

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Beatriz Müller Nunes Souza

Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana com photodithazine® sobre *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA): estudos em biofilmes e modelo experimental de *Galleria mellonella*.

São José dos Campos
2022

Beatriz Müller Nunes Souza

Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana com photodithazine® sobre *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA): estudos em biofilmes e modelo experimental de *Galleria mellonella*.

Defesa de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, 2021.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Juliana Ferreira Strixino
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Juliana Guerra Pinto

São José dos Campos
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Souza, Beatriz Müller Nunes
Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana com photodithazine® sobre Staphylococcus aureus resistente à Meticilina (MRSA) : estudos em biofilmes e modelo experimental de Galleria mellonella / Beatriz Müller Nunes Souza; orientadora, Juliana Ferreira Strixino; co-orientadora Juliana Guerra Pinto. - São José dos Campos, SP, 2022.
1 CD-ROM, 89 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências


1. Engenharia Biomédica. 2. terapia fotodinâmica. 3. bactérias gram-positivas. 4. Meticilina. 5. Clorina. I. Strixino, Juliana Ferreira, orient. II. Pinto, Juliana Guerra, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Beatriz Müller Nunes Souza, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 21 de Junho de 2022.



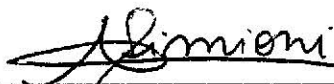
Autor(a) da Obra

BEATRIZ MÜLLER NUNES SOUZA

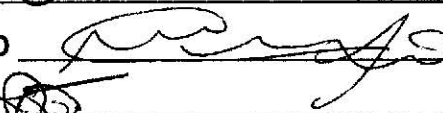
“EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM PHOTODITHAZINE® SOBRE *S. aureus* RESISTENTE Á METICILINA (MRSA): ESTUDOS EM BIOFILMES E MODELO EXPERIMENTAL EM *Galleria mellonella*”.

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.ª DR.ª ANDREZA RIBEIRO SIMIONI



PROF.ª DR.ª JULIANA FERREIRA STRIXINO



PROF.ª DR.ª JULIANA GUERRA PINTO



PROF.ª DR.ª JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA – UNESP



PROF.ª DR.ª CRISTINA PACHECO SOARES



PROF. DR. ALEJANDRO GUILERMO MINÂN – Conicet-unip



Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 24 de fevereiro 2022.

AGRADECIMENTOS

A realização da dissertação de Mestrado apresentada não seria possível sem o apoio de diversas pessoas. Agradeço primeiramente a UNIVAP pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Juliana Ferreira Strixino e à minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a. Juliana Guerra Pinto, pela confiança desde a iniciação científica, pela paciência em todos os momentos e por todos os ensinamentos compartilhados que com certeza levarei para vida toda! Muito obrigada!

À minha mãe Marcia, que nunca mediu esforços para contribuir para minha educação, sempre me apoiou em todas as etapas da minha vida, me consolando em dias difíceis e me incentivando todos os dias. Sem você, eu não chegaria até aqui. Muito obrigada por tudo!

À minha irmã Danielle, por toda a paciência nessa difícil jornada. Muito obrigada por alegrar todos meus dias e me encorajar a ser uma pessoa melhor a cada dia. O amor que sinto por você é incondicional.

Ao meu pai Ricardo e à minha madrastra Rita, obrigada por acreditarem no meu sonho e sempre me motivarem a seguir em frente. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos.

À Prof.^a Dr.^a. Juliana Campos Junqueira e à Prof.^a Máira Terra Garcia pela contribuição com o estudo *in vivo*, por ceder o espaço para a execução dos experimentos, pelo tempo e paciência dedicados. Obrigada por todo conhecimento transmitido, foi um prazer poder trabalhar com vocês.

Aos professores do programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica, em especial ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva, Prof.^a Dr.^a Cristina Pacheco Soares, Prof.^a Dr.^a. Andreza Ribeiro Simioni, Prof.^a Dr.^a Marcília Silva Costa e Prof. Dr. Leandro José Raniero por ceder seus respectivos laboratórios, tempo e materiais para o presente estudo. Além de incentivar e me apoiar diariamente a seguir o caminho da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alejandro Guillermo Minân pela disponibilidade, ajuda e ensinamentos.

À todos os integrantes do grupo Fotobios, em especial às minhas amigas Isabelle, Juliana e Gabrielle pela ajuda diariamente e por seguir nossas jornadas juntas com muita parceria e amizade.

EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM PHOTODITHAZINE® SOBRE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA): ESTUDOS EM BIOFILMES E MODELO EXPERIMENTAL DE *Galleria mellonella*.

RESUMO

Infecções por *Staphylococcus aureus* são consideradas um grave problema de saúde, gerando altos índices de mortalidade. O tratamento convencional para essas infecções é feito por meio da administração de antibióticos, porém o uso indiscriminado destes fármacos pode selecionar microrganismos resistentes. Por este motivo, é necessário o desenvolvimento de alternativas para a antibioticoterapia, como a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) que se baseia em um método terapêutico que emprega um fotossensibilizador (FS) e uma fonte de luz com comprimento de onda adequado ao FS, capazes de interagir com o oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela inativação celular. O trabalho teve como objetivo analisar, *in vitro* e *in vivo*, a ação da TFDa com Photodithazine® (PDZ) em cepa de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Para o método *in vitro*, o biofilme de *S. aureus* foi incubado com PDZ nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante 15 minutos e a irradiação foi realizada com as fluências de 25, 50 e 100 J/cm^2 . Foram avaliadas a internalização do FS, a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), o metabolismo bacteriano, a aderência e a estrutura do biofilme por microscopia eletrônica de varredura, antes e após aplicação da terapia. No método *in vivo*, inicialmente a cepa foi inoculada em modelos de *Galleria mellonella* e após a aplicação da TFDa foi analisada curva de sobrevivência, escala de saúde, análise hemocitária e UFC/mL de *S. aureus* na hemolinfa. Nos resultados *in vitro*, foi observada a redução bacteriana nas diferentes concentrações de PDZ, destacando os parâmetros de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PDZ e 100 J/cm^2 . Já nos resultados *in vivo*, a TFDa aumentou a sobrevivência e estimulou o sistema imune das larvas de *G. mellonella* infectadas por *S. aureus*. A TFDa em ambos os métodos foi eficaz, demonstrando o potencial da terapia como uma alternativa no tratamento de infecções bacterianas por MRSA.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; bactérias gram-positivas; *staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA); clorina; modelo invertebrado.

EFFECTS OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY WITH PHOTODITHAZINE® ON METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA): STUDIES IN BIOFILMS AND EXPERIMENTAL MODEL OF *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus infections are considered a serious health problem, generating high mortality rates. Conventional treatment for these infections is done through the administration of antibiotics, but the indiscriminate use of these drugs can select resistant microorganisms. For this reason, it is necessary to develop alternatives for antibiotic therapy, such as Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), which is based on a therapeutic method that employs a photosensitizer (PS) and a source of light with adequate wavelength to PS, capable of interact with molecular oxygen forming reactive oxygen species, responsible for cell inactivation. The objective of this study was to analyze, *in vitro* and *in vivo*, the action of aPDT with Photodithazine® (PDZ) on a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). For the *in vitro* method, the *S. aureus* biofilm was incubated with PDZ at concentrations of 50 and 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 15 minutes and irradiation was performed with fluences of 25, 50 and 100 J/cm^2 . PS internalization, colony forming unit count (CFU/mL), formation of reactive oxygen species (ROS), bacterial metabolism, adherence and biofilm structure were evaluated by scanning electron microscopy, before and after application of therapy. In the *in vivo* method, initially the strain was inoculated in *Galleria mellonella* models and after the application of the aPDT survival curve, health scale, hemocytic analysis and CFU/mL of *S. aureus* in the hemolymph were analyzed. In the *in vitro* results, bacterial reduction was observed at different concentrations of PDZ, highlighting the parameters of 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PDZ and 100 J/cm^2 . In the *in vivo* results, aPDT increased survival and stimulated the immune system of *G. mellonella* larvae infected by *S. aureus*. aPDT in both methods was effective, demonstrating the potential of the therapy as an alternative in the treatment of bacterial infections caused by MRSA.

Key words: photodynamic therapy; gram-positive bacteria; methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA); Chlorine; invertebrate model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Projeção do aumento de mortes por resistência microbiana comparada às mortes pelas demais doenças. AMR (Resistência microbiana).	20
Figura 2- Projeção da mortalidade mundial por microrganismos resistentes em 2050.	21
Figura 3- Impacto da resistência microbiana em países de alta, média e baixa renda, comparado com a crise financeira mundial de 2008-2009. AMR (antimicrobial resistance)	22
Figura 4- Princípios da Inativação Fotodinâmica, Diagrama de Jablonski	27
Figura 5- Estrutura química do PDZ.	30
Figura 6 - Micrografias obtidas por Microscopia Confocal para biofilmes de MRSA incubadas com PDZ nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Apresentando as colunas com Marcação com o DAPI marcando o DNA bacteriano (A), Fluorescência emitida pelo PDZ(B) e sobreposição dos canais (C-Overlap).	41
Figura 7 - Micrografia obtida por Microscopia Confocal de fluorescência de biofilme de MRSA incubadas com PDZ nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Sobreposição dos canais DAPI e PDZ em 2.5 D.	42
Figura 8- Valores médios de UFC/mL em log ₁₀ em biofilme MRSA, apresentando grupo Controle não irradiado e irradiado, PDZ nas concentrações 50, 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não irradiado e irradiado nas fluências de 100, 50 e 25 J/cm ² . Os ícones *, ○, ●, ■, □, ▼, ▲ representam as diferenças estatísticas entre os grupos.	43
Figura 9 - Produção de ERO em biofilme de MRSA, apresentando o grupo controle irradiado e o grupo TFDa com a concentração de 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PDZ, ambos irradiados na fluência 100 J/cm ² . O ícone * demonstra diferença estatística entre os grupos.	44
Figura 10 - Leitura visual da metabolização do resazurin em biofilme de MRSA após aplicação da terapia, apresentando grupo controle não irradiado, apenas PDZ na concentração 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, controle irradiado e TFDa, ambos irradiados nas fluências de 100 J/cm ² .	45
Figura 11 - Avaliação da atividade metabólica bacteriana com resazurin em unidades arbitrárias de fluorescência para biofilme de MRSA, apresentando grupo controle não irradiado, apenas PDZ na concentração 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, controle irradiado e TFDa, ambos irradiados nas fluências de 100 J/cm ² .	45
Figura 12 - Quantificação da biomassa realizada com o método de coloração por Cristal Violeta. Apresentando grupo controle não irradiado, grupo apenas PDZ 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não irradiado, grupo controle Irrradiado 100 J/cm ² e grupo TFDa com PDZ 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ irradiado a 100 J/cm ² .	47
Figura 13 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura biofilme, apresentando magnificações de 500 x e 2.00 k x dos grupos Controle não irradiado, Controle irradiado (100 J/cm ²), PDZ (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TFDa.	49
Figura 14 - Esquema de infecção e aplicação da TFDa em <i>G. mellonella</i>	61
Figura 15 - Teste de concentração bacteriana apresentando grupo controle, sem inoculação bacteriana e grupos com inoculação de MRSA nas seguintes concentrações 10 ⁶ , 10 ⁷ , 10 ⁸ e legenda estatística com comparação entre os grupos.	64

Figura 16 - Teste de dose de luz, apresentando grupo controle, mantido na ausência da luz, e grupos submetidos a fluência de 10, 25, 50, 75 e 100 J/cm ² e intensidade de 30 mW/cm ² . Legenda estatística com comparação entre os grupos.....	65
Figura 17 - Teste de concentração do FS, apresentando grupo controle, sem a inoculação do PDZ, e grupos submetidos ao PDZ nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL. Legenda estatística com comparação entre os grupos.	66
Figura 18 - TFDa com PDZ em <i>G. mellonella</i> , apresentando os grupos Controle PBS não irradiado, grupo L irradiado a 10 J/cm ² , Controle MRSA, grupo PDZ e TFDa. Figura (A) – apresenta a concentração de PDZ 5 µg/mL; Figura (B) 25x10 ⁻² µg/mL e Figura (C) 25x10 ⁻⁶ µg/mL.	67
Figura 19 - Escala de saúde de <i>G. mellonella</i> pós TFDa, apresentando os grupos Controle PBS não irradiado e irradiado a 10 J/cm ² , Controle MRSA, apenas PDZ 5; 25x10 ⁻² ; 25x10 ⁻⁶ µg/mL, apenas L 10 J/cm ² e TFDa 5; 25x10 ⁻² ; 25x10 ⁻⁶ µg/mL com a fluência de 10 J/cm ² . O ícone * demonstra diferença estatística entre os grupos.....	70
Figura 20 - Contagem hemocitária de <i>G.mellonella</i> pós TFDa, apresentando os grupos Controle PBS não irradiado, Controle PBS irradiado a 10 J/cm ² , Controle PBS com PDZ, Controle PBS com PDZ irradiado a 10 J/cm ² , Controle MRSA, Controle MRSA apenas irradiado, Controle MRSA apenas PDZ 25 x 10 ⁻² µg/mL e TFDa 25 x 10 ⁻² µg/mL com a fluência de 10 J/cm ²	71
Figura 21 - Contagem bacteriana pós TFDa, apresentando os grupos Controle PBS, Controle MRSA, apenas PDZ 25 x 10 ⁻² µg/mL, apenas L 10 J/cm ² e TFDa 25 x 10 ⁻² µg/mL com a fluência de 10 J/cm ²	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais para o método <i>in vitro</i>	36
Tabela 2- Divisão dos grupos experimentais para contagem de UFC/mL.	37
Tabela 3 - Divisão dos grupos experimentais <i>in vivo</i> e local e conteúdo das injeções em <i>G. mellonella</i>	60
Tabela 4 - Divisão dos grupos experimentais para análise hemocitária, local e conteúdo das injeções em <i>G. mellonella</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI - Brain Heart Infusion

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ERO - Espécies reativas do oxigênio

FS - Fotossensibilizador

J/cm² - Joule por centímetro²

LED - Diodo emissor de luz

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

PBS - Tampão fosfato salino

PDZ - Photoditazine®

RPM - Rotações por minuto

TFD - Terapia Fotodinâmica

TFDa - Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
2.2.1 <i>Objetivos in vitro</i>	16
2.2.2 <i>Objetivos in vivo</i>	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Infecções Bacterianas	17
3.2 Resistência Bacteriana	17
3.3 Staphylococcus aureus	22
3.4 Staphylococcus aureus resistente à meticilina	23
3.5 Terapia fotodinâmica (histórico, mecanismo de ação)	25
3.5.1 <i>Breve Histórico</i>	25
3.5.2 <i>Mecanismo de ação</i>	26
3.6 Fotossensibilizadores	28
3.7 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	31
3.8 <i>Galleria mellonella</i> COMO MODELO DE PESQUISA <i>in vivo</i>	33
4 METODOLOGIA GERAL	35
4.1 Local do Estudo	35
4.2 Obtenção e Manutenção das Cepas Bacterianas	35
4.3 Obtenção e Preparação do Fotossensibilizador	35
4.4 Preparo das Bactérias:	35
5 ESTUDO <i>IN VITRO</i>	36
5.1 Metodologia para Aplicação da TFDA Em Biofilme MRSA, Estudo <i>In Vitro</i>	36
5.1.2 <i>Preparo do Biofilme</i>	36
5.1.3 <i>Internalização do PDZ em biofilme de cepas MRSA</i>	36
5.1.4 <i>Divisão dos grupos experimentais</i>	36
5.1.5 <i>Aplicação da TFDA e parâmetros de irradiação</i>	37
5.1.6 <i>Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)</i>	37
5.1.7 <i>Análise da produção de espécies reativas de oxigênio</i>	38
5.1.8 <i>Avaliação da capacidade metabólica bacteriana por metabolização do resazurin</i>	38
5.1.9 <i>Quantificação da biomassa</i>	39
5.1.10 <i>Avaliação morfológica do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	39
5.1.11 <i>Análise estatística</i>	40
5.2 Resultados	40
5.2.1 <i>Internalização do Photoditazine® em Biofilme de Cepas MRSA</i>	40
5.2.3 <i>Análise da produção de espécies reativas de oxigênio</i>	44
5.2.4 <i>Avaliação da atividade metabólica bacteriana</i>	44
5.2.5 <i>Quantificação da biomassa total</i>	46
5.2.6 <i>Avaliação morfológica do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	47
5.3 Discussão	50
6 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	59
6.1 Metodologia para Aplicação da TFDA com Cepas MRSA em Modelo Invertebrado de <i>Galleria Mellonella</i>	59

6.1.1 Critério de seleção do modelo invertebrado de <i>Galleria mellonella</i>	59
6.1.2 Preparo para infecção <i>in vivo</i>	59
6.1.3 Curva de sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i> testes pilotos de concentrações de MRSA, fluências de luz e concentrações do FS.....	60
6.1.4 Terapia fotodinâmica antimicrobiana em <i>Galleria mellonella</i>	60
6.1.5 Escala de saúde e sobrevivência.....	61
6.1.6 Análise hemocitária.....	62
6.1.7 UFC/mL de hemolinfa.....	62
6.1.8 Análise estatística.....	63
6.2 Resultados	63
6.2.1 Curva de sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i> após inoculação de MRSA.....	63
6.2.2 Terapia fotodinâmica antimicrobiana em <i>Galleria mellonella</i>	66
6.2.3 Escala de saúde e sobrevivência.....	68
6.2.4 Análise hemocitária.....	70
6.2.5 UFC/mL de hemolinfa.....	72
6.3 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO GERAL	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O surgimento da resistência bacteriana e a dificuldade de eliminá-la com o tratamento convencional com antibióticos é considerado um problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a resistência bacteriana é umas das 10 ameaças à saúde pública global que a humanidade enfrenta atualmente (ELHAWY *et al.*, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

A OMS divulgou em 2017 uma lista com as 12 bactérias de maior risco à saúde humana. Pelo seu alto poder de resistência, as bactérias foram divididas em três fases de prioridade, na qual entre as bactérias relatadas como alta prioridade estão: *Staphylococcus aureus resistente a meticilina* e *Staphylococcus aureus resistente a vancomicina* (MRSA e VRSA) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

S. aureus é uma das bactérias que causam maior preocupação em âmbito hospitalar por estarem relacionadas a altos índices de mortalidade, principalmente em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI) (GAO *et al.*, 2019). Esta espécie possui diversos fatores de virulência e alta capacidade em desenvolver resistência à antibióticos. A formação do biofilme é um dos fatores de virulência mais difícil de combater, visto que, o biofilme se trata de uma estrutura composta por camadas de bactérias unidas à matriz extracelular, resultando em uma estrutura rígida que dificulta a penetração do antibiótico. Desta forma, a capacidade de adesão e rápida disseminação, contribuem para a colonização de biofilme em cateteres e sondas, agravando a saúde de pacientes hospitalizados (HAMDAN-PARTIDA *et al.*, 2018; MALIK, 2020).

Em 2019, a OMS reforçou o alerta sobre a dificuldade e escassez no desenvolvimento de novos antibióticos para os patógenos de alta prioridade, o que inclui MRSA. Atualmente apenas sete antibióticos estão em fase pré-clínica para o tratamento de infecções por MRSA, porém sem previsão de aplicabilidade, reforçando a importância de alternativas à antibioticoterapia. Uma das alternativas que vem se mostrando promissora é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

A TFDa se baseia em um método que emprega um fotossensibilizador (FS) que após internalizado na célula é excitado a partir de uma fonte de luz com comprimento de onda adequado ao FS, tornando-se capaz de interagir com o oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio (ERO), responsáveis pela inativação celular

(DHARMARATNE *et al.*, 2020; JIA *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2000). As ERO são capazes de causar morte celular bacteriana ao invés de apenas inibir seu crescimento, ação que ocorre com alguns tipos de antibióticos. Deste modo, as chances dos microrganismos desenvolverem tolerância ou resistência a TFDa são consideradas mínimas (KASHEF; HAMBLIN, 2017).

O FS Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e6 de origem Russa, obtida a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*. Há relatos da ação antibacteriana e antifúngica deste composto associada a luz, porém ainda são necessários estudos que demonstrem o potencial do PDZ como um possível FS na aplicação da TFDa para inativação de microrganismos (ALVES *et al.*, 2018a, 2018b; GARCIA *et al.*, 2018; QUISHIDA *et al.*, 2015a).

Portanto, frente às atuais dificuldades ao combate de infecções bacterianas por MRSA, tornam-se necessários estudos que avaliem a aplicação da TFDa com PDZ em métodos *in vitro* e *in vivo* como alternativa de tratamento à antibioticoterapia. Os modelos invertebrados para pesquisa *in vivo*, como os insetos, estão cada vez mais sendo utilizados pela facilidade de manipulação e por apresentarem sistema imune inato, que é o caso da espécie *Galleria mellonella*, permitindo assim, compreender tanto o efeito da bactéria no organismo, quanto o efeito do tratamento aplicado, no caso deste estudo, a ação da TFDa com PDZ em cepas MRSA (CHAMPION; TITBALL; BATES, 2018; JUNQUEIRA, 2012; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

Desta forma, este estudo visa encontrar soluções para o combate de infecções por MRSA, contribuindo assim para a diminuição, controle da resistência bacteriana e redução ou inativação de biofilme de *S. aureus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é analisar, *in vitro* e *in vivo*, o efeito da TFDa com PDZ em diferentes concentrações e diferentes doses de luz para inativação da cepa MRSA.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Objetivos *in vitro*

Avaliar os biofilmes quanto à(o):

- Internalização do PDZ
- Citotoxicidade do PDZ na ausência de luz sobre biofilme de MRSA.
- Efeito da TFDa empregando o fotossensibilizador PDZ em diferentes concentrações;
- Ação da TFDa em diferentes fluências de luz;
- Crescimento bacteriano após a TFDa;
- Capacidade de produção de ERO;
- Metabolização bacteriana com resazurin após a TFDa;
- Biomassa por cristal violeta do biofilme após a TFDa;
- Estrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura após a TFDa

2.2.2 Objetivos *in vivo*

Avaliar os testes com modelo de *Galleria mellonella* quanto à(o):

- Uso de *G. mellonella* como modelo de pesquisa *in vivo* para TFDa;
- Efeito da TFDa empregando o fotossensibilizador PDZ em diferentes concentrações;
- Reação das larvas frente a aplicação da TFDa com diferentes fluências de luz;
- Capacidade de sobrevivência de *G. mellonella* após a TFDa;
- Escala de saúde das larvas após a aplicação da TFDa;
- Resposta do sistema imune após a TFDa;
- Crescimento bacteriano após a TFDa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Infecções Bacterianas

Grande parte das infecções bacterianas iniciam quando uma bactéria presente na microbiota natural causa uma infecção oportunista em razão da imunodepressão do hospedeiro. Caso o hospedeiro esteja em condições ideais de imunidade e homeostase, mesmo com a bactéria patogênica, a infecção pode permanecer de forma latente ou subclínica não manifestando a doença (CARVALHO, 2010; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O corpo humano apresenta várias barreiras físicas na pele e mucosas, com o intuito de evitar infecções bacterianas. Porém, bactérias patogênicas possuem diversos fatores de virulência que contribuem para a aderência, agressão e invasão do hospedeiro. A partir da invasão, as bactérias podem proliferar-se, causando reações inflamatórias específicas, liberando mediadores de resposta inflamatória como, por exemplo, Interleucina1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Deste modo, o sistema imunológico (SI) é ativado enviando as células polimorfonucleares e macrófagos para eliminar a bactéria. Caso o SI não cause a lise e nem a eliminação da bactéria, a infecção pode se alastrar para diversas áreas e uma vez instalada, pode invadir camadas profundas do tecido, alcançando a corrente sanguínea, causando um quadro mais grave para o hospedeiro (GEO et al., 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Entre os fatores de virulência presentes nas bactérias é possível citar a produção de lipopolissacarídeos, ácido lipoteicóico e toxinas que são responsáveis pelos sintomas característicos de infecção como dor, diarreia, febre, leucopenia, hipoglicemia, hipotensão, choque, podendo levar a sepse do indivíduo. A capacidade de crescimento, nutrição e multiplicação a partir das células do hospedeiro, e a capacidade antifagocítica que impossibilita a fagocitose das bactérias pelas células de defesa também podem ser citados como fatores de virulência que dificultam o combate do SI (MARILIA *et al.*, 2016; MEDEIROS, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

3.2 Resistência Bacteriana

Atualmente o tratamento para infecções bacterianas é realizado pela administração de antibióticos, fármacos que possuem ação bactericida ou bacteriostática. Um marco na descoberta dos antibióticos foi realizado por Alexander Fleming, em 1929, que descobriu a Penicilina, relatando atividade superior a outros compostos quando relacionados ao controle da proliferação bacteriana. Deste modo, iniciou-se a busca por novos antimicrobianos como Tirotricina e Griseofulvina em 1939, Estreptomicina em 1944, Bacitracina em 1945, Meticilina em 1960, entre outros, originando a mais utilizada classe de antibióticos: os beta-lactâmicos. Além desta, foi descoberta a classe das Quinolonas, Glicopeptídeos, Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Sulfonamidas, entre outras (BLOISE et al., 2017; SERRA, 2014).

Os antibióticos possuem diversos mecanismos de ação como: inibir síntese proteica, se ligar a enzimas bacterianas inibindo a ação das mesmas, modificar a estrutura da membrana plasmática da bactéria fazendo com que esta perca metabólitos essenciais para a sobrevivência, interromper a formação completa do peptidoglicano na parede celular causando lise bacteriana e atuar na função do ribossomo afetando a transcrição do DNA (ácido desoxirribonucleico) impedindo a reprodução do microrganismo (SERRA, 2014; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A internalização dos antibióticos é diferente em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas em razão da diferença na composição da parede celular. As bactérias Gram-positivas possuem parede celular mais simples e geralmente são tratadas com antibiótico de baixo espectro como as Penicilinas e Eritromicinas. Já as Gram-negativas, possuem camada de lipopolissacarídeos que dificultam a penetração de antibióticos, e são tratadas principalmente com a classe das Fluoroquinolonas (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016; ROCHA et al., 2011; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; WU et al., 2017).

Com o passar dos anos, observou-se que a efetividade dos antibióticos em cepas que antes eram suscetíveis, estava prejudicada, e que as bactérias desenvolveram capacidade de resistir à ação do antibiótico. A resistência bacteriana pode ser caracterizada como intrínseca (natural) ou adquirida. Quando, por exemplo, utiliza-se um antibiótico responsável por inibir a síntese da parede celular (os beta-lactâmicos) em um microrganismo que não possui parede celular, pode-se caracterizar essa resistência como intrínseca, pois o mecanismo de ação do antibiótico não foi capaz de efetuar a ação desejada para inativar o microrganismo. Já a resistência adquirida ocorre quando uma espécie bacteriana anteriormente sensível

ao fármaco adquire resistência ao mecanismo de ação deste, sendo assim, a resistência bacteriana adquirida se trata de uma resposta evolutiva. Essa resposta pode ser entendida por mutação espontânea de DNA, na qual, as bactérias adquirem genes que codificam proteínas permitindo a inibição do mecanismo de ação do antibiótico, ou por transferência de genes, como transformação e conjugação entre as bactérias, tornando-as resistentes aos antibióticos (ANTONIO *et al.*, 2009; MARILIA *et al.*, 2016).

A utilização indiscriminada, generalizada e incorreta dos antibióticos em razão da automedicação ou prescrições médicas inadequadas contribui para o aumento da resistência bacteriana, gerando superbactérias. As superbactérias são cepas resistentes a vários antibióticos, que causam preocupação de âmbito mundial pelo alto índice de letalidade e altos custos no tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2017; CAIRES, 2017).

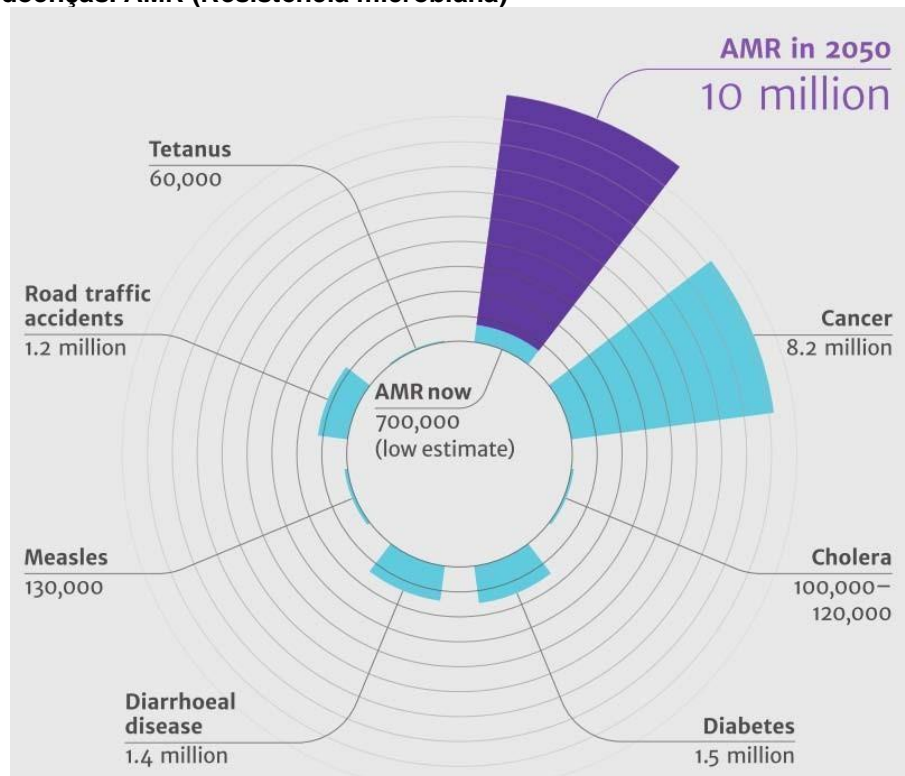
Para alertar a população mundial o Grupo de Coordenação Interagências sobre resistência microbiana (IACG) apresentou um relatório, em 2019, intitulado “ Sem tempo para esperar: Protegendo o futuro das infecções resistentes aos medicamentos ”, documento destinado à Secretaria Geral das Nações Unidas e a Organização Mundial de Saúde que relata os impactos atuais e a longo prazo da resistência antimicrobiana, principalmente a bacteriana (BRYAN-WILSON, 2019).

O relatório aponta que resistência antimicrobiana é uma crise global que ameaça um século de progresso na saúde e que níveis alarmantes de resistência foram relatados em países de todos os níveis de renda. Mas afirma que há dificuldade em combater igualmente a resistência em todos os países, visto que além do uso inadequado e indiscriminado dos medicamentos, a falta de acesso à água potável, saneamento e higiene; a indisponibilidade e altos preços de antimicrobianos; as deficiências no sistemas de saúde, produção de alimentos e rações, segurança alimentar e gestão de resíduos estão aumentando o número de doenças infecciosas em animais e humanos, contribuindo para o surgimento e disseminação de patógenos resistentes aos medicamentos (BRYAN-WILSON, 2019).

O relatório cita que as doenças causadas pela resistência medicamentosa são responsáveis por no mínimo 700.000 mortes por ano no mundo, número que segundo o *Review on Antimicrobial Resistance* publicado em 2014, deve aumentar para 10 milhões de mortes por ano até o ano de 2050, levando ao custo para o sistema de saúde de mais de US\$ 100 trilhões, superando o número de mortes causadas pelo

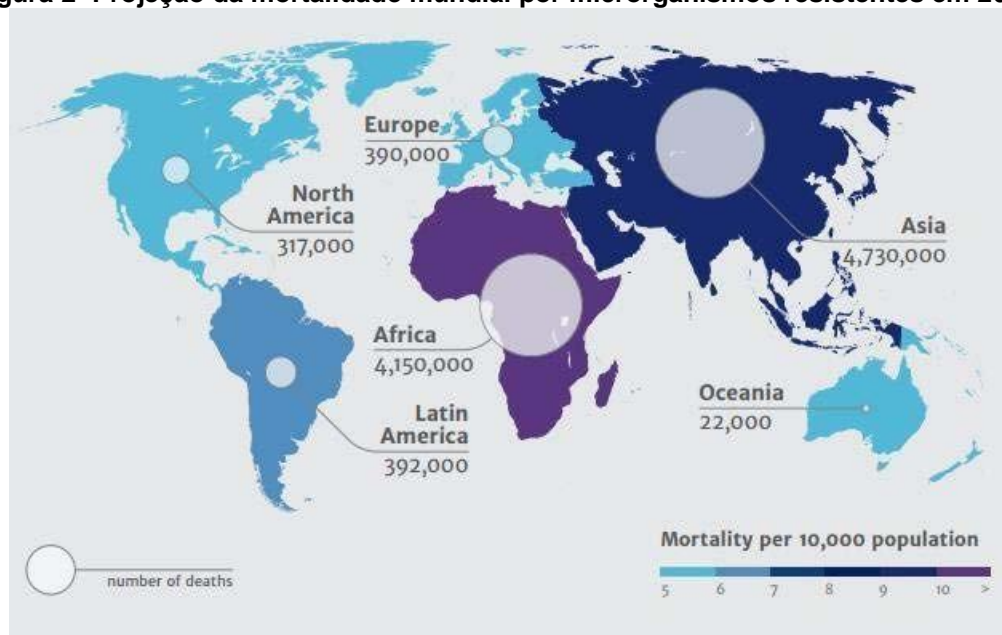
câncer e outras doenças no mundo (figura 1) (BRYAN-WILSON, 2019; O'NEILL, 2016). Ainda, estima que 2,4 milhões de pessoas podem morrer em países considerados de alta renda entre 2015 e 2050 se nenhuma ação for tomada para conter a resistência antimicrobiana, mas que os países mais prejudicados serão aqueles com economia emergente, entre eles o Brasil (figura 2).

Figura 1 - Projeção do aumento de mortes por resistência microbiana comparada às mortes pelas demais doenças. AMR (Resistência microbiana)



Fonte: O'neill, (2016)

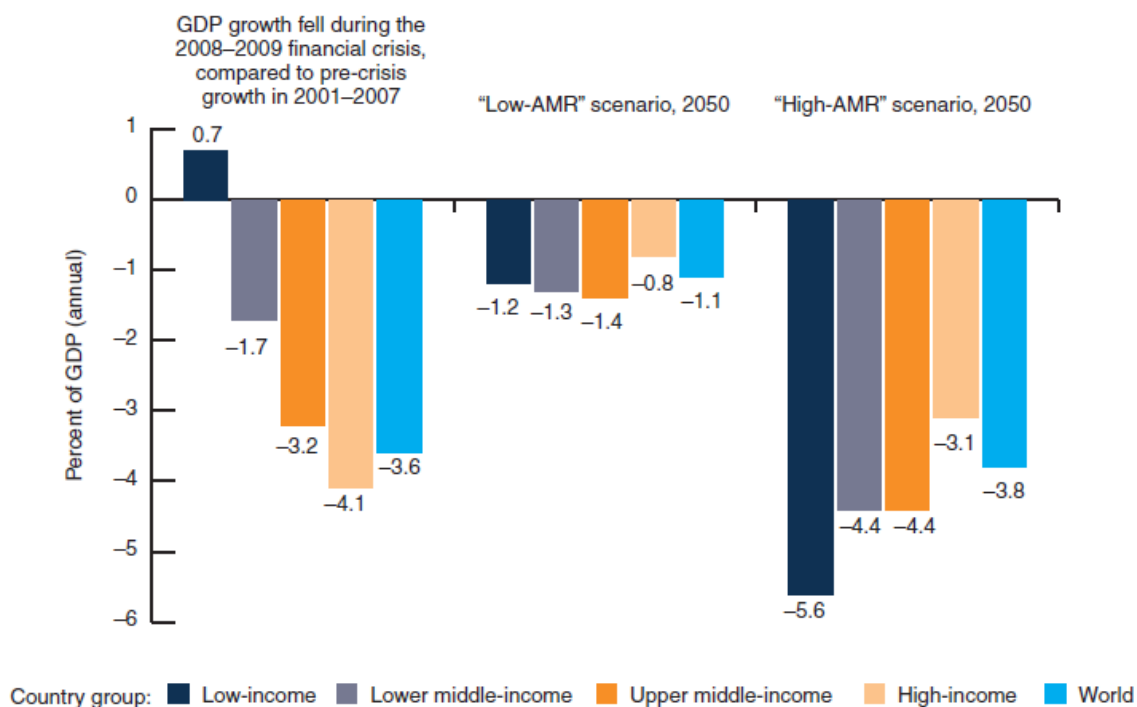
Figura 2- Projeção da mortalidade mundial por microrganismos resistentes em 2050.



Fonte: O'neill, (2016)

Avaliando o cenário econômico, o *World Bank Group*, publicou em 2017 o relatório “Drug resistant infections -A Threat to Our Economic Future”, estimando os impactos da resistência bacteriana na economia mundial. No caso de baixos impactos, as simulações relataram que em 2050, o produto interno bruto (PIB) global anual provavelmente cairia 1,1 %, em relação a um cenário sem efeitos da resistência microbiana, causando o déficit de US\$ 1 trilhão anualmente após 2030. No caso de alto impacto, o mundo perderá 3,8 % de seu PIB anual até 2050, com um déficit anual de US\$ 3,4 trilhões até 2030. Além de compararem a queda do PIB em países com renda alta, média e baixa, compararam também o prejuízo financeiro da resistência bacteriana em relação a crise financeira mundial de 2008-2009, demonstrando que o alto impacto da resistência bacteriana até o ano de 2050 causará um déficit financeiro maior que o da crise em questão, e ainda afirmam que a resistência microbiana poderia reduzir o PIB substancialmente, mas ao contrário da recente crise financeira, os danos podem durar mais tempo e afetar mais os países de baixa renda (figura 3) (WORLD BANK, 2017).

Figura 3- Impacto da resistência microbiana em países de alta, média e baixa renda, comparado com a crise financeira mundial de 2008-2009. AMR (antimicrobial resistance)



Fonte: Adaptado de "Drug-resistant infections - A Threat to Our Economic Future" WORLD BANK, (2016).

Todas essas projeções nos alertam sobre o perigo da resistência microbiana e a importância de alternativas. É necessário ressaltar também que já foi relatado a resistência de uma cepa de *Escherichia coli* ao antibiótico considerado como última opção de tratamento para bactérias multiresistentes, a Colistina (Polimixina E). Visto que, na literatura é descrito um número limitado de antibióticos e não há previsão para a descoberta de novos, são necessárias novas alternativas para combater infecções bacterianas. Uma alternativa que vem se mostrando promissora é a TFDa, que se demonstra eficiente para a inativação de diversos microrganismos, incluindo as bactérias (JIA *et al.*, 2020; KAWCZYK-KRUPKA *et al.*, 2018).

3.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus spp. possui 32 espécies, dentre elas, quinze podem ser encontradas na microbiota normal humana, sendo *S. aureus* a espécie com mais importância clínica. *S. aureus* são bactérias Gram-positivas em forma de cocos, não são esporulados, podendo ser aeróbio ou anaeróbio facultativo com diâmetro aproximadamente de 0,5 a 1,5 µm. É o mais comum patógeno oportunista encontrado

na microbiota natural da pele e do trato respiratório, sendo a espécie mais virulenta do seu gênero, apresentando altas taxas de morte. Em sua morfologia é comum apresentarem o formato de “cachos de uva”, se desenvolvem à temperaturas de 10 a 45°C, sendo considerada a temperatura ótima a 37°C (HORI, 2013; MALIK, 2020).

A superfície corporal dos mamíferos é considerada seu habitat natural, onde pode apresentar-se em grandes quantidades, mas pode também ser encontrado na natureza, na água, ar ou poeira. Esta espécie é resistente ao congelamento, à luz solar, a algumas substâncias químicas e possui alta capacidade de reprodução, causando uma grande variedade de doenças incluindo acne, furúnculos, pústulas, impetigo, pneumonia, osteomielite, endocardites, meningite e estão presentes na maioria das feridas piogênicas, sendo também importante causa de infecções hospitalares, podendo levar a sepse (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

S. aureus contém um fator-chave de virulência responsável pela produção da coagulase, que ocasiona acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, dificultando o acesso das células de defesa às bactérias. Essa espécie é capaz de formar o biofilme, que é uma forma mais virulenta, caracterizada pela adesão e sobreposição bacteriana a superfícies observada principalmente em infecções hospitalares com formação de biofilme em cateteres e sondas. Além disso, é capaz de produzir algumas toxinas que contribuem para a gravidade das infecções como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), toxinas esfoliativas (ETs), hemolisinas e a toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) (LIMA *et al.*, 2015; MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2016).

3.4 Staphylococcus aureus resistente à meticilina

Na década de 40 o antibiótico penicilina era utilizado para o combate de infecções por *S. aureus*. O seu mecanismo de ação, por pertencer aos antibióticos beta-lactâmicos, é interromper a síntese da parede celular, para isso, o antibiótico se liga as proteínas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina) que são responsáveis pela síntese da parede celular, impedindo a formação e resultando em lise bacteriana (MOREILLON, 2008; MUN *et al.*, 2014).

Já na década de 1950, a resistência de *S. aureus* pelo antibiótico penicilina foi predominante em cepas isoladas de pacientes hospitalizados. Essa resistência

ocorreu pela produção das enzimas penicilinases (β -lactamases), que são responsáveis por hidrolisar o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana. Já foram descritos mais de 200 tipos de β -lactamases que podem ser originadas por mutações ou por transferência de plasmídeos entre bactérias (RANTZ; KIRBY, 1994; STEFANIAK *et al.*, 2005).

Deste modo, em 1960 o antibiótico meticilina, também do grupo dos beta-lactâmicos, foi estabelecido como uma alternativa para cepas resistentes à penicilina, visto que, o mecanismo de ação deste antibiótico não é afetado pela ação das penicilinases. No entanto, em 1961, foi relatado a resistência de cepas de *S. aureus* pela meticilina, denominadas MRSA, e a partir de 1980 essas cepas foram responsáveis por epidemias em muitos hospitais, causando preocupação até os dias atuais (MORGAN *et al.*, 1999).

Optando pelo tratamento com outro antibiótico foi utilizado a vancomicina, mas também foi relatado por Rossi *et al.*, em 2014, o surgimento de uma nova superbactéria, VRSA, alertando a capacidade de resistência destas cepas e a necessidade de novas alternativas ao tratamento desta bactéria (CAIRES, 2017; HAMDAN-PARTIDA *et al.*, 2018; ROSSI *et al.*, 2014).

Em 2018, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou o Boletim Segurança do paciente e Qualidade de Serviços de Saúde nº 21, no qual apresentou o monitoramento nacional de Infecção Primária de Corrente Sanguínea em pacientes com Cateter Venoso Central (IPCS-CVC) internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) adulto, pediátrico e neonatal, relatando os principais microrganismos causadores dessas infecções e os perfis de resistência microbiana. Entre eles é destacado *S. aureus* com porcentagem de fenótipo de resistência ao antibiótico meticilina de 52,3% dos casos da UTI adulto; 41,5% pediátrica e 37,4% da neonatal. Outra bactéria que se destacou foi *Staphylococcus* coagulase negativa que apresentou fenótipo de resistência a meticilina e vancomicina acima de 70% dos casos nas UTIs avaliadas, demonstrando a capacidade de resistência das bactérias do gênero *Staphylococcus* à um dos principais antibióticos destinados ao combate dessas infecções (BRASIL, 2018).

Apesar do conhecimento sobre a gravidade desta resistência, as cepas MRSA continuam fazendo diversas vítimas ao longo dos anos. Um relatório de ameaças de resistência bacteriana realizado pelo *Center for Diseases Control and Prevention*

(CDC), nos Estados Unidos da América (EUA), mostraram que no ano de 2019, o índice de cepas MRSA ultrapassou 41% entre os pacientes adultos e 28% pediátrico, obtendo cerca de 323.700 casos que resultaram em aproximadamente 10.600 mortes no país, acarretando um gasto de 1,7 bilhões de dólares. No Brasil este cenário não é diferente, na verdade encontra-se um pouco pior, visto que se trata de um país emergente, com situações precárias de higiene e saúde em determinadas regiões. Segundo a ANVISA os índices de infecção por cepas MRSA são bastante elevados podendo alcançar até 80% dos pacientes, principalmente em UTIs, em todo o país (BRASIL, 2017; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; CDC., 2019).

Desta forma, torna-se cada vez mais preocupante o aumento da resistência bacteriana, destacando a capacidade de resistência de *S. aureus* e a importância o desenvolvimento de tratamentos antibacterianos alternativos. Uma das alternativas que vem se mostrando promissora é a TFDa.

3.5 Terapia fotodinâmica (histórico, mecanismo de ação)

3.5.1 Breve Histórico

Os primeiros relatos da luz aplicada como agente terapêutico, foi observado na Grécia antiga, China, Índia e Egito a mais de 3000 anos, onde a fototerapia era aplicada com a luz solar para o tratamento de doenças como vitiligo, raquitismo, psoríase e câncer de pele. Em 1903, o médico dinamarquês Niels Finsen ganhou o prêmio Nobel ao usar a fototerapia, com luz ultravioleta, para tratar *Lupus vulgar*, demonstrando o potencial do uso da luz para a medicina (DANIELL, 1991; RAAB, 1997).

Já em 1900, o estudante de medicina Oscar Raab, orientado por Hermann Von Tappeiner, observou que a interação da luz solar com determinados corantes sobre o protozoário *Paramécio* induzia a morte celular, enquanto apenas a aplicação do corante ou somente a exposição a luz solar não atingia a inativação celular, assim, descrevendo a ação fotodinâmica (DANIELL, 1991; MACHADO, 2000; RONQUI, 2015).

A partir destas descobertas, a TFD vem sendo estudada para a inativação de diversas células, demonstrando o potencial para tratamento, não apenas de doenças

oncológicas, mas como as não-oncológicas, gerando a inativação de fungos, protozoários, bactérias e vírus, incluindo o COVID-19 (SARS-CoV-2) (AFRASIABI *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2018a; SOUZA *et al.*, 2021; VITORIO *et al.*, 2021). O estudo da aplicação da TFD em infecções bacterianas, teve uma queda com a descoberta da penicilina e dos outros antibióticos subsequentes, mas com o aumento da resistência bacteriana, TFDa surge como uma alternativa promissora à antibioticoterapia (BOLUKI *et al.*, 2017; GIANNELLI *et al.*, 2017; HORI, 2013; KASIMOVA *et al.*, 2014; MACHADO, 2000; TURUBANOVA *et al.*, 2019).

3.5.2 Mecanismo de ação

A TFD visa um tratamento menos invasivo em relação a antibioticoterapia, de baixo custo e eficaz, que associa um fotossensibilizador, uma fonte de luz e oxigênio molecular, gerando danos oxidativos e desencadeando a morte celular (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009; PATZI; VILLALOBOS, 2014).

A aplicação da TFD se baseia no emprego do FS, que após internalizado na célula a ser inativada, é excitado na presença da luz visível em um comprimento de onda adequado, o qual deve corresponder a banda de absorção do FS na região do espectro da luz visível (400 a 700 nm). Após a excitação, a molécula do FS alcança um estado energético chamado singlete excitado, ao atingir este estado, pode-se voltar ao seu estado fundamental, emitindo fluorescência ou calor, ou pode alcançar o estado tripleto excitado por meio da inversão do seu spin através do processo de cruzamento intersistema (figura 4) (QUISHIDA *et al.*, 2015b; SOARES, 2019).

O estado tripleto excitado, é considerado mais energético, e ao interagir com moléculas de oxigênio molecular, torna-as reativas levando a produção de ERO. Esta ETAPA ocorre por meio de dois processos oxidativos principais: reações Tipo I – formação de radicais livres e Tipo II – formação de oxigênio singlete, ambos são citotóxicos para células microbianas ou células hospedeiras (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; HUANG *et al.*, 2011; QUISHIDA *et al.*, 2015a).

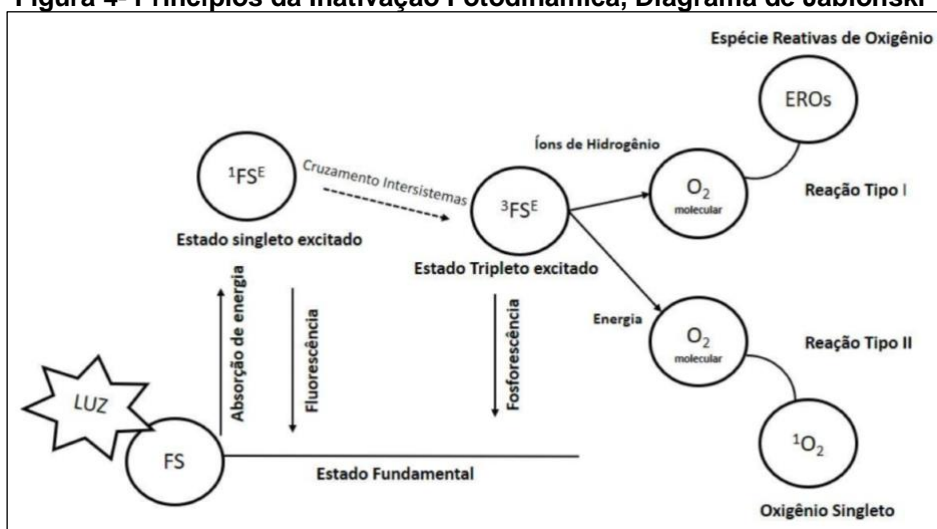
Na reação tipo I ocorre a produção de íons de hidrogênio que ao interagir com o oxigênio molecular formam os radicais livres, resultando nas espécies reativas de oxigênio como, por exemplo, íons hidroxila. Já nas reações do tipo II o FS no estado tripleto ao transferir energia para o oxigênio molecular, produz o oxigênio singlete. Ambas as reações ocorrem de forma simultânea, apesar disso, é observado

predominância de reações de tipo II visto que a transferência de energia para produção do oxigênio singleto ocorre mais rápido do que a transferência de elétrons para a produção dos radicais livres, sendo o oxigênio singleto o principal produto da TFD (GSPONER *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A quantidade da formação das ERO, seja por radicais livres ou oxigênio singleto, é dependente da concentração do FS, da concentração de oxigênio e da fluência de luz utilizada. Por este motivo, variações dos parâmetros são necessários para adequar valores para cada tipo de tratamento, visto que, a produção de ERO tem a capacidade de reagir com diversas biomoléculas induzindo a inativação imediata do microrganismo ou das células alvo por meio de danos oxidativos (GERALDE *et al.*, 2017; KASHEF; HAMBLIN, 2017; SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013).

A aplicação clínica da TFD tem enfoque principalmente no tratamento de cânceres e de infecções microbianas, podendo ser aplicadas em diversas áreas do corpo humano e animal como, por exemplo, pele, cabeça, pescoço e esôfago, tendo ampla aplicação na área odontológica (ALLISON *et al.*, 2006; ALLISON; MOTA; SIBATA, 2004; CARMELLO, 2011; GARCIA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017).

Figura 4- Princípios da Inativação Fotodinâmica, Diagrama de Jablonski



Fonte: Adaptado de Kashef e Hamblin, (2017)

O efeito citotóxico da TFD é realizado por meio de estresse oxidativo que pode ter diversas macromoléculas como alvos celulares, dificultando a aquisição de resistência específica pelas células-alvo. Além disso, a terapia é considerada não invasiva, pois pode ser aplicada topicamente em casos de lesões causadas por microrganismos. Portanto, as vantagens da TFDa incluem eficácia da ação bactericida

ou bacteriostática, independentemente da resistência aos antibióticos, causando quantidade mínima de efeitos colaterais, fácil aplicação, baixo custo e necessidade de apenas FS, uma fonte de luz e oxigênio molecular para a execução (AMARAL; LINARES; PERUSSI, 2020; PAOLILLO *et al.*, 2021).

3.6 Fotossensibilizadores

Os FS são substâncias fotoquímicas capazes de absorver fótons e transferir elétrons e energia para o oxigênio molecular, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio que provocam danos aos componentes celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (MACHADO, 2000; PRATES *et al.*, 2010).

A escolha do FS é imprescindível, visto que, para garantir a eficácia da TFD este deve possuir baixa citotoxicidade na ausência da luz, já que alguns FS apresentam um alto índice de toxicidade às células, influenciando seu uso em pequenas concentrações para a aplicação da terapia (GERALDE *et al.*, 2017; TIM, 2015). Além disso, existem outros fatores que influenciam a eficiência do FS, tais como: pureza química; hidrossolubilidade; capacidade de permanecer estável em solução aquosa a fim de permitir circulação e acúmulo seletivo nas células; baixa agregação em soluções aquosas, adequada internalização ao tecido ou célula alvo, meia vida curta; rápida eliminação do corpo e ter alto rendimento quântico nos estados singlete e/ou tripleto para produzir grande quantidade de produtos citotóxicos induzindo a inativação celular (BOLUKI *et al.*, 2017; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Estudos sobre o efeito da TFD são realizados tanto em células procariontes quanto em células eucariontes, porém nota-se mais rapidez na resposta ao tratamento nas células procariontes. Em razão da maioria dos FS serem compostos de cargas positivas, e das bactérias possuírem maior quantidade de cargas negativas, acabam sendo mais suscetíveis a interação do FS pela atração de cargas opostas, aumentando a velocidade de resposta (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; KUMAR *et al.*, 2014; PARASURAMAN *et al.*, 2019).

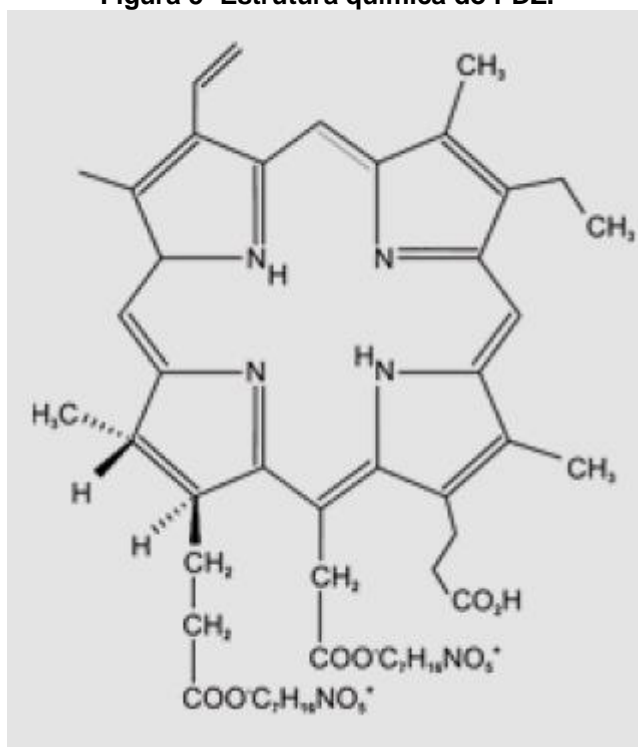
Os fotossensibilizadores são classificados por gerações, os FS de primeira geração são caracterizados pelas porfirinas que diferem entre si em relação ao número de unidades monoméricas, diméricas e oligoméricas de hematoporfirina que as compõem e que apresentam bandas de absorção de 400-650 nm da região visível. O primeiro FS autorizado para tratamentos clínicos foi o Photofrin®, em 1993, que

demonstrou bons resultados para o tratamento em células cancerígenas, porém durante o processo foi relatado elevada permanência no tecido alvo, por até 6 semanas, deixando o paciente sensível a luz, tornando-se necessária a procura por novos fotossensibilizadores (MORITZ *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

As clorinas são consideradas fotossensibilizadores de segunda geração e são formadas a partir da redução de um anel pirrol de uma porfirina. Sua atividade antimicrobiana é relatada no comprimento de onda entre 640-700 nm do espectro eletromagnético. As clorinas e6 são formas derivadas da clorofila-a e possuem alto rendimento de espécies reativas de oxigênio, baixa toxicidade no escuro, permitem tratamentos de lesões mais profundas devido à maior penetração da luz e apresentam curto período de fotossensibilidade, sendo excretadas até dois dias após o tratamento. Algumas clorinas já foram aprovadas para uso clínico como Temoporfin®, clorina e6 *N*-Aspartil (NPe6) e Visudyne®, O Photodithazine® (PDZ) já é utilizado clinicamente para o tratamento do câncer, mas no Brasil ainda são feitas pesquisas que comprovem sua eficácia na inativação bacteriana (ALVES *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2018; RESHETNICKOV *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2021; VITORIO *et al.*, 2021).

Obtido a partir da cianobactéria *Spirulina platensis*, o PDZ, é uma clorina e6 russa, modificada pela adição de *N*-metil-D-glicosamina 0,5%, que se trata de um composto capaz de solubilizar e estabilizar a clorina e6, tornando-a hidrossolúvel (figura 5). Algumas vantagens da aplicação do PDZ é a baixa agregação em soluções aquosas, ausência de citotoxicidade no escuro em altas concentrações, hidrossolubilidade, rápida eliminação do organismo relatada em 94% em 24h e 100% em pouco mais de 48h, capacidade de penetrar através de membranas biológicas, estabilidade a longos armazenamentos e, principalmente, alta geração de ERO (CORREA *et al.*, 2012; MORITZ *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2021).

Figura 5- Estrutura química do PDZ.



Fonte: Adaptado de Corrêa (2006).

Um teste clínico, realizado por Stranadko, em 2000, na Rússia, aplicou a TFD com PDZ em 44 pacientes com tumores malignos, obtendo ótimos resultados com remoção total do tumor em aproximadamente 54% e parcial em 46% dos casos (RESHETNICKOV *et al.*, 2000). Outro estudo realizado por Vitória, em 2021, aplicou a TFD com PDZ (200 a 3,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em células de gliosarcoma, e observou 99% de redução na viabilidade celular e que a geração de ERO pelo PDZ foi suficiente para desencadear morte celular, afirmando a eficácia do PDZ para tratamento de células cancerígenas (VITORIO *et al.*, 2021).

Baseado em estudos prévios sabe-se que a TFDa em cepas planctônicas de MRSA é eficaz com PDZ nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e irradiação 100 J/cm^2 , alcançando completa inativação bacteriana (SOUZA *et al.*, 2021). Há relatos também da ação antimicrobiana em outras cepas e antifúngica deste composto, porém ainda são necessários novos estudos que demonstrem o PDZ como um possível FS na aplicação da TFD para inativação de microrganismos em diversas formas de virulência como o biofilme (ALVES *et al.*, 2018a, 2018b; BUZZÁ *et al.*, 2014; CARMELLO, 2011; PINTO, 2013).

3.7 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A TFDa engloba a inativação de microrganismos causadores de infecções, sendo os principais, bactérias e fungos. Com o aumento da resistência aos tratamentos atuais a TFDa surge como uma alternativa que vem se mostrando promissora por ser eficaz e de baixo custo (AMARAL; LINARES; PERUSSI, 2020; DHARMARATNE *et al.*, 2020; PAOLILLO *et al.*, 2021)

A TFDa em superbactérias, que são bactérias resistentes a diversos tipos de antibióticos, está sendo testada em diversas espécies, com diferentes cepas resistentes, a fim de estipular um protocolo adequado para cada tratamento. O desenvolvimento do protocolo para aplicação clínica envolve a adequação de diversos parâmetros como, por exemplo: parâmetros de irradiação (fonte de luz, comprimento de onda, fluência de luz, densidade de potência); características do FS (concentração, tempo para internalização na célula e capacidade de geração de ERO); número e intervalos das aplicações; tipo de microrganismo a ser inativado; entre outros. Por este motivo, não é fácil estabelecer um protocolo clínico para a TFDa (AMARAL; LINARES; PERUSSI, 2020; STÁJER *et al.*, 2020).

A TFDa demonstra ser mais eficaz em bactérias Gram-positivas em comparação com as Gram-negativas por conta das diferenças nas estruturas das paredes celulares. A membrana das Gram-positivas é porosa contendo camadas de peptidoglicanos que permitem a passagem do fotossensibilizador. Já a parede celular das Gram-negativas é formado por uma membrana interna e uma membrana externa composta por lipoproteínas, polissacarídeos e fosfolípidios, ainda entre elas no periplasma há uma fina camada de peptidoglicano. Portanto, nas Gram-negativas esta barreira de permeabilidade restringe a penetração do FS, sendo necessária em alguns casos, utilização conjunta à antibióticos (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009; PATZI; VILLALOBOS, 2014; PENHA *et al.*, 2017).

Um estudo realizado por Geralde, em 2013, aplicou a TFDa nas espécies *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* com curcumina na concentração de 0,10; 0,25; 0,50 e 1 μM e irradiação com comprimento de onda 460 nm, e a fluência de 30 J/cm^2 , alcançando redução bacteriana apenas para *S. aureus* (GERALDE, 2013). Entretanto, outro estudo realizado por Sueoka, em 2018, aplicou a TFDa em cepas de *P. aeruginosa* com clorina TONS 504 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), irradiação a 30 J/cm^2 (660 nm) e observou redução bacteriana significativa após a aplicação de terapia (SUEOKA *et*

al., 2018). Desta forma, é possível determinar que a variação dos parâmetros, principalmente do FS utilizado, influencia no sucesso da terapia.

Estudos sugerem que com a aplicação da TFDa e a geração de ERO, principalmente, o oxigênio singlete, é possível causar danos irreversíveis às células bacterianas, gerando estresse oxidativo, oxidando componentes presentes no citoplasma de bactérias e fungos, como lipídeos, enzimas, proteínas e ácidos nucleicos, levando a inativação celular completa (KASHEF; HAMBLIN, 2017; MESQUITA *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Silva, em 2021, aplicou a TFDa em amostras multiespécies de pacientes ortodônticos com necrose pulpar e lesões periapicais, e quantificou a presença, pós TFDa, dos fatores de virulência bacterianos: Lipopolissacarídeo (LPS) e Ácido Lipoteicóico (LTA) e das citocinas pró-inflamatórias Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina – 1 (IL-1). Como resultado, observou que a terapia reduziu significativamente os fatores de virulência e as citocinas inflamatórias, demonstrando o potencial da terapia de reduzir, tanto a virulência bacteriana, quanto a inflamação (SILVA, 2021).

Winkler *et al.*, em 2017, induziram infecções de cepas MRSA em córneas em camundongos e como tratamento aplicaram TFDa com uma clorina e6 nas concentrações de 128 μM a 512 μM , e irradiação de 18,6 J/cm^2 com comprimento de onda de 670 nm. Após a TFD, como resultado, foi apresentada redução de aproximadamente 5 \log_{10} em todos os isolados (WINKLER *et al.*, 2017). Outro estudo realizado por Garcia *et. al.*, em 2018, aplicou a TFDa em culturas planctônicas e biofilme de amostras clínicas de *Streptococcus mutans* comparando o efeito de duas clorinas e6, o Fotoenticine® (FTC) e o PDZ com o FS azul de metileno (AM). Para as culturas planctônicas, o FTC e PDZ foram usados na concentração de 0,3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o AM na concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para os biofilmes, FTC e PDZ a 0,6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e AM 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, todos foram irradiados a 15 J/cm^2 (660 nm). Nos resultados, o PDZ e AM obtiveram redução bacteriana, porém o FTC conseguiu atingir 100% de inativação nas células planctônicas. Já a aplicação sobre o biofilme clínico, obteve redução bacteriana de 4 log para o AM, 6 log para o PDZ e de 5 a 8 log para o FTC, demonstrando que FS derivados da clorina demonstraram maior atividade antimicrobiana na TFDa contra *S. mutans* (GARCIA *et al.*, 2018)

Deste modo, em razão do aumento progressivo das superbactérias, são necessários estudos que abordam métodos alternativos à antibioticoterapia. A TFDa

é uma alternativa promissora que está se demonstrando eficaz em diversas espécies independente da resistência bacteriana, além disso, possui mínimos efeitos colaterais e apresenta baixo custo por necessitar apenas de uma fonte de luz e o fotossensibilizador para aplicação.

3.8 *Galleria mellonella* COMO MODELO DE PESQUISA *in vivo*

Na área da pesquisa, utiliza-se modelos *in vivo* para investigações médicas e científicas com o intuito de elucidar questões biológicas, desenvolver tratamentos e fármacos, contribuindo para a evolução humana. Os modelos para estudo *in vivo* incluem diversos animais, os mais comuns são: insetos, por exemplo, larvas e moscas e mamíferos como camundongos, ratos, coelhos, primatas e etc (ROSSONI *et al.*, 2017; SINGKUM *et al.*, 2019).

Embora os mamíferos apresentem maior semelhança com o sistema anatômico e fisiológico humano, a utilização deste modelo *in vivo* é conflitada por questões éticas, ocasionando certa dificuldade no uso desses animais para a pesquisa. Desta forma, a logística e a quantidade de animais são limitadas, e exigem infra estruturas próprias, ocasionando um tempo maior para avaliação do comitê de ética e para a execução dos experimentos, influenciando nas pesquisas clínicas que demoram a ser efetuadas (FIGUEIREDO-GODOI *et al.*, 2019; KANGASSALO, 2020).

Em razão do conflito ético e dificuldade de manutenção do modelo *in vivo* vertebrado, a aplicação do modelo invertebrado vem ocorrendo em grande escala. A economia, facilidade de manipulação, manutenção e aceitabilidade ética, tamanho pequeno, estruturas anatômicas simples, e curta duração de vida, contribuem para a aplicação da larva de *G. mellonella* como modelo *in vivo* ideal para investigação em larga escala (ASAI *et al.*, 2020; ROSSONI *et al.*, 2019a; SINGKUM *et al.*, 2019; CHIBEBE JUNIOR *et al.*, 2013a; CHIBEBE JUNIOR *et al.*, 2013b; ROSSONI *et al.*, 2019b).

Estudos demonstram que essa espécie possui um sistema imune altamente eficaz que é capaz de combater bactérias, fungos e protozoários. No entanto, não exibem adaptações de resposta imune adquirida, tais como célula T, célula B e anticorpos, como no modelo mamífero. Porém, possuem resposta imune inata com a atuação, principalmente, dos hemócitos que agem de forma semelhante aos neutrófilos nos mamíferos. Além disso, o tamanho das larvas permite a injeção de

substâncias diretamente na hemolinfa e a coleta de hemolinfa e outros órgãos para posterior análise (SINGKUM *et al.*, 2019; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020; WOJDA, 2017).

Em 2000, Cotter, Doyle e Kavanagh, demonstraram que as larvas de *G. mellonella* podem morrer decorrente de infecção por diversos patógenos humanos bacterianos e fúngicos, mas também podem sobreviver sobre infecção de microrganismos não patogênicos. Desta forma, é possível estudar fatores de virulência, mecanismos de resposta imune, patogênese da doença, tratamentos e ação de fármacos (COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

A partir desta descoberta, as larvas de *G. mellonella* foram amplamente utilizadas para estudar os mecanismos de infecções por microrganismos, entre as bactérias estudadas estão *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii*, entre outros (ANDREJKO; MIZERSKA-DUDKA, 2011; ASAI *et al.*, 2020; JACOBS *et al.*, 2014; MUKHERJEE *et al.*, 2011; RADY *et al.*, 2020; RICHMOND *et al.*, 2016). Entre os fungos estudados estão *Cryptococcus ssp*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (BOUKLAS *et al.*, 2015; CHIBEBE JUNIOR *et al.*, 2013a; 2013b; FIRACATIVE; DUAN; MEYER, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018b; SLATER *et al.*, 2011). Atualmente, além dos mecanismos de infecção e identificação de genes, as larvas estão sendo utilizadas para avaliar a eficácia das alternativas de tratamento para infecções bacterianas e fúngicas, como a TFDa.

Garcez *et al.*, em 2020, aplicaram a TFDa sozinha e em ação conjunta com antibióticos em larvas de *G. mellonella* infectadas por cepas resistentes de *E. coli* e observaram que a aplicação prévia da TFDa tornam as larvas mais suscetíveis a ação dos antibióticos sugerindo uma alternativa ao tratamento de bactérias resistentes (GARCEZ *et al.*, 2020).

Portanto, larvas de *G. mellonella* como modelo animal para pesquisas *in vivo* podem auxiliar na compreensão sobre infecções por microrganismos, mecanismo de ação de fármacos e sua eficácia, avaliação de terapias e potenciais tratamentos, desenvolvimento de produtos médicos, entre outros (JEMEL *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2018b; ROSSONI *et al.*, 2019b). Sendo uma ótima opção de modelo *in vivo* para avaliar a eficácia da TFDa em infecções por cepas resistentes de *S. aureus*.

4 METODOLOGIA GERAL

4.1 Local do Estudo

Este estudo foi realizado no Laboratório de Fotobiologia Aplicada à Saúde (PHOTOBIO) da Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP e no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia /ICT da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus São José dos Campos.

4.2 Obtenção e Manutenção das Cepas Bacterianas

A cepa MRSA (PBNS02SA) é do acervo do Laboratório PHOTOBIO, fruto de parceria anterior com o Laboratório Oswaldo Cruz de São José dos Campos. As cepas foram mantidas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – DIFCO) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h. Posteriormente, suspendidas a caldo BHI em eppendorfs com 5% de glicerol e acondicionadas em freezer à -20°C.

4.3 Obtenção e Preparação do Fotossensibilizador

O fotossensibilizador PDZ produzido pela empresa russa Veta-Grand®, foi cedido pelo Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos – USP. Apresenta-se inicialmente na concentração de 5 mg.mL⁻¹, sendo diluído em Tampão fosfato-salino (PBS) nas concentrações de 50 e 75 µg.mL⁻¹. Essas concentrações foram determinadas baseado em um estudo prévio que demonstrou total inativação bacteriana em cepas MRSA sob forma planctônica (SOUZA *et al.*, 2021). O PDZ foi armazenado a 4°C e mantido na ausência da luz durante o processo.

4.4 Preparo das Bactérias:

As culturas de MRSA, foram preparadas a partir da semeadura em 10 mL de caldo BHI e incubadas por 24 h em estufa a 37°C, para crescimento e reativação da cepa.

5 ESTUDO *IN VITRO*

5.1 Metodologia para Aplicação da TFDA Em Biofilme MRSA, Estudo *In Vitro*

5.1.2 Preparo do Biofilme

Após o preparo das bactérias, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e em seguida foi adicionado PBS estéril até obter uma solução bacteriana à 1,175 de densidade óptica 490 nm, que equivale a aproximadamente 1×10^8 células/mL. Após o preparo da solução, 225 μ L foi adicionado a 2 mL de caldo BHI para cada grupo em placas de 24 poços. 24 h após a formação foi retirado toda a solução dos poços, lavados duas vezes com PBS e adicionado 2 mL de BHI, para a manutenção do biofilme com formação até 48h.

5.1.3 Internalização do PDZ em biofilme de cepas MRSA

Para avaliar a internalização do PDZ, o biofilme foi montado sobre lamínulas dispostas em placa de 24 poços. Após o preparo do biofilme de 48 h, as bactérias foram incubadas durante 15 minutos com 300 μ L de PDZ nas concentrações de 50 e 75 μ g.mL⁻¹. Após a incubação, o FS foi retirado e as amostras foram lavadas com PBS. As lamínulas foram montadas em lâminas com *ProLong™ Diamond Antifade Mountant* com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e observadas em Microscópio Confocal LSM 700 Zeiss, excitação para DAPI em 405 nm e PDZ em 555 nm, onde as imagens foram capturadas pelo software Zen (Zeiss).

5.1.4 Divisão dos grupos experimentais

Para a avaliação da TFDA foram divididos grupos controle não irradiados e irradiados, grupos apenas com o PDZ e grupos em que foi aplicado a terapia (Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos experimentais para o método *in vitro*.

GRUPO	TRATAMENTO
-------	------------

Controle não irradiado PDZ	Apenas PBS PBS + PDZ
Controle Irrradiado TFDa	PBS + Irradiação PDZ + Irradiação

5.1.5 Aplicação da TFDa e parâmetros de irradiação

Nos grupos TFDa, grupos com a presença de PDZ, os biofilmes de MRSA foram previamente incubados com PDZ nas concentrações de 50 e/ou 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto os grupos sem PDZ foram incubados com PBS, ambos por 15 minutos. Em seguida, nos grupos irradiados, foi realizada a irradiação com as fluências de 25, 50 e/ou 100 J/cm^2 , nos tempos de 16 minutos e 40 segundos, 33 minutos e 20 segundos, 53 minutos e 20 segundos e 1 hora 6 minutos e 40 segundos, respectivamente. Os grupos, controle não irradiado e PDZ, foram mantidos ao abrigo de luz. A irradiação foi realizada utilizando uma Biotable (Biotable/Biopdi660) com 54 LEDs, com comprimento de onda de 660 nm e densidade de potência de 25 mW/cm^2 .

5.1.6 Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Após a aplicação dos tratamentos, foi realizada a dissolução mecânica do biofilme com auxílio de alça descartável. Após homogeneizados, foi realizada a diluição seriada dos grupos experimentais até a proporção de diluição equivalente a 10^{-10} . As diluições foram semeadas pelo método de gota (10 μL) em ágar BHI e incubados a 37°C durante 24 h para posterior contagem de UFC/mL.

Durante a análise dos dados foi selecionada a melhor diluição em que fosse possível realizar a contagem de colônias, não sendo necessariamente a mesma para todos os grupos experimentais. A contagem de unidades formadoras de colônias foi submetida a seguinte fórmula: " $\text{UFC}/\text{mL} = \text{Número de colônias} \times \text{Fator volume} \times \text{Fator diluição}$ ". O valor obtido de UFC/mL foi transformado para escala logarítmica de base 10 (\log_{10}) utilizando o software Microsoft Office Excel.

Este ensaio foi realizado mais de uma vez em dias distintos e em triplicata para garantir a fidelidade dos dados.

Tabela 2- Divisão dos grupos experimentais para contagem de UFC/mL.

GRUPO	IRRADIAÇÃO	PDZ
-------	------------	-----

Controle não irradiado	-----	-----
PDZ	-----	50 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Controle Irrradiado	25, 50 e 100 J/cm^2	-----
TFDa	25, 50 e 100 J/cm^2	50 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

5.1.7 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio

A análise das espécies reativas de oxigênio foi realizada com a sonda diacetato 2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína (DCFDA) que é uma forma reduzida de fluoresceína usada como indicador para espécies reativas de oxigênio em células. Neste ensaio foram avaliados os grupos controle irradiado e TFDa. Após o preparo do biofilme em uma placa de 24 poços, o PDZ na concentração de 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi incubado durante 15 min. Em seguida foram adicionados 300 μL do reagente DCFDA na concentração de 100 μM e incubado durante 30 minutos. Depois desse intervalo, ainda com o reagente foi feita a irradiação com fluência de 100 J/cm^2 . A leitura foi realizada por espectroscopia de fluorescência usando o equipamento *Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader* (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) com excitação a 480 nm e emissão a 530 nm.

5.1.8 Avaliação da capacidade metabólica bacteriana por metabolização do resazurin

Resazurin é um reagente que permite a determinação da capacidade metabólica das células e quando adicionado em solução bacteriana é metabolizado pelas células viáveis. A solução de resazurin foi preparada na concentração de 6,75 mg.mL^{-1} , posteriormente a solução foi filtrada e armazenada no escuro.

Para a análise metabólica, o biofilme foi montado em uma placa de 96 poços seguindo o mesmo protocolo do item 4.2. porém, com o volume proporcional de 22,5 μL de solução bacteriana para 200 μL de BHI. Após 48h foi realizada uma lavagem com PBS para retirar as células planctônicas. O PDZ na concentração de 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi incubado durante 15 min e em seguida a irradiação foi realizada com a fluência de 100 J/cm^2 . Após a aplicação da TFDa, foi adicionado 4 μL do resazurin por poço. Após 4 h de incubação a 37°C foi observado que células bacterianas ativas metabolizaram o reagente, modificando sua coloração de uma cor roxa/azulada para uma cor rosa fluorescente. Posteriormente, a solução foi quantificada por espectrofotometria espectroscopia de fluorescência, usando o equipamento *Synergy HT Multi-Detection*

Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) na excitação 528/20nm e emissão 645/40nm.

5.1.9 Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa foi realizada utilizando o corante cristal violeta (CV) que tem a capacidade de aderir à superfície celular, determinando a área de formação do biofilme que constitui a biomassa formada pela matriz extracelular e bactérias. A formação do biofilme foi feita em uma placa de 96 poços, após 48 h, foi feita uma lavagem com PBS para retirar as células planctônicas, em seguida o PDZ na concentração de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi incubado durante 15 min e a irradiação foi realizada com a fluência de 100 J/cm^2 .

Após a aplicação da terapia foi retirado o PBS e as amostras foram fixadas com metanol por 15 min. Em seguida, o metanol foi removido, e os grupos foram mantidos em estufa para a completa secagem do metanol durante 2 h. Após a secagem, o CV (0,5%) foi adicionado às amostras e incubado por 20 minutos. Posteriormente, os grupos foram lavados duas vezes com PBS para a remoção do CV não aderido ao biofilme. O CV que permaneceu aderido ao biofilme foi removido com a adição de ácido acético (33%). As soluções obtidas foram transferidas para outra placa para a leitura. A leitura foi realizada por absorvância 560 nm com leitor espectrofotômetro PACKARD, modelo Perkin Elmer SpectraCount BS 10000.

5.1.10 Avaliação morfológica do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliação morfológica, o biofilme foi montado sobre lamínulas em placas de 24 poços. Após a aplicação dos tratamentos, os grupos foram fixados com uma solução de fixação (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 4,0%; tampão cacodilato 0,1M; cloreto de cálcio 1mM e água por osmose reversa). Após a fixação, as amostras foram desidratadas com soluções crescentes de álcool de 10, 25, 70, e 90% por 20 min e 100% por 1 hora. A placa foi deixada secando durante 24 h em estufa a 37°C para a posterior montagem das lamínulas em *stubs* específicos. As amostras foram metalizadas (Metalizadora Emitech k550x) e a leitura foi realizada pelo Microscopia Eletrônica de Varredura EVO MA 10 Zeiss.

5.1.11 Análise estatística

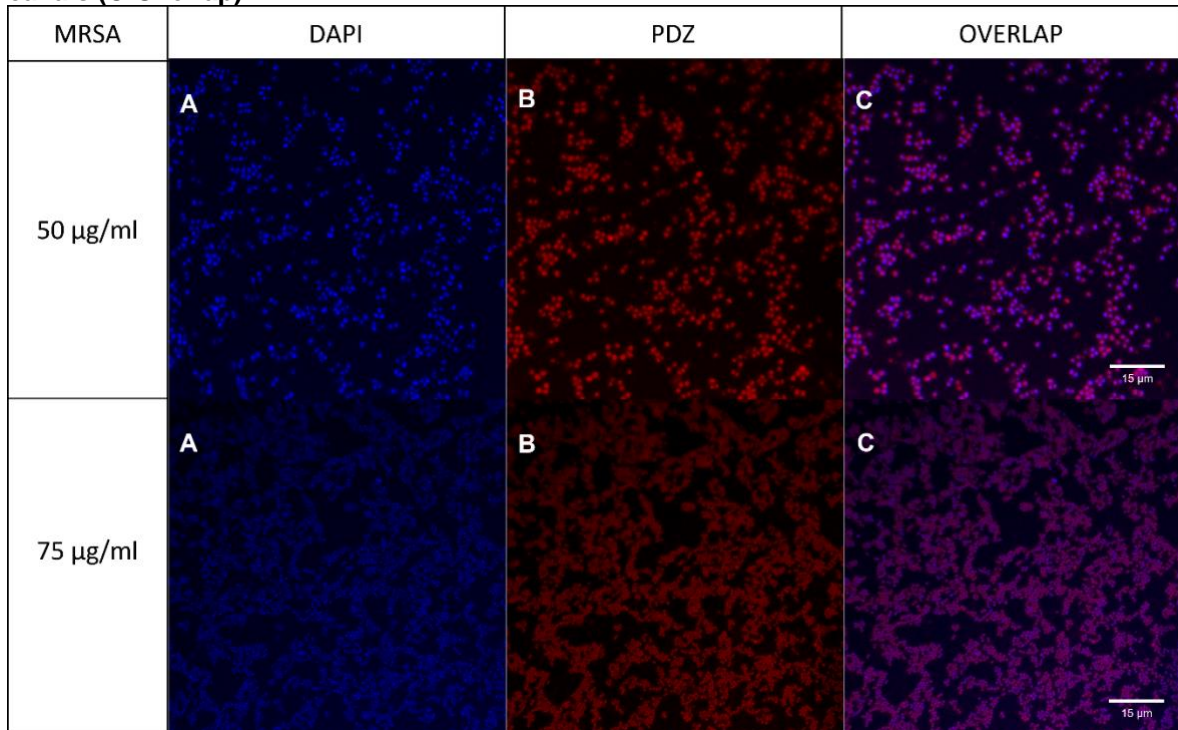
Nos experimentos in vitro as análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas utilizando o software Bioestat 5.0, com teste ANOVA e Tukey two way, considerando valor de $p \leq 0,05$.

5.2 Resultados

5.2.1 Internalização do Photoditazine® em Biofilme de Cepas MRSA

A figura 6 e 7 apresentam as micrografias obtidas por microscopia confocal de fluorescência de biofilme MRSA, o intuito deste teste foi avaliar se o tempo de incubação de 15 minutos foi suficiente para a internalização do PDZ nas bactérias.

Figura 6 - Micrografias obtidas por Microscopia Confocal para biofilmes de MRSA incubadas com PDZ nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Apresentando as colunas com Marcação com o DAPI marcando o DNA bacteriano (A), Fluorescência emitida pelo PDZ(B) e sobreposição dos canais (C-Overlap).

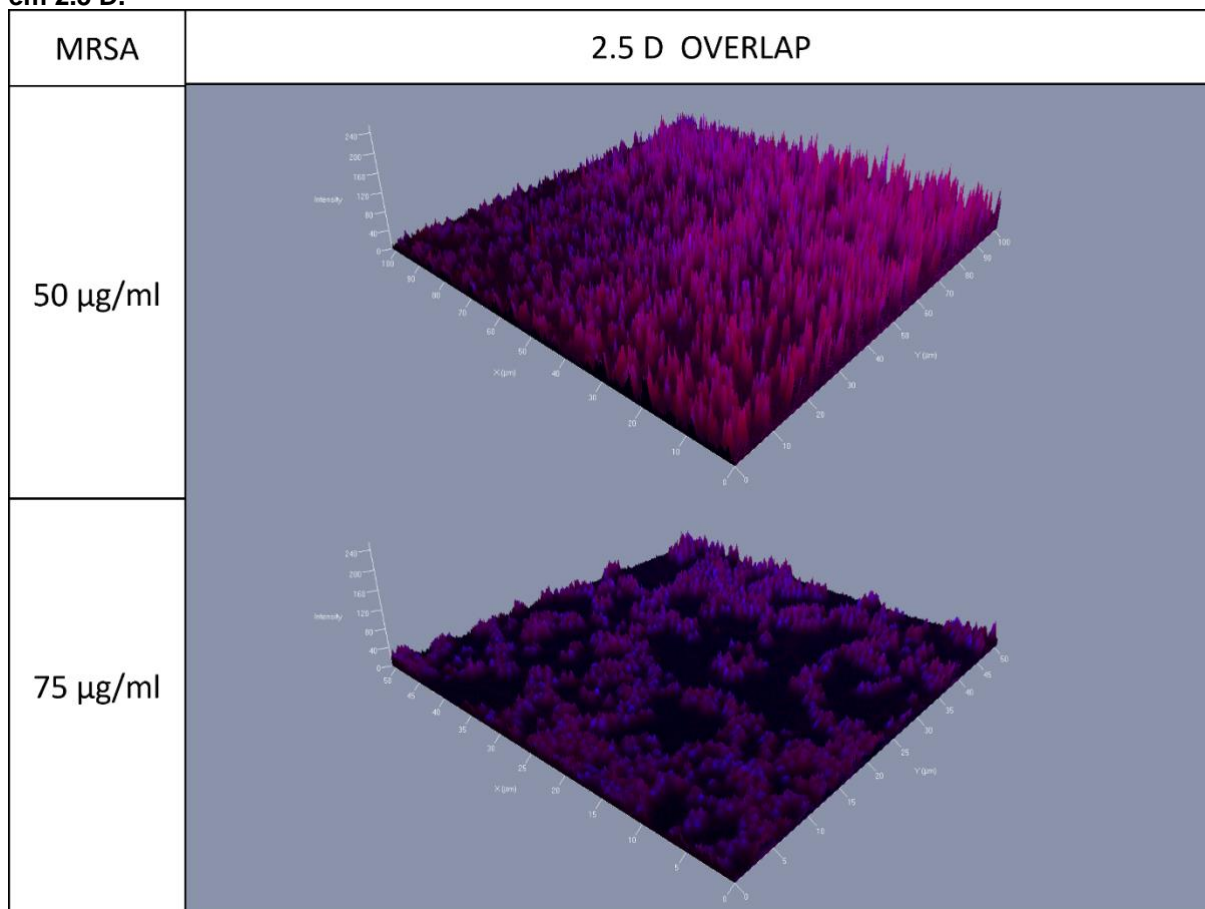


Fonte: Próprio autor.

A marcação com DAPI permitiu visualizar as delimitações celulares, visto que, em seres procariontes o material genético encontra-se disperso no citoplasma. Sendo assim, foi possível visualizar a morfologia de arranjos em cocos, característica típica de cepas de *S. aureus*.

A marcação com PDZ permitiu observar que a difusão do FS também se assemelha com as delimitações celulares e a sobreposição das imagens permitiu afirmar que houve interação do PDZ com as células bacterianas uma vez que, o sinal emitido pelo PDZ encontra-se na mesma região que às marcações com o DAPI. Além disso, a sobreposição das imagens em 2.5 D permitiu observar a internalização em diversas camadas do biofilme (figura 7).

Figura 7 - Micrografia obtida por Microscopia Confocal de fluorescência de biofilme de MRSA incubadas com PDZ nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sobreposição dos canais DAPI e PDZ em 2.5 D.



Fonte: Próprio autor.

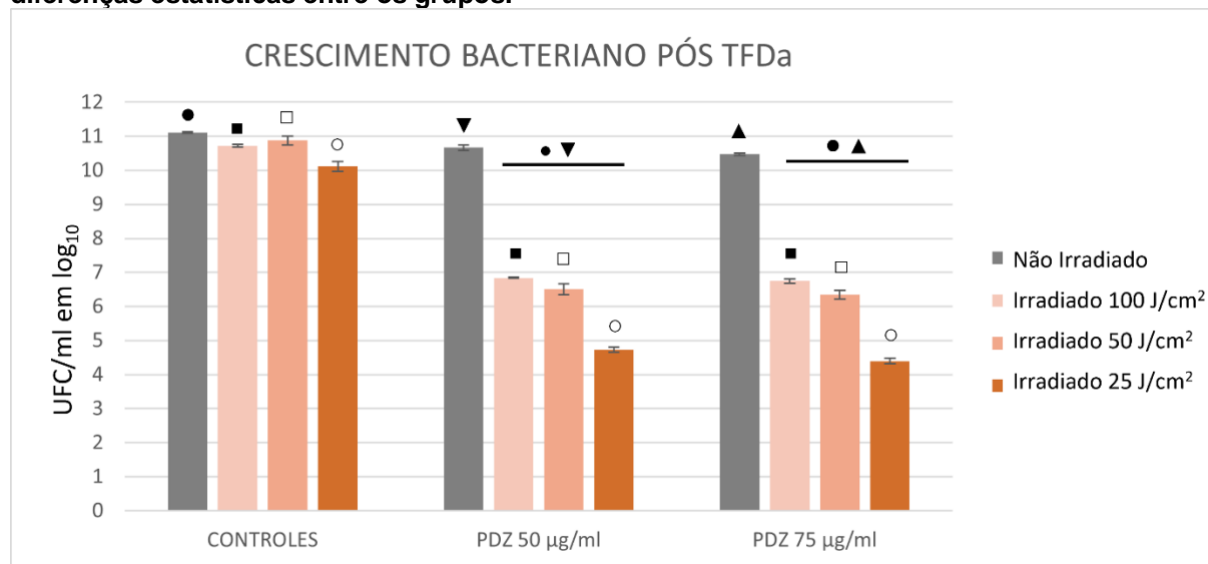
5.2.2 Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/ML)

Os grupos submetidos apenas à interação com o PDZ, não apresentaram diferença significativa em relação ao controle não irradiado, demonstrando que a ação individual do PDZ não foi considerada citotóxica para as células quando na concentração de 50 e 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os grupos controles irradiados nas fluências de 25, 50 e 100 J/cm^2 não obtiveram diferenças significativas em relação ao controle não irradiado, demonstrando que a ação apenas da luz também não foi citotóxica para o biofilme.

Todos os grupos submetidos à TFDa apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.01$) em relação ao controle não irradiado, demonstrando o potencial da terapia com reduções de 4,27; 4,60 e 6,37 para a concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 4,36; 4,76 e

6,71 para a concentração de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quando aplicada a TFDa nas fluências de 25, 50, 100 J/cm^2 , respectivamente (figura 8).

Figura 8- Valores médios de UFC/mL em \log_{10} em biofilme MRSA, apresentando grupo Controle não irradiado e irradiado, PDZ nas concentrações 50, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não irradiado e irradiado nas fluências de 100, 50 e 25 J/cm^2 . Os ícones *, \circ , \bullet , \blacksquare , \square , \blacktriangledown , \blacktriangle representam as diferenças estatísticas entre os grupos.



Fonte: Próprio autor.

Os grupos TFDa (em todas as irradiações) em relação aos grupos PDZ não irradiados obtiveram diferenças significativas ($p \leq 0,01$), demonstrando que a ação sozinha do PDZ não causou redução significativa, porém quando irradiado nas fluências de 25, 50 e 100 J/cm^2 foi capaz de causar redução de até 6,71 \log_{10} nos parâmetros de 100 J/cm^2 e 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PDZ.

Todos os grupos controle irradiados obtiveram diferenças significativas ($p \leq 0,01$) em relação aos seus respectivos grupos TFDa. Sendo assim, foi possível observar que a TFDa causou redução bacteriana significativa com diferenças aproximadamente de 3,88; 4,37 e 5,38 \log_{10} para o grupo PDZ 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e de 3,97; 4,53 e 5,72 \log_{10} para o grupo PDZ 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em relação a ação sozinha da luz nas fluências de 25, 50 e 100 J/cm^2 , respectivamente.

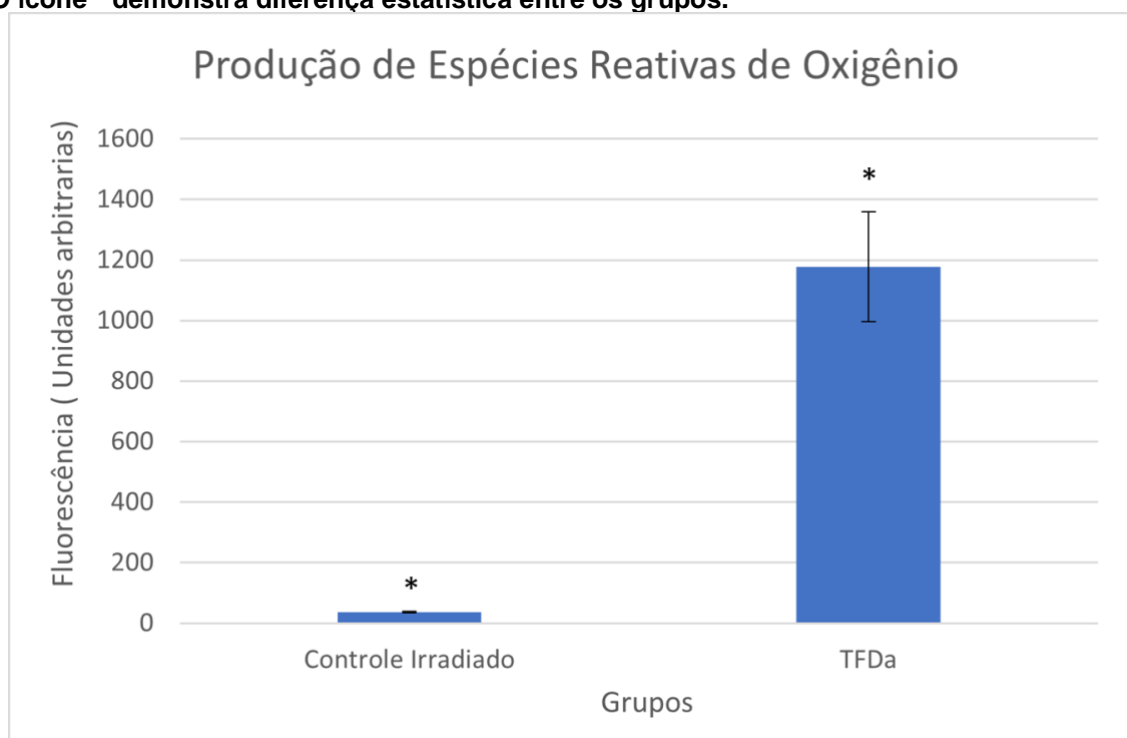
A partir da análise dos resultados, foram selecionados os parâmetros que obtiveram maior redução bacteriana para a aplicação nos demais testes do estudo, relacionados ao método *in vitro*. Os parâmetros selecionados foram a concentração do PDZ 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e fluência de 100 J/cm^2 , os quais foram capazes de causar redução bacteriana de aproximadamente 6,71 \log_{10} .

5.2.3 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio

A análise de ERO foi realizada para relacionar a produção de ERO com a eficácia da TFDa em biofilme de MRSA. Este teste foi realizado apenas nos grupos controle irradiado e TFDa, com os parâmetros de $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentração do PDZ e fluência de $100 \text{ J}/\text{cm}^2$.

Avaliando a produção de ERO foi possível observar diferença significativa ($p \leq 0.01$) entre o grupo controle irradiado e grupo TFDa, demonstrando que houve aumento significativo na produção de ERO de aproximadamente 1140 u.a. (unidades arbitrárias) gerados da interação do PDZ com a luz, demonstrando o potencial da TFDa na produção de ERO (figura 9).

Figura 9 - Produção de ERO em biofilme de MRSA, apresentando o grupo controle irradiado e o grupo TFDa com a concentração de $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PDZ, ambos irradiados na fluência $100 \text{ J}/\text{cm}^2$. O ícone * demonstra diferença estatística entre os grupos.



Fonte: Próprio autor.

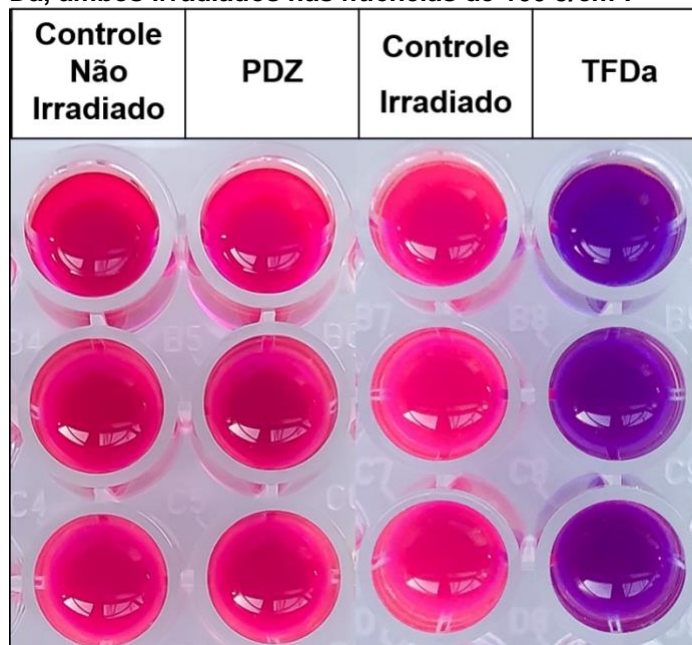
5.2.4 Avaliação da atividade metabólica bacteriana

A avaliação da atividade metabólica bacteriana foi realizada com o reagente resazurin. A metabolização do resazurin pode ser analisada por leitura visual e por espectrofotômetro de fluorescência. A solução de resazurin é natural na coloração

roxa e quanto maior a metabolização do reagente, há a modificação para coloração rosa.

Nos resultados da leitura visual foi possível observar coloração predominantemente rosa nos grupos controle não irradiado, irradiado e somente tratados com PDZ, apresentando um padrão similar de metabolização, indicando que não houve redução da atividade metabólica nesses grupos. Já no grupo TFDa foi possível observar coloração arroxeadada, significando que a atividade metabólica desse grupo foi significativamente menor (figura 10).

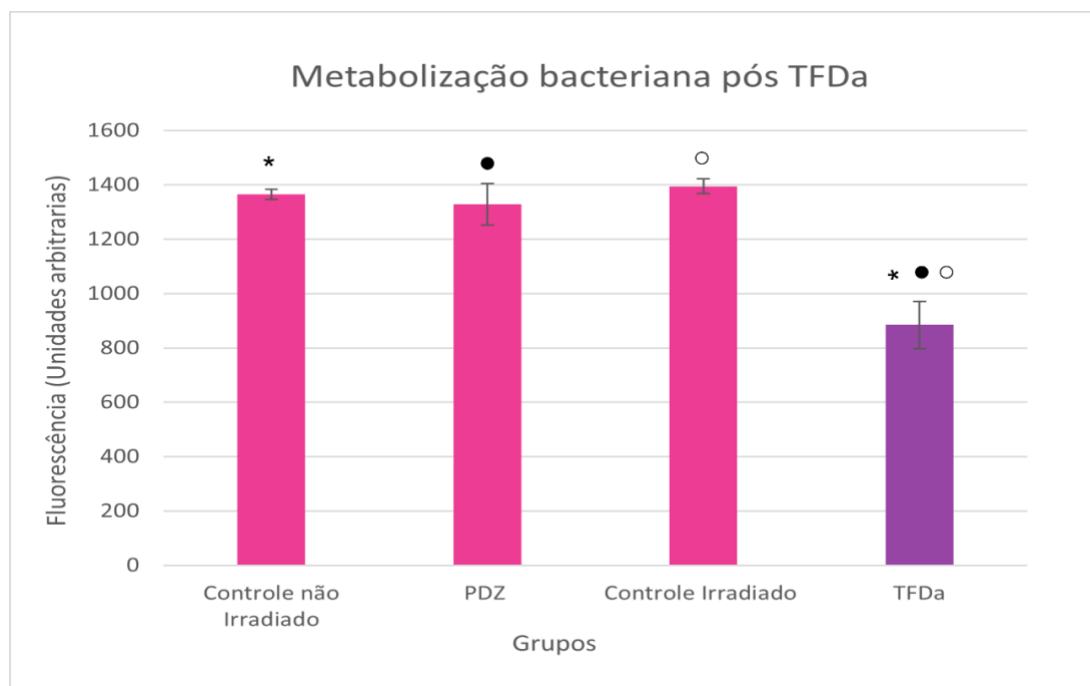
Figura 10 - Leitura visual da metabolização do resazurin em biofilme de MRSA após aplicação da terapia, apresentando grupo controle não irradiado, apenas PDZ na concentração $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, controle irradiado e TFDa, ambos irradiados nas fluências de $100 \text{ J}/\text{cm}^2$.



Fonte: Próprio autor.

Figura 11 - Avaliação da atividade metabólica bacteriana com resazurin em unidades arbitrárias de fluorescência para biofilme de MRSA, apresentando grupo controle não irradiado, apenas

PDZ na concentração $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, controle irradiado e TFDa, ambos irradiados nas fluências de 100 J/cm^2 .



Fonte: Próprio autor

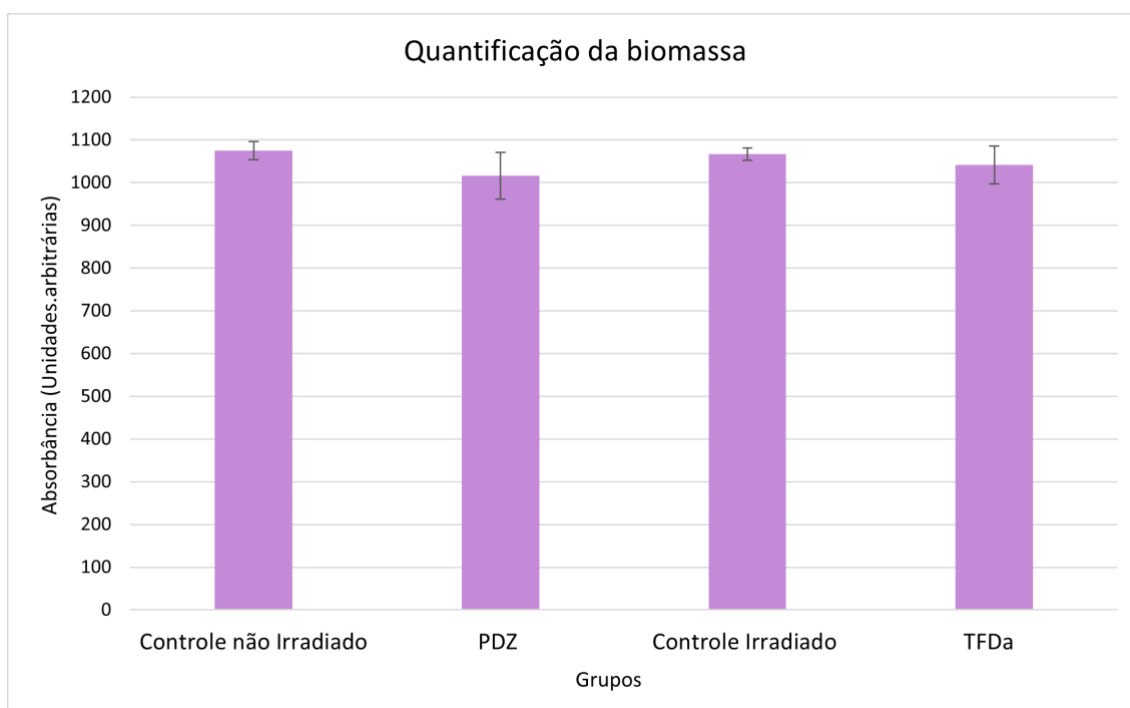
A leitura pelo espectrofotômetro de fluorescência corroborou com resultados da leitura visual, sendo possível observar os grupos controle não irradiado, irradiado e apenas PDZ obtiveram fluorescências maiores em torno de 1300 u.a. enquanto o grupo TFDa apresentou fluorescência em torno de 880 u.a, demonstrando menor atividade metabólica.

As fluorescências do grupo controle não irradiado em relação aos grupos controle irradiados não obtiveram diferenças significativas, demonstrando que apenas a luz não foi capaz de afetar a capacidade metabólica bacteriana. Os grupos com o FS não irradiado não obtiveram diferença significativa em relação ao grupo controle não irradiado, confirmando que o PDZ quando na ausência da luz não afetou a capacidade metabólica. Já os grupos controles não irradiado, irradiado e apenas PDZ, em relação ao grupo submetido a TFDa obtiveram diferenças significativas ($p \leq 0,01$), significando que a terapia diminuiu significativamente a capacidade metabólica bacteriana (figura 11).

5.2.5 Quantificação da biomassa total

A quantificação da biomassa foi realizada por coloração com Cristal Violeta, analisando os resultados foi possível observar que não houve diferença significativa entre todos os grupos avaliados, significando que a terapia não foi capaz de alterar a biomassa total do biofilme quando comparada com o grupo controle não irradiado. Apenas a aplicação da luz, assim como, apenas a aplicação do PDZ, também não indica alteração da biomassa. Ainda assim, foi possível avaliar que a ausência da diferença significativa entre as absorbâncias sugere que a estrutura formada em todos os grupos foi semelhante, indicando que a construção do biofilme em todos os grupos foi, relativamente, homogênea (figura 12).

Figura 12 - Quantificação da biomassa realizada com o método de coloração por Cristal Violeta. Apresentando grupo controle não irradiado, grupo apenas PDZ 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não irradiado, grupo controle Irrradiado 100 J/cm^2 e grupo TFDa com PDZ 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ irradiado a 100 J/cm^2 .

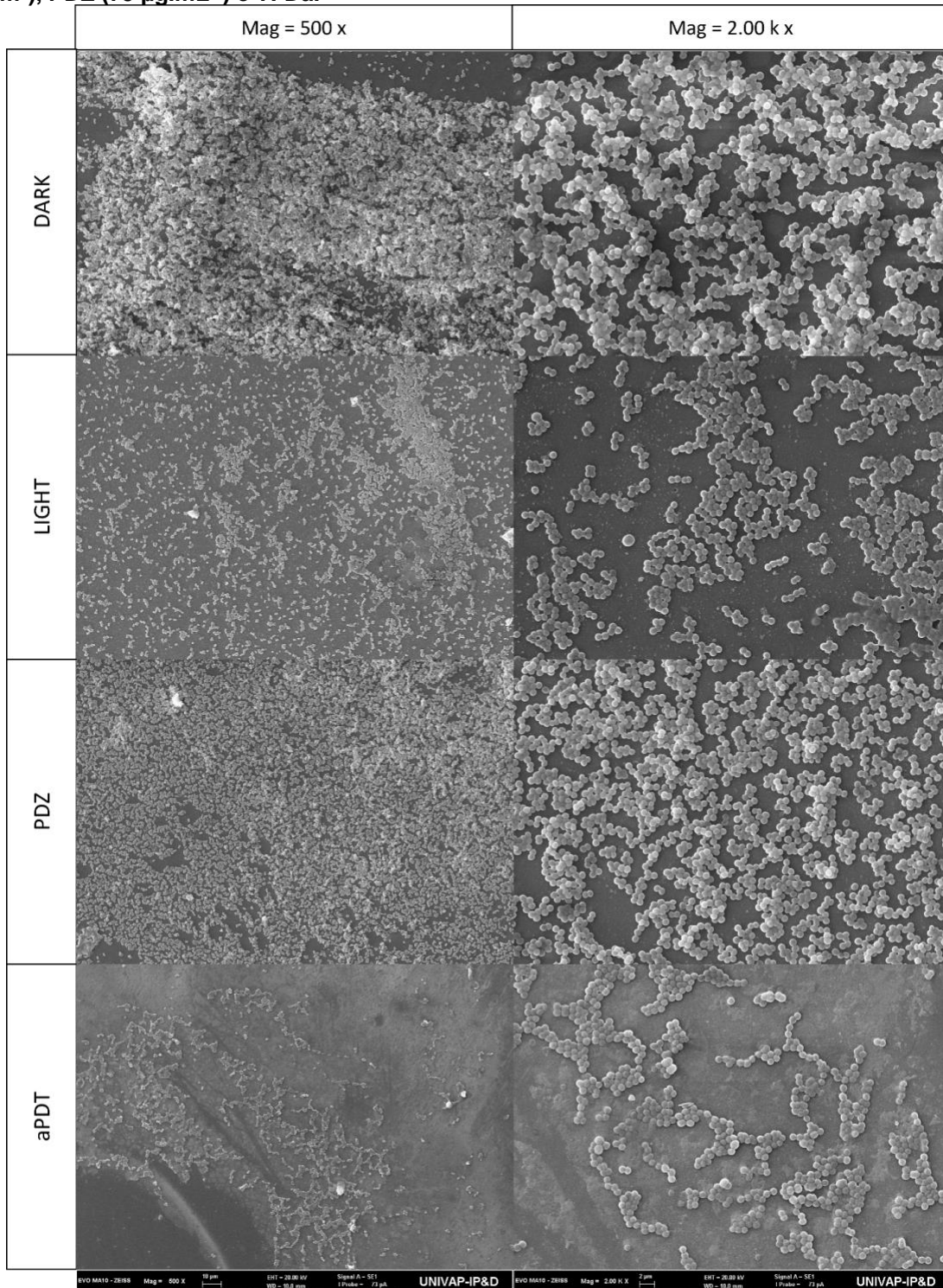


Fonte: Próprio autor

5.2.6 Avaliação morfológica do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na avaliação morfológica do biofilme foi possível observar em todos os grupos morfologia de cocos característica de *S. aureus*. No controle não irradiado pôde-se observar bactérias agrupadas com matriz extracelular e sobreposição de camadas, caracterizando a formação do biofilme. O grupo controle irradiado apresentou redução bacteriana, caracterizando perda da adesão do biofilme. Já no grupo apenas com PDZ ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi possível observar a formação do biofilme semelhante ao grupo controle não irradiado. O grupo TFDa apresentou, visivelmente, diminuições qualitativas de bactérias aderidas à biomassa após o tratamento com a TFDa, em ambas as magnificações observadas (500 x e 2.00 k x), demonstradas na figura 13.

Figura 13 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura biofilme, apresentando magnificações de 500 x e 2.00 k x dos grupos Controle não irradiado, Controle irradiado (100 J/cm²), PDZ (75 µg.mL⁻¹) e TFDa.



Fonte: Próprio autor

5.3 Discussão

O ponto inicial para a execução do presente estudo foi baseado em estudo anterior onde avaliou-se o efeito da TFDa em culturas planctônicas de cepas MRSA e MSSA (*Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina) com o PDZ nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tempo de incubação de 15 minutos e fluências de 25, 50 e 100 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, alcançando inativação completa em ambas as cepas, na maioria dos parâmetros (SOUZA *et al.*, 2021).

No presente estudo, embora tenham sido utilizados os mesmos parâmetros, não foi possível alcançar inativação completa em biofilme de MRSA. Provavelmente porque o biofilme apresenta uma estrutura rígida composta de camadas de bactérias unidas a matriz celular e que possui a atuação conjunta de diversos fatores de virulência, como por exemplo, componentes de superfície, moléculas de adesão, toxinas e moléculas de evasão do sistema imune, tornando mais difícil combate da infecção (ACOSTA *et al.*, 2018).

Um estudo realizado por Silva, em 2021, aplicou a TFDa em amostras multiespécies de pacientes ortodônticos com necrose pulpar e lesões periapicais, e quantificou a presença, pós TFDa, dos fatores de virulência bacterianos: Lipopolissacarídeo (LPS) e Ácido Lipoteicóico (LTA) e das citocinas pró-inflamatórias Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina – 1 (IL-1). Como resultado, observou que a terapia reduziu significativamente os fatores de virulência e as citocinas inflamatórias, demonstrando o potencial da terapia de reduzir, tanto a virulência bacteriana, quanto a inflamação (SILVA, 2021).

Deste modo, apesar do presente estudo não alcançar completa inativação foi possível observar redução de até 6,54 \log_{10} , afetando além da viabilidade, a capacidade metabólica bacteriana com diminuições significativas, podendo supor a redução da produção dos fatores de virulência bacterianos, sendo necessários estudos que comprovem esta hipótese.

O presente estudo demonstrou que o período de incubação de 15 minutos foi suficiente para internalização do PDZ pelas bactérias no biofilme e pelas micrografias 3D, foi possível observar que houve internalização do PDZ nas diversas camadas do biofilme. A internalização de compostos nas células bacterianas é uma questão muito abordada, sabe-se que a composição mais complexa das bactérias Gram-negativas podem conferir uma certa resistência a entrada de compostos quando comparadas

com as Gram-positivas que possuem uma camada porosa de peptidoglicano (ALMEIDA JUNIOR, 2020).

Magacho et al., em 2020 e Pereira et al., em 2018 avaliaram a internalização do Azul de metileno ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em cepas planctônicas de bactéria Gram-negativa e Gram-positiva, respectivamente, e como resultado a internalização não foi efetiva em todas as Gram-negativas, já nas Gram-positivas foi possível observar maior internalização (MAGACHO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2018a).

Diante da dificuldade de internalização em bactérias planctônicas, preocupa-se em relação a internalização no formato de biofilme, entretanto, Bohm et al., em 2020, observaram maior acúmulo intracelular da protoporfirina IX (PpIX) induzida pelo 5-aminolevulinic acid (ALA) em biofilme de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) do que em bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*). Demonstrando que, ao contrário do pensamento de que a membrana externa da Gram-negativa pode dificultar de certa forma a penetração do FS, os autores afirmam que porinas presentes na membrana de bactérias Gram-negativas permitem que pequenas moléculas hidrofílicas entrem nas bactérias, visando a utilização de FS com moléculas hidrofílicas para o tratamento de Gram-negativas. Porém independente do maior acúmulo de ALA em *E. coli* e *P. aeruginosa*, mesmo uma alta produção de porfirina não foi capaz de fotossensibilizar a bactéria a ponto de aumentar a inativação (BOHM *et al.*, 2020). Ao contrário do presente estudo que demonstrou maior internalização no biofilme de MRSA levando a inativação celular na (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008) TFDa com o PDZ (50 e $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Apesar do atual estudo demonstrar que não houve diferenças significativas na biomassa após a aplicação da terapia, foi possível observar que houve diminuição da capacidade metabólica bacteriana e redução da viabilidade pelo teste de UFC/mL. A partir dos resultados, acredita-se que a capacidade de aderência bacteriana à biomassa não depende apenas da sobrevivência da bactéria, mas também a formação estrutural completa ressaltando a presença fundamental da matriz celular para manter a estrutura do biofilme (SOARES, 2019).

Para análise da formação do biofilme o teste mais comumente utilizado é a quantificação com o corante CV. O ensaio com este corante permite a análise da biomassa como um todo, corando células viáveis, células mortas e matriz extracelular (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Desta forma, bactérias com a viabilidade ou com a capacidade metabólica prejudicada podem permanecer aderidas a biomassa. Esta

suposição pode ser analisada comparando a execução dos testes de CV e MEV. Apesar do teste CV não demonstrar redução da biomassa, o MEV demonstrou diminuição qualitativa da biomassa após a TFDa, isso provavelmente se deve ao tempo de processamento da amostra. Para o MEV são necessárias várias etapas e lavagens da amostra, estendendo o tempo de preparo, enquanto no CV a estrutura foi observada imediatamente após a TFDa.

Quishida et al, em 2015 realizaram uma e três aplicações da TFDa com PDZ (175 e 200 mg.L⁻¹) e irradiação de 37,5 J/cm² (660 nm) em biofilmes multiespécies de *S. mutans*, *C. albicans* e *C. glabrata*, observando que apenas uma aplicação da TFDa não apresenta diferenças significativas para a redução da biomassa. No entanto, a aplicação seriada (três vezes) da TFDa apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle, sugerindo que aplicações múltiplas da TFDa podem promover redução da biomassa, assim como redução bacteriana (QUISHIDA *et al.*, 2015a). Desta forma acredita-se, baseado nos resultados obtidos no estudo atual, que aplicações seriadas da TFDa tem o potencial de alcançar redução da biomassa, assim como, completa inativação do biofilme.

Tendo em vista a capacidade bacteriana de mutações de gene que conferem resistência aos antibióticos, é discutido a hipótese da aplicação seriada da TFDa em bactérias desenvolver mecanismos de resistência contra a terapia. Apesar de alguns artigos citarem que é improvável que ocorra algum mecanismo que barre a produção de ERO, visto que, trata-se de uma reação natural do organismo na presença de luz, danos constantes ao DNA por ERO podem levar a mutações seletivas (MENEHINI, 1988).

Sendo assim, a utilização demasiada de compostos como os FS em altas concentrações ou a aplicação em altas fluências preocupa em relação ao desenvolvimento de tolerância ou resistência a estes compostos (NIE *et al.*, 2021). Para avaliar estes fatores, Giuliani et al., em 2010, aplicou 20 vezes consecutivas a TFDa com ftalocianina Zn (II) e fluência de 30 J/cm² (600nm) em bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os autores usaram concentrações elevadas do FS, selecionadas por concentração inibitória mínima para avaliar a capacidade de resistência a altas concentrações. Ambas as bactérias foram incapazes de desenvolver resistência a TFDa. No entanto, quando na ausência da luz a concentração inibitória mínima do FS para *S. aureus* aumentou, demonstrando tolerância à concentração do FS (GIULIANI *et al.*, 2010). Apesar de não demonstrar resistência a ação da terapia, a tolerância a

altas concentrações do FS podem ser observada, alertando sobre o uso exagerado do FS, sendo necessários estudos que avaliem a tolerância a estes compostos e sobre a exposição seriada a altas fluências.

Outro mecanismo de tolerância a produção de ERO possivelmente adquirido por cepas de *S. aureus* está relacionado com a produção do pigmento carotenoide, que funciona como um metabólito secundário que exerce papel importante em driblar o sistema imunológico auxiliando na sobrevivência das bactérias (KASHEF; HAMBLIN, 2017). Também conhecido como estafiloxantina, este pigmento funciona como um fator de virulência que tem a capacidade de reduzir a penetração do oxigênio singlete, diminuindo a fluidez da membrana. Uma vez formado, o carotenoide é capaz de quelar o oxigênio singlete, entrando em estado excitado e podendo retornar ao estado fundamental, dissipando energia na forma de calor.

Reações exacerbadas causadas pelo carotenoide podem afetar diretamente a eficácia da TFDa, visto que, o oxigênio singlete é o principal produto formado pela TFDa, a utilização demasiada deste composto pode diminuir significativamente a citotoxicidade causada pela terapia, diminuindo sua eficácia contra cepas *S. aureus* (UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007). Portanto, a ineficácia da TFDa pode ser em razão da produção exacerbada de carotenoide, sendo necessários estudos que avaliem a presença do pigmento em cada cepa.

Para afirmar a capacidade de produção de ERO a partir da TFD, Elias, em 2021, quantificou a produção de oxigênio singlete e radicais superóxidos a partir da aplicação da TFD com AM, Eosina Y E Fluoresceína (1,5; 15 e 150 μM). Os resultados demonstraram que o AM obteve maior potencial fotodinâmico por apresentar valores superiores na produção de oxigênio singlete na maior concentração (150 μM), entretanto não obteve diferença significativa entre as concentrações em todos os FS utilizados (ELIAS, 2021).

No estudo de Souza et al, em 2021, a geração de ERO com o PDZ nos parâmetros testados também não obteve diferenças significativas entre as concentrações de PDZ (25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizadas. No entanto, se mostrou fluência dependente, sendo que em todas as concentrações de PDZ, na dose de 100 J/cm^2 , houve aumento significativo de ERO em relação às outras fluências de luz, alcançando completa inativação nos resultados de UFC/mL (SOUZA *et al.*, 2021).

Freitas et al., em 2019, também analisaram a formação de ERO, após aplicação da TFDa com curcumina e fluências de 8 e 20 J/cm^2 , e observaram que a produção

de ERO aumentou significativamente após a aplicação da TFDa nas cepas testadas, demonstrando um padrão de que quanto maior a fluência, maior a produção de ERO (FREITAS et al., 2019b).

No atual estudo, o PDZ na concentração de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrou ser um ótimo FS para geração de ERO quando irradiado com 100 J/cm^2 , comparando com os resultados de UFC/mL a quantidade de ERO gerada, reduziu $6,54 \log_{10}$. Sugere-se, baseado no fator fluência dependente, fluências de luz maiores, com o intuito de aumentar a produção de ERO a fim de atingir a quantidade necessária para completa inativação do biofilme.

Estudos sugerem que a geração de ERO e conseqüentemente a eficácia da TFDa pode ser amplificada com a adição de diversos compostos, dentre eles o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GARCEZ; HAMBLIN, 2017; YANG *et al.*, 2019). Um estudo realizado por Nie et al em 2021, utilizou um biofilme multiespécies derivado da saliva para aplicação da TFDa com Ce6 (50 mM) e combinou com H_2O_2 (0,3, 3,3, 33,3 mM) e irradiação a 15 J/cm^2 (450 nm ou 660 nm), com ou sem oxigênio. A combinação de 33,3 mM H_2O_2 e Ce6-aPDT teve maior atividade antimicrobiana em comparação com os compostos isolados, independentemente da presença de oxigênio e comprimento de onda de irradiação.

A metabolização bacteriana está diretamente relacionada com a capacidade de produção dos fatores de virulência bacterianos e principalmente a formação do biofilme. No estudo atual a avaliação metabólica foi realizada com o resazurin, um reagente azul, que ao ser metabolizado pelas células bacterianas, se reduz a resorufina que emite fluorescência, na coloração rosa/avermelhado (CSEPREGI *et al.*, 2018). A avaliação do metabolismo bacteriano com resazurin é muito aplicada para pesquisa de resistência a antibióticos, associando com o crescimento inibitório mínimo dos microrganismos (GERM *et al.*, 2019; JIA *et al.*, 2020; MISHRA *et al.*, 2019; RAVI; ASLAM; VEERARAGHAVAN, 2019). Entretanto este teste vem sendo aplicado para avaliar a metabolização bacteriana pós TFDa, visto que, é um teste fácil de conduzir e os biofilmes podem ser testados *in situ* sem serem removidos das superfícies, permitindo avaliar a metabolização total, o que evita potenciais problemas relacionados a variações na remoção de biofilme (NIE *et al.*, 2021). Magacho, em 2020, avaliou o metabolismo bacteriano pós TFDa com AM em bactérias Gram negativas, concluindo que é possível observar redução do metabolismo bacteriano após a aplicação da terapia (MAGACHO *et al.*, 2020).

Na avaliação da capacidade metabólica com resazurin, o grupo Ce6 irradiado (660) obteve redução significativa da atividade metabólica do biofilme, enquanto no UFC/mL as células de biofilme permaneceram viáveis em condições anaeróbias, demonstrando que apesar da condição anaeróbica, dificultando a obtenção de oxigênio para a geração de ERO, foi possível obter redução da atividade metabólica com a TFDa (NIE *et al.*, 2021).

Em contra partida Souza et al, em 2021, avaliou a metabolização bacteriana com resazurin pós TFDa, relatando completa inativação metabólica corroborando com os resultados de UFC/mL o qual demonstrou completa inativação de cultura planctônica de *S. aureus* com PDZ (SOUZA *et al.*, 2021). Desta forma, pode-se considerar que a diminuição da viabilidade bacteriana está diretamente associada à diminuição do metabolismo, mas nem sempre a redução da capacidade metabólica indicará redução da viabilidade. Contudo, o presente estudo demonstrou diminuição no metabolismo do biofilme com diferença significativa de aproximadamente 420 u.a. em relação ao controle não irradiado, corroborando também com os resultados de UFC/mL. A partir destas afirmações é possível sugerir que a diminuição do metabolismo bacteriano dificulta a replicação, a produção dos fatores de virulência e a produção de matriz extracelular essencial para a formação do biofilme, contribuindo para a inativação do biofilme.

Outros compostos que são estudados para avaliar a potencialização da TFDa são os peptídeos. Freitas et al, em 2019, aplicou a TFDa em biofilmes de *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* com Ce6 e AM combinada aos peptídeos AU (monômero de aureína 1.2) ou AU 2K (dímero C-terminal aurein 1.2) a fim de avaliar a capacidade de prevenir o desenvolvimento do biofilme. Foi observada redução da viabilidade por microscopia confocal e redução da capacidade metabólica utilizando resazurin em todos os grupos analisados, destacando o AU 2K que apresentou efeito antimicrobiano maior, tanto sozinho quanto combinado com TFDa. Além disso, os autores demonstraram que os peptídeos se ligam ao ácido lipoteicóico da parede celular de *E. faecalis*, apontando para um possível mecanismo chave de inibição do biofilme (FREITAS *et al.*, 2019a). Diante da dificuldade de inativar completamente o biofilme de MRSA, a atuação conjunta de compostos que aumentem a produção de ERO, ou que contribuam para barrar fatores de virulência podem ser benéficos para potencializar a ação da TFDa, como uma alternativa para antibioticoterapia.

Entre as espécies bacterianas patogênicas a principal dificuldade no tratamento são os fatores de virulência. São descritos 25 tipos de toxinas, 20 moléculas de evasão de sistema imune e 15 fatores de virulência relacionados ao *S. aureus* que se tratam de componentes de superfície que têm a capacidade de aderir a matriz extracelular ao colonizar o hospedeiro. Sendo que um dos fatores mais difíceis de combater é a produção da coagulase, que ocasiona acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, dificultando o acesso das células de defesa às bactérias (ACOSTA *et al.*, 2018). Desta forma, já é difícil o combate do biofilme de uma espécie virulenta, visto isso, o tratamento de infecções causadas por biofilmes multiespécies resistentes se torna ainda mais dificultoso em razão da presença de diversos fatores de virulência e variados mecanismos de resistência envolvidos.

Quishida *et al.*, em 2015, aplicaram a TFDa em biofilmes multiespécies de *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Candida glabrata* com PDZ nas concentrações de 100, 150, 175, 200, e 250 mg.L⁻¹ e irradiação de 37,5 J/cm² (660 nm). Observaram que a maior redução foi da bactéria *S. mutans* na concentração de 200 mg.L⁻¹ com diferença de 2,34 log₁₀ em relação ao grupo controle, e que a aplicação da TFDa com PDZ foi capaz de reduzir a viabilidade de todas as espécies do biofilme (QUISHIDA *et al.*, 2015b). Sendo assim, é possível realizar uma comparação da resposta a TFDa de Quishida *et al.* com o presente estudo, visto que, ambas as bactérias utilizadas são Gram-positivas. Embora os resultados de Quishida *et al.* apresentem redução bacteriana é possível observar que concentrações menores do PDZ (75 µg.mL⁻¹) associada a maior fluência (100 J/cm²) promoveu maior redução da bactéria *S. aureus*, no presente estudo. Seria interessante avaliar se a redução alcançada prevalece na presença de outras espécies formadoras de biofilme, podendo ser fungos, bactérias Gram-negativas e/ou Gram-positivas, ou se essa alteração influencia na mudança dos parâmetros utilizados neste estudo para alcançar a inativação.

Bokan *et al.*, em 2020, compararam o efeito da TFDa em cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) com um novo FS IQCy (quinono-cianina hexa-iodada) em relação aos FS Ce6 e HITC (1,3,3,1',3',3'-hexamethyl-2,2'-indotricarbocyanine iodide). Quando exposto à luz LED branca a 14,9 J/cm², 0,5 µM de IQCy, Ce6 e HITC inativaram, 99%, 40% e 30% de *S. aureus*, respectivamente, e a mesma concentração dos FS na fluência de 27,9 J/cm² inativaram 71%, 18% e 9%, demonstrando que o FS desenvolvido é promissor para inativação de cepas clínicas de *S. aureus*, e em

comparação com a Ce6 e HITC demonstrou melhor desempenho. IQCy e Ce6 não exibiram toxicidade no escuro em concentrações até 10 μM , assim como o PDZ no presente estudo, não apresentando citotoxicidade nas concentrações 50 e 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Souza et al., em 2019, aplicaram TFDa nas cepas de *S.aureus* (ATCC 25923) com o PDZ, e este, demonstrou melhor desempenho quando irradiado por LED vermelho (660 nm) e fluências (25, 50, 75 e 100 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), apesar de Bokan et al. citar que os espectros de absorção de IQCy, Ce6 e HITC se sobrepõem ao espectro de emissão do LED usado para excitação, o espectro direcionado para alcançar o pico de absorção do FS no estudo de Souza et al., demonstrou ser mais eficaz, visto que, alcançou completa inativação bacteriana (BOKAN et al., 2020; SOUZA, 2019). O estudo atual aplicou a irradiação no pico absorção máximo para o FS Ce6, atingindo maior redução bacteriana para cepa clínica de *S. aureus* comparado ao estudo de Bokan et al., demonstrando a importância de aplicar o comprimento de onda adequado para alcançar alta absorção do FS.

Luke-Marshall et al., em 2020, aplicaram a TFDa com Ce6 (10 μM) em biofilmes de *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Haemophilus influenzae* com irradiação de 90 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (100 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) alcançando redução de 4 a 6 \log_{10} indicando redução máxima de 99,9%. Além disso, sabe-se que após o tratamento, as bactérias associadas ao biofilme que são liberadas no meio podem colonizar novas superfícies ou causar maior disseminação se ainda estiverem viáveis. Por este motivo, Luke-Marshall et al. avaliou a viabilidade destas bactérias após a TFDa e afirmou que aquelas que se soltaram do biofilme estavam completamente inativadas. Para comprovar a liberação dessas bactérias do biofilme, realizaram MEV após a TFDa, relatando que houve diminuição significativa das bactérias aderidas em relação ao grupo controle (LUKE-MARSHALL et al., 2020).

No presente estudo, foi possível observar por MEV que a aplicação sozinha do PDZ não demonstrou redução visível do biofilme e que apenas a ação da luz com 100 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ demonstrou discreta diminuição da biomassa, corroborando com o resultado de UFC/mL que houve discreta redução bacteriana, porém não significativa. Ainda, foi possível observar diminuição qualitativas de bactérias aderidas à biomassa após a TFDa com PDZ em relação ao grupo controle, demonstrando o potencial da terapia para inativação do biofilme.

Com o intuito de alcançar completa inativação e evitar a recidiva do biofilme Luke-Marshall et al. realizaram uma segunda aplicação da TFDa imediatamente após a primeira, inibindo o crescimento bacteriano após 24h (LUKE-MARSHALL *et al.*, 2020). Reforçando novamente a possibilidade de que mais uma aplicação da TFDa possa ser benéfica, tanto para alcançar inativação completa, quanto para evitar a recidiva das bactérias.

6 ESTUDO *IN VIVO*

6.1 Metodologia para Aplicação da TFDA com Cepas MRSA em Modelo Invertebrado de *Galleria Mellonella*

6.1.1 Critério de seleção do modelo invertebrado de *Galleria mellonella*

Para a infecção de *S. aureus in vivo*, foram utilizadas larvas de *G. mellonella* fornecidas pelo laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos- UNESP. A quantidade de *G. mellonella* utilizada no experimento foi de 10 larvas para cada grupo pré-definido. As larvas foram infectadas no estágio final da fase larval com peso corporal entre 200 a 250 mg. Os insetos selecionados apresentaram coloração clara, sem pigmentos escuros em sua cutícula, descartando a possibilidade de algum processo infeccioso no animal interferir nos resultados.

6.1.2 Preparo para infecção *in vivo*

Para a inoculação do microrganismo foram utilizadas seringas *Hamilton* com capacidade de 10 μ L (Hamilton Inc, EUA) previamente esterilizadas com ácido peracético (Henkel - Ecolab GmbH, Düsseldorf, Alemanha). As injeções foram aplicadas com 10 μ L da suspensão com *S. aureus* e inoculadas na hemolinfa do inseto via sua última *proleg* direita. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foi realizada regularmente antes de cada experimento e em cada troca do conteúdo a ser injetado. As lavagens foram realizadas com 7 movimentos no êmbolo para cima e para baixo em solução de hipoclorito de sódio, álcool absoluto, água destilada estéril e PBS estéril, respectivamente.

Para cada ensaio de infecção foram realizados grupos controle. Este grupo recebeu a mesma quantidade de injeções que a dos grupos inoculados com o microrganismo, porém com 10 μ L de PBS. O objetivo deste controle foi avaliar, caso ocorra a morte do inseto, se a morte foi em virtude do trauma das injeções ou da técnica de manipulação do operador, excluindo danos físicos durante a injeção. Após a injeção, as larvas foram armazenadas em recipientes plásticos e mantidas no escuro em estufa a 37°C.

6.1.3 Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* testes pilotos de concentrações de MRSA, fluências de luz e concentrações do FS

No teste de concentração de MRSA, foi realizada curva de sobrevivência de *G. mellonella* injetando nas larvas suspensões nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 de *S. aureus*. No teste de fluência de luz foram aplicadas as fluências de 10, 25, 50, 75 e 100 J/cm² e densidade de potência de 30 mW/cm², com comprimento de onda de 660 nm. No teste de concentrações do FS, foram inoculados apenas o PDZ nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg.mL⁻¹. Em seguida, os animais foram dispostos em placas de Petri e incubados a 37°C no escuro. Foram realizadas checagens diárias das larvas, relatando o número de mortes e o índice de sobrevivência. Foi considerada morta a lagarta que não se movimentou ao toque por uma pinça metálica. Todos os insetos mortos foram removidos do grupo.

6.1.4 Terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Galleria mellonella*

Após determinada a concentração bacteriana a ser inoculada, a aplicação da TFDa *in vivo* foi realizada nos mesmos parâmetros do experimento *in vitro* com 50 e 75 µg.mL⁻¹ de PDZ e fluências de 25 e 50 J/cm² e densidade de potência de 30 mW/cm². As larvas de *G. mellonella* foram separadas em cinco grupos experimentais: Dois grupos controles, um com apenas a injeção de PBS; outro com a injeção de PBS e MRSA; grupo apenas submetido a irradiação, grupo PDZ com apenas a injeção do FS e sem irradiação e grupo TFDa com a aplicação do PDZ e submetido a irradiação (Tabela 3). A quantidade de grupos L, PDZ e TFDa foi dependente da fluência de luz e concentrações do FS determinadas no decorrer dos experimentos.

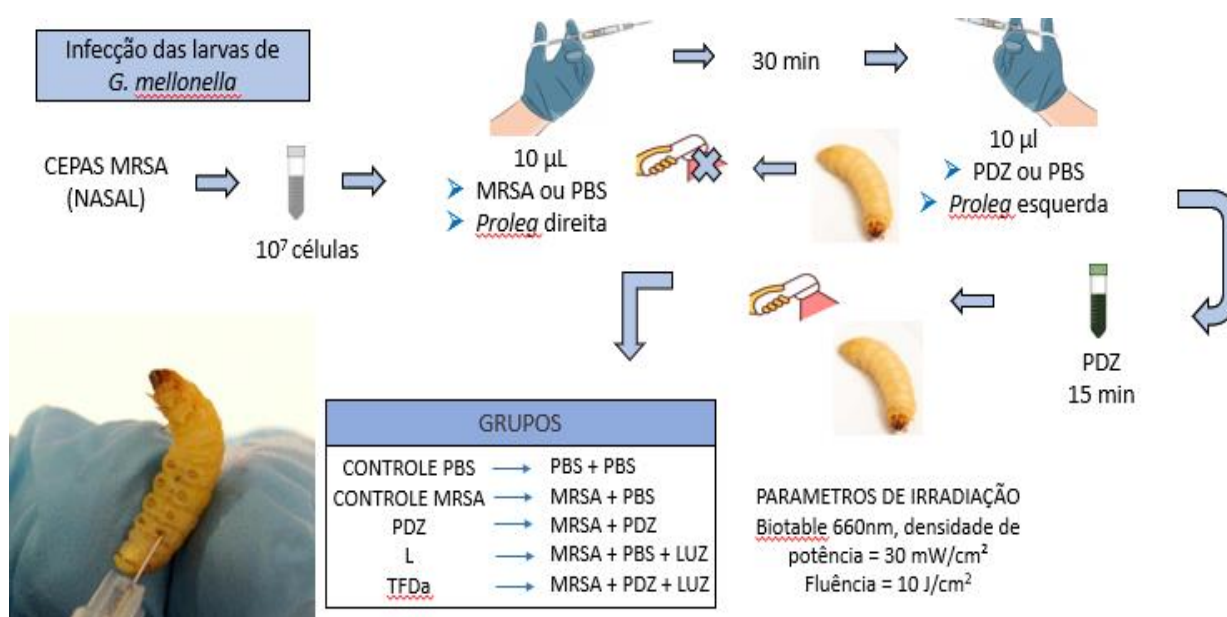
Tabela 3 - Divisão dos grupos experimentais *in vivo* e local e conteúdo das injeções em *G. mellonella*

GRUPO	<i>Proleg</i> direita	<i>Proleg</i> esquerda	LUZ
Controle PBS	PBS	PBS	-
Controle MRSA	MRSA	PBS	-

L (fluência aplicada)	MRSA	PBS	X
PDZ (concentração utilizada)	MRSA	PDZ	-
TFDa (fluência) + PDZ	MRSA	PDZ	X

Todos os grupos, com exceção do Controle PBS, foram inoculados com MRSA na *proleg* direita (tabela 3). Após 30 min da infecção de *G. mellonella* com MRSA, os grupos receberam as concentrações do PDZ ou do PBS (10 µL) na *proleg* esquerda e ficaram incubados por 15 min para a internalização do PDZ (figura 14). Em seguida, cada larva foi disposta em um poço da placa de 24 poços e os grupos que deveriam receber irradiação, foram expostos à luz. Já os outros grupos foram mantidos no escuro. Após a irradiação, os animais ficaram acondicionados em recipientes de plástico, mantidos no escuro e em estufa a 37°C. O número de larvas mortas foi anotado diariamente para determinação da curva de sobrevivência durante sete dias ou até a morte completa do grupo TFDa.

Figura 14 - Esquema de infecção e aplicação da TFDa em *G. mellonella*



Fonte: Próprio autor

6.1.5 Escala de saúde e sobrevivência

Foi avaliado a escala de saúde e sobrevivência de *G. mellonella* durante a análise da curva de sobrevivência após a aplicação da TFDa. A escala foi baseada no estudo de Loh et al, em 2013, onde foi estabelecido um sistema de pontuação

patológica, no qual é avaliada diferenças sutis na saúde das larvas com base em sua aparência. As características observadas foram: atividade (movimentação do animal), capacidade de formação de casulos, presença de melanização e sobrevivência. Para cada característica foi atribuída uma nota, e ao final a soma das notas varia de 0 a 10 (LOH *et al.*, 2013).

6.1.6 Análise hemocitária

Para a análise hemocitária, foi inoculado *S. aureus* em *G. mellonella* na concentração de 10^7 bactérias e após submetidas a TFDa nas condições descritas anteriormente, as larvas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 30 minutos. A divisão dos grupos está descrita na tabela 4, para cada grupo foi utilizado a quantidade de 10 larvas/grupo.

Tabela 4 - Divisão dos grupos experimentais para análise hemocitária, local e conteúdo das injeções em *G. mellonella*

GRUPO	<i>Proleg</i> direita	<i>Proleg</i> esquerda	LUZ
Controle PBS	PBS	PBS	-
Controle PBS (L10)	PBS	PBS	X
Controle PBS (PDZ)	PBS	PDZ	-
Controle PBS (PDZ + L10)	PBS	PDZ	X
Controle MRSA	MRSA	PBS	-
L (fluência aplicada)	MRSA	PBS	X
PDZ (concentração utilizada)	MRSA	PDZ	-
TFDa (fluência) + PDZ	MRSA	PDZ	X

A coleta da hemolinfa foi realizada a partir da imobilização das lavas em placas de Petri. Em seguida, os animais foram cortados com bisturi na parte ventral no sentido cefálo-caudal e espremidos para a retirada da hemolinfa. Foram coletados 10 µL da hemolinfa e diluídos em 990 µL de solução de IPS (tampão anticoagulante estéril – 150nM de cloreto de sódio, 5nM de cloreto de potássio, 10nM de tris-HCL PH 6,9, 10nM de EDTA e 30nM de citrato de sódio) dispostos em *ependorfs* previamente gelados. A contagem de hemócitos foi realizada em câmaras de Neubauer.

6.1.7 UFC/mL de hemolinfa

Após a TFDa foi realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da hemolinfa, para avaliar a permanência de *S. aureus* na *G. mellonella* após

a aplicação da terapia. A coleta da hemolinfa foi realizada como descrita anteriormente, após 30 minutos da aplicação da terapia. Em seguida, a solução foi submetida à diluição seriada em PBS e semeada em ágar BHI pelo método de gota escorrida. Após 24 h foi realizada a contagem de UFC/mL e os resultados foram transformados em \log_{10} .

6.1.8 Análise estatística

Nos experimentos *in vivo* escala de saúde, análise hemocitária e UFC/mL de hemolinfa, as análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas utilizando o software Bioestat 5.0, com teste ANOVA e Tukey two way, considerando valor de $p \leq 0,05$. Já para os experimentos de sobrevivência das larvas a análise estatística foi realizada com o teste de Logrank.

6.2 Resultados

6.2.1 Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* após inoculação de MRSA

Inicialmente, foi realizado o teste de curva de sobrevivência avaliando a inoculação de MRSA em *Galleria mellonella* nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 bactérias.

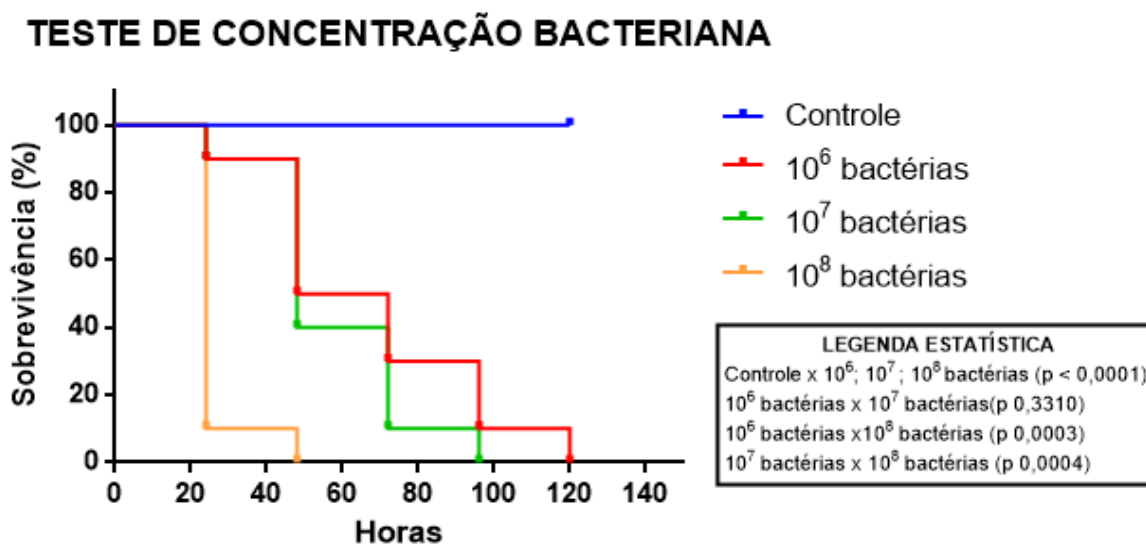
Foi possível observar que houve sobrevivência de 100% das *G.mellonella* no grupo controle até o período de 120 h após a inoculação. Já no grupo 10^8 pôde-se observar que em 24 h após a inoculação houve sobrevivência de apenas 10% das larvas, enquanto em 48 h essa concentração foi letal para *G. mellonella*.

No grupo 10^7 pôde-se observar que em 24 h 90% das larvas sobreviveram a esta concentração e que o período de letalidade total das *G.mellonella* ocorreu 96 h após. O grupo 10^6 também apresentou 90% de sobrevivência em 24 h, entretanto o período de letalidade das larvas se estendeu para 120h. Desta forma, foi possível observar diferenças significativas entre o grupo controle e todas as concentrações bacterianas. O grupo 10^6 e 10^7 apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo 10^8 . Mas ao comparar os grupos 10^6 e 10^7 não foi possível observar diferenças significativas.

A escolha da concentração a ser inoculada para os experimentos seguintes, foi realizada com base em uma concentração com um período de letalidade

intermediário, que não seja letal em 24 h, mas que seja letal em um curto período para avaliar a eficácia da TFDa com PDZ em inativar a infecção causada por cepas MRSA e auxiliar na sobrevivência das *G. mellonella*. Deste modo, foi selecionada a concentração de 10^7 que apresentou período de letalidade intermediário em relação as outras concentrações avaliadas. Todas as concentrações testadas demonstraram maior índice de mortalidade das larvas inoculadas por MRSA a partir de 48 h após a inoculação (figura 15).

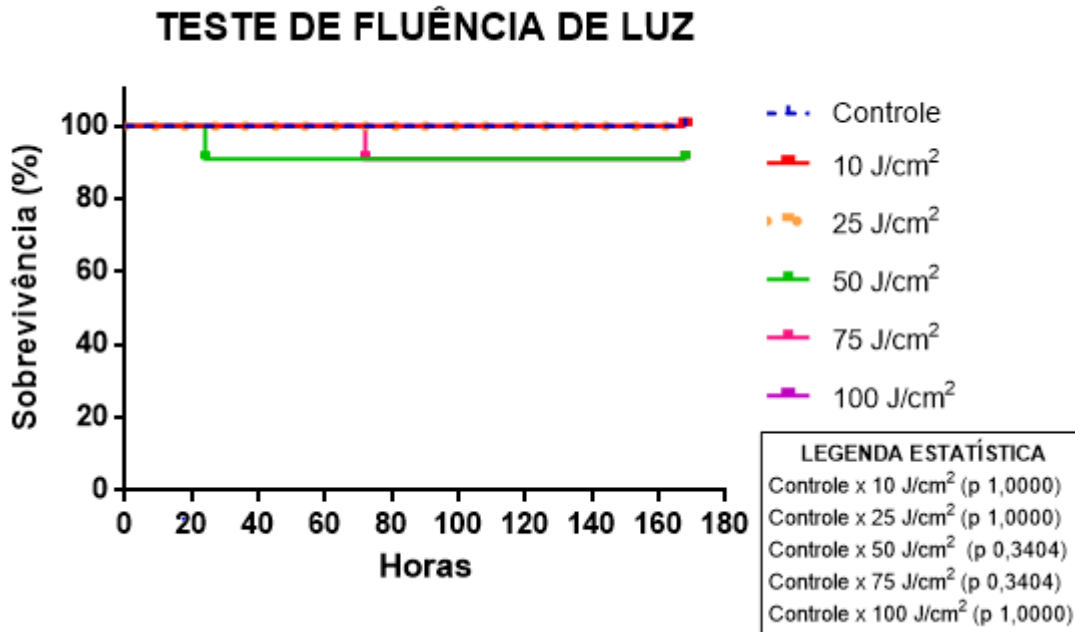
Figura 15 - Teste de concentração bacteriana apresentando grupo controle, sem inoculação bacteriana e grupos com inoculação de MRSA nas seguintes concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 e legenda estatística com comparação entre os grupos.



Fonte: Próprio autor.

Foram utilizadas as fluências de 100, 75, 50, 25 e 10 J/cm² com intensidade de 30 mW/cm², as quais demonstraram que apenas a ação da luz em todas as fluências aplicadas não foi citotóxica para *G. mellonella*, não obtendo diferenças significativas em relação ao grupo controle (figura 16). Tendo em vista a ausência da citotoxicidade foram selecionadas as fluências de 25 e 50 J/cm² para a aplicação inicial da TFDa com PDZ.

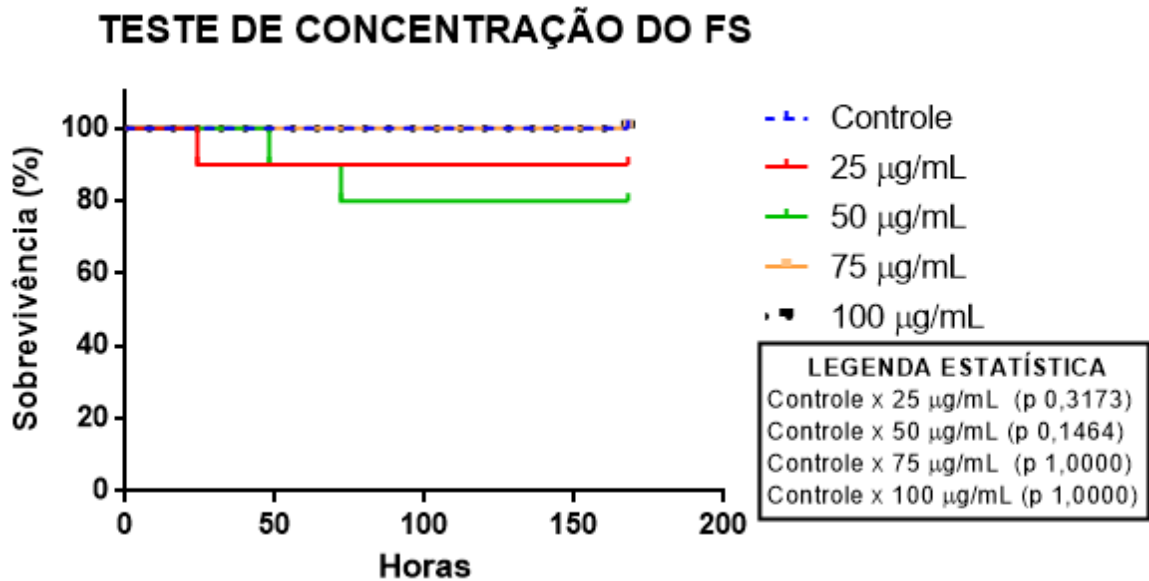
Figura 16 - Teste de dose de luz, apresentando grupo controle, mantido na ausência da luz, e grupos submetidos a fluência de 10, 25, 50, 75 e 100 J/cm² e intensidade de 30 mW/cm². Legenda estatística com comparação entre os grupos.



Fonte: Próprio autor.

Foram testadas concentrações de PDZ de 25, 50, 75 e 100 µg/mL, não foi observada diferenças significativas em relação ao grupo controle, demonstrando que a ação sozinha do PDZ nas concentrações utilizadas não foram citotóxicas para *G.mellonella* (figura 17). Em razão da ausência da citotoxicidade foram selecionadas concentrações do PDZ de 50 e 75 µg/mL, semelhantes as estudo *in vitro*.

Figura 17 - Teste de concentração do FS, apresentando grupo controle, sem a inoculação do PDZ, e grupos submetidos ao PDZ nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL. Legenda estatística com comparação entre os grupos.



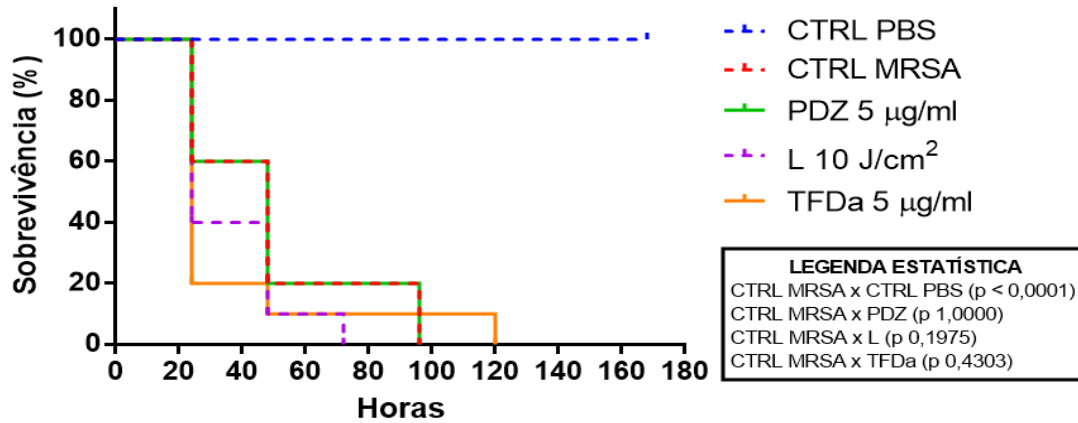
Fonte: Próprio autor.

6.2.2 Terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Galleria mellonella*

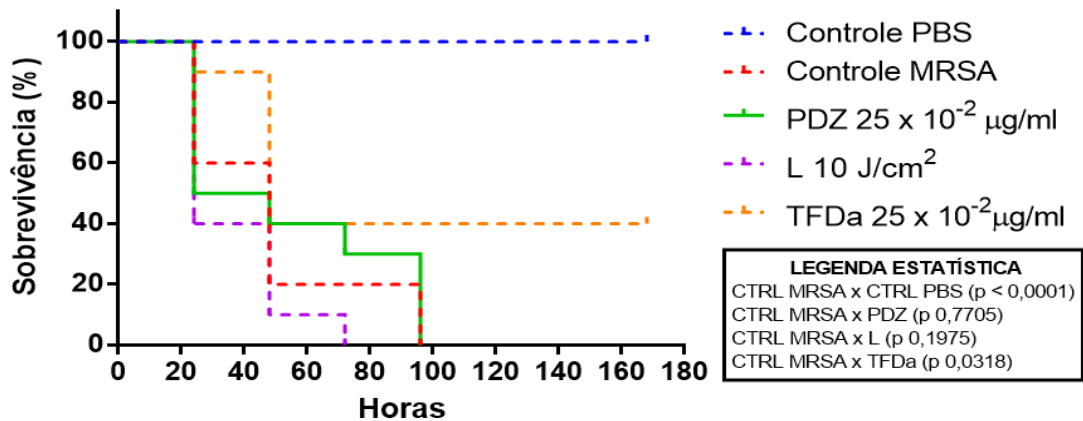
A TFDa foi aplicada inicialmente com as concentrações de PDZ de 50 e 75 µg/mL e fluências de 25 e 50 J/cm², utilizadas nos experimentos *in vitro*. Porém, os grupos TFDa com esses parâmetros foram citotóxicos para as larvas, não influenciando na sobrevivência. Desta forma, foram realizados sucessivos testes com menores concentrações de PDZ e fluências de luz até alcançar as concentrações de PDZ 5; 25x10⁻² e 25x10⁻⁶ µg/mL e fluência de luz de 10 J/cm² (figura 18).

Figura 18 - TFDa com PDZ em *G. mellonella*, apresentando os grupos Controle PBS não irradiado, grupo L irradiado a 10 J/cm², Controle MRSA, grupo PDZ e TFDa. Figura (A) – apresenta a concentração de PDZ 5 µg/mL; Figura (B) 25x10⁻² µg/mL e Figura (C) 25x10⁻⁶ µg/mL.

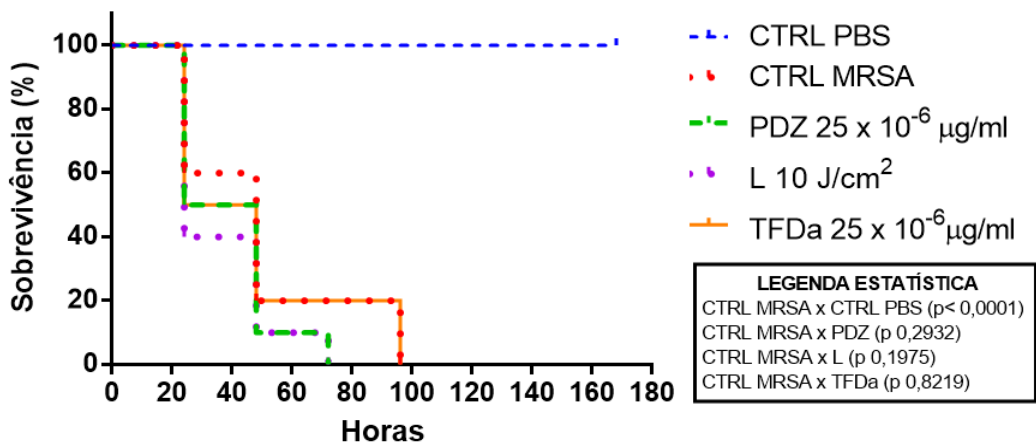
(A) **TFDa com PDZ 5 µg/mL em *Galleria mellonella***



(B) **TFDa com PDZ 25 x 10⁻² µg/mL em *Galleria mellonella***



(C) **TFDa com PDZ 25 x 10⁻⁶ µg/mL em *Galleria mellonella***



Fonte: Próprio autor.

Após a aplicação da TFDa em *G. mellonella* com PDZ nas concentrações de 5, 25×10^{-2} ; 25×10^{-6} µg/mL com irradiação a fluência de 10 J/cm², foi possível observar que o grupo CTRL PBS obteve sobrevivência de 100% no período de até 168 h (7 dias), demonstrando que a manipulação das larvas e não influenciou na mortalidade (figura 31).

O grupo CTRL MRSA apresentou sobrevivência de 60 % em 24 h, 20% em até 72 h, com letalidade em 96 h. Os grupos PDZ e L 10 J/cm², demonstrando sobrevivência semelhante ao do grupo CTRL MRSA, sugerindo que a mortalidade foi parecida independente da aplicação da luz, ou da concentração do FS, demonstrando que a morte das larvas foi em função da infecção por MRSA.

A sobrevivência dos grupos TFDa 5 µg/mL e TFDa 0,000025 µg/mL ocorreu de forma semelhante ao do CTRL MRSA, demonstrando que a ação da TFDa nestes parâmetros utilizados não influenciou na sobrevivência das larvas, não apresentando diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, o grupo TFDa 0,25 µg/mL apresentou menor mortalidade em relação ao grupo controle MRSA auxiliando na sobrevivência das larvas em 90 % em 24 e 40% em até 168 h, não apresentando mortalidade total no período de 7 dias, obtendo diferenças significativas em relação ao grupo CTRL MRSA. Demonstrando o potencial da terapia com PDZ em inativar o microrganismo sem causar maiores danos ao hospedeiro.

6.2.3 Escala de saúde e sobrevivência

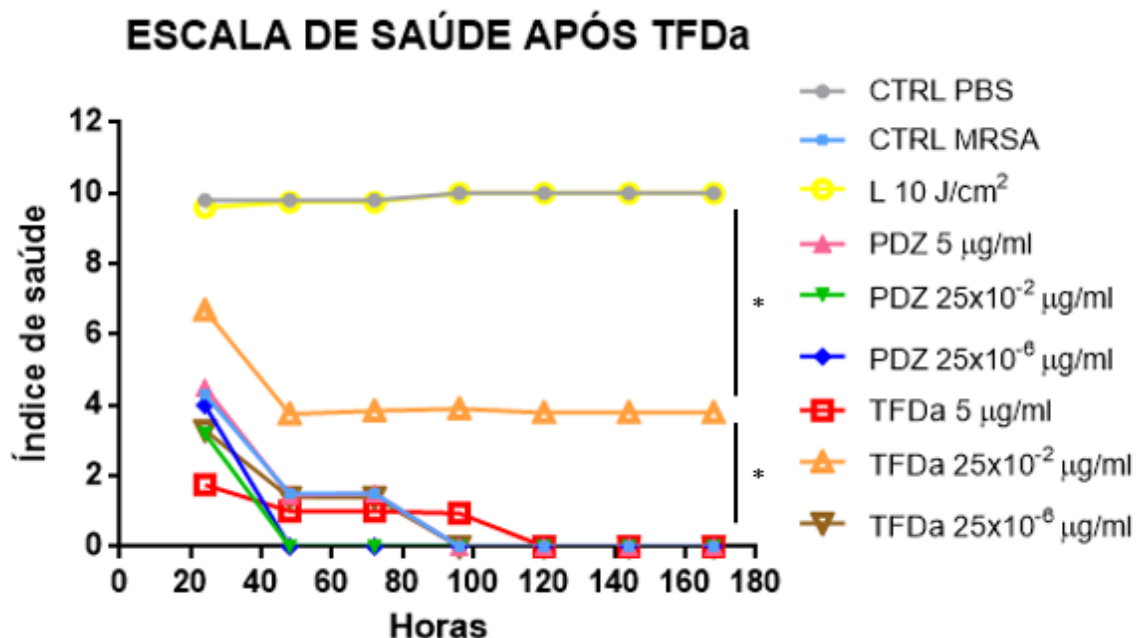
Realizada a escala de saúde após a aplicação da terapia nas concentrações de PDZ de 5; 25×10^{-2} ; 25×10^{-6} µg/mL e fluência de 10 J/cm² foi possível observar que o índice de saúde dos grupos CTRL PBS e L 10 J/cm² foi aproximadamente 10, demonstrando que apenas a ação da luz, assim como o manuseio das larvas não influenciou na diminuição do índice de saúde, obtendo diferenças significativas com todos os demais grupos.

Os grupos CTRL MRSA, PDZ e L 10 J/cm² apresentaram escalas de saúde semelhantes com mínimas variações de 4,5/3 a 1,5/0 dentro do período de 48 h. O grupo controle MRSA obteve o índice de saúde de aproximadamente 4 em 24 h, atingindo o índice 0 em 96 h. O grupo PDZ 25×10^{-2} e 25×10^{-6} µg/mL apresentaram índices 3 e 4 respectivamente, atingindo índice 0 em 48 h. Já o grupo PDZ 5 µg/mL obteve índice 4,5 em 24 h e 0 em 96 h, demonstrando que a saúde das larvas na

concentração de 5 µg/mL foi ligeiramente melhor em relação aos outros grupos PDZ porém sem diferença significativa em relação ao grupo controle.

Os índices de saúde dos grupos TFDa 5 µg/mL e TFDa 25×10^{-6} µg/mL foram semelhantes ao do grupo CTRL MRSA, obtendo índices aproximadamente 2 e 3 em 24 h, alcançando índice 0 em 120 e 96 h respectivamente. Já grupo TFDa (10) 0,25 obteve índices maiores em relação ao grupo CTRL MRSA demonstrando que a ação da terapia melhorou a saúde das larvas, obtendo diferenças significativas entre os grupos. Porém, não a ponto de comparar com larvas totalmente sadias exemplificadas pelo grupo CTRL PBS, obtendo diferenças significativas entre o grupo TFDa 0,25 µg/mL e o grupo controle PBS.

Figura 19 - Escala de saúde de *G. mellonella* pós TFDa, apresentando os grupos Controle PBS não irradiado e irradiado a 10 J/cm², Controle MRSA, apenas PDZ 5; 25x10⁻²; 25x10⁻⁶ µg/mL, apenas L 10 J/cm² e TFDa 5; 25x10⁻²; 25x10⁻⁶ µg/mL com a fluência de 10 J/cm². O ícone * demonstra diferença estatística entre os grupos.



Fonte: Próprio autor.

6.2.4 Análise hemocitária

Baseado nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi selecionada a concentração de 25x10⁻² µg/mL de PDZ e a fluência de 10 J/cm² para a aplicação da TFDa e a posterior contagem de hemócitos.

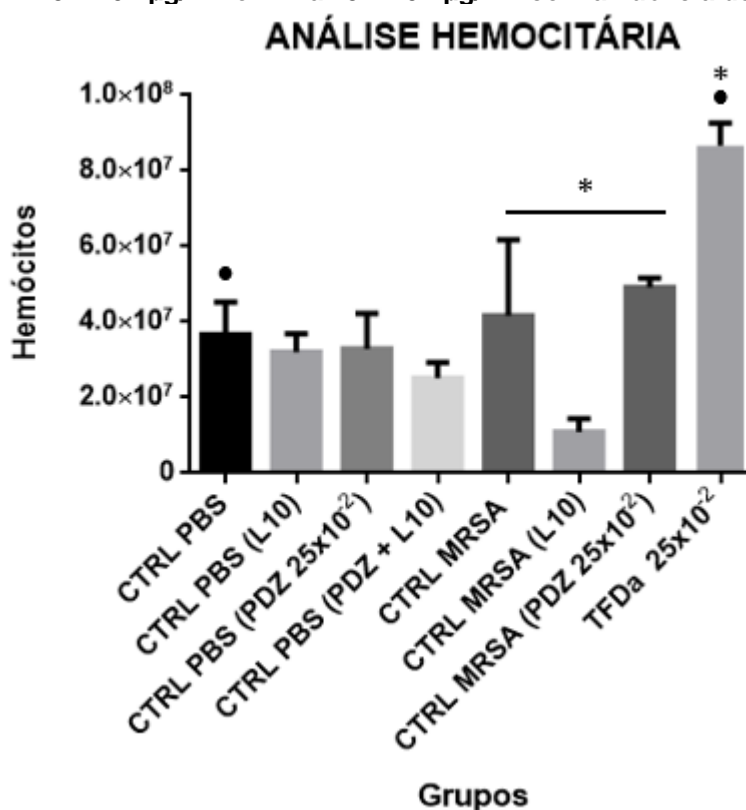
Avaliando a contagem hemocitária foi possível observar que todos os grupos controle PBS [CTRL PBS, CTRL PBS (L10), CTRL PBS (PDZ) e CTRL PBS (PDZ+L10)] não obtiveram diferenças significativas entre si, demonstrando que a ação apenas da luz, apenas do PDZ na concentração de 25x10⁻² e a combinação PDZ e luz não influenciaram no aumento de hemócitos.

O grupo CTRL PBS não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo CTRL MRSA, sugerindo que a presença das cepas MRSA não foi capaz de induzir maior resposta imune nas larvas. Entretanto o grupo CTRL MRSA obteve diferenças significativas em relação ao grupo CTRL MRSA (L10) irradiado, demonstrando que a ação da luz combinada a presença das bactérias MRSA foi capaz de induzir a diminuição na produção de hemócitos.

O grupo CTRL PBS não obteve diferenças significativas em relação ao grupo CTRL MRSA (PDZ 25×10^{-2}), sugerindo que a interação do PDZ com a cepa MRSA não influenciou no aumento da resposta imune. Entretanto, na presença da luz, o grupo CTRL MRSA (PDZ 25×10^{-2}) obteve diferenças significativas com o grupo TFDa 25×10^{-2} , significando que a aplicação da terapia favoreceu a produção de hemócitos (figura 33).

Além disso, o grupo TFDa 25×10^{-2} também obteve diferenças significativas em relação ao grupo CTRL PBS e CTRL MRSA, demonstrando que a aplicação da terapia aumentou a produção de hemócitos em comparação com a resposta imune produzida apenas na presença das bactérias.

Figura 20 - Contagem hemocitária de *G.mellonella* pós TFDa, apresentando os grupos Controle PBS não irradiado, Controle PBS irradiado a 10 J/cm^2 , Controle PBS com PDZ, Controle PBS com PDZ irradiado a 10 J/cm^2 , Controle MRSA, Controle MRSA apenas irradiado, Controle MRSA apenas PDZ $25 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ e TFDa $25 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ com a fluência de 10 J/cm^2 .

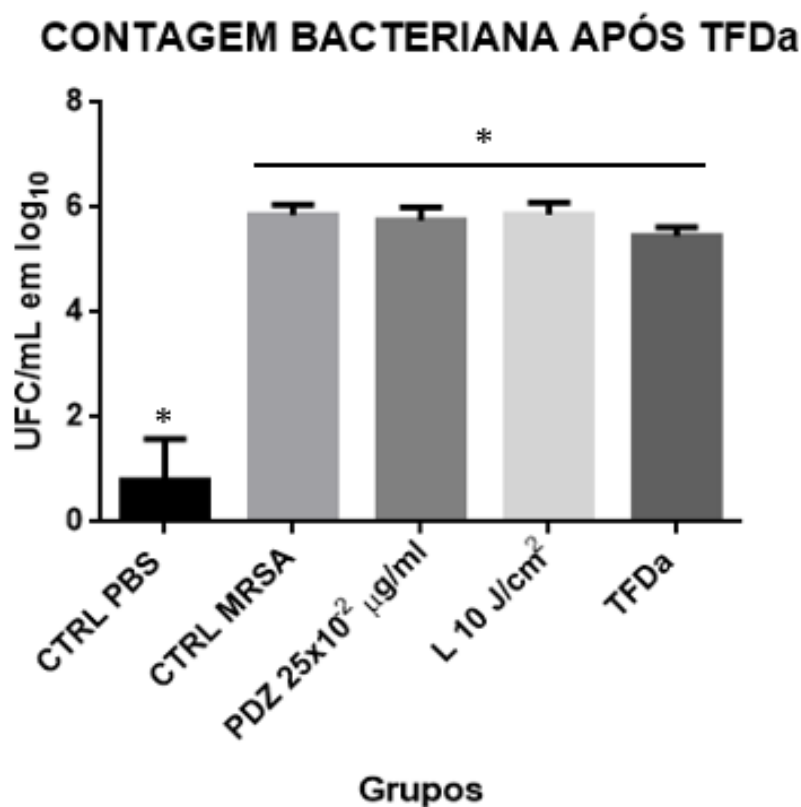


Fonte: Próprio autor.

6.2.5 UFC/mL de hemolinfa

Os valores absolutos do número de UFC/mL transformados em \log_{10} (figura 21). O grupo CTRL PBS apresentou discreta presença bacteriana, característica natural da espécie *G. mellonella*. Os grupos submetidos a infecção com MRSA mantiveram em torno de 6 \log_{10} independente da aplicação da luz ou do PDZ isolados. Sendo assim, obtiveram diferença significativa com o grupo CTRL PBS, demonstrando a infecção instalada. Quando submetidos a TFDa pôde-se observar discreta redução bacteriana, porém não significativa em relação ao CTRL MRSA.

Figura 21 - Contagem bacteriana pós TFDa, apresentando os grupos Controle PBS, Controle MRSA, apenas PDZ $25 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$, apenas L 10 J/cm^2 e TFDa $25 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ com a fluência de 10 J/cm^2 .



Fonte: Próprio autor.

6.3 Discussão

O modelo invertebrado de *G. mellonella* está sendo usado cada vez mais para pesquisas *in vivo*, já que, apresenta um sistema imunológico eficaz, constituído por hemócitos, que neste caso, permite a compreensão dos efeitos causados pela terapia (FIGUEIREDO-GODOI *et al.*, 2019; KANGASSALO, 2020). Apesar da ação do sistema imune de *G. mellonella*, os agentes patogênicos podem conseguir instalar a infecção e levar o inseto a morte. Algumas das possíveis causas da falha do sistema imunológico são: dificuldade do reconhecimento imunológico em razão de alterações dos patógenos em relação a parede celular, ação de diversos fatores de virulência, alta exposição aos microrganismos, presença de multiespécies, entre outros (KANGASSALO, 2020; ROSSONI *et al.*, 2019a)

Primeiramente, no estudo atual, foi avaliada a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por cepas MRSA nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 células/larva. Nos resultados foi possível observar que os níveis de sobrevivência das larvas foram dependentes da quantidade de MRSA aplicadas, sendo que na concentração de 10^6 o período de letalidade total das larvas foi de 120 h após a inoculação, enquanto a 10^7 o período foi de 96 h e a 10^8 foi a concentração mais patogênica para as larvas com letalidade em 48 h. A partir destes dados a concentração de 10^7 células/lagarta foi selecionada para todos os ensaios subsequentes, visto que, para avaliar a ação da TFDa é interessante uma concentração com patogenicidade intermediária. Já que, caso seja pouco patogênica, pode não oferecer danos ao hospedeiro, mas se for muito patogênica pode causar mortalidade antes da aplicação da terapia. Alvarenga e Santos, em 2015, avaliaram a TFDa com AM em modelo de *G. mellonella* após a infecção por *P. gingivalis*. Para determinar a concentração de bactéria a ser inoculada, analisaram as concentrações de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 , sendo que a concentração de 10^2 não causou infecção no hospedeiro. Já a concentração de 10^6 houve letalidade total. Desta forma, os autores selecionaram a concentração de 10^4 para inoculação, visto que, apresentou patogenicidade intermediária (ALVARENGA; SANTOS, 2015). Portanto, é fundamental estabelecer a concentração bacteriana a ser inoculada, pois a patogenicidade varia para cada espécie e cepa de acordo com a resistência e fatores de virulência presentes.

No estudo atual, foram avaliadas diversas concentrações do PDZ e diversas fluências que não demonstraram toxicidade às larvas quando na ausência do

microrganismo. Deste modo, os parâmetros utilizados inicialmente para a aplicação da TFDa foram selecionados baseados no método *in vitro* com concentrações de PDZ 50 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e fluências de 50 e 25 J/cm^2 . Apesar de apresentarem reduções do biofilme de MRSA, os grupos TFDa se demonstraram tóxicos para as larvas de *G. mellonella*, obtendo letalidade total em 24 h. Após a redução consecutiva dos parâmetros foi alcançada ação benéfica da terapia com os parâmetros 5; 0,25 e 0,00025 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com fluência de 10 J/cm^2 , destacando a concentração de 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ que garantiu a sobrevivência de 40% das larvas no período de até 168 h, demonstrando o potencial da terapia com PDZ para o tratamento de infecções com MRSA.

Garcez et al. em 2020 avaliou o efeito da TFDa com AM (100 μM) combinada a antibióticos em larvas de *G. mellonella* infectadas por cepas multirresistente de *E. coli*. Os parâmetros de irradiação utilizados foram 3 e 18 J/cm^2 e 100 mW/cm^2 (660nm). Como resultado observaram que os grupos com apenas antibiótico ou TFDa não melhorou a sobrevivência de larvas, mas a terapia combinada aumentou significativamente a curva de sobrevivência. Além disso, em testes *in vitro* com biofilme de *E. coli* observaram por crio-tomografia de elétrons que imagens fluorescentes mostram que TFDa parece promover micro-danos ao envelope celular e causa a produção de vesículas de membrana que permeabilizam membranas celulares, demonstrando a capacidade da TFDa em causar danos a estrutura bacteriana (GARCEZ *et al.*, 2020). Junior et al., em 2013, utilizou *G. mellonella* para avaliar a ação da TFDa com AM em infecções por cepas multirresistentes de *Enterococcus faecium*, avaliando também a ação combinada a antibióticos (CHIBE JUNIOR *et al.* 2013a). Concluindo que a TFDa prolongou a sobrevivência das larvas e quando associada ao tratamento com antibióticos demonstrou que a cepa que antes era resistente a vancomicina, após o tratamento da TFDa combinada a vancomicina, tornou as bactérias mais suscetíveis ao antibiótico. Portanto, sugere-se que o pré-tratamento com a TFDa pode torná-las mais suscetíveis aos antibióticos, sendo interessante realizar estudos com cepas MRSA.

O sistema imune de *G. mellonella* é dividido pela resposta imune celular e resposta imune humoral. A resposta imune celular é mediada por células fagocitárias, os hemócitos, que além de serem responsáveis pela ingestão dos invasores, auxiliam no encapsulamento e coagulação (HOFFMANN, 1995; JEMEL *et al.*, 2020; WOJDA, 2017). Os plasmatócitos e células granulares são os principais hemócitos

responsáveis pela fagocitose e o encapsulamento. A fagocitose ocorre de forma semelhante ao sistema imune dos mamíferos, com o englobamento e degradação do invasor. Essa degradação pode ocorrer pela atuação de enzimas ou pela geração de ERO. Os hemócitos são capazes de produzir proteínas p47 e p67, que promovem a produção de superóxido (NADPH oxidase), gerando reação de oxidação e formação de ERO, assim como os neutrófilos nos mamíferos. Já o encapsulamento, a ação inicial dos hemócitos, pode desencadear liberação de materiais citotóxicos pelo mecanismo de defesa dos microrganismos, por exemplo, proteína de polissacaropéptido. Desta forma, os plasmócitos se dispõem em camadas ao redor do corpo estranho e formam uma espécie de capsula, inibindo a ação citotóxica (CHAMPION; TITBALL; BATES, 2018; JEMEL *et al.*, 2020; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

A análise hemocitária no presente estudo demonstrou um aumento significativo de hemócitos após a aplicação da terapia. No grupo CTRL MRSA foi possível observar aproximadamente 41×10^7 hemócitos, enquanto na TFDa aumentou aproximadamente 86×10^7 hemócitos, demonstrando que a aplicação da terapia influenciou no aumento da resposta imune auxiliando no combate da infecção. Alvarenga, em 2015, aplicaram a TFDa com AM em *G.mellonella* infectadas por *P.gingivalis*. Após realizada a TFDa, foi observada um aumento de 25% de sobrevivência das larvas em relação ao grupo controle. Entretanto, apesar de influenciar na sobrevivência, a análise hemocitária pós TFDa não demonstrou aumento na resposta imune, o grupo controle obteve 30×10^4 hemócitos, enquanto o grupo TFDa obteve 19×10^4 hemócitos (ALVARENGA, 2015). Desta forma, pode-se supor que apesar de no atual estudo obter aumento da resposta imune com a TFDa, a aplicação da terapia nem sempre deve influenciar no aumento de hemócitos, demonstrando que a escolha do FS e dos parâmetros utilizados é crucial para o desempenho da TFDa.

Durante a infecção, ocorre a regulação mútua da resposta imune celular com a resposta imune humoral, onde os hemócitos sintetizam e secretam moléculas humorais para a hemolinfa, tais como, proteínas, peptídeos antimicrobianos (AMPs) e melanina. Os AMPs têm função de quebrar membranas patogênicas, tem toxicidade seletiva afetando apenas as células do microrganismo, sua ação é mais rápida do que o tempo de duplicação do microrganismo, não há relatos de resistência bacteriana as AMPs e grande parte desta molécula é produzida no corpo de gordura e destinada a

hemolinfa (KANGASSALO, 2020; SINGKUM et al., 2019). O processo de melanização também faz parte do sistema imune humoral e é realizado por uma cascata, regulada pela enzima fenol oxidase (PO), na qual após infecção ou lesão na área onde houve um processo de coagulação, formação de capsulas, fagocitose ou lesões, ocorre a melanização. Deste modo, a melanização é um importante indicativo de infecção ou lesão, podendo ser identificada visualmente (COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000; VERTYPOROKH; WOJDA, 2020).

A escala de saúde avaliada no estudo foi baseada no estudo de Loh et al., em 2013, o qual propôs uma análise da saúde das larvas com base em sua aparência. As características observadas foram: a movimentação do animal, capacidade de formação de casulos, presença de melanização e sobrevivência, com notas de 0 a 10 (LOH *et al.*, 2013). No estudo atual foi observado que as larvas tratadas apenas com PBS mantiveram a saúde íntegra com notas de aproximadamente 10 ao longo dos sete dias observados. Os demais grupos, obtiveram um padrão de diminuição da saúde ao longo dos dias, com exceção do grupo TFD (0,25) que obteve nota inicial de aproximadamente 7, mantendo nota 4 ao longo dos sete dias. Demonstrando que a concentração de 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ irradiada a 10 J/cm^2 são parâmetros promissores para aplicação da TFDa para futura aplicação clínica.

O teste de UFC/mL de hemolinfa foi realizado para observar a presença das bactérias após a aplicação da terapia. Os grupos submetidos a infecção com MRSA mantiveram em torno de 6 \log_{10} independente da aplicação da luz ou do PDZ isolados. Quando submetidos a TFDa pôde-se observar discreta redução bacteriana, porém não significativa em relação ao Controle MRSA, sugerindo a ineficácia da terapia. Entretanto ao comparar com os resultados de sobrevivência de *G.mellonella* foi possível observar que a longo prazo uma aplicação da terapia foi benéfica, estendendo a sobrevivência além de 120 h. Além disso, ao comparar os resultados de análise hemocitária e UFC/mL de hemolinfa, ambos avaliados em 30 min após a aplicação da TFDa, observa-se um aumento significativo dos hemócitos enquanto nos resultados de UFC/mL não há diminuição bacteriana significativa. A diferença nos resultados destes experimentos provavelmente ocorreu porque o sistema imune das larvas está aumentando pelo estímulo da terapia, porém o tempo de 30 minutos talvez não tenha sido suficiente para os hemócitos agirem e auxiliarem na inativação bacteriana, justificando que a ação tardia dos hemócitos foi capaz de estender a sobrevivência das larvas. Chibebe Junior et. al., em 2013a, aplicou a TFDa em

modelos de *G. mellonella* infectados por *E. faecium* e avaliaram UFC/mL de hemolinfa em diferentes horas (0, 2, 4, 8, 12, 24 h) após a aplicação da terapia. O período de 2 h apresentou menor UFC/mL, enquanto em 8 h apresentou o pico de UFC/mL (CHIBEBE JUNIOR *et al.*, 2013a). Desta forma, seria interessante avaliar UFC/mL de hemolinfa do presente estudo em diversos tempos como, por exemplo, tempos maiores que 30 minutos. Além disso, pode-se perceber que apesar da diminuição de UFC/mL em 2 h, houve crescimento da infecção em 8 h, deste modo a aplicação seriada da terapia se torna interessante para evitar o aumento da infecção.

Chibebe Junior *et al.*, em 2013b, avaliaram o número de células fúngicas recuperadas da hemolinfa de *G. mellonella* infectada por *C. albicans* imediatamente após a aplicação da TFDa. Neste caso a avaliação imediata após a aplicação da terapia demonstrou redução significativa do microrganismo quando comparado com o grupo não irradiado (CHIBEBE JUNIOR *et al.*, 2013b). Desta forma, é interessante avaliar a resposta de tempo individualizada para cada microorganismo.

Por este motivo, sugere-se novos testes para avaliar a longo prazo a contagem bacteriana após TFDa, assim como, a análise hemocitária para justificar esse auxílio dos hemátócitos na inativação. Além disso, seria interessante a aplicação seriada da terapia visando não apenas a produção de ERO para inativação, mas também a estimulação seriada do sistema imune das larvas. Sugerindo que, assim como, o tratamento com antibióticos é necessário estabelecer adequados parâmetros (de luz e FS), além do tempo adequado entre as administrações do tratamento.

7 CONCLUSÃO GERAL

Foi possível concluir que o PDZ nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não foi citotóxico para biofilmes de MRSA, e quando submetidos a TFDa com irradiação de 25, 50 e 100 J/cm^2 apresentaram redução significativa de UFC/mL do biofilme. Observando-se redução máxima de 6,71 \log_{10} nos parâmetros de irradiação de 100 J/cm^2 e PDZ a 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com redução da metabolização bacteriana, produzindo altas quantidades de ERO capazes de afetar a viabilidade bacteriana e reduzir a biomassa avaliada por MEV.

A aplicação da TFDa no modelo invertebrado de *G. mellonella* demonstrou que os parâmetros que foram eficazes no método *in vitro* foram tóxicas para as larvas. Entretanto, após sucessivas reduções da concentração do PDZ e das fluências de luz, os parâmetros de 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 J/cm^2 mantiveram sobrevivência de 40% das larvas ao longo de sete dias, sendo observado também o aumento da resposta imune e melhora na saúde das larvas.

A ação da terapia foi eficaz, reforçando o potencial da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana como uma alternativa no tratamento de infecções bacterianas por MRSA. Além disso, é possível sugerir a aplicação seriada da TFDa com PDZ em estudos futuros a fim de atingir completa inativação do biofilme e em modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 15 fev. 2016.
- ACOSTA, A. C. *et al.* Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 4, p. 252, 2018.
- AFRASIABI, S. *et al.* Anti-biofilm and anti-metabolic effects of antimicrobial photodynamic therapy using chlorophyllin-phycoerythrin mixture against *Streptococcus mutans* in experimental biofilm caries model on enamel slabs. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101620, 2020.
- ALLISON, R. R. *et al.* A clinical review of PDT for cutaneous malignancies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 3, n. 4, p. 214–226, 2006.
- ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; SIBATA, C. H. Clinical PD/PDT in North America: An historical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 263–277, dez. 2004.
- ALMEIDA JUNIOR, A. M. D. **Fotossensibilização de sistemas miméticos de membrana celular induzida pelo fenotiazínico azul de toluidina**. 2020. 49f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.
- ALVARENGA, J. A.; SANTOS, J. D. **Galleria mellonella como modelo hospedeiro para estudo de *Porphyromonas gingivalis*: análise da virulência e sensibilidade à terapia fotodinâmica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, São José dos Campos,
- ALVES, F. *et al.* Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. **Medical Mycology**, p. 1–9, 2018a.
- ALVES, F. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy mediated by Photodithazine® in the treatment of denture stomatitis: A case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 168–171, mar. 2018b.
- ALVES, F. *et al.* A randomized clinical trial evaluating Photodithazine-mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy as a treatment for Denture stomatitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, p. 102041, dez. 2020.
- AMARAL, L. S.; LINARES, I. A. P.; PERUSSI, J. R. Photoinactivation of methicillin-resistant *S. Aureus* Biofilm using a New Chlorin as Photosensitizer. **PHOTOPTICS 2020 - Proceedings of the 8th International Conference on Photonics, Optics and Laser Technology**, n. January, p. 92–96, 2020.
- ANDREJKO, M.; MIZERSKA-DUDKA, M. Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria*

mellonella. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. 1, p. 16–26, 2011.

ANTONIO, N. DA S. *et al.* Mecanismos de resistência bacteriana. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, p. 1-4, 2009.

ASAI, M. *et al.* A novel biosafety level 2 compliant tuberculosis infection model using a Δ leuD Δ panCD double auxotroph of Mycobacterium tuberculosis H37Rv and Galleria mellonella. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 811–824, 2020.

BLOISE, N. *et al.* Can Nanotechnology Shine a New Light on Antimicrobial Photodynamic Therapies? In: TANAKA, Yohei. **Photomedicine: Advances in Clinical Practice**. [s.l.] InTech, 2017. p. 607–631.

BOHM, G. C. *et al.* Photodynamic inactivation mediated by 5-aminolevulinic acid of bacteria in planktonic and biofilm forms. **Biochemical Pharmacology**, v. 177, n. May, p. 114016, 2020.

BOKAN, M. *et al.* Photodynamic effect of novel hexa-iodinated quinono-cyanine dye on Staphylococcus aureus. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101866, set. 2020.

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.

BOUKLAS, T. *et al.* Characterization of the virulence of Cryptococcus neoformans strains in an insect model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 809–813, 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde** n. 16, p. 83, 2017.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2018. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**, n. 21, 2018.

BRYAN-WILSON, J. No time to wait. **Artforum International**, v. 54, n. 10, p. 113–114, 2019.

BUZZÁ, H. H. *et al.* Evaluation of vascular effect of Photodynamic Therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 1–7, set. 2014.

CAIRES, C. S. A. **Avaliação da inativação fotodinâmica em s. aureus, e. coli e p. aeruginosa utilizando os fotossensibilizadores eosina azul de metileno e metalo-clorofilina**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2017.

CARMELLO, Juliana Cabrini. **Efetividade da Terapia fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador photodithazine® na inativação de *Candida albicans in vivo***. 2011. 141 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011.

CARVALHO, I. T. DE. **Microbiologia Basica**. Recife: EDUFRPE, 2010.

CHAMPION, O. L.; TITBALL, R. W.; BATES, S. Standardization of *G. Mellonella* larvae to provide reliable and reproducible results in the study of fungal pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 108, 2018.

CHIBEBE JUNIOR, J. *et al.* Photodynamic and Antibiotic Therapy Impair the Pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a Whole Animal Insect Model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55926, Feb. 2013a.

CHIBEBE JUNIOR, J. *et al.* Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 217, 1 dez. 2013b.

CORREA, J. C. *et al.* Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. **Laser Physics**, v. 22, n. 9, p. 1387–1394, 2012.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 163–169, 2000.

CSEPREGI, R. *et al.* Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay? **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 382, Feb. 2018.

DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3–4, p. 170–188, Sep. 2009.

DANIELL, M. History of photodynamic therapy. *In*: ABDEL-KADER, Mahmoud H. (Ed.). **Photodynamic Therapy: From Theory to Application**. [S.l.]: Springer1991. p. 3–22.

DHARMARATNE, P. *et al.* Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A systematic review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 200, p. 112341, 2020.

ELHAWY, M. I. *et al.* The Phosphoarginine Phosphatase PtpB from *Staphylococcus aureus* Is Involved in Bacterial Stress Adaptation during Infection. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 645, 2021.

ELIAS, G. M. **Avaliação da liberação de oxigênio singlete e radicais superóxidos em função de diferentes concentrações dos fotossensibilizadores azul de metileno, eosina y e fluoresceína: análise físico-química**. 2021.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2021.

FIGUEIREDO-GODOI, L. M. A. *et al.* Exploring the *Galleria mellonella* model to study antifungal photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, n. May, p. 66–73, set. 2019.

FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014.

FREITAS, L. M. *et al.* Photodynamic and peptide-based strategy to inhibit Gram-positive bacterial biofilm formation. **Biofouling**, v. 35, n. 7, p. 742–757, 2019a.

FREITAS, M. A. A. *et al.* Bacterial viability after antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on multiresistant *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 739–748, jun. 2019b.

GAO, Y. *et al.* Bacteria-Targeted Supramolecular Photosensitizer Delivery Vehicles for Photodynamic Ablation Against Biofilms. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 40, n. 4, p. 1–6, 2019.

GARCEZ, A. S. *et al.* Effects of antimicrobial photodynamic therapy on antibiotic-resistant *Escherichia coli*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, p. 102029, 2020.

GARCEZ, A. S.; HAMBLIN, M. R. Methylene blue and hydrogen peroxide for photodynamic inactivation in root canal - A new protocol for use in endodontics. **European Endodontic Journal**, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2017.

GARCIA, M. *et al.* Photodynamic therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against *Streptococcus mutans* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 256–261, dez. 2018.

GEO, F. B. *et al.* Summary for Policymakers. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). **Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. p. 1–30.

GERALDE, M. C. **Avaliação do tempo de incubação do fotossensibilizador curcumina em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na Inativação Fotodinâmica**. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado em Multidisciplinar) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

GERALDE, M. C. *et al.* Pneumonia treatment by photodynamic therapy with extracorporeal illumination - an experimental model. **Physiological Reports**, v. 5, n. 5, p. e13190, mar. 2017.

GERM, Julija *et al.* Evaluation of resazurin-based rapid test to detect colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 11, p. 2159-2162, 2019.

- GIANNELLI, M. *et al.* Effects of photodynamic laser and violet-blue led irradiation on Staphylococcus aureus biofilm and Escherichia coli lipopolysaccharide attached to moderately rough titanium surface: in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 4, p. 857–864, 2017.
- GIULIANI, F. *et al.* In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 637–642, 2010.
- GSPONER, N. S. *et al.* Approaches to unravel pathways of reactive oxygen species in the photoinactivation of bacteria induced by a dicationic fulleropyrrolidinium derivative. **Methods**, v. 109, p. 167–174, 2016.
- HAMDAN-PARTIDA, A. *et al.* Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus can persist in the throat. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 4, p. 469–475, jun. 2018.
- HOFFMANN J. A. Innate immunity of insects. **Current opinion in immunology**, v. 7, p. 4–10, 1995.
- HORI, Leda Yumi. **Susceptibilidade do Staphylococcus aureus à terapia fotodinâmica (PDT)**. 2013. 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara – SP, 2013.
- HUANG, L. *et al.* Photodynamic inactivation of bacteria using polyethylenimine-chlorin(e6) conjugates: Effect of polymer molecular weight, substitution ratio of chlorin(e6) and pH. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 4, p. 313–323, 2011.
- ISSA, M.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010.
- JACOBS, A. C. *et al.* AB5075, a highly virulent isolate of acinetobacter baumannii, as a model strain for the evaluation of pathogenesis and antimicrobial treatments. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–10, 2014.
- JEMEL, S. *et al.* Galleria mellonella for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 390, 11 mar. 2020.
- JIA, H. *et al.* Evaluation of resazurin-based assay for rapid detection of polymyxin-resistant gram-negative bacteria. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020.
- JIA, M. *et al.* Antibacterial effect of S-Porphin sodium photodynamic therapy on Staphylococcus aureus and multiple drug resistance Staphylococcus aureus. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, n. August, p. 80–87, 2019.
- JUNQUEIRA, J. C. Galleria mellonella as a model host for human pathogens. **Virulence**, v. 3, n. 6, p. 474–476, 27 out. 2012.

- KANGASSALO, K. **The intra- and trans- generational effects of larval nutritional conditions on life- history traits of the greater wax moth, galleria mellonella.** 2020. Tese (Doutorado) - University of Turku, Faculty of Science and Engineering, Finland, 2020. Disponível em: <https://www.utupub.fi/bitstream/handle/10024/148966/AnnalesAll364Kangassalo.pdf?sequence=1>. Acesso em: 6 ago. 2021.
- KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resistance Updates**, v. 31, n. July, p. 31–42, mar. 2017.
- KASIMOVA, K. R. *et al.* Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 13, n. 11, p. 1541–8, 2014.
- KAWCZYK-KRUPKA, A. *et al.* Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, 2018.
- KUMAR, A. *et al.* Curcumin Targets Cell Wall Integrity via Calcineurin-Mediated Signaling in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 167–175, Jan. 2014.
- LIMA, M. F. P. *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. **Uningá**, v. 21, n. 1, p. 32–39, 2015.
- LOH, J. M. S. *et al.* *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, 2013.
- LUKE-MARSHALL, N. R. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy with Chlorin e6 Is Bactericidal against Biofilms of the Primary Human Otopathogens. **mSphere**, v. 5, n. 4, p. 1–11, Ago. 2020.
- MACHADO, A. D. H. Relativa Ao Estado Fundamental. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K. Summary for Policymakers. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). **Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2016. p. 1–30.
- MAGACHO, C. C. *et al.* Comparison of photodynamic therapy with methylene blue associated with ceftriaxone in gram-negative bacteria; an in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101691, jun. 2020.
- MALIK, Z. Photodynamic inactivation of antibiotic-resistant Gram-positive bacteria: Challenges and opportunities. **Translational Biophotonics**, v. 2, n. 1–2, p. 1–6, 4 maio 2020.
- MARILIA, J. *et al.* Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar Profile of

bacterial infection in a hospital environment. **Rev. Ciênc. Méd. Biol**, v. 15, n. 2, p. 199–207, 2016.

MEDEIROS, I. G. F. **Resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em um hospital municipal na cidade de Uberlândia/MG**. 2017. 29f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MENEGHINI, R. Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 195, n. 3, p. 215–230, 1988.

MESQUITA, K. S. F. *et al.* Terapia Fotodinâmica: Tratamento Promissor na Odontologia? **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 23, n. 2, p. 45–52, 2013.

MISHRA, P. *et al.* Rapid antibiotic susceptibility testing by resazurin using thin film platinum as a bio-electrode. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, n. May, p. 69–76, 2019.

MOREILLON, P. New and emerging treatment of *Staphylococcus aureus* infections in the hospital setting. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. suppl. 3, p. 32–41, 2008.

MORGAN, M. *et al.* All Wales surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): The first year's results. **Journal of Hospital Infection**, v. 41, n. 3, p. 173–179, 1999.

MORITZ, M. N. O. *et al.* Semi-synthesis and PDT activities of a new amphiphilic chlorin derivative. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 17, p. 39–47, 2017.

MUKHERJEE, K. *et al.* Anti-*Listeria* activities of *Galleria mellonella* hemolymph proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4237–4240, 2011.

MUN, S. *et al.* Curcumin Reverse Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18283–18295, 2014.

NIE, M. *et al.* Synergetic antimicrobial effect of chlorin e6 and hydrogen peroxide on multi-species biofilms. **Biofouling**, v. 37, n. 6, p. 656–665, 2021.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally : final report and recommendations the review on. **Review on Antimicrobial Resistance**, n. May, 2016.

OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotodinâmicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310–335, 2015.

OLIVEIRA, H. J. P. *et al.* Educação em saúde como forma preventiva do uso

indiscriminado dos antibióticos. **Revista saúde**, v. 11, n. 1 esp., 2017.

PAOLILLO, F. R. *et al.* The effect of combined curcumin-mediated photodynamic therapy and artificial skin on *Staphylococcus aureus*-infected wounds in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 6, p. 1219–1226, 2021.

PARASURAMAN, P. *et al.* Antimicrobial photodynamic activity of toluidine blue encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**, v. 35, n. 1, p. 89–103, 2019.

PATZI, M. A. M.; VILLALOBOS, C. G. Bacterias Gram Negativas. **Revista de Actualización Clínica Volumen**, v. 49, p. 2609–2613, 2014.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PENHA, C. B. *et al.* Photodynamic inactivation of foodborne and food spoilage bacteria by curcumin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 198–202, 2017.

PEREIRA, A. H. C. *et al.* Methylene blue internalization and photodynamic action against clinical and ATCC *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, n. November 2017, p. 43–50, 2018a.

PEREIRA, T. *et al.* Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 128, 27 nov. 2018b.

PINTO, G. C. S. **Eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em biofilmes de *Staphylococcus aureus* suscetível e resistente à meticilina**. 2013. 120f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Araraquara, 2013.

PRATES, R. A. *et al.* Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n. 1, p. 53–57, 2010.

QUISHIDA, C. C. C. *et al.* Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using Photodithazine® and LED light after one and three successive applications. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 9, p. 2303–2312, 2015a.

QUISHIDA, C. C. C. *et al.* Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 685–694, 3 fev. 2015b.

RAAB, O. History of Therapeutic UV Radiation. *In*: ALTMAYER, P.; HOFFMANN, K.; STÜCKER, M. (eds) **Skin Cancer and UV Radiation**. Berlin: Springer, 1997.

- RADY, S. A. et al. Hemolymph Changes Resulting from Injection of *Escherichia coli* Into the Larvae of the Wax Moth , *Galleria mellonella* (Lepidoptera : Pyralidae). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 1, p. 93–105, 2020.
- RANTZ, L.; KIRBY, W. A ação da penicilina no *Staphylococcus* in vitro. **Journal of Immunology**, 1994.
- RAVI, N. S.; ASLAM, R. F.; VEERARAGHAVAN, B. ***Acinetobacter baumannii***. New York, NY: Springer New York, 2019.
- RESHETNICKOV, A. V. et al. Novel drug form of chlorin e 6. **Laser Use in Oncology II**, v. 4059, n. 7, p. 130, 2000.
- RICHMOND, G. E. et al. Regulates Genes Required for Multidrug Efflux , Biofilm Formation , and Virulence in a Strain-Specific Manner. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 1–12, 2016.
- ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111–118, 2011.
- RONQUI, M. R. **Eficiência da terapia fotodinâmica em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2015. 126f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- ROSSI, F. et al. Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 16, p. 1524–1531, 2014.
- ROSSONI, R. D. et al. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173332, 2017.
- ROSSONI, R. D. et al. *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 101, n. March, p. 13–22, 2019a.
- ROSSONI, R. D. et al. Effects of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate on *Candida* spp.: antifungal activity, anti-biofilm properties, and protective effects on *Galleria mellonella* against *C. albicans* infection. **Biofouling**, v. 35, n. 9, p. 997–1006, 2019b.
- SERRA, H. A. Micro: História Dos Antibióticos. **Igarss 2014**, n. 1, p. 1–5, 2014.
- SILVA, E. G. A. E. **Efeito do preparo químico-mecânico, associado à terapia fotodinâmica na redução da carga microbiana, LPS, LTA, citocinas pró-inflamatórias e substância P nas infecções endodônticas primárias**. 2021. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2021.
- SINGKUM, P. et al. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 1, p. 31–55, mar. 2019.

SLATER, J. L. *et al.* Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. **Medical Mycology**, v. 49, n. SUPPL. 1, p. 107–113, 2011.

SOARES, J. M. **Estudo de parâmetros microbianos em múltiplas sessões de terapia fotodinâmica antimicrobiana**. 2019. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

SOUZA, B. M. N. Potencial da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com Photodithazine® em cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*. 2019.

SOUZA, B. M. N. *et al.* Efficiency of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Photodithazine® on MSSA and MRSA Strains. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, p. 869, 2021.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov.**, v. 8, n. 2, p. 108–120, 2013.

STÁJER, A. *et al.* Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts. **Dentistry Journal**, v. 8, n. 2, p. 43, 2020.

STEFANIAK, L. A. *et al.* Resistência bacteriana: a importância das beta-lactamases. **Revista Uninga**, v. 4, n. 1, p. 123–137, 2005.

SUEOKA, K. *et al.* Time-dependent antimicrobial effect of photodynamic therapy with TONS 504 on *Pseudomonas aeruginosa*. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 7, p. 1455–1460, 27 set. 2018.

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**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TURUBANOVA, V. D. *et al.* Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 350, 16 dez. 2019.

UENOJO, M.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: Propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; CDC. **Antibiotic Resistance Threats in the United States**. Centers for Disease Control and Prevention, p. 1–113, 2019.

VERTYPOROKH, L.; WOJDA, I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 170, p. 107327, fev. 2020.

VITORIO, G. DOS S. *et al.* Analysis of the effects of Photodynamic therapy with Photodithazine on the treatment of 9l/lacZ cells, in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, n. February, p. 102233, 2021.

WANG, Y. Y. *et al.* Chlorin e6-mediated Photodynamic therapy suppresses *P. acnes*-induced inflammatory response via NF κ B and MAPKs signaling pathway. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017.

WINKLER, K. *et al.* Journal of Photochemistry & Photobiology, B : Biology Photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by chlorin e6 and red light ($\lambda = 670$ nm). **JPB**, v. 162, p. 340–347, 2017.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 24, n. 3, p. 342–357, 2017.

WORLD BANK. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future (Discussion Draft). **World Bank Report**, v. 2, n. September, p. 1–132, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global priority pathogens list on antibiotic resistance: an urgent need for action to integrate One Health data. **Perspectives in Public Health**, v. 138, n. 2, p. 87–88, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2019 Antibacterial agents in clinical development**: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. s.l: WHO, 2020.

WU, M. F. *et al.* Chlorin e6 mediated photodynamic inactivation for multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice in vivo. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–12, 2017.

YANG, S. M. *et al.* Hydrogen Peroxide Enhances the Antibacterial Effect of Methylene Blue-based Photodynamic Therapy on Biofilm-forming Bacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 95, n. 3, p. 833–838, 2019.