprimento de onda adequado (DAHL *et al.*, 1989, BRUZELL *et al.*, 2005, DOVIGO *et al.*, 2011).

Sendo assim, a curcumina é um potencial FS na IFD para infecções superficiais localizadas, porém seu uso é limitado pela difícil solubilidade em água e baixa estabilidade em solução. A curcumina é praticamente impossível de ser solubilizada em água em pH ácido

e neutro, sendo solúvel somente em meios alcalinos. Uma formulação adequada de curcumina deve ser estável durante a produção, estocagem e durante a IFD. Uma vez que os produtos da fotodegradação não mostram nenhuma atividade fotobiológica, estes efeitos têm sido atribuídos ao estado excitado da curcumina (HAUKVIKI *et al.*, 2009).

A curcumina é a fração mais importante da cúrcuma, e é responsável pela sua atividade biológica. ÇIKRIKÇI *et al.* (2008) discutiram o isolamento e a avaliação biológica de cúrcuma e curcumina contra bactérias e micobactérias, tais como *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis*, *M. simiae*, *M. kansasii*, *M. terrae*, *M. szulgai* e o fungo *Candida albicans*. Os resultados da avaliação antibacteriana dos extratos de cúrcuma e curcumina pura foram fracos para as micobactérias, não tiveram nenhum efeito para as Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* e tiveram efeito moderado para as demais bactérias e o fungo.

A curcumina é considerada um composto não tóxico e seguro, tanto em culturas de células e estudos em animais quanto em ensaios clínicos (HEGGE *et al.*, 2010).

A escolha da curcumina como FS para este trabalho foi baseada em estudos que demonstram a eficácia como antimicrobiano e demais efeitos citados e, principalmente, por se tratar de um composto natural, já utilizado como corante e tempero, considerado atóxico.

### **3.3. *Staphylococcus aureus***

São cocos Gram-positivos, coagulase e fosfatase alcalina positivos, anaeróbios facultativos e fermentadores de manitol. As bactérias Gram-positivas possuem como característica a parede celular espessa, formada basicamente por uma macromolécula porosa e insolúvel conhecida como peptidoglicano, e por ácidos teicóicos (WALKER, 2002; TORTORA *et al.*, 2005; TRABULSI *et al.*, 2005; LEVINSON, 2010).

A figura abaixo mostra detalhadamente as estruturas que formam a parede celular das bactérias Gram-positivas (Figura 2).

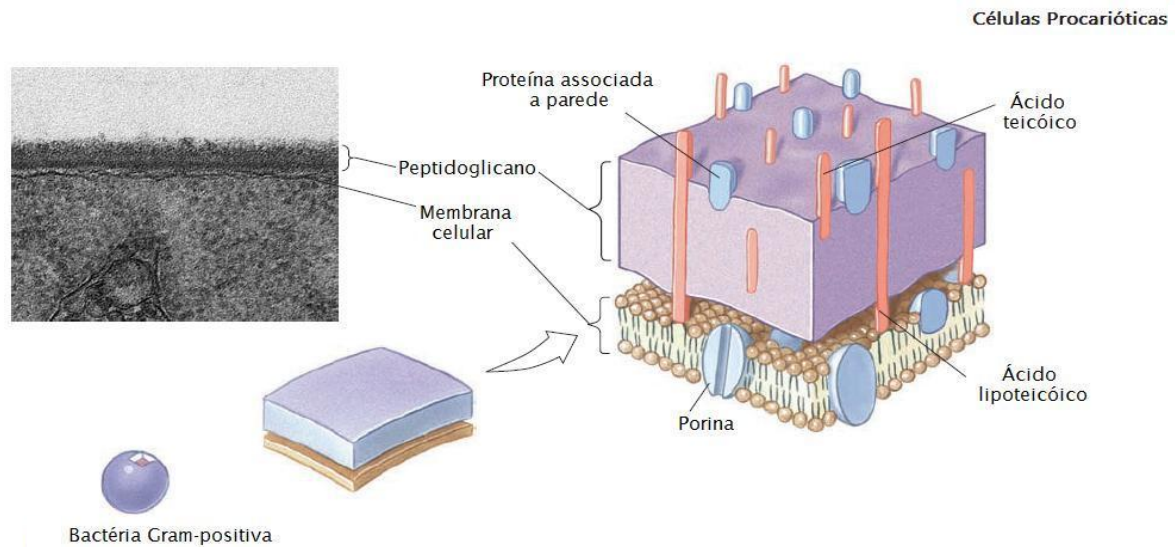


Figura 2: Representativo estrutural da parede celular de bactéria Gram-positiva (Adaptado, BLACK, 2008).

Apesar de ser encontrado na microbiota normal, como na cavidade bucal em 95%, e nas narinas e intestino de 30-50% de indivíduos saudáveis, o *Staphylococcus aureus* é o agente de inúmeras infecções que acometem o ser humano. Estas infecções podem ser brandas ou levarem à morte, podendo ser localizadas, normalmente superficiais e/ou disseminadas. Possui alta porcentagem de resistência à antibioticoterapia convencional. Muitas das infecções hospitalares têm como causador a bactéria *S. aureus*, pois está presente em 90% da equipe clínica de um hospital (BARON, 1996; WALKER, 2002; TORTORA *et al.*, 2005; TRABULSI *et al.*, 2005; MIYABE, 2011).

As infecções causadas pelo microrganismo *S. aureus* podem ser:

- Supurativas
  - infecções superficiais – foliculite; furúnculos e carbúnculos.
  - infecções sistêmicas – pneumonia; osteomielite; endocardite e enterite estafilocócica aguda; miosite tropical e septicemia.
- Não supurativas
  - quadros tóxicos – síndrome estafilocócica da pele escaldada; síndrome do choque tóxico; doença de Kawasaki e intoxicação alimentar por estafilococos.

(KONEMAN *et al.*, 2001; WALKER, 2002; SCHAECHTER *et al.*, 2002; TRABULSI *et al.*, 2005).



Como principais fatores de virulência o *S. aureus* possui componentes da superfície celular (cápsula, peptidoglicano e ácidos teicóicos, proteína A, enzimas, proteína ligadora de fibronectina e de colágeno) e toxinas (algumas são citotoxinas ou superantígenos e outras degradam moléculas de adesão de células epiteliais cutâneas) (KONEMAN *et al.*, 2001; WALKER, 2002; TRABULSI *et al.*, 2005).

As penicilinas, cefalosporinas, eritromicinas, aminoglicosídeos, tetraciclinas e os cloranfenicóis são drogas eficientes no combate às infecções causadas pelos estafilococos, porém este microrganismo possui capacidade de se tornar resistente a todas estas. Tal capacidade se dá por mutações em seus genes e/ou por adquirir genes de resistência provenientes de outras bactérias da mesma ou de outras espécies. Por isso a escolha da antibioticoterapia apropriada deve ser com fundamento nos resultados de testes de suscetibilidade, considerando que amostras de infecções em pacientes hospitalizados são mais resistentes que em pacientes na sociedade (SCHAECHTER *et al.*, 2002; TRABULSI *et al.*, 2005).

Há cerca de 50 anos surgiram os primeiros relatos de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), desafiando assim as terapêuticas de infecções causadas por *S. aureus*. MRSA tornou-se um grande problema de infecções hospitalares sendo responsável pelo aumento significativo das taxas de morbidade e mortalidade (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Alguns estudos envolvendo a IFD para inativação de *Staphylococcus* spp demonstraram efeito satisfatório. PELOI *et al.* (2008) propôs o uso de diodos emissores de luz (LED – do inglês: Light emitting diode, diodos emissores de luz) vermelha como fonte de luz para efeito fotossensibilizante do azul de metileno (AM) na IFD. Para o estudo utilizaram microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Candida albicans* e o microcrustáceo *Artemia salina*, para iluminação utilizaram lâmpadas de LED no comprimento de onda de 663 nm e doses de 2, 4, 6 e 12 J/cm<sup>2</sup> e como FS o AM nas concentrações de 7-140.8 µM para microrganismos e 13.35-668.5 µM para microcrustáceo. Neste trabalho foi determinado D-valor (o tempo, em minutos, necessário para reduzir a população de 1 log de microrganismo). A exposição do LED induziu mais de 93,05%, 93,7% e 93,33% de inibição de crescimento para as concentrações de 42,2 µM de AM por *S. aureus* (D-valor = 12.05min) e 35,2 µM de AM para *E. coli* (D-valor = 11.51min) e *C. albicans* (D-valor = 12.18min), respectivamente, após 20 minutos de exposição. A exposição do LED por 1 hora aumentou o efeito citotóxico do AM contra *A. salina* de 27% para 75%. Os autores concluíram que o LED vermelho é um dispositivo de luz promissor para a IFD que pode inibir eficazmente o crescimento das bactérias, leveduras e microcrustáceos.

MIYABE *et al.* (2011) utilizaram cepas de *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus* e *S. lentus* isoladas da cavidade oral de humanos. Utilizaram como FS o azul de metileno (AM) na concentração de 3 mM com fonte de luz de 660 nm e dose de 10 J/cm<sup>2</sup>, e utilizaram como comparação o antibiótico ciprofloxacina. Obtiveram uma redução total de 6.29 log<sub>10</sub> UFC/mL em comparação com o grupo controle. O uso do antibiótico ciprofloxacina foi eficaz em todos os isolados, exceto para *S. schleiferi*, contudo esta cepa se mostrou sensível a IFD com uma redução de 6.83 log<sub>10</sub> UFC/mL, sugerindo a IFD como tratamento alternativo para cepas resistentes a antibióticos.

RIBEIRO *et al.* (2012) avaliou *in vitro* a efetividade fototóxica da curcumina em *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA), resistente a meticilina (MRSA) e fibroblastos L929. Utilizaram concentrações de curcumina de 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 µM, luz LED no comprimento de onda de 455 nm e doses de 37,5; 25,5 e 18 J/cm<sup>2</sup>. O FS foi incubado por 20 minutos antes da irradiação. Neste trabalho os autores concluíram que a curcumina é eficiente na IFD de MRSA, quando combinada com luz LED. Também observaram uma redução em torno 80% do metabolismo dos fibroblastos.

Diante destes estudos com resultados promissores à IFD não foram observados trabalhos que avaliaram o tempo de incubação dos fotossensibilizadores, o que é importante para maior efetividade da IFD.

### **3.4. *Pseudomonas aeruginosa***

Trata-se de um bacilo Gram-negativo, não fermentador, não esporulado, móvel (um flagelo polar) e ubiqüitário encontrado desde solo, água e vegetais até animais, alimentos e ambientes hospitalares. É classificado como aeróbio, podendo crescer anaerobicamente na presença de nitrato. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa quando comparada com a parede celular das bactérias Gram-positivas. A parede celular destas bactérias é formada por uma camada de peptidoglicano e por uma membrana externa, o espaço que se separa a membrana citoplasmática da membrana externa é chamado de espaço periplasmático. A membrana externa é importante na defesa destas bactérias à ação de fagocitose e ao sistema complemento durante a invasão em um hospedeiro (TRABULSI *et al.*, 2005; TORTORA *et al.*, 2005).

O microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* raramente causa infecções em indivíduos saudáveis, mas é um dos principais agentes de infecções em indivíduos imunodeficientes. É

considerado um microrganismo oportunista, com grande importância em infecções hospitalares, seguido de alto índice de falha terapêutica, por conta da resistência adquirida e natural a muitos antibióticos, desinfetantes convencionais e por se tratar de um agente com amplos fatores de virulência (KONEMAN *et al.*, 2001; TRABULSI *et al.*, 2005; TORTORA *et al.*, 2005).

A figura abaixo demonstra detalhadamente as estruturas da parede celular de bactérias Gram-negativas (Figura 3).

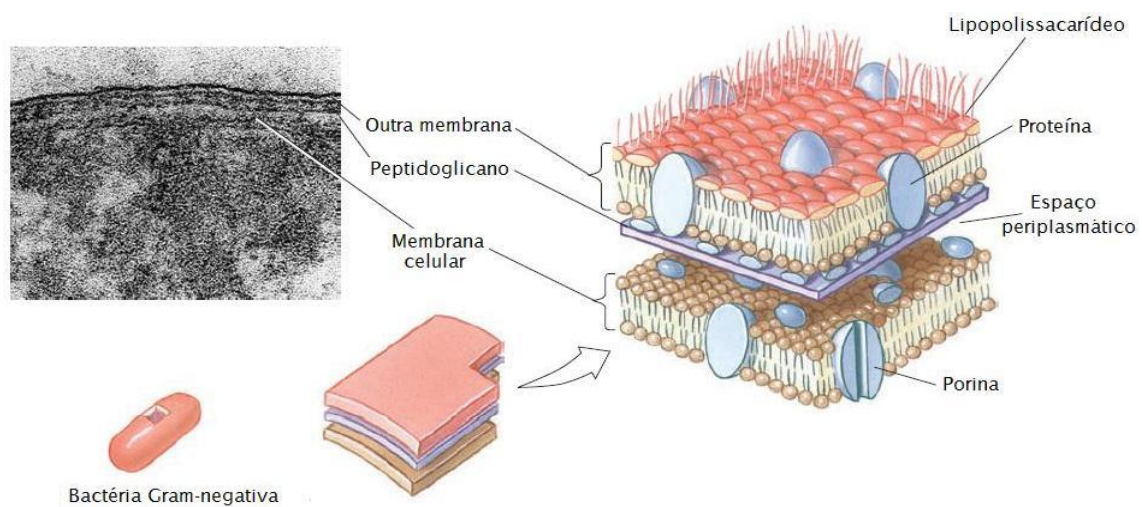


Figura 3: Representativo estrutural da parede celular da bactéria Gram-negativa (Adaptado, BLACK, 2008).

As infecções por *P. aeruginosa* abrangem diferentes tecidos e órgãos, por conta da variedade e do grande número dos fatores de virulência, sendo alguns desses fatores parte da estrutura celular e outros são produtos extracelulares. Fímbrias ou pili, flagelo, lipopolissacarídeo e alginato são fatores de virulência contidos na estrutura celular. Como fatores extracelulares destacam-se a exoenzima S e exoenzima U (inibidoras de fagocitose; ExoS é tóxica para neutrófilos e ExoU é tóxica para macrófagos), exotoxina A (altamente tóxica), proteases (elastase B, elastase A e protease alcalina; responsáveis pelas lesões de pele e tecidos associadas à hemorragia e necrose), fosfolipase C e ramnolipídeo (destroem o surfactante pulmonar, fazendo os alvéolos colabarem), pigmentos fenazínicos (inibem proliferação da epiderme humana, linfócitos e outras bactérias), sideróforos (captura ferro do hospedeiro) e o biofilme (KONEMAN *et al.*, 2001; TRABULSI *et al.*, 2005; TORTORA *et al.*, 2005).

Indivíduos saudáveis dificilmente são vítimas de infecções por *P. aeruginosa*, pois o início da infecção depende de uma falha na primeira linha de defesa do organismo, que pode

ser resultado de traumas cirúrgicos, queimaduras, diálises, transplantes, longo uso de cateter, imunodepressão terapêutica (corticóides, radiação, anticarcinogênicos) ou de imunodepressão clínica (diabetes, neoplasia, imunodeficiências, fibrose cística). As infecções podem acometer o trato respiratório superior (otite, sinusite, conjuntivite, ceratite, úlceras na córnea), o trato respiratório inferior (pneumonia, infecção pulmonar crônica na fibrose cística), sistema nervoso central e bacteremia (septicemia, meningites, abscesso cerebral, endocardite), trato urinário, trato gastrointestinal (enterocolite necrotizante, inflamação no seco), infecções superficiais e tecidos moles (ectima gangrenoso, foliculite, celulite, fasciite necrotizante, necrose, gangrena, síndrome da unha verde) e infecções ósseas e nas articulações (osteomielite, osteocondrite) (KONEMAN *et al.*, 2001; TORTORA *et al.*, 2005; TRABULSI *et al.*, 2005).

Além de ser um microrganismo naturalmente resistente à maioria dos antibióticos eficientes em casos de infecções por outras bactérias Gram-negativas, a *P. aeruginosa* pode adquirir resistência a antibióticos após uma primeira exposição. Para o tratamento das infecções aceftazidima tem sido considerada o  $\beta$ -lactâmico mais indicado, e entre os aminoglicosídeos, a amicacina é mais indicada. Em caso de infecções severas é recomendado o uso combinado de um  $\beta$ -lactâmico e um aminoglicosídeo (TORTORA *et al.*, 2005; TRABULSI *et al.*, 2005).

HAMBLIN *et al.* (2003) demonstraram a efetividade da IFD por meio de um estudo *in vivo*, utilizando ratos com feridas infectadas por *P. aeruginosa*. Todos os grupos controle (ratos que não foram tratados) morreram dentro de 5 dias, em contraste, 90% dos ratos tratados com IFD sobreviveram. Utilizaram um conjugado de poli-L-lisina-CE6 como FS. A fonte de luz utilizada foi de 660 nm.

STREET *et al.* (2009) analisaram a capacidade da IFD inativar, *in vitro*, *P. aeruginosa* em fase planctônica e biofilme, utilizando como FS o azul de metileno (AM). As culturas planctônicas de *P. aeruginosa* foram expostas a uma concentração do fotossensibilizador de 0,01% e submetidas a doses de energia de 1,7 a 20,6 J/cm<sup>2</sup> usando um laser de diodo 670 nm. Os biofilmes foram expostos ao FS (0,01%) durante 30 segundos antes da iluminação com 13,2 ou 26,4 J/cm<sup>2</sup> de energia. Em fase planctônica uma única exposição ao FS com doses de luz maiores de 15,5 J/cm<sup>2</sup> resultou em 100% de eliminação. A viabilidade de 24 horas do biofilme foi reduzida em 99% com exposição única e 99,9% com dupla exposição, enquanto a viabilidade de 48 horas foi reduzida em > 99,999% com exposições tanto individuais quanto duplas. Os autores concluíram que a IFD é eficaz na inativação de *P. aeruginosa* em fase

planctônica e biofilme, apoiando que na prática clínica a IFD é uma opção viável para indicações como, por exemplo, otite externa e desinfecção de feridas.

HUANG *et al.* (2010) relatam que na década de 90 foi observado uma diferença fundamental na susceptibilidade da IFD entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Verificou-se que, em geral, moléculas neutras ou aniônicas de FS se ligam com eficiência a bactérias Gram-positivas e células fúngicas, enquanto que as bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a estes compostos. Citam que a membrana citoplasmática rodeada por uma camada porosa de peptidoglicano e ácido lipoteicóico das bactérias Gram-positivas e a beta-glucana e quitina das células fúngicas permitem atravessar estruturas não catiônicas dos FSs, aumentando a efetividade da IFD.

WARDLAW *et al.*, (2011) avaliaram, *in vitro*, a efetividade da IFD na inativação de microrganismos mais comumente encontrados em infecções de ferida como *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus canis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Utilizaram como FS o ácido aminolevulínico (ALA) tópico em exposições variando de 15 segundos a 2 horas e com concentrações que variaram de 1 M a 0,1 mM, a fonte de luz foi utilizada no comprimento de onda de 635 nm e doses de 0, 54, 108, 162, 216, e 324 J/cm<sup>2</sup>. Não houve redução significativa na sobrevivência bacteriana após IFD para todos os organismos, exceto para *E. coli*, quando comparados ao controle. Com os dados encontrados os autores sugeriram que a IFD pode ser uma opção terapêutica para infecções de feridas, mas é necessário repetir os tratamentos ou alterar o FS em relação ao seu mecanismo de transporte para diminuir o tempo de tratamento. Os autores concluíram também que a IFD foi mais eficaz com bactérias Gram-positivas e que são necessários estudos para melhorar a eficácia em bactérias Gram-negativas.

HUANG *et al.* (2012) avaliaram as contribuições do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (oxigênio singlete, produzido na reação tipo II) e do HO· (radical hidroxila, produzido na reação tipo I) na IFD para inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores concluíram que bactérias Gram-negativas podem ser mais susceptíveis a HO·, enquanto bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Perante a estes estudos, alguns com resultados promissores e outros demonstrando a dificuldade da inativação de *P. aeruginosa* por IFD, não foram observados trabalhos que variaram o tempo de incubação dos FSs, o que sugere melhorar a efetividade da IFD.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Preparo das amostras

As amostras de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram cultivadas em caldo TSB (Tryptic Soy Broth), incubadas em estufa de 37 °C ( $\pm 1$  °C) por 24 horas. Após o crescimento as culturas foram centrifugadas e posteriormente resuspendidas em solução salina e homogeneizadas, com o auxílio de um agitador automático de tubos. Em seguida, foi realizada leitura em espectrofotômetro, operando em comprimento de onda de 600 nm. Para cada unidade da densidade óptica foi determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Os inóculos testados nos grupos de estudos eram de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL, de acordo com a densidade óptica.

A metodologia utilizada e o fotossensibilizador escolhido neste trabalho foram determinados a partir de sucessivos testes, que estão apresentados como Apêndice 1.

### 4.2. Fotossensibilizador

Neste trabalho, a curcumina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi utilizada como droga fotossensibilizadora. As concentrações do FS e dose de luz foram determinadas em estudos piloto com os respectivos microrganismos. As concentrações da curcumina utilizadas são apresentadas na Tabela 1. Os tempos de incubação do FS no escuro, antes da exposição à luz, foram de 0, 5, 15 e 30 minutos.

Em ambiente protegido da luz, a curcumina foi solubilizada em DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração de 20 mM por mL. A partir desta solução estoque, foram realizadas diluições com solução salina com 1% de DMSO, para que o FS atingisse as concentrações desejadas para cada microrganismo. As soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas imediatamente antes do uso. Os tubos contendo as soluções foram envolvidos em papel alumínio para manter o fotossensibilizador sem exposição à luz durante a realização dos experimentos.

**Tabela 1** Concentrações do fotossensibilizador utilizadas em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Concentração do Fotossensibilizador ( $\mu\text{M}$ ) para <i>Staphylococcus aureus</i>	Concentração do Fotossensibilizador ( $\mu\text{M}$ ) para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
0,10	1,00
0,25	10,00
0,50	25,00
1,00	50,00

#### 4.3. Fonte de Luz e Fluência

Neste trabalho foi utilizada uma mesa iluminadora chamada de BioTable RGB de construção própria do Instituto de Física de São Carlos da USP pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT), na qual LEDs permitem produzir uma iluminação uniforme em toda a placa. A potência do sistema pode ser variada, ajustando-se o tempo e intensidade para produzir a dose desejada. O sistema opera com os comprimentos de onda de 460, 530 e 630 nm. O comprimento de onda utilizado neste estudo foi de 460 nm, com potência de 36,1 mW/cm<sup>2</sup> e a fluência testada foi de 30 J/cm<sup>2</sup>. As amostras foram irradiadas em temperatura ambiente, de acordo com a fluência previamente estabelecida.

#### 4.4. Grupos de Estudo

Os experimentos foram realizados em fase planctônica (suspensão) e foram avaliadas as seguintes condições: controle L0FS0; controle do fotossensibilizador L0FS(+); controle da luz L30FS0 e inativação fotodinâmica IFD, em que “L” representa luz, “FS” representa fotossensibilizador, “(+)” presença e “0” ausência.

Para simular as mesmas condições, o grupo controle (L0FS0), que não foi exposto ao fotossensibilizador ou a luz, também foi colocado nos poços da placa em temperatura ambiente pelo mesmo tempo utilizado para a incubação e irradiação dos outros grupos.

Os experimentos foram realizados em quintuplicata em duas ocasiões distintas em microplacas de 96 poços. Após a incubação e/ou irradiação, foram aspirados 100  $\mu\text{L}$  de um

total de 200  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{L}$  do inóculo + 100  $\mu\text{L}$  do fotossensibilizador ou salina) da amostra de cada poço e transferidos para microtubos de centrífuga contendo 900  $\mu\text{L}$  de solução salina esterilizada, seguido de diluições decimais até  $10^{-5}$ . Foram plaqueados em duplicata pelo método de espalhamento 25  $\mu\text{L}$  de cada diluição em cada quadrante, em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar). As placas de Petri utilizadas foram divididas em quadrantes. Após as inoculações as placas foram incubadas em estufa a 37 °C ( $\pm 1$  °C) por 48 horas para a realização das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC).

As análises estatísticas foram feitas pelos métodos análise de variância com dois fatores (ANOVA “Two Way”) e teste de Tukey, que estão apresentadas como Apêndice 2.

#### **4.5. Efeito da IFD na ausência do FS no meio**

Para avaliar a interferência na passagem da luz por conta da concentração do FS foi realizado o processo de retirada do FS da seguinte forma: após os tempos de incubação com o FS as amostras foram centrifugadas em centrífuga de microtubos a 6000 g por 10 minutos, os sobrenadantes foram retirados e as amostras foram ressuspensas em salina com 1% de DMSO. Após o processo de retirada do FS, as amostras foram transferidas para placa de 96 orifícios e iluminada com dose de luz de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ , seguidas de diluições decimais e plaqueamento (mesmo processo feito com os experimentos sem a retirada do FS). Foram escolhidas uma concentração para cada microrganismo, com o critério dos melhores resultados. Para *S. aureus* foi escolhida a concentração de FS de 0,5  $\mu\text{M}$  e para *P. aeruginosa* foi escolhida a concentração de 25  $\mu\text{M}$ . A dose de luz permaneceu a mesma para ambos os microrganismos (30  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. *Staphylococcus aureus*

Os resultados da avaliação dos tempos de incubação de 0; 5; 15 e 30 minutos para o microrganismo *Staphylococcus aureus* e o fotossensibilizador curcumina nas concentrações 0,1; 0,25; 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  estão representados nas Figuras 4 e 5.

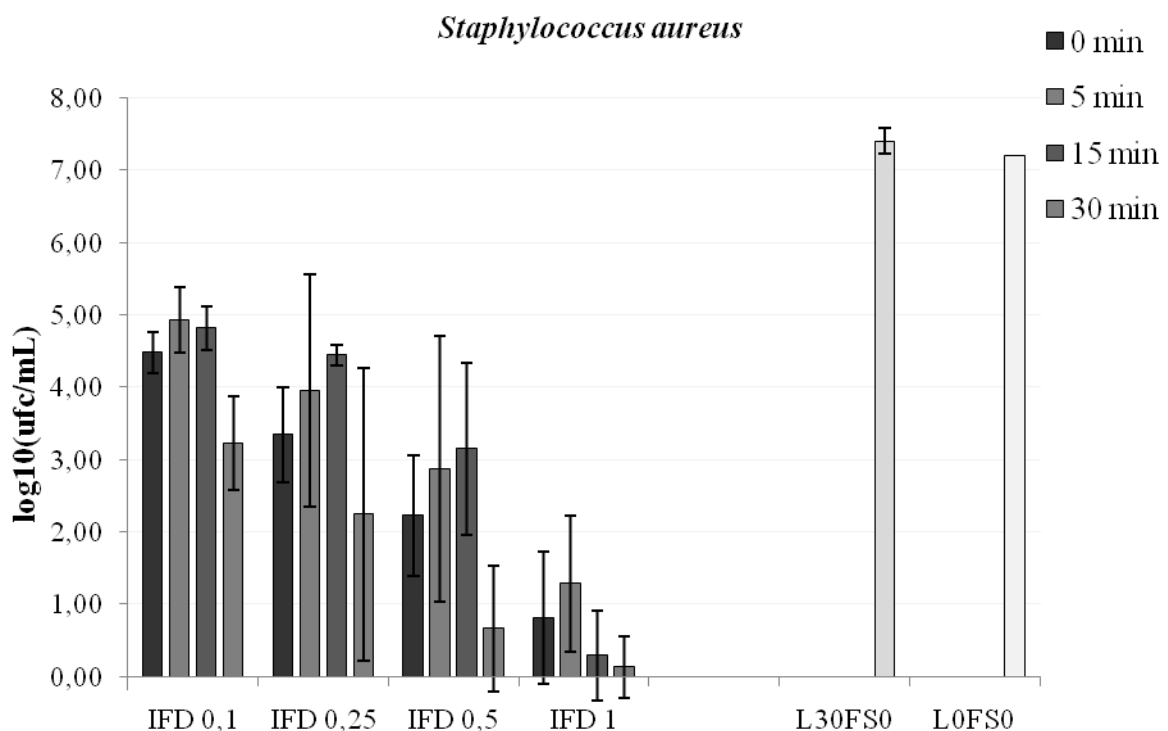


Figura 4. Avaliação dos diferentes tempos de incubação para *Staphylococcus aureus*, utilizando curcumina nas concentrações 0,1; 0,25; 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Valores médios de log (UFC/mL) e desvio-padrão. Grupos: inativação fotodinâmica (IFD), controle da luz (L30FS0) e controle (L0FS0).

Pode-se considerar que houve redução de aproximadamente 3 logs na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  do FS nos tempos de incubação de 0, 5 e 15 minutos e redução de aproximadamente 4 logs no tempo de 30 minutos. Na concentração de 0,25  $\mu\text{M}$  do FS houve redução de 3 logs no tempo de 15 minutos, redução de 4 logs nos tempos de 0 e 5 minutos e redução de 5 logs no tempo de 30 minutos. Houve redução de aproximadamente 4 logs na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  do FS no tempo de 15 minutos, redução de 5 logs nos tempos de 0 e 15 minutos de incubação

e redução de 6 logs no tempo de 30 minutos. Na concentração de 1  $\mu\text{M}$  do FS houve redução de aproximadamente 6 logs no tempo de 5 minutos e 7 logs nos tempos de 0, 15 e 30 minutos.

Os resultados mais satisfatórios foram no tempo de 30 minutos para todas as concentrações do FS. E os resultados com menores reduções de UFC/mL foram nos tempos de incubação de 5 e 15 minutos em todas as concentrações, exceto na concentração de 1  $\mu\text{M}$  com tempo de 15 minutos.

Deve-se ressaltar também que não houve redução na utilização da luz isolada, caracterizando assim que o emprego da luz sem fotossensibilizador não possuiu efeito fototóxico na dose escolhida.

As análises estatísticas feitas pelos métodos ANOVA e teste de Tukey mostraram que as concentrações de 0,10  $\mu\text{M}$  e 0,50  $\mu\text{M}$  apresentam comportamentos semelhantes em todos os tempos, ou seja, há um aumento na média entre os tempos 0 e 5 minutos, entre 5 e 15 permanecem quase constantes e apresentam um decaimento significativo entre 15 e 30 minutos. Para a concentração 0,25  $\mu\text{M}$  há um aumento na média entre os tempos 0 e 15 minutos e, assim como em 0,10  $\mu\text{M}$  e 0,5  $\mu\text{M}$ , há um decréscimo significativo dos 15 aos 30 minutos.

É possível observar que as concentrações 0,10  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$  e 0,50  $\mu\text{M}$  apresentam médias bem superiores às apresentadas quando as bactérias são submetidas a concentrações 1  $\mu\text{M}$ , exceto para o tempo 30 das duas concentrações mais altas.

Em suma, há indícios de que a combinação de concentração e tempo que reduziu a maior quantidade de UFC/mL é a de 1  $\mu\text{M}$  associada ao tempo de incubação de 30 minutos. Sendo assim, basta se observar na Tabela 2 apresentada no Apêndice 2, as quais combinações ela é estatisticamente igual.

Considerando-se a economia de tempo e de concentração de curcumina, tem-se que a melhor combinação que tem resultados iguais aos encontrados com a concentração 1  $\mu\text{M}$  com 30 minutos é a de 0,5  $\mu\text{M}$  com 30 minutos.

Com o gráfico representado na Figura 5 pode-se observar que o uso isolado do FS incubado por 30 minutos não possui efeito citotóxico nas concentrações escolhidas, pois não houve redução do número de UFC/mL.

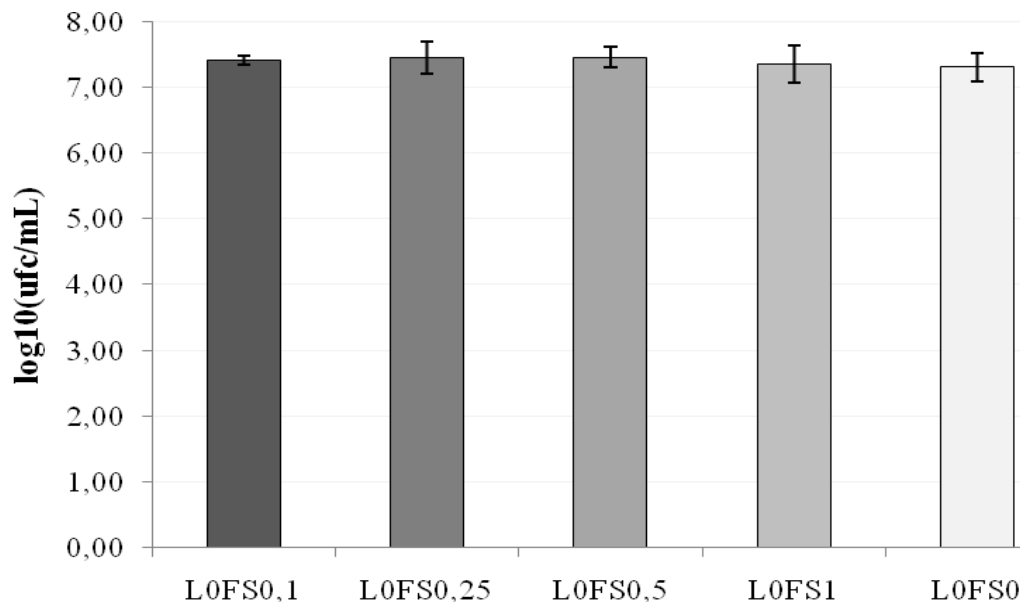


Figura 5. Controles do fotossensibilizador curcumina (L0FS0,1 ; L0FS0,25 ; L0FS0,5 e L0FS1 – concentrações em  $\mu\text{M}$ ) no escuro, com tempo de incubação de 30 minutos e grupo controle (L0FS0) em *Staphylococcus aureus*. Valores médios de log (UFC/mL) e desvio-padrão.

## 5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Os resultados utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* com as concentrações de 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{M}$  de curcumina e tempos de incubação de 0; 5; 15 e 30 minutos estão representados nas Figuras 6 e 7.

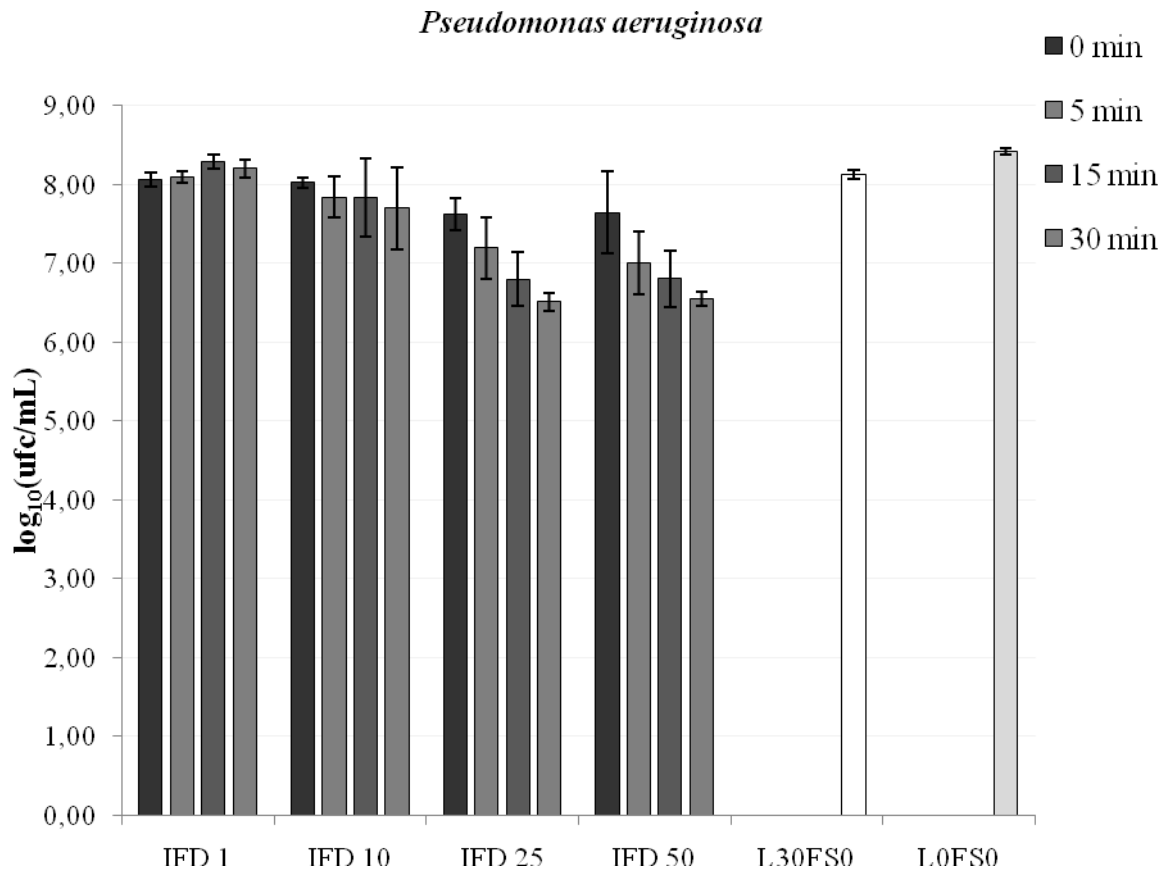


Figura 6. Avaliação dos diferentes tempos de incubação para *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando curcumina nas concentrações 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{M}$  e dose de luz de 30  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Valores médios de log (UFC/mL) e desvio-padrão. Grupos: inativação fotodinâmica (IFD), controle da luz (L30FS0) e controle (L0FS0).

Não houve redução satisfatória do número de UFC/mL na IFD na concentração de 1  $\mu\text{M}$  do FS em nenhum dos tempos de incubação. Na concentração de 10  $\mu\text{M}$  do FS houve pequena redução de aproximadamente 1 log nos tempos de 5, 15 e 30 minutos. Na concentração de 25  $\mu\text{M}$  do FS houve redução de 1 log nos tempos de incubação de 0 e 5 minutos e redução de aproximadamente 2 logs nos tempos de 15 e 30 minutos. Houve redução de 1 log na concentração de 50  $\mu\text{M}$  do FS no tempo de incubação de 0 minuto e de aproximadamente 2 logs nos tempos de 5, 15 e 30 minutos.

Em todas as concentrações do FS no grupo IFD o melhor tempo de incubação foi de 30 minutos, exceto para a concentração de 1  $\mu\text{M}$  do FS, na qual não houve redução significativa do número de UFC/mL.

Pode-se observar que o uso isolado da luz, assim como no microrganismo *S. aureus*, não reduziu o número de UFC/mL de *P. aeruginosa*, demonstrando que a luz não possui efeito fototóxico na dose utilizada.

Por meio das análises estatísticas (Tabela 3 apresentada no Apêndice 2), verifica-se que a concentração de 1  $\mu\text{M}$  não apresenta diferenças estatísticas em relação a variação no tempo. O mesmo acontece com a concentração de 10  $\mu\text{M}$ . As amostras expostas a concentrações 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  de FS apresentam médias de UFC/mL superiores às médias encontradas quando as bactérias foram submetidas às concentrações 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de FS.

Há indícios de que as concentrações 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  apresentam os mesmos resultados para todos os tempos observados (0, 5, 15 e 30 minutos), em média o mesmo número de bactérias não sobrevive à exposição ao fotossensibilizador e à luz. Assim, pode-se dizer que as maiores reduções do número de UFC/mL foram com as concentrações de 25  $\mu\text{M}$  ou 50  $\mu\text{M}$ , possivelmente nos tempos 15 ou 30 minutos.

A combinação de concentração e tempo que reduziu o maior número de UFC/mL foi a de 25  $\mu\text{M}$  associada ao tempo de incubação de 30 minutos. Considerando-se a economia de tempo e de concentração de curcumina, tem-se que a melhor combinação que tem resultados iguais a essa é a de 25  $\mu\text{M}$  com 15 minutos.

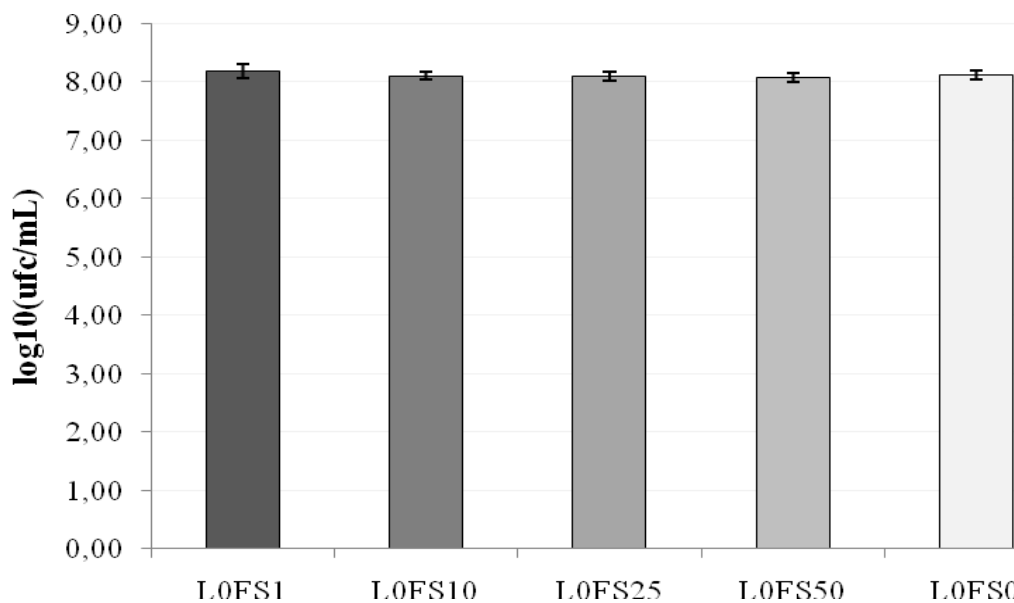


Figura 7. Controles do fotossensibilizador curcumina (L0FS1 ; L0FS10 ; L0FS25 e L0FS50 – concentrações em  $\mu\text{M}$ ) no escuro, com tempo de incubação de 30 minutos e grupo controle (L0FS0) em *Pseudomonas aeruginosa*. Valores médios de log (UFC/mL) e desvio-padrão.

Com o gráfico representado na Figura 7 pode-se observar que o uso isolado do FS nas concentrações utilizadas e tempo de incubação de 30 minutos não possui efeito citotóxico, pois não houve redução do número de UFC/mL.

### 5.3. Efeito da IFD na ausência do FS no meio

Os resultados do processo de retirada do FS do meio após as incubações e antes da iluminação estão representados nas Figuras 8 e 9.

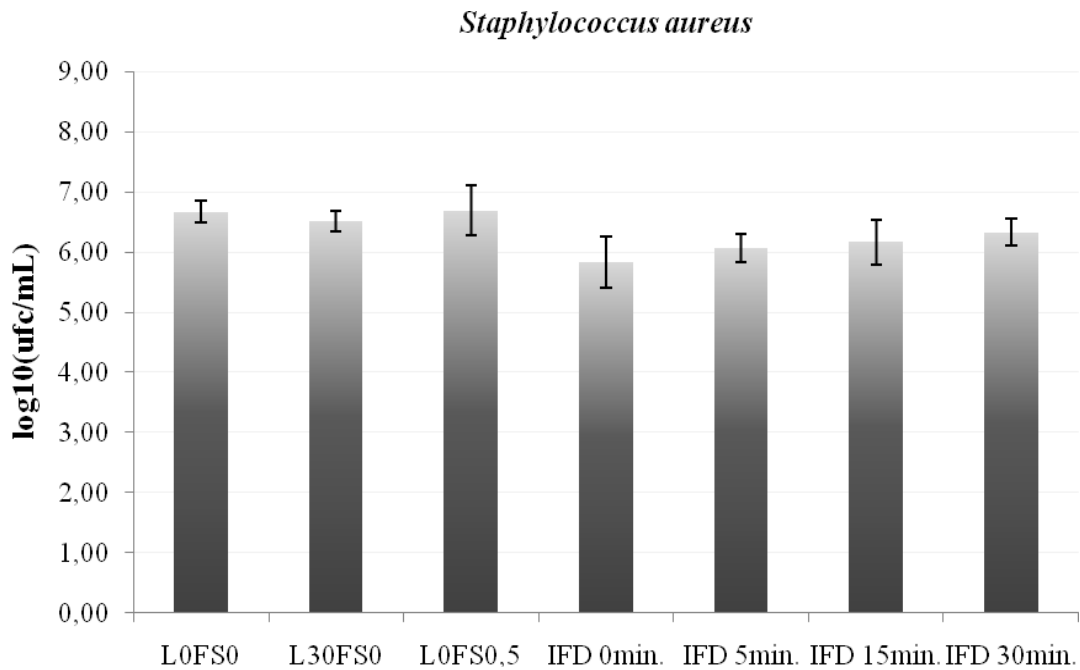


Figura 8. Valores médios de log(UFC/mL) e desvio-padrão dos testes com *Staphylococcus aureus* da retirada do FS Curcumina na concentração de 0,5  $\mu$ M, após os tempos de incubação de 0, 5, 15 e 30 minutos, seguidos de dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup>. Controle (L0FS0), controle da luz (L30FS0), controle do fotossensibilizador curcumina (L0FS0,5) e IFD.

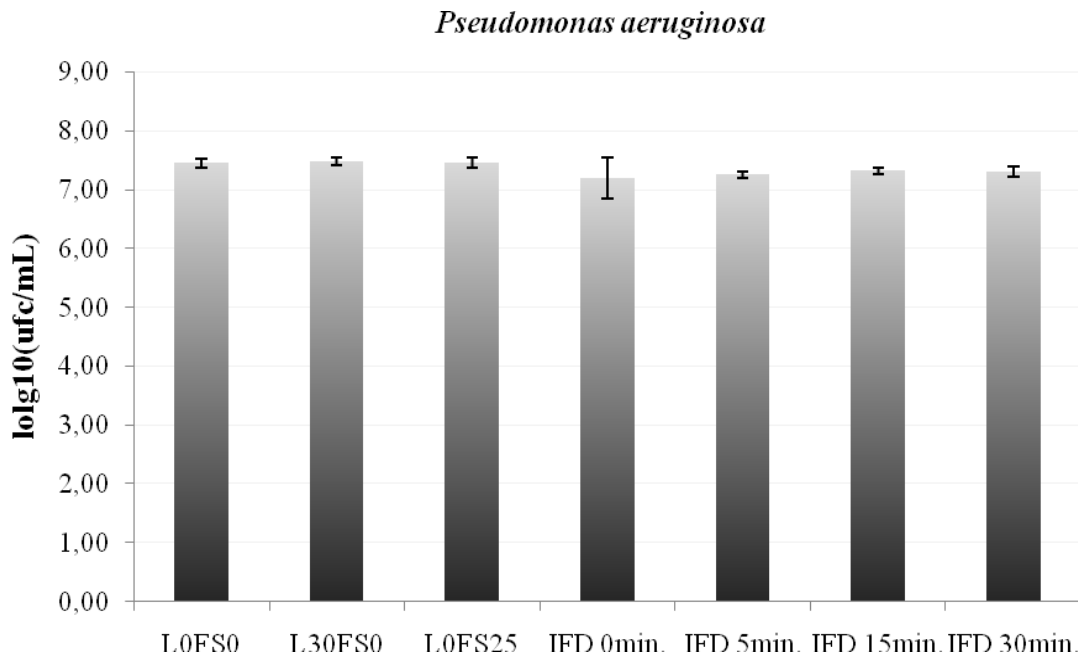


Figura 9. Valores médios de log e desvio-padrão dos testes com *Pseudomonas aeruginosa* com a retirada do FS Curcumina na concentração de 25  $\mu$ M, após os tempos de incubação de 0, 5, 15 e 30 minutos, seguidos de dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup>. Controle (L0FS0), controle da luz (L30FS0), controle do fotossensibilizador curcumina (L0FS25) e IFD.

Com os Gráficos apresentados foi possível observar que não houve reduções expressivas do número de UFC/mL como as encontradas com o FS no meio. Caracterizando assim que a eficiência da IFD utilizando curcumina como FS, nas concentrações estudadas, para os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* é dependente da presença do FS no meio a ser iluminado. Sendo assim, a proposta de que a alta concentração do FS teria dificultado a passagem da luz, logo, proporcionado a ineficiência da IFD para *Pseudomonas aeruginosa* não é verdadeira, já que com a retirada do FS do meio não houve redução expressiva do número de UFC/mL. Foi possível observar também que, as reduções encontradas com o microrganismo *Staphylococcus aureus* na presença do FS, não foram as mesmas quando retirado o FS antes da iluminação.

## 6. DISCUSSÃO

A inativação fotodinâmica (IFD) surgiu no campo clínico como uma potencial alternativa para antibióticos no tratamento de infecções microbianas. A abordagem da IFD baseia-se no conceito de TFD, que compreende a ação de três componentes: um agente fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz com um comprimento de onda apropriado e oxigênio (TAVARES *et al.*, 2010). São considerados dois mecanismos de oxidação para inativação das células-alvo. No tipo I o fotossensibilizador ativado pode reagir a moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou de hidrogênio, levando assim à produção de radicais livres enquanto o tipo II envolve transferência de energia do estado tripleto do oxigênio molecular para produzir oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Ambos os processos levam à formação de espécies reativas de oxigênio capazes de alterar irreversivelmente componentes vitais das células, resultando em dano letal oxidativo (ROSA e CRUTCHLEY, 2002; BAGNATO, 2008; TAVARES *et al.*, 2010; MANTAREVA *et al.*, 2011). Uma das principais características da IFD é a falta de desenvolvimento de mecanismos de resistência, em função do modo de ação (TAVARES *et al.*, 2010).

O tempo de incubação analisado neste trabalho é de suma importância para a eficaz ação da IFD. A incubação do FS com o microrganismo é processo necessário para que haja a interação entre eles, ou seja, a penetração do FS na parede do microrganismo.

A composição e formação da parede celular se distinguem de um microrganismo para outro, por isso a concentração e o tempo que o FS leva para adentrar à célula microbiana também é diferente. Com os resultados obtidos neste trabalho podemos observar que a concentração necessária do FS curcumina para atingir a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* é menor do que a concentração necessária para a inativação da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Isto é explicado pela diferente composição de parede dos microrganismos utilizados.

As bactérias Gram-positivas possuem a parede celular mais espessa, formada basicamente por peptidoglicano, por ácidos teicóicos e proteínas. Já as Gram-negativas possuem a parede celular mais complexa formada por uma camada de peptidoglicano e por uma membrana externa formada por dupla camada lipídica, o que confere a estas bactérias características muito peculiares quando comparadas às Gram-positivas. A membrana externa confere às Gram-negativas uma barreira hidrofóbica adicional dificultando a entrada de algumas substâncias como antibióticos, detergentes, metais pesados, sais de bile, enzimas



digestivas e alguns corantes (WALKER, 2002; TORTORA *et al.*, 2005; TRABULSI *et al.*, 2005; LEVINSON, 2010).

Os resultados obtidos com o microrganismo *S. aureus* mostraram que para as concentrações 0,1 ; 0,25 ; 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  do FS curcumina na IFD o melhor tempo de incubação foi o de 30 minutos, seguido do tempo de 0 minuto, exceto para a concentração de 1  $\mu\text{M}$ , onde o segundo melhor tempo de incubação foi o de 15 minutos. A menor redução do número de UFC/mL foi utilizando o tempo de 5 minutos de incubação para as concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{M}$ . Já para as concentrações de 0,25 e 0,5  $\mu\text{M}$  do FS curcumina na IFD a menor redução do número de UFC/mL foi utilizando o tempo de 15 minutos.

Percebeu-se uma semelhança de comportamento nas concentrações 0,1 ; 0,25 e 0,5  $\mu\text{M}$ , que seguem uma regularidade de resultados, ou seja, uma redução com o tempo de incubação 0 minutos, seguido de um aumento com os tempos de 5 e 15 minutos, depois uma diminuição com o tempo de 30 minutos de incubação.

Os resultados obtidos com a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  do FS na IFD com o tempo de incubação de 30 minutos foram semelhantes aos encontrados utilizando a concentração de 0,25  $\mu\text{M}$  do FS na IFD utilizando o tempo 0 minuto. Isto indica que para alguns casos é possível optar pelo uso de uma menor concentração do FS com um maior tempo de incubação e obter o mesmo resultado de uma maior concentração de FS com menor tempo de incubação. O mesmo ocorre com as outras concentrações e tempos. Como por exemplo, a concentração de 0,25  $\mu\text{M}$  do FS associada ao tempo de 30 minutos obteve um resultado semelhante à concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  com tempo de incubação de 0 minuto; assim como para a concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  com tempo de incubação de 30 minutos observa-se resultado semelhante ao encontrado quando se utiliza a concentração de 1  $\mu\text{M}$  com tempo 0 de incubação.

Com os resultados obtidos é possível dizer que, avaliar o tempo de incubação auxilia na terapêutica, optando pela melhor concentração do FS unida ao tempo de incubação, atendendo assim à necessidade de cada caso. Utilizando concentrações menores do FS, portanto menos tóxicas, associadas a maiores tempos de incubação é possível obter resultados semelhantes aos encontrados quando utilizadas concentrações maiores com tempos menores de incubação.

Alguns trabalhos comprovam a eficácia da IFD para a inativação de bactérias Gram-positivas, como o *S. aureus*. Por exemplo, MIYABE *et al.* (2011) comprovaram o efeito da IFD utilizando cepas de *S. aureus* e outras isoladas da cavidade oral de humanos. Utilizaram como FS o azul de metileno (AM), fonte de luz de 660 nm e como comparação o antibiótico

ciprofloxacina. Obtiveram uma redução total de 6.29 log<sub>10</sub> UFC/mL em comparação com o grupo controle. O uso do antibiótico ciprofloxacina foi eficaz em todos os isolados, exceto para *S. schleiferi*, contudo se mostrou sensível a IFD com uma redução de 6.83 log<sub>10</sub> UFC/mL, sugerindo a IFD como tratamento alternativo para cepas resistentes a antibióticos.

RIBEIRO *et al.* (2012) avaliaram a efetividade da curcumina em *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) e resistente a meticilina (MRSA). Utilizaram luz LED no comprimento de onda de 455 nm. O FS foi incubado por 20 minutos antes da irradiação. Neste trabalho os autores concluíram que a curcumina é eficiente na IFD de MRSA.

Para microrganismos Gram-negativos, alguns trabalhos demonstram a dificuldade de utilizar a IFD eficazmente, sendo necessário pesquisar mais sobre método de ação do FS curcumina e de outros FSs.

Bactérias Gram-negativas parecem produzir porfirinas diferentes das bactérias Gram-positivas, o que pode influenciar na resposta a IFD (FOTINOS *et al.*, 2008). Em geral, acredita-se que os agentes neutros ou aniônicos dos FS podem se ligar e inativar bactérias Gram-positivas, mas apenas se ligam à membrana externa das Gram-negativas (HAMBLIN *et al.*, 2004).

Apesar das concentrações utilizadas do FS curcumina serem mais elevadas para inativar *P. aeruginosa* do que as concentrações utilizadas para o microrganismo *S. aureus*, foram obtidos apenas 2 logs de redução nas maiores concentrações como 25 e 50 µM.

O melhor tempo de incubação foi o de 30 minutos para todas as concentrações e percebeu-se uma linearidade dos resultados dependente do tempo. Ou seja, quanto maior o tempo de incubação maior a redução do número de UFC/mL.

As concentrações 25 e 50 µM tiveram resultados aparentemente semelhantes quanto à redução do número de UFC/mL. Foi proposto que pelo fato das concentrações serem elevadas, sendo assim menos translúcidas, houvesse uma interferência na passagem da luz resultando em reduções insatisfatórias. Por isso foi realizado um segundo teste onde foi retirado o FS do meio antes da iluminação e, com os resultados obtidos, não foi observada reduções expressivas no número de UFC/mL. É possível interpretar que não há ligação ou penetração do FS com o microrganismo, pois o mesmo foi excluído com o processo de centrifugação e ressuspensão.

WARDLAW *et al.* (2011) avaliaram, *in vitro*, a efetividade da IFD na inativação de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos. Utilizaram como FS o ácido aminolevulínico (ALA). Os autores concluíram que a IFD foi mais eficaz com

bactérias Gram-positivas e que são necessários estudos para melhorar a eficácia em bactérias Gram-negativas.

HUANG *et al.* (2010) afirmaram que as espécies de bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa*, são muito mais difíceis de inativar por IFD do que bactérias Gram-positivas, *S. aureus*. Apesar de todas as espécies de bactérias Gram-negativas serem mais resistentes a IFD de espécies Gram-positivas, *P. aeruginosa*, em particular, é uma das mais resistentes. Os autores concluíram que concentrações de AM muito mais baixas do que 1 mM foram ineficazes na IFD sob quaisquer condições, porém quando utilizaram o AM com lavagem por centrifugação e resuspensão, foi possível obter morte dependente da dose de luz. Foi necessária dose relativamente alta (320 J/cm<sup>2</sup>) para reduzir 5 logs. Quando a suspensão bacteriana não foi lavada esta morte não foi observada. Os autores sugeriram que a explicação para tal fato é que o FS livre em solução atuou como um escudo óptico e impediu a luz de atingir a bactéria e realizar a inativação.

Apesar de HUANG e colaboradores (2010) terem concluído que o processo de retirada do FS seja essencial para efetividade da IFD, com este trabalho não foi obtido o mesmo resultado, pelo contrário, as reduções não foram expressivas tanto para o microrganismo *S. aureus*, quanto para o microrganismo *P. aeruginosa*. Sendo que sem a retirada do FS foram observadas reduções significativas com o microrganismo *S. aureus*.

A presença da membrana externa nas bactérias Gram-negativas como a *Pseudomonas aeruginosa*, utilizada neste trabalho, pode ser a justificativa para a menor efetividade da IFD nestes microrganismos. E como foi apresentado nas revisões de literatura os microrganismos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* é sensível a IFD, sendo de fácil inativação.

## 7. CONCLUSÃO

Este estudo comprovou que a curcumina, utilizada como FS, não possui efeitos citotóxicos sem a associação da luz nas concentrações estudadas para ambos os microrganismos, pois não houve redução do número de UFC/mL. Assim como o uso isolado da luz no comprimento de onda de 460 nm com fluência de 30 J/cm<sup>2</sup> não possui efeito fototóxico para ambos os microrganismos.

O tempo de incubação do FS com o microrganismo influi diretamente no resultado da efetividade da IFD, variando de acordo com cada microrganismo e suas diferenças estruturais. O microrganismo Gram-positivo *S. aureus* é mais sensível à IFD com FS curcumina do que o microrganismo Gram-negativo *P. aeruginosa*, o que pode ser justificado pela diferente composição de parede de cada um.

A retirada do FS do meio influi diretamente na efetividade da IFD, pois com este trabalho foi possível observar que sem o FS presente não houve reduções expressivas em ambos os microrganismos, nas concentrações escolhidas e tempos de incubação utilizados.

Com este trabalho foi possível concluir que levando em conta o tempo de incubação do FS e o microrganismo, pode-se utilizar uma maior concentração do FS associando um tempo menor de incubação, sendo o mesmo resultado encontrado se for utilizada uma concentração menor do FS associado a um tempo maior de incubação. Sendo assim, pode-se variar a terapêutica de acordo com a necessidade de cada infecção, paciente ou local acometido.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, Lúcia P.; Caracterização de Pigmentos da *Curcuma longa* L., Avaliação da atividade antimicrobiana, Morfogênese in vitro na produção de curcuminóides e óleos essenciais. Monografia de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2006.
2. BAGNATO, V.S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. São Paulo: Livraria da Física, 2008. 239 p.
3. BARON, S. *Staphylococcus*. In: PEAKE, R. C. et al. (Eds.). **Medica Microbiology**. Galveston: The University of Texas Medical Branch, 1996.
4. BECERRA, M.C.; SAMIENTO, M.; PÁEZ, P.L.; ARGUELLO, G.; ALBESA, I. Light effect and reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.76, p. 13-18, 2004.
5. BLACK, J. G. Microbiology - principles and explorations, 7ª edição. USA: Editora Wiley, 2008.
6. BRUZELL, E.M.; MORISBAK, E.; TONNESEN, H.H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v. 4, p. 523-530, 2005.
7. CALIN, M. A.; PARASCA, S. V. Light Sources for Photodynamic Inactivation of Bacteria. **Lasers Med Sci**. v.24, p. 453-460, 2009.
8. CASSIDY, C.M.; TUNNEY, M.M.; McCARRON, P.A.; DONNELLY, R.F. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: From benchtop to clinical practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 95, p. 71-80, 2009.
9. ÇIKRIKÇI, S.; MOZIOGLU, E.; YILMAZ, H. Biological Activity of Curcuminoids Isolated from *Curcuma longa*. **Records of Natural Products**. v.2, n.1, p. 19-24, 2008.
10. DAHL, T.A., McGOWAN, W.M., SHAND, M.A., SRINIVASAN, V.S. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. **Arch Microbiol**, v. 151, n.2, p. 183- 185, 1989.
11. DOVIGO, L.N., PAVARINA, A.C.; RIBEIRO, A.P.D.; BRUNETTI, I.L.; COSTA, C.A.S.; JACOMASSI, D.P.; BAGNATO, V.S.; KURACHI, C. Investigation of Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. **Photochemistry and Photobiology**. v. 87, p. 895-903, 2011.
12. FOTINOS, N.; CONVERT, M.; PIFFARETTI, J.C.; GURNY, R.; LANGE, N. Effects on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria Mediated by 5-Aminolevulinic Acid and 5 Aminolevulinic Acid Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, no. 4, p. 1366-1373, 2008.

13. HAMBLIN, M.R.; ZAHRA, T.; CONTAG, C.H.; MCMANUS, A.T.; HASAN, T. Optical Monitoring and Treatment of Potentially Lethal Wound Infections In Vivo. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 187, no. 11, p. 1717-1725, 2003.
14. HAMBLIN, M. R.; HANSAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v. 3, no. 5, p. 436-450, 2004.
15. HAUKVIK, T.; BRUZELL, E.; KRISTENSEN, S.; TONNESEN, H. H. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**. v. 64, p. 666-673, 2009.
16. KHARKWAL, G.B.; SHARMA, S.K.; HUANG, Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 43, p. 755-767, 2011.
17. HEGGE, A.B.; ANDERSEN, T.; MELVIK, J.E.; KRISTENSEN, S.; TØNNESEN, H.H. Evaluation of Novel Alginate Foams as Drug Delivery Systems in Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) of Infected Wounds—An In Vitro Study: Studies on Curcumin and Curcuminoides XL. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 99, no. 8, 2010.
18. HUANG, L.; DAI, T.; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections. **Methods Mol Biol**. v. 635, p. 155-173, 2010.
19. HUANG, L.; XUAN, Y.; KOIDE, Y.; ZHIYENTAYEV, T.; TANAKA, M.; HAMBLIN, M.R. Type I and Type II Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Therapy: An In Vitro Study on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 44, p. 490-499, 2012.
20. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5ª edição. Rio de Janeiro. MESDI Editora Médica e Científica Ltda, 2001.
21. LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.
22. MAISCH, T. Anti-Microbial Photodynamic Therapy: Useful in the future?. **Lasers Med Sci**. v. 22, p. 83-91, 2007.
23. MANTAREVA, V.; KUSSOVSKI, V.; ANGELOV, I.; WHÖRLE, D.; DIMITROV, R.; POPOVA, E.; DIMITROV, S. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v. 10, p. 91-102, 2011.
24. MARTINS, C.R.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N.; RIBEIRO, A.P.D.; BRUNETTI, I.L.; GIAMPAOLO, E.T. Avaliação *in vitro* da efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na inativação de *Staphylococcus aureus*. Faculdade de Odontologia de Araraquara. PIBIC/CNPq.

25. MIYABE, M.; JUNQUEIRA, J.C.; COSTA, A.C.B.P.; JORGE, A.O.C.; RIBEIRO, M.S.; FEIST, I.S. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp. **Brazilian Oral Research**. v. 25, no. 3, p. 230-234, 2011.
26. MUELLER, G.; WALDECK, W.; BRAUN, K. From green to red – To more dead? Autofluorescent proteins as photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 98, p. 95-98, 2009.
27. O'RIORDAN, K.; AKILOVE, O. E.; CHANG, S. K.; FOLEY, J. W.; HASAN, T. Real-time fluorescence monitoring of phenothiazinium photosensitizers and their antimycobacterial photodynamic activity against *Mycobacterium bovis* BCG in in vitro and in vivo models of localized infection. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 6, p. 1117-1123, 2007.
28. PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Biosciences**. v. 33, no. 2, p. 231-237, 2008.
20. RIBEIRO, A.P.D.; PAVARINA, A.C.; DOVIGO, L.N.; BRUNETTI, I.L.; BAGNATO, V.S.; VERGANI, C.E.; COSTA, C.A.S. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. **Lasers in medical science**. 2012.
30. RONSEIN, G.E.; Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas; **Quím. Nova** v.29 no.3. São Paulo May/June, 2006.
31. ROSA, M.; CRUTCHLEY, R. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 233, p. 351-371, 2002.
32. SALMON-DIVION, M., NITZAN, Y., MALIK, Z. Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-mesoN-methylpyridylporphine. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, p.423-429, 2004.
33. SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia - Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.
34. STERNBERG, E., DOLPHIN, D. "Pyrrolic Photosensitizers ", **Curr. Med. Chem.**, v. 3, p. 239-272, 1996.
35. STREET, C.N.; GIBBIS, A.; PEDIGO, L.; ANDERSEN, D.; LOEBEL, N.G. *In Vitro* Photodynamic Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in Planktonic and Biofilm Culture. **Photochemistry and Photobiology**. v. 85, p. 137-143, 2009.
36. TAVARES, A.; CARVALHO, C.M.B.; FAUSTINO, M.A.; NEVES, M.G.P.M.S.; TOMÉ, J.P.C.; TOMÉ, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; CUNHA, A.; GOMES, N.C.M.; ALVES, E.; ALMEIDA, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. **Marine Drugs**. v. 8, p. 91-105, 2010.

37. TEITEN, M.H.; EIFES, S.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Curcumin—The Paradigm of a Multi-Target Natural Compound with Applications in Cancer Prevention and Treatment. **Toxins**. v. 2, p. 128-162, 2010.
38. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.
39. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
40. WAINWRIGHT, M. The emerging chemistry of blood product disinfection. **Chem. Soc. Ver.**, v.31, p. 128-136, 2002.
41. WALKER, T.S. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2002.
42. WARDLAW, J.L.; SULLIVAN, T.J.; LUX, C.N.; AUSTIN, F.W. Photodynamic therapy against common bacteria causing wound and skin infections. **The Veterinary Journal**. v. 192, no. 3, p. 374-377, 2011.



## 9. APÊNCIDE 1

A proposta inicial deste trabalho foi avaliar o tempo de incubação do fotossensibilizador (FS) sal de curcumina (N-Metil-D-Glucominato de Curcumina) a 31,8% com os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na Inativação Fotodinâmica (IFD). O sal de curcumina, produzido pela PDT Pharma (Ribeirão Preto – SP – Brasil), foi obtido através do extrato da *Curcuma longa L.* A escolha da solução do sal de curcumina como FS foi justificada pela fácil solubilidade em água.

Os primeiros experimentos foram realizados com o microrganismo *S. aureus*, e com altas concentrações do FS, porém houve redução do número de microrganismo sem a presença da luz, caracterizando citotoxicidade do FS. Em seguida foram realizados outros experimentos na tentativa de encontrar concentrações ideais para a continuidade do trabalho. As concentrações 400, 500 e 800 µg/mL foram escolhidas como parâmetro de acordo com os resultados encontrados e apresentados na Figura 10.

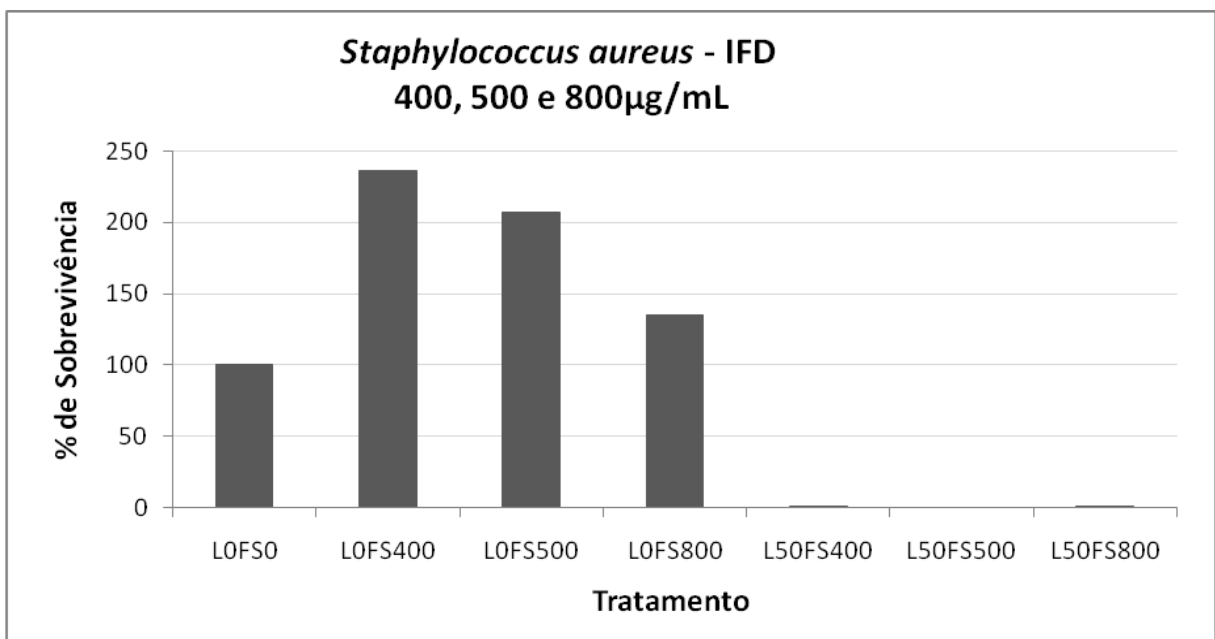


Figura 10. Porcentagem de sobrevivência de *S. aureus* na IFD com dose de luz de 50 J/cm<sup>2</sup> e concentrações de 400, 500 e 800 µg/mL de sal de curcumina (L50FS400, L50FS500 e L50FS800), sal de curcumina na ausência de luz (L0FS400, L0FS500 e L0FS800) e controle (L0FS0).

As concentrações do FS na ausência da luz (L0FS800 e L0FS400) não reduziram a quantidade de microrganismo e, na presença da luz na dose de 50 J/cm<sup>2</sup> reduziram 99,22%, por isso serviram de parâmetro para a escolha das demais concentrações.

A partir destes resultados foi escolhida uma concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$ , na qual se avaliou o tempo de incubação (Figura 11) e o processo de lavagem do FS antes da iluminação (Figura 12).

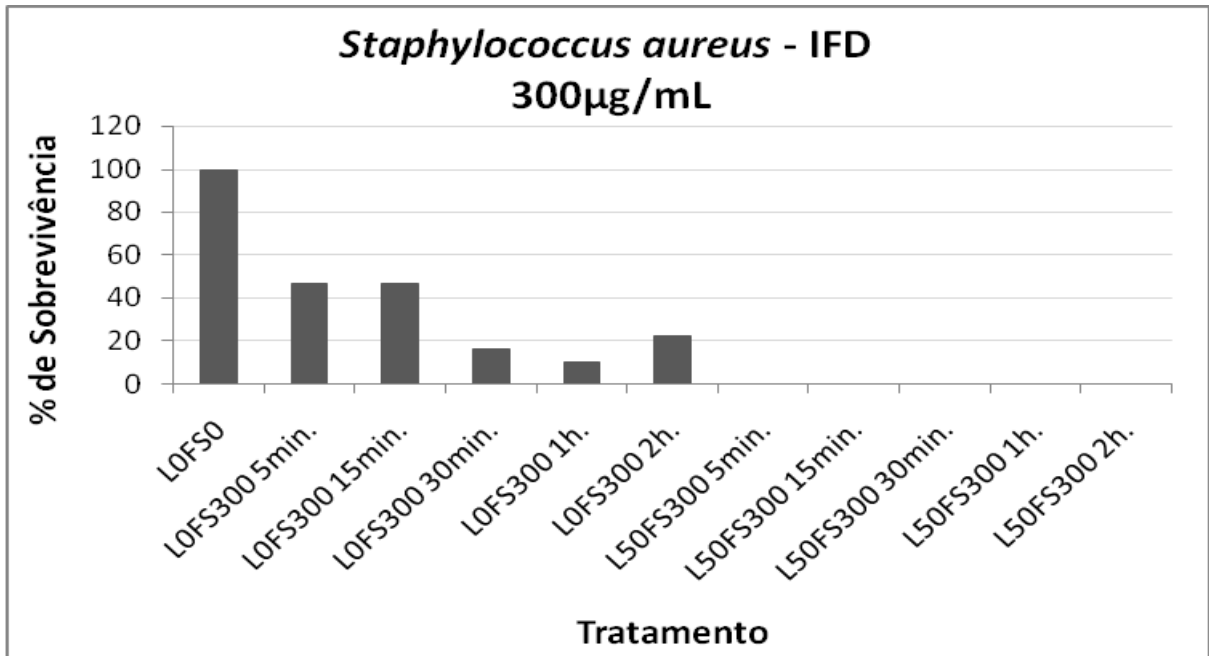


Figura 11. Porcentagem de sobrevivência de *S. aureus* na IFD com dose de luz de 50  $\text{J/cm}^2$  com concentrações de 300  $\mu\text{g/mL}$  de sal de curcumina e tempos de incubação de 5, 15 e 30 minutos e 1 e 2 horas (L50FS3005min., 15min., 30min., 1h. e 2h) sal de curcumina na ausência de luz e tempos de incubação de 5, 15, 30 minutos e 1 e 2 horas (LOFS3005min., 15min., 30min., 1h. e 2h.) e controle (LOFS0).

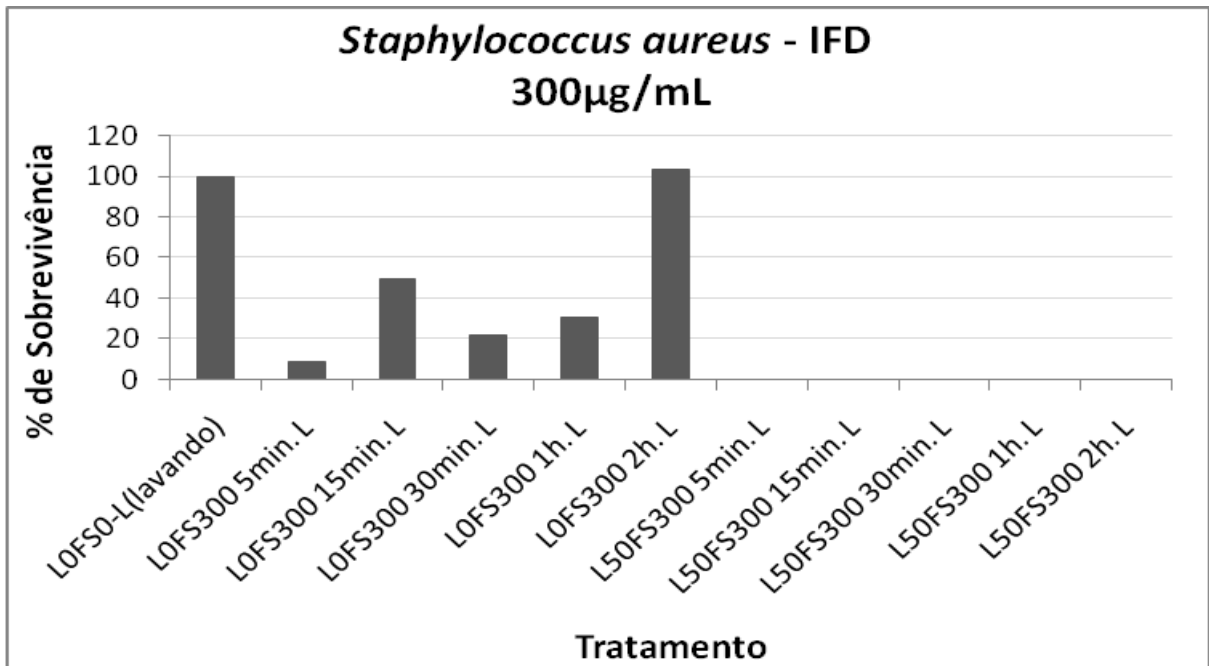


Figura 12. Porcentagem de sobrevivência de *S. aureus* na IFD com dose de luz de 50 J/cm<sup>2</sup> com concentrações de 300 µg/mL de sal de curcumina lavando o FS antes da iluminação, tempos de incubação de 5, 15 e 30 minutos e 1 e 2 horas (L50FS3005min.L, 15min.L, 30min.L, 1h.L e 2h.L) sal de curcumina na ausência de luz e tempos de incubação de 5, 15, 30 minutos e 1 e 2 horas (L0F3005min.L, 15min.L, 30min.L, 1h.L e 2h.L) e controle (LOFS0-L).

Com estes experimentos foi notado que havia irregularidade de resultado, pois as concentrações de 400, 500 e 800 µg/mL na ausência da luz não reduziram o número de microrganismo e a concentração de 300 µg/mL na ausência da luz reduziu a porcentagem de sobrevivência, caracterizando uma instabilidade do FS. Diante destes resultados foi suspeitado que o sal de curcumina estivesse degradado. Foi recebida uma nova alíquota do FS para novos testes, e novas concentrações foram determinadas. Foi testada a concentração de 100 µg/mL, a qual não reduziu o número de microrganismos na ausência da luz. A partir deste resultado foram testadas as concentrações 25 e 50 µg/mL (Figura 13).

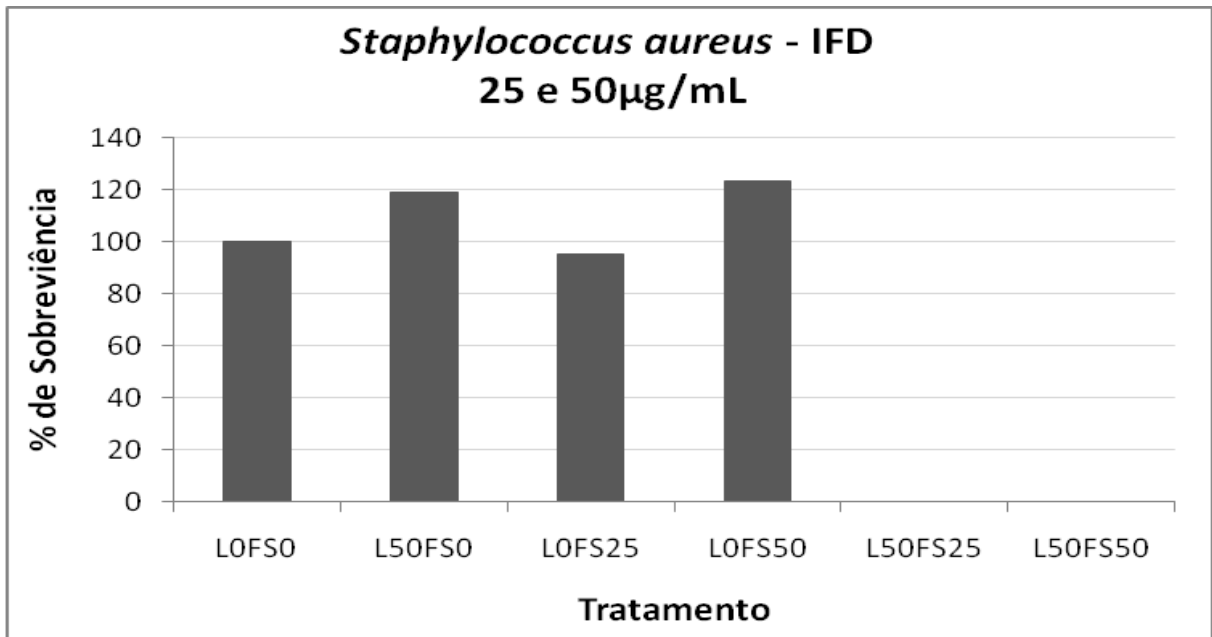


Figura 13. Porcentagem de sobrevivência de *S. aureus* na IFD com dose de luz de 50 J/cm<sup>2</sup> e concentrações de 25 e 50 µg/mL de sal de curcumina (L50FS21 e L50FS50), sal de curcumina na ausência de luz (LOFS25 e LOFS50), controle (LOFS0) e controle da luz (L50FS0).

Com a confirmação de que o FS nas concentrações de 25 e 50 µg/mL não reduzem o número de microrganismos na ausência da luz, foram escolhidas as concentrações 12, 25 e 50 µg/mL. A dose de luz foi diminuída para que houvesse menor redução na IFD, auxiliando assim, a avaliação do tempo de incubação.

Escolhidas as concentrações, os testes foram realizados para avaliar o tempo de incubação (Figura 14) e o processo de lavagem (Figura 15)

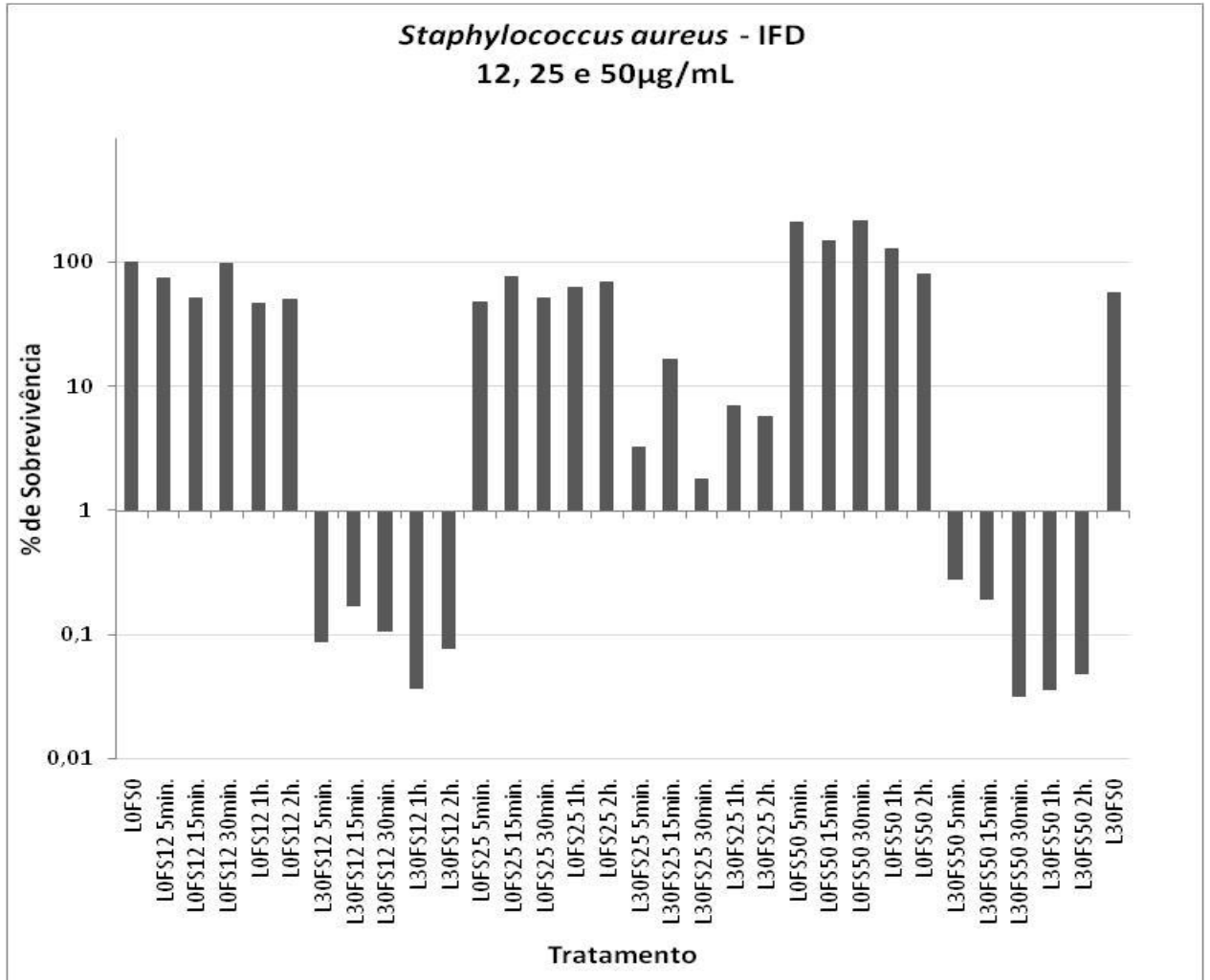


Figura 14. Porcentagem de sobrevivência de *S. aureus* na IFD com dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup> com concentrações de 12, 25 e 50 µg/mL de sal de curcumina lavando, tempos de incubação de 5, 15 e 30 minutos e 1 e 2 horas, sal de curcumina na ausência de luz, controle e controle da luz. L representa luz e FS fotossensibilizador.

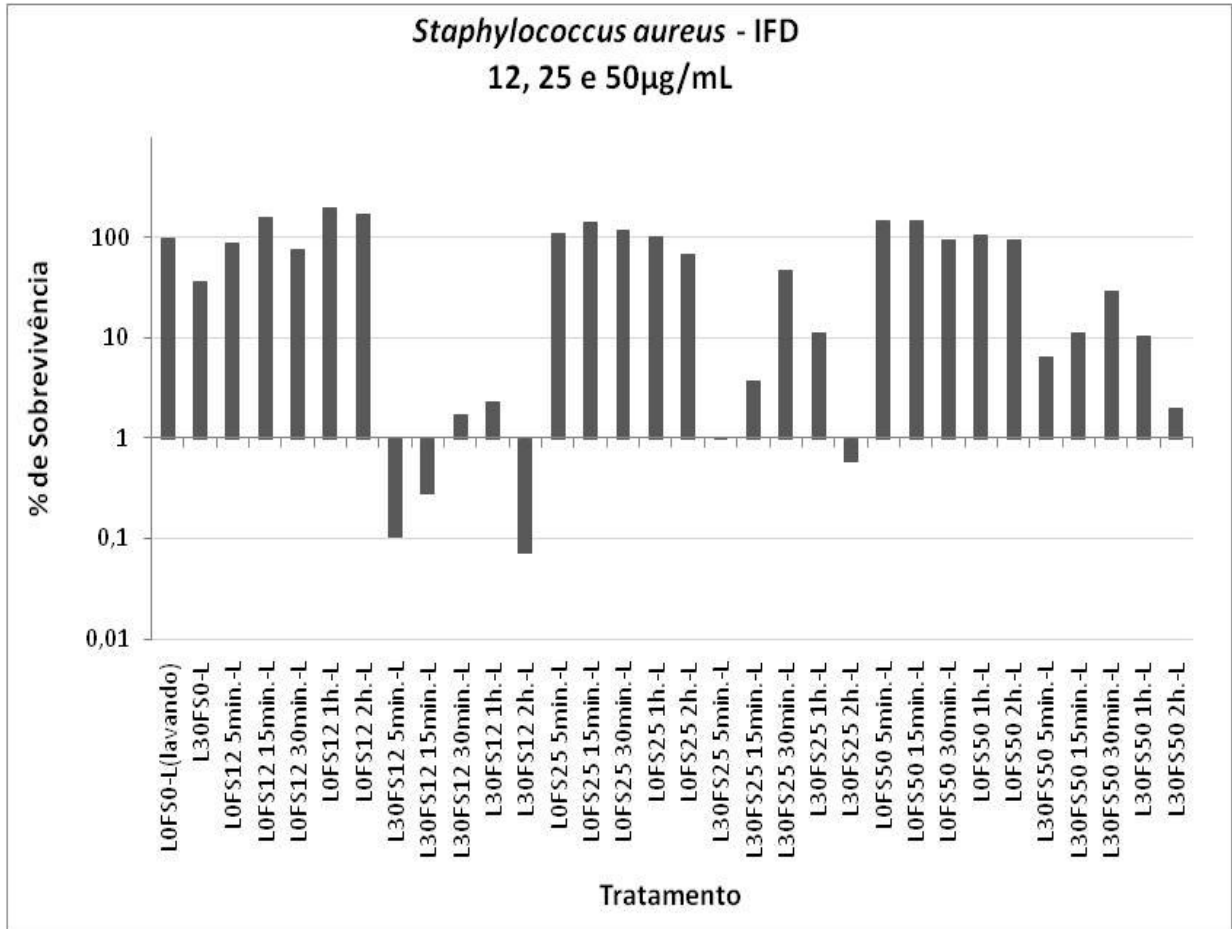


Figura 15. Porcentagem de sobrevivência de *S. aureus* na IFD com dose de luz de 30 J/cm<sup>2</sup> com concentrações de 12, 25 e 50 µg/mL de sal de curcumina lavando o FS antes da iluminação, tempos de incubação de 5, 15 e 30 minutos e 1 e 2 horas, sal de curcumina na ausência de luz, controle e controle da luz. L representa luz, FS fotossensibilizador e -L lavando.

Com os resultados encontrados, foi concluído que se tratava de um FS instável, pois os primeiros testes não reduziram o número de microrganismos na ausência da luz e nestes testes houve reduções.

Diante destas problemáticas foi definida a troca do sal de curcumina pela curcumina (Sigma-Aldrich) por ter maior pureza e estabilidade. Porém este FS não possui a solubilidade em água como o sal de curcumina, obrigando o uso do DMSO para sua solubilização. Então foi determinada uma concentração limite de 1% de DMSO na diluição da curcumina. Os testes foram iniciados com o microrganismo *S. aureus*. O microrganismo se mostrou sensível a IFD quando utilizada esta curcumina como FS, pois foi trabalhado em baixas concentrações, para que não houvesse redução total e, assim, fosse observada a influência do tempo de incubação. As concentrações escolhidas foram baseadas em trabalhos já publicados com o FS curcumina e o microrganismo *S. aureus*.

Posteriormente foi realizado um teste piloto para determinação das concentrações do FS para o microrganismo *P. aeruginosa*. Como se tratava de um microrganismo já conhecido como mais resistente que o *S. aureus* à FSs, foram testadas concentrações mais elevadas, porém dentro do limite de solubilização da curcumina. A partir dos resultados foram definidas as concentrações utilizadas no presente trabalho.

## 10. APÊNDICE 2



Tabela 2: Teste de Tukey para Múltiplas Comparações para *Staphylococcus aureus*

**Teste de Tukey para a interação Concentração\*Tempo**  
**Pr> |t| para  $H_0$ : Média(i)=Média(j)**

$\mu\text{M}/\text{min}$	0,1/0	0,1/5	0,1/15	0,1/30	0,25/0	0,25/5	0,25/15	0,25/30	0,5/0	0,5/5	0,5/15	0,5/30	1/0	1/5	1/15	1/30
<b>0,1/0</b>		0.9961	0.9999	0.0439	0.1153	0.9980	1.0000	<.0001	<.0001	0.0105	0.0213	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>0,1/5</b>	0.9961		1.0000	0.0004	0.0017	0.4925	0.9927	<.0001	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>0,1/15</b>	0.9999	1.0000		0.0016	0.0057	0.7273	0.9997	<.0001	<.0001	0.0003	0.0006	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>0,1/30</b>	0.0439	0.0004	0.0016		1.0000	0.6028	0.0559	0.9603	0.4459	1.0000	1.0000	<.0001	<.0001	0.0008	<.0001	<.0001
<b>0,25/0</b>	0.1153	0.0017	0.0057	1.0000		0.8292	0.1417	0.8356	0.2340	1.0000	1.0000	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001
<b>0,25/5</b>	0.9980	0.4925	0.7273	0.6028	0.8292		0.9991	0.0109	0.0003	0.3000	0.4358	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>0,25/15</b>	1.0000	0.9927	0.9997	0.0559	0.1417	0.9991		0.0001	<.0001	0.0139	0.0278	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>0,25/30</b>	<.0001	<.0001	<.0001	0.9603	0.8356	0.0109	0.0001		0.9999	0.9982	0.9901	0.0122	0.0201	0.1745	0.0021	0.0011
<b>0,5/0</b>	<.0001	<.0001	<.0001	0.4459	0.2340	0.0003	<.0001	0.9999		0.7581	0.6133	0.1776	0.2466	0.7595	0.0502	0.0298
<b>0,5/5</b>	0.0105	<.0001	0.0003	1.0000	1.0000	0.3000	0.0139	0.9982	0.7581		1.0000	0.0001	0.0002	0.0044	<.0001	<.0001
<b>0,5/15</b>	0.0213	0.0002	0.0006	1.0000	1.0000	0.4358	0.0278	0.9901	0.6133	1.0000		<.0001	<.0001	0.0020	<.0001	<.0001
<b>0,5/30</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0122	0.1776	0.0001	<.0001		1.0000	0.9999	1.0000	1.0000
<b>1/0</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0201	0.2466	0.0002	<.0001	1.0000		1.0000	1.0000	1.0000
<b>1/5</b>	<.0001	<.0001	<.0001	0.0008	0.0002	<.0001	<.0001	0.1745	0.7595	0.0044	0.0020	0.9999	1.0000		0.9913	0.9740
<b>1/15</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0021	0.0502	<.0001	<.0001	1.0000	1.0000	0.9913		1.0000
<b>1/30</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0011	0.0298	<.0001	<.0001	1.0000	1.0000	0.9740	1.0000	

*Número em vermelho: os resultados apresentam diferenças estatísticas de  $p < 0,05$ .*

Tabela 3: Teste de Tukey para Múltiplas Comparações para *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Teste de Tukey para a interação Concentração*Tempo</b>																
<b>Pr &gt;  t  para <math>H_0</math>: Média(i)=Média(j)</b>																
<b>μM/min</b>	<b>1/0</b>	<b>1/5</b>	<b>1/15</b>	<b>1/30</b>	<b>10/0</b>	<b>10/5</b>	<b>10/15</b>	<b>10/30</b>	<b>25/0</b>	<b>25/5</b>	<b>25/15</b>	<b>25/30</b>	<b>50/0</b>	<b>50/5</b>	<b>50/15</b>	<b>50/30</b>
<b>1/0</b>		1.0000	0.9672	0.9997	1.0000	0.9643	0.9577	0.3808	0.1129	<.0001	<.0001	<.0001	0.1622	<.0001	<.0001	<.0001
<b>1/5</b>	1.0000		0.9917	1.0000	1.0000	0.9024	0.8894	0.2501	0.0621	<.0001	<.0001	<.0001	0.0931	<.0001	<.0001	<.0001
<b>1/15</b>	0.9672	0.9917		1.0000	0.8853	0.1109	0.1018	0.0041	0.0004	<.0001	<.0001	<.0001	0.0008	<.0001	<.0001	<.0001
<b>1/30</b>	0.9997	1.0000	1.0000		0.9959	0.3952	0.3735	0.0306	0.0045	<.0001	<.0001	<.0001	0.0077	<.0001	<.0001	<.0001
<b>10/0</b>	1.0000	1.0000	0.8853	0.9959		0.9940	0.9923	0.5782	0.2189	<.0001	<.0001	<.0001	0.2962	<.0001	<.0001	<.0001
<b>10/5</b>	0.9643	0.9024	0.1109	0.3952	0.9940		1.0000	0.9997	0.9684	0.0006	<.0001	<.0001	0.9869	<.0001	<.0001	<.0001
<b>10/15</b>	0.9577	0.8894	0.1018	0.3735	0.9923	1.0000		0.9998	0.9737	0.0007	<.0001	<.0001	0.9895	<.0001	<.0001	<.0001
<b>10/30</b>	0.3808	0.2501	0.0041	0.0306	0.5782	0.9997	0.9998		1.0000	0.0282	<.0001	<.0001	1.0000	0.0001	<.0001	<.0001
<b>25/0</b>	0.1129	0.0621	0.0004	0.0045	0.2189	0.9684	0.9737	1.0000		0.1374	<.0001	<.0001	1.0000	0.0015	<.0001	<.0001
<b>25/5</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0006	0.0007	0.0282	0.1374		0.2512	0.0003	0.0943	0.9917	0.2864	0.0007
<b>25/15</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.2512		0.7806	<.0001	0.9833	1.0000	0.9066
<b>25/30</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0003	0.7806		<.0001	0.0417	0.7402	1.0000
<b>50/0</b>	0.1622	0.0931	0.0008	0.0077	0.2962	0.9869	0.9895	1.0000	1.0000	0.0943	<.0001	<.0001		0.0008	<.0001	<.0001
<b>50/5</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0001	0.0015	0.9917	0.9833	0.0417	0.0008		0.9891	0.0867
<b>50/15</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.2864	1.0000	0.7402	<.0001	0.9891		0.8806
<b>50/30</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0007	0.9066	1.0000	<.0001	0.0867	0.8806	

Número em vermelho: os resultados apresentam diferenças estatísticas de  $p < 0,05$ .