

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

ISABELLE DE PAULA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA CURCUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE BIOFILME  
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA – ESTUDO *in vitro***

São José dos Campos, SP  
2021

**ISABELLE DE PAULA RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO DA CURCUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE BIOFILME  
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA – ESTUDO *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Ferreira Strixino  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Guerra Pinto

São José dos Campos, SP  
2021

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Ribeiro, Isabelle de Paula

Avaliação da curcumina na terapia fotodinâmica sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina - estudo in vitro / Isabelle de Paula Ribeiro; orientadora, Profa. Dra. Juliana Ferreira-Strixino; co-orientadora Profa. Dra. Juliana Guerra Pinto. - São José dos Campos, SP, 2021.

1 CD-ROM, 72 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. Fotoquimioterapia. 3. Curcumina. 4. Biofilme. I. Ferreira-Strixino, Profa. Dra. Juliana, orient. II. Pinto, Profa. Dra. Juliana Guerra, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Isabelle de Paula Ribeiro, 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, 1 de Dezembro de 2021.

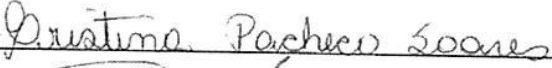

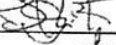
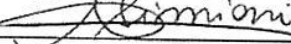



Autor(a) da Obra

**ISABELLE DE PAULA RIBEIRO**

**“AVALIAÇÃO FOTODINÂMICA DA CURCUMINA NA INATIVAÇÃO MICROBIANA EM BIOFILME DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA – ESTUDO *in vitro*”.**

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.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> CRISTINA PACHECO SOARES   
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> JULIANA FERREIRA STRIXINO   
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> JULIANA GUERRA PINTO   
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> ANDREZA RIBEIRO SIMIONI   
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA – UNESP 

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 05 de outubro 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me capacitado e dado forças para enfrentar todos obstáculos durante esse período da minha vida.

Agradeço a minha mãe Regiane por ter me incentivado a não desistir em todos momentos, pelas orações e suporte.

Agradeço, especialmente à minha orientadora e coorientadora, pois em cada passo que eu dei durante meu mestrado elas me ampararam, me ensinaram e me deram suporte em todos os momentos em que não me sentia capaz de chegar até aqui.

Agradeço a todos os membros do laboratório FOTOBIO, em especial a Beatriz, Juliana, Luciana, André e a Gabrielle por todos os momentos de conversas, trocas de conhecimento e risadas, tornando essa caminhada mais leve nos momentos difíceis.

E agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela minha bolsa de estudos, sem a qual eu não conseguiria realizar esse sonho.

# **AVALIAÇÃO DA CURCUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE BIOFILME DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA – ESTUDO *in vitro***

## **Resumo**

O aumento do número de bactérias multirresistentes aos antibióticos em ambientes de prestação de serviços à saúde vem se tornando um problema global de saúde pública. Os biofilmes são estruturas que conferem às bactérias uma maior resistência antimicrobiana. Por isso, os estudos com biofilmes bacterianos tornaram-se objeto de extrema relevância, uma vez que essas estruturas reduzem a penetração dos antibióticos, comprometendo a resposta imunológica do hospedeiro. A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento que combina a luz, uma substância fotossensível (FS) e o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio, levando à morte celular, surge como uma alternativa na inativação desses microrganismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar, em estudo *in vitro*, a ação antimicrobiana da TFD, mediada pela curcumina (*Curcuma Longa*), em biofilme de cepa *Staphylococcus aureus*, resistentes à Meticilina (MRSA). Os grupos experimentais foram divididos em Controle, Controle Escuro, Fotossensibilizador (FS), Irrradiado (claro), TFD. Os grupos FS e TFD foram incubados com curcumina durante 20 minutos. Em seguida, o grupo TFD foi irradiado utilizando dispositivo de LED em 450 nm, com irradiância de 110 mW/cm<sup>2</sup> e fluência de 50 J/cm<sup>2</sup>. Foram avaliadas a internalização do FS por microscopia confocal, as unidades formadoras de colônia (UFC), a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), o metabolismo bacteriano por meio do Resazurin, a estrutura do biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV), antes e após a PDT. Os resultados demonstraram que a TFD mediada pela curcumina foi capaz de reduzir o crescimento de biofilme de cepa MRSA, alterar a atividade metabólica e aumentar a produção de ERO. Pela microscopia confocal foi observada a presença da curcumina no biofilme e o MEV demonstrou que a estrutura do biofilme foi alterada após TFD. O estudo mostrou que a TFD é capaz de reduzir o crescimento do biofilme de cepa MRSA, evidenciando a eficácia da curcumina como FS a ser utilizado na TFD.

**Palavras-chave:** terapia fotodinâmica antimicrobiana. *staphylococcus aureus*. biofilme. curcumina.

## EVALUATION OF CURCUMIN IN PHOTODYNAMIC THERAPY ON METICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* BIOFILM – *in vitro* STUDY

### Abstract

The increase in the number of multi-antibiotic-resistant bacteria in healthcare delivery settings is becoming a global public health problem. Biofilms are structures that give bacteria greater antimicrobial resistance. Therefore, studies with bacterial biofilms have become an extremely relevant object, since these structures reduce the penetration of antibiotics, compromising the host's immune response. Photodynamic therapy (PDT) is a treatment that combines light, a photosensitive drug (FS) and molecular oxygen, generating reactive oxygen species (ROS), leading to cell death, appears as an alternative in inactivating these microorganisms. The objective of this work was to evaluate, in an *in vitro* study, the antimicrobial action of PDT, mediated by curcumin (*Curcuma Longa*), in biofilm of the *Staphylococcus aureus* strain, resistant to Methicillin (MRSA). The experimental groups were divided into Control, Dark Control, Photosensitizer (FS), Irradiated (light), PDT. The FS and PDT groups were incubated with curcumin for 20 minutes. Then, the PDT group was irradiated using a LED device at 450 nm, with an irradiance of 110 mW/cm<sup>2</sup> and a fluence of 50 J/cm<sup>2</sup>. The internalization of PS by confocal microscopy, the colony forming units (CFU), formation of reactive oxygen species (ROS), bacterial metabolism by means of Resazurin, biofilm structure by scanning electron microscopy (SEM) before and after PDT were evaluated. The results demonstrated that curcumin-mediated PDT was able to reduce MRSA strain biofilm growth, alter metabolic activity and increase ROS production. By confocal microscopy the presence of curcumin in the biofilm was observed and the SEM showed that the biofilm structure was altered after PDT. The study showed that PDT is able to reduce the growth of the MRSA strain biofilm, evidencing the effectiveness of curcumin as a PS to be used in PDT.

**Key words:** antimicrobial photodynamic therapy. *staphylococcus aureus*. biofilm. curcumin.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> - Etapas fundamentais da formação de um biofilme bacteriano .....	20
<b>Figura 2</b> - Número de mortes ocasionadas pelas infecções geradas por microrganismos resistentes, identificado pela sigla AMR, em comparação com as maiores causas de óbito. ....	23
<b>Figura 3</b> - Distribuição em porcentagem dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCLS em pacientes de UTI, Brasil.....	24
<b>Figura 4</b> - Porcentagem de fenótipos resistentes mais notificados como agentes etiológicos de IPCSL em paciente de UTI, Brasil .....	25
<b>Figura 5</b> - Esquema ilustrativo da reação de tipo I e tipo II da TFD.....	28
<b>Figura 6</b> - Cúrcuma (A), rizoma da cúrcuma (B) e curcumina em pó (C) .....	31
<b>Figura 7</b> - Estrutura das moléculas de BDMC, DMC e curcumina.....	32
<b>Figura 8</b> - Imagens de Microscopia Confocal de biofilme de MRSA, com incubação de curcumina no escuro, onde (A) apresenta a internalização da curcumina pela célula bacteriana e (B) apresenta a intensidade da fluorescência com imagem em 2,5 D. ....	41
<b>Figura 9</b> - Valores médios de UFC/mL para cepa MRSA, constando os grupos Controle escuro, FS, LED e TFD. Sendo os símbolos * identificando a diferença estatística de $p \leq 0,01$ .....	42
<b>Figura 10</b> - Atividade metabólica por metabolização do resazurin em fluorescência, sendo os símbolos * e $\Delta$ equivalentes a $p \leq 0,01$ , representando a diferença estatística entre os grupos .....	43
<b>Figura 11</b> - Leitura visual da metabolização do corante resazurin, identificada pela alteração da coloração original azul do corante para coloração rosa proveniente da metabolização do corante.....	44
<b>Figura 12</b> - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de biofilme de cepa MRSA, dos grupos Controle escuro, FS, LED e TFD. ....	45
<b>Figura 13</b> - Produção de espécies reativas de oxigênio após aplicação da terapia, dado em porcentagem da média.....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Grupos Experimentais.....	37
---	----

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	OBJETIVOS .....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos .....	13
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	14
3.1	Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS).....	14
3.2	Infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
3.3	Caracterização de biofilme.....	18
3.4	Tratamento convencional de infecções por <i>S. aureus</i> .....	20
3.5	O uso de antibióticos e a resistência bacteriana.....	21
3.6	O uso da luz como terapia alternativa para resistência bacteriana.....	25
3.6.1	Terapia Fotodinâmica (TFD) .....	26
3.6.2	Mecanismo de ação da TFD.....	26
3.6.3	Dano celular gerado pelas ERO.....	28
3.6.4	Fontes de luz.....	29
3.6.5	Fotossensibilizadores .....	30
3.7	Curcumina .....	31
3.8	Terapia fotodinâmica x antibioticoterapia .....	33
4	JUSTIFICATIVA.....	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
5.1	Obtenção e manutenção das cepas .....	36
5.2	Preparo do fotossensibilizador.....	36
5.3	Formação do biofilme.....	36
5.4	Grupos experimentais .....	37
5.5	Internalização da curcumina pelas células de <i>S. aureus</i> por Microscopia Confocal .....	37
5.6	Aplicação da terapia fotodinâmica .....	38
5.7	Contagem de Unidades Formadoras de Colônia.....	38
5.8	Avaliação da atividade metabólica pelo teste de Resazurin.....	38
5.9	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
5.10	Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	39

5.11	Análises estatísticas .....	40
6	RESULTADOS.....	41
6.1	Análise da internalização do fotossensibilizador por microscopia confocal.....	41
6.2	Avaliação do crescimento bacteriano após aplicação da Terapia Fotodinâmica .....	41
6.3	Avaliação da atividade metabólica com Resazurin.....	42
6.4	Análise da morfologia bacteriana por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	44
6.5	Análise da produção de Espécies reativas de oxigênio .....	46
7	DISCUSSÃO.....	47
8	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	53

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções em ambientes hospitalares tornaram-se um relevante problema de saúde, visto que anualmente atingem 1,5 milhões de pessoas no mundo, com a estimativa para países em desenvolvimento, como o Brasil, a ocorrência de 10 casos de infecção em cada 100 pacientes hospitalizados, ocasionando a prorrogação do período de internação, o aumento dos custos e até o óbito do paciente (GIROTI *et al.*, 2018).

No Brasil, entre 10% a 15% dos pacientes hospitalizados são acometidos pelas Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS). Com base no período de internação essa porcentagem pode crescer na média de 5 a 10 dias, além disso, segundo o *European Center for Disease Prevention and Control* (2016), estima-se que 8% dos pacientes que permanecem em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) por mais de dois dias adquirem pelo menos uma IRAS (SANTOS *et al.*, 2018).

Segundo Costa (2019), as cepas da bactéria *Staphylococcus aureus* têm sido consideradas a principal causa de infecção em ambiente hospitalar da América Latina, principalmente em UTI. São extremamente perigosas devido à sua rápida e forte disseminação a nível global e pela sua facilidade em desenvolver resistência aos antibióticos. No momento em que essa bactéria adquire resistência a meticilina, um fármaco antimicrobiano, recebe a classificação *Methicillin resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) (MENEQUIN; TORRES; POLLO, 2020).

Devido ao fato de ser considerado um dos principais agentes patogênicos, *S. aureus* se destaca pelo seu grande potencial de interação, adaptação e aquisição de genes de virulência e sua capacidade de formação de biofilme, responsáveis pelo aumento de sua patogenicidade e pelas diversas enfermidades que pode desencadear ao homem, transformando-o em um notório problema de saúde pública (PAHARIK; HORSWILL, 2016; MOORMEIER; BAYLES, 2017; MOHAMMED *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2021).

O biofilme é uma estrutura que confere uma maior resistência bacteriana aos tratamentos antimicrobianos e as defesas do hospedeiro, essa característica se deve pela presença da matriz de polímeros extracelular que envolve as bactérias, exercendo a função de barreira difusora resultando na redução da penetração dos antibióticos no meio intracelular do alvo e o processo de fagocitose realizado pelo hospedeiro (PAHARIK; HORSWILL, 2016; KOMMEREIN *et al.*, 2018).

Os tratamentos atuais para as infecções causadas por biofilmes bacterianos são baseados no uso de antibióticos que segundo Saxena *et al.* (2019) podem desencadear efeitos tóxicos, além disso, as bactérias em agregados de biofilme possuem uma maior resistência aos fármacos convencionais tornando a antibioticoterapia ineficaz (CRAFT *et al.*, 2019; GUO *et al.*, 2020).

Desta forma, o uso da Terapia Fotodinâmica (TFD) vem ganhando cada vez mais destaque, considerada uma promissora terapia antimicrobiana alternativa capaz de prevenir o avanço das cepas multirresistentes. A terapia consiste na aplicação em conjunto de uma molécula fotossensível, denominada fotossensibilizador (FS), luz em comprimento de onda adequado e o oxigênio molecular presente no meio, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) capazes de degradar a célula alvo (MROZ *et al.*, 2011).

A inativação fotodinâmica apresenta como vantagens o amplo espectro de ação, agindo em bactérias, fungos, vírus e protozoários; alta eficácia sobre as cepas microbianas resistentes aos antibióticos; uso de protocolos que geram a redução microbiana com baixo dano ao tecido do hospedeiro; improvável desenvolvimento de cepas fotorresistentes mesmo após tratamentos repetidos; a aplicação de formulações que agem em local específico com liberação controlada do FS e a utilização de uma fonte de luz de baixo custo (HAMBLIN; HASAN., 2004; JORI *et al.*, 2006; SANTOS, 2019).

Os compostos provenientes das plantas medicinais têm sido utilizados para o tratamento de diversas doenças, devido à sua fácil disponibilidade, baixo custo e menores efeitos colaterais. Essas substâncias são fontes de inspiração para o desenvolvimento de 35% dos medicamentos disponíveis no mercado. Entre as plantas medicinais, destaca-se a cúrcuma por possuir atividade farmacológica relevante como ação antibacteriana (ANITHA *et al.*, 2015; ELAVARASU *et al.*, 2016; MONDAL *et al.*, 2016; NELSON *et al.*, 2017; CALIXTO, 2019).

Desta forma, a proposta deste estudo foi de utilizar um composto natural, a curcumina, presente na planta cúrcuma, por apresentar um baixo custo e comprovada ação antibacteriana em associação a TFD, que pode ser capaz de potencializar esse efeito para ser empregado como técnica terapêutica alternativa para o tratamento das infecções geradas por cepa MRSA, visto a ineficácia da antibioticoterapia.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar a eficácia antibiofilme da TFD, com o uso da curcumina como fotossensibilizador, em biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Verificar a internalização do fotossensibilizador por meio de Microscopia Confocal;
2. Realizar a contagem de unidades formadoras de colônias para avaliar a morte do microrganismo;
3. Analisar a estrutura do biofilme após aplicação da terapia por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura;
4. Avaliar a atividade metabólica com Rezasurin;
5. Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS)

Atualmente é notável o aumento nos casos de infecções hospitalares, expressão que se encontra substituída pela terminologia Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS), que se caracteriza como patologias contraídas pelo paciente em até 72 horas após sua admissão em uma unidade de saúde (BARROS *et al.*, 2016).

A elevada quantidade de indivíduos adoecidos em áreas hospitalares transforma-a em um relevante reservatório de microrganismo patogênicos, uma vez que abriga um grande número de pessoas imunocomprometidas, susceptíveis a infecções, possibilitando que até os microrganismos da microbiota normal apresentem riscos aos pacientes em internação (MORAES; RAU, 2016; SANTOS, 2018; SILVA, 2018).

O risco de adquirir uma IRAS está associado a alguns fatores como a gravidade do quadro clínico, condição nutricional, procedimentos médicos, tempo de internação, entre outros. As IRAS representam-se como a principal causa de morbidade e mortalidade e vem apresentando um aumento contínuo em razão da diminuição da eficácia do tratamento atual, realizado com antibióticos, em concomitância ao crescimento da resistência bacteriana (COSTA; JÚNIOR, 2017).

Segundo Padoveze e Fortaleza (2014) e Watanabe *et al.* (2015), as IRAS são classificadas de acordo com sua origem, sendo endógena quando causadas pela colonização de microrganismos da pele e mucosa do próprio paciente, que devido a algumas condições clínicas, como a imunidade baixa, favorecem infecção, ou exógena, provocada por microrganismos provenientes de outros pacientes, profissionais da saúde, equipamentos e/ou ambientes contaminados.

Em conformidade com Santos (2018), os microrganismos podem ser transmitidos mediante ao contato direto ou indireto, gotículas ou aerossóis. Na transmissão direta ocorre a transferência de agentes infecciosos de um indivíduo para o outro por meio da dispersão de gotículas ao espirrar, tossir, cuspir, falar ou cantar, e pelo contato direto (OPAS, 2010). Já na propagação por contato indireto, a transmissão ocorre pelo contato de indivíduos com objetos contaminados (WATANABE *et al.*, 2015).

Na transmissão por gotículas, o agente infeccioso é transferido das secreções contidas na orofaringe de uma pessoa infectada para outra, por meio de gotículas respiratórias geradas quando o indivíduo tosse, espirra, fala ou até mesmo durante a realização de procedimentos como aspiração, intubação traqueal e ressuscitação cardiopulmonar (SILVA *et al.*, 2014).

Já na transmissão por aerossóis ocorre a dispersão de partículas contendo microrganismos patogênicos, que podem percorrer uma extensa distância, por meio de correntes de ar que ocasionam a disseminação dos agentes infecciosos, podendo ser inalados por indivíduos vulneráveis gerando a infecção (GARNICA, 2016).

De acordo com Souza (2014), os sítios de infecções hospitalares mais atingidos são o trato urinário, feridas cirúrgicas, trato respiratório e a corrente sanguínea, possuindo como agentes causadores os vírus, fungos, protozoários e principalmente as bactérias.

Algumas bactérias compõem a microbiota natural do ser humano e em condições adequadas de imunidade e homeostase não oferecem risco, entretanto, quando em condições inadequadas podem gerar uma infecção. Apesar do organismo conter mecanismos de defesa como a pele, mucosa e o sistema imunológico, quando a colonização de bactérias se instala ocorre a invasão para camadas de tecidos mais profundos até a corrente sanguínea. Uma vez no tecido, as bactérias utilizam as células do hospedeiro como nutriente para se multiplicar e produzem toxinas que são transportadas pelo sangue desencadeando os efeitos sistêmicos das infecções bacterianas como a diarreia, febre e o choque (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Em resposta a uma infecção pode desencadear-se um quadro clínico denominado sepse, ou infecção generalizada, que se caracteriza como uma inflamação sistêmica com o potencial de ocasionar a falência de múltiplos órgãos, sendo uma das principais causas de óbito em UTI. A sepse de origem bacteriana detém a maior prevalência em pacientes hospitalizados, visto que esses microrganismos possuem uma expressiva capacidade de disseminação com diversos mecanismos de infecção e uma grande aquisição de resistência (CDC, 2014; ILAS, 2018).

De acordo com a Associação Nacional de Biossegurança (ANBio), no Brasil, o número de mortes provenientes de infecções em ambientes hospitalares excede 100 mil casos anuais, onde em alguns estados a taxa de mortalidade atinge 70%. Estima-

se que cerca de 400 mil novos casos sejam diagnosticados anualmente e leve à morte 240 mil pacientes nas UTI, ultrapassando o número de vítimas de alguns cânceres e do infarto agudo do miocárdio. Além disso, a cada segundo um paciente morre de sepse e anualmente 30 milhões de indivíduos no mundo são afetados (MACHADO *et al.*, 2017; CECCONI *et al.*, 2018; ANDRÉ, 2019).

Dentre o grupo das bactérias, as que lideram o ranking de resistência em UTI são as espécies *Staphylococcus*, *Acinetobacter ssp*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (LIU *et al.*, 2015; ANVISA, 2017).

O desenvolvimento de IRAS em pacientes críticos representa cerca de 20% de todas as infecções de pessoas hospitalizadas, 15% das infecções primárias de corrente sanguínea e meio milhão de casos anuais nas UTI. Na última década, *Staphylococcus aureus* apresentou grande destaque, sendo a cepa resistente a meticilina responsável por 40 a 60% dos casos de IRAS, emergindo desta forma como um importante patógeno associado às infecções de feridas operatórias, derme, corrente sanguínea e sepse e assumindo posição entre as principais causas de morbimortalidade elevando os índices de complicações relacionada à saúde, principalmente em países em desenvolvimento (CATÃO, 2013; MARTINS *et al.*, 2013; GUIMARÃES; HORÁCIO; TERRA, 2017; MENEGUIN; TORRES; POLLO, 2020).

### 3.2 Infecções por *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* constitui-se de cerca de 30 espécies, sendo possível identificar e isolar 17 delas em amostras biológicas humana, na qual as mais comumente encontradas são *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 2007; BARRETO; PICOLI, 2008).

*S. aureus* é uma bactéria de formato esférico pertencente ao grupo dos gram-positivos, geralmente encontram-se agrupados em cocos semelhantes a cachos de uva, com colônias de coloração amarelo-dourada, sendo essa pigmentação antioxidante capaz de protegê-la do efeito antimicrobiano da luz solar. São encontrados na pele, glândulas e na mucosa de animais de sangue quente, podendo estar frequentemente presente em ambiente circulatório humano e nos indivíduos, que se caracterizam como seu principal reservatório (SANTOS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Por mais que *S. aureus* seja uma bactéria integrante da microbiota normal do organismo, quando ocorre a quebra da barreira cutânea ou a diminuição da imunidade a mesma pode ocasionar desde infecções mais simples, como espinhas, furúnculos e celulites, até infecções mais severas como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e morte (FREITAS *et al.*, 2021).

*S. aureus* possui uma grande propensão para ocasionar infecções como a septicemia, que se configura como uma das 10 principais causas de morte mundial. Essas infecções geram o desenvolvimento de lesões e abscessos em diferentes tecidos, fato que se associa a falência múltipla dos órgãos, afetando o sistema respiratório, cardiovascular, hepático, renal, neurológico e levando a óbito (HAWIGER; VEAC; ZIENKIEWICZ, 2015; BERGIN *et al.*, 2017; OTTO, 2017; NAPOLITANO, 2018).

Devido ao fato de ser considerado um dos principais agentes patogênicos, *S. aureus* se destaca pelo seu grande potencial de interação, adaptação e aquisição de genes, responsáveis pelo aumento de sua patogenicidade e pelas diversas enfermidades que pode causar ao homem, transformando-o em um grande problema de saúde pública (FREITAS *et al.*, 2021).

A patogenicidade apresentada pela bactéria *S. aureus* está associada a uma série de fatores como a ação de enzimas, toxinas, adesinas e imunomoduladores, a presença de cápsula na parede celular, que eleva seu potencial de invasão aos tecidos e a expressão de proteínas de superfície interligadas ao peptidoglicano (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

As proteínas de superfície interligadas ao peptidoglicano conferem à bactéria a capacidade de identificar as estruturas da matriz celular e do plasma, secretar exoproteínas, enzimas e exotoxinas, as quais as lipases, proteases, nucleases, collagenase, catalase e hialuronidase ocasionam a destruição celular e a disseminação da bactéria. Ressalta-se que as proteínas e toxinas secretadas são capazes de bloquear a quimiotaxia e destruir as células fagocíticas influenciando na resposta inflamatória do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Além disso, a enzima coagulase secretada por esse patógeno, coagula o fibrinogênio do sangue que ao ser encaminhado ao fígado será convertido em fibrina resultando na formação de um coágulo sanguíneo e na sua deposição na parede bacteriana conferindo a bactéria uma espécie de capa antifagocítica (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O gênero *Staphylococcus* apresenta a capacidade de se ligar as superfícies formando estruturas rígidas, conhecidas como biofilme, fator responsável por uma maior patogenicidade com aumento da complexidade das infecções e menor susceptibilidade das bactérias aos antimicrobianos, colaborando desta maneira na manutenção das infecções crônicas (PAHARIK; HORSWILL, 2016; MOORMEIER; BAYLES, 2017; MOHAMMED *et al.*, 2018).

### 3.3 Caracterização de biofilme

Algumas células bacterianas apresentam a capacidade de produzir uma matriz de polímeros extracelular constituída de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Essa estrutura denomina-se biofilme e confere às bactérias uma vantagem adaptativa devido ao fato de protegê-las contra as agressões do meio exterior como a desidratação; ataques do sistema imune do hospedeiro e resistência a substâncias antimicrobianas, além de possibilitar um aumento da adesão em superfícies (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005; SILVA, 2019).

Desta maneira o biofilme compreende a uma comunidade composta de diversas espécies de microrganismos revestidos por uma camada heterogênea de matriz extracelular e que se desenvolvem aderidos a uma superfície biótica ou abiótica como cateteres, sondas, próteses, entre outros dispositivos de ambiente hospitalar, tecidos vivos, tubulações de sistema de água industrial e na água potável (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005; MENOITA, *et al.*, 2012; HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013; SCHIESARI-JUNIOR, *et al.*, 2015).

A formação de um biofilme ocorre por meio de um estímulo que pode ser desencadeado em resposta à escassez de nutrientes no meio onde as cepas estão inseridas, reação a sinais do hospedeiro e a exposição a mínimas concentrações de substâncias antibióticas (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018; SATO *et al.*, 2018). O início da formação e produção da matriz de polímeros extracelular ocorre por meio de um mecanismo de comunicação, denominado de *quorum sensing*, no qual as bactérias são capazes de produzir moléculas reconhecendo-as e gerando uma resposta por meio da ativação de genes específicos fazendo-as agir de forma coordenada (LI; TIAN, 2016; NICOL *et al.*, 2018).

O processo de desenvolvimento de um biofilme é complexo, ordenado e coordenado e abrange a produção de uma película aderida e a colonização realizada

por colonizadores primários e secundários. Os primários agregam entre si por reconhecimento e servem de fixação para outras bactérias para a posterior síntese de matriz de polissacarídeos extracelular (KOMMEREIN *et al.*, 2018).

Durante a formação do biofilme, ocorre dois tipos de adesão, à reversível originada da fraca interação inicial da bactéria com o substrato por meio das forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interações hidrofóbicas. E a adesão irreversível, que resulta do ancoramento de apêndices da bactéria como pili e as proteínas adesinas e da produção de substâncias poliméricas extracelulares que fortalecem a fixação das células na superfície por meio das interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010; KOMMEREIN *et al.*, 2018).

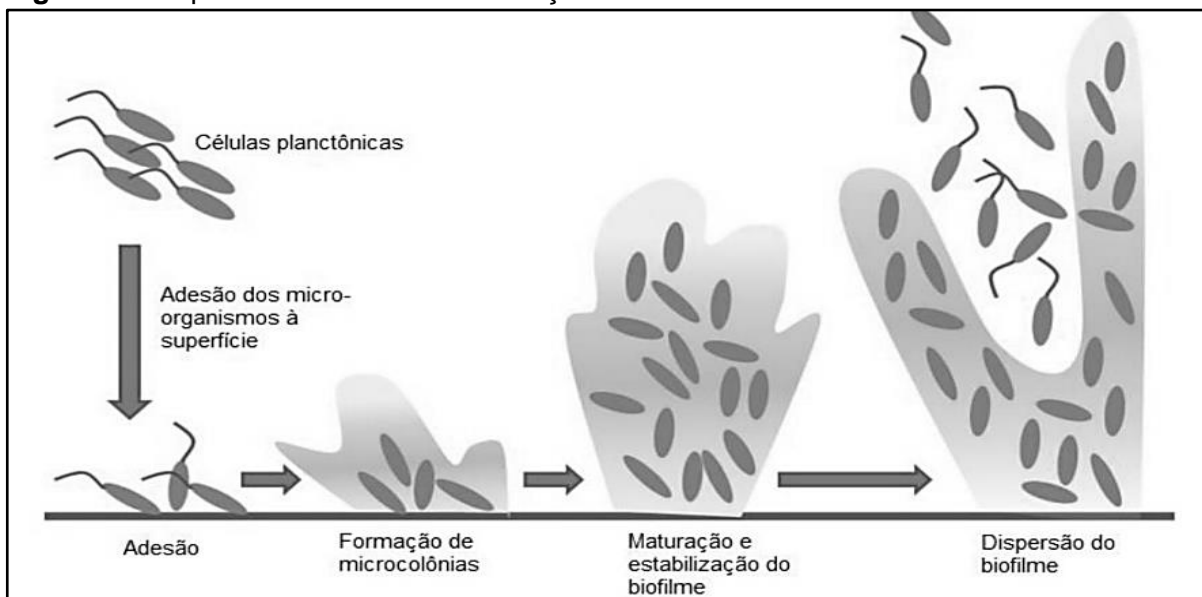
A adesão irreversível depende de fatores como a espécie bacteriana, densidade e duração da exposição, sendo necessário para sua remoção o uso de força mecânica ou química com a aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes ou calor (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010; KOMMEREIN *et al.*, 2018).

A velocidade de formação inicial de um biofilme sofre influência de diversos fatores como a concentração de moléculas orgânicas presente no meio aquoso e que entram em contato com a superfície sólida, a afinidade das moléculas com a superfície de suporte e com as condições hidrodinâmicas do meio líquido, no qual o caráter hidrofóbico é o principal fator associado a fixação à superfície (OTTO, 2018).

Considera-se que o biofilme atingiu sua maturidade, principalmente, pelo aumento da densidade populacional e pela expressiva produção e deposição de polímeros extracelulares que ocasionam o crescimento da espessura do biofilme (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

De acordo com Otto (2018) e Silva (2019), durante sua formação o biofilme passa por importantes etapas de desenvolvimento, iniciando com a adesão que compreende a fixação das células bacterianas livres à uma superfície. Após a adesão, as células começam a etapa, de proliferação e maturação, onde ocorre a aderência de outras células e a secreção de moléculas poliméricas para formação da matriz, em seguida ocorre o descolamento do biofilme, ocasionado principalmente, pela ação de enzimas como as nucleases e proteases que quebram as ligações da matriz polimérica gerando como consequência a liberação das células para o meio aquoso. Esse processo encontra-se ilustrado na figura 1.

**Figura 1** - Etapas fundamentais da formação de um biofilme bacteriano



Fonte: Adaptado de Gupta *et al.* (2016).

Os microrganismos relacionados a infecções por biofilmes apresentam um comportamento fisiológico diferente em relação a taxa de crescimento e a capacidade de resistência a agentes antimicrobianos, ressalta-se que os biofilmes expressam papel fundamental no desenvolvimento de doenças infecciosas podendo se estabelecer em qualquer parte do corpo e sobreviver a tratamentos com altas doses de antibióticos e quando bem estabelecidos conseguem ocasionar danos em locais diferentes devido ao rompimento de seus fragmentos contendo células bacterianas produtoras de endotoxinas, além de invadirem o sistema imunológico causando uma resposta inflamatória e propiciando sítios de replicação de cepas resistentes a antibióticos (WRÓBLEWSKA; STRUŻYCKA; MIERZWIŃSKA-NASTALSKA, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2016).

### 3.4 Tratamento convencional de infecções por *S. aureus*

No início da década de 1930, ocorreu a implementação da antibioticoterapia contra as infecções causada por *S. aureus*, com o uso da sulfanilamida, que supostamente ditava o fim das doenças infecciosas. No entanto no final desta década as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes àquele quimioterápico emergiram (SANTOS *et al.*, 2007).

Já em 1943, com a introdução da penicilina para uso clínico, *S. aureus* desenvolveu resistência a esse betalactâmico por meio da produção de

betalactamase, denominada penicilinase, capaz de hidrolisar o anel betalactâmico da penicilina inativando-a. A resistência frente ao quimioterápico, em 1959, alcançava 80% das cepas, abrangendo tanto a amoxicilina como a ampicilina (TAVARES, 2002; MAMISUKA, 2005).

Mediante ao problema de resistência a penicilina, desenvolveu-se uma nova classe de antimicrobianos, provenientes de penicilinas resistentes às betalactamases, denominada de oxacilina e meticilina, em seguida surgiram as cefalosporinas (SANTOS *et al.*, 2007; KLEIN; GOULART, 2008).

No entanto, no início da década de 1970, manifestaram-se cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina, identificadas pela sigla MRSA, apresentando também resistência a outros betalactâmicos como as cefalosporinas. As cepas se disseminaram em ambientes hospitalares, restringindo a antibioticoterapia aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina (SANTOS *et al.*, 2007).

A vancomicina se tornou o fármaco utilizado no combate das infecções causadas pelas cepas MRSA, contudo detém reações adversas como o efeito nefrotóxico e em 1997, no Japão, surgiram as primeiras cepas resistentes a esse fármaco (SRINIVASAN; DICK; PERL, 2002; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005; MACHADO, 2005).

Atualmente o tratamento para as infecções por cepas de *S. aureus* ainda é realizado com o uso de antibióticos, em especial os pertencentes à classe dos  $\beta$ -Lactâmicos como as penicilinas. Contudo as cepas MRSA e as resistentes à vancomicina, antibiótico alternativo para tratar as infecções de MRSA, continua sendo um desafio para os profissionais da área da saúde, em razão da ineficácia da antibioticoterapia, gerando urgência na busca pelo desenvolvimento de novas terapias e fármacos para o controle desta bactéria (NABER, 2009; KURLENDÁ; GRINHOLC, 2012; GARDETE; TOMASZ, 2014; PANESSO *et al.*, 2015).

### **3.5 O uso de antibióticos e a resistência bacteriana**

O atual aumento do número de bactérias multirresistentes nos ambientes de prestação de serviços de saúde é reconhecido como um problema global de saúde pública e associa-se a resistência antimicrobiana, que se tornou um fenômeno natural ao longo dos anos que pode ser agravada pelo uso inadequado de antibióticos

resultando na limitação das opções de tratamento e elevando os custos hospitalares e o risco de morte (OMS, 2018).

De acordo com Vasconcelos *et al.* (2015), classifica-se como antibióticos os medicamentos que possuem o intuito de inibir, cessar e/ou ocasionar a morte de microrganismos, contudo o uso inadequado dessa classe de fármaco auxilia na propagação da resistência aos mesmos.

Esses agentes antimicrobianos possuem diferentes ações e alvos celulares, podendo gerar desde a inativação de enzimas que atuam na síntese de substâncias essenciais, como as que compõe a parede celular, como agir modificando a permeabilidade plasmática ou até mesmo impedir processos de replicação e reparo do material genético. Desta forma esses mecanismos de ação inibe a síntese da parede celular, síntese ou dano da membrana citoplasmática, síntese proteica dos ribossomos, altera a síntese dos ácidos nucléicos e o metabolismo celular (DAVIES; DAVIES, 2010; BAPTISTA, 2013).

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos ocasionou um aumento na ocorrência de doenças infecciosas com consequências clínicas e econômicas que culminam na elevação da morbidade e mortalidade. Esse fenômeno natural agrava-se, principalmente, pela pressão seletiva imposta pelo uso excessivo de antibióticos, que é considerado um dos principais fatores contribuintes para a resistência microbiana (LOUREIRO *et al.*, 2016).

Essa resistência pode ser decorrente tanto de um aspecto intrínseco que algumas espécies apresentam em resistir à ação de um antibiótico devido a uma característica estrutural e/ou funcional, quanto pode ser adquirida por meio de mutações no processo de replicação celular ou pela ação de agentes mutagênicos como radiações ionizantes e não ionizantes e a ação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Além de poder desenvolver-se pela aquisição de material genético exógeno, contendo genes de resistência, pode ser adquirido pelos mecanismos de transferência gênica horizontal como a conjugação bacteriana, a transformação e a transdução (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

As células bacterianas apresentam cinco mecanismos principais relacionados à resistência aos antibióticos, sendo eles:

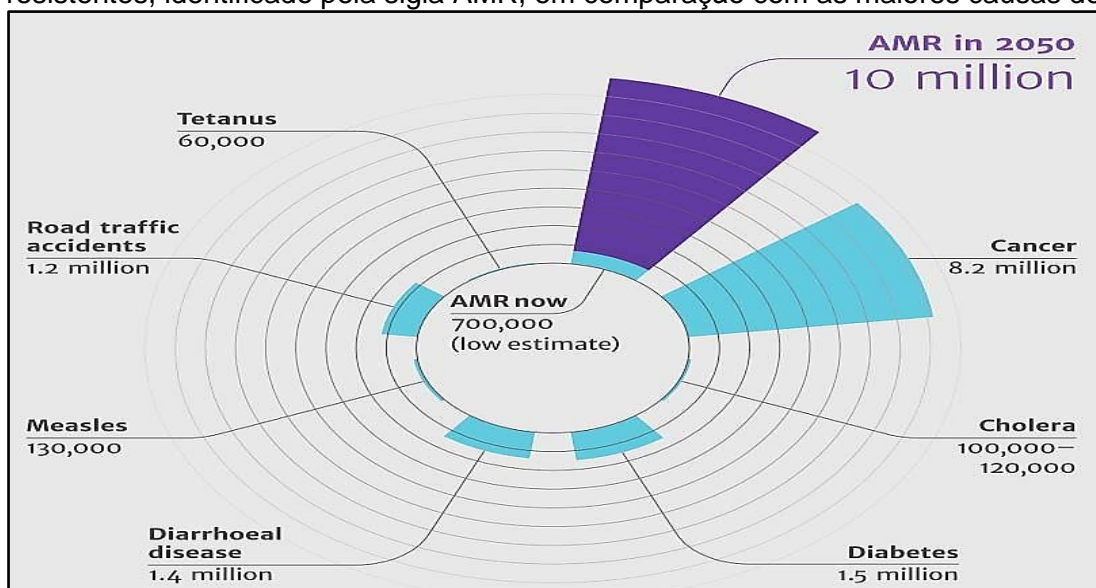
1. O mecanismo enzimático responsável em inativar ou degradar o antibiótico pela ação de enzimas que realizam reações de hidrólise, de transferência de grupos químicos ou pelo processo de oxirredução (COSTA, 2016).

2. A redução da permeabilidade da membrana celular, dificultando a penetração e o acúmulo intracelular do fármaco (BAPTISTA, 2013; LOUREIRO *et al.*, 2016).
3. A presença de bombas de efluxo que removem o antibiótico para o meio extracelular mantendo as concentrações intracelulares baixas (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).
4. A alteração das moléculas alvo dos antibióticos, afetando a ligação dos fármacos, sua ação e a produção de moléculas alvo alternativas para mascarar os originais, defendendo-as da ação dos fármacos, sendo esse o mecanismo utilizado por *S. aureus* contra à meticilina (LOUREIRO *et al.*, 2016).
5. A formação de biofilme que protege as células bacterianas da ação de múltiplos agentes antimicrobianos (KUMA; VARELA, 2013).

De acordo com Fisman *et al.*, (2014), considera-se como microrganismo resistente quando o mesmo apresenta resistência simultânea a diversos antimicrobianos.

Em relação ao crescimento da resistência bacteriana, em 2014, o governo britânico publicou o *Review on Antimicrobial Resistance*, que ressalta a alta mortalidade das infecções resistentes, responsáveis pela morte anual de cerca de 50 mil pessoas na Europa e nos Estados Unidos e 100 mil mortes por ano ao redor do mundo. Além disso, segundo o trabalho, estima-se que em 2050, os óbitos por essas infecções atinjam 10 milhões de indivíduos a cada ano, ultrapassando o número de mortes causadas pelo câncer, como demonstrado na figura 2 (O'NEILL, 2014).

**Figura 2** - Número de mortes ocasionadas pelas infecções geradas por microrganismos resistentes, identificado pela sigla AMR, em comparação com as maiores causas de óbito.



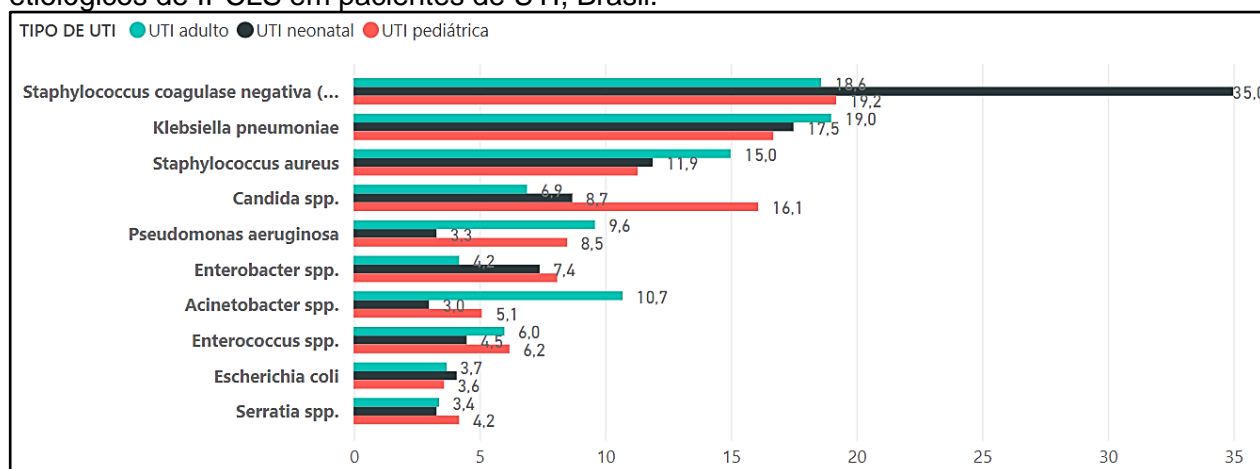
Fonte: O'neill, (2014).

Além do efeito gerado pela mortalidade, o impacto econômico ao sistema de saúde associado a diminuição da capacidade produtiva pode chegar a 1,5 bilhões de euros anualmente no mundo. De acordo a OMS, se o cenário de resistência microbiana aos antimicrobianos não se alterar, os danos à economia serão catastróficos, com uma estimativa de que até 2030 aproximadamente 24 milhões de pessoas podem ser forçadas à pobreza extrema (O'NEILL, 2016; WHO, 2019).

Em conformidade com o *World Economic Forum (WEF)*, estima-se que em 2050 as mortes decorrentes de infecções por bactérias resistentes ocasionarão um expressivo dano a economia mundial, levando a retração do PIB em até 3% e um gasto acumulado de 100 trilhões de dólares para os próximos 35 anos. Sendo os países de economias emergentes, como o Brasil, os que apresentarão o maior risco de mortalidade (O'NEILL, 2015; JØRGENSEN, 2016).

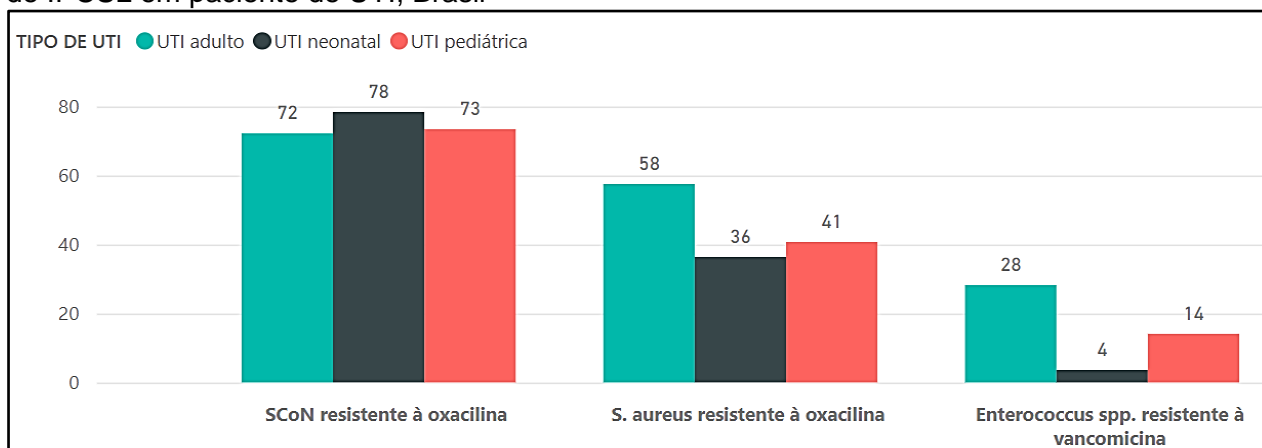
Segundo o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviço de Saúde nº 17, os principais microrganismos notificados como causadores de infecções primárias de corrente sanguínea (IPCLS) em pacientes de UTI, são as bactérias *Staphylococcus coagulase negativa (SCon)*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus* (figura 3). Dentre as bactérias resistentes, demonstra-se na figura 4, os fenótipos mais notificados, sendo eles o *SCon*, resistente a oxaciclina, *S. aureus*, resistente a oxaciclina, e *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina os mais frequentes (ANVISA, 2017).

**Figura 3** - Distribuição em porcentagem dos microrganismos notificados como agentes etiológicos de IPCLS em pacientes de UTI, Brasil.



Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2017.

**Figura 4** - Porcentagem de fenótipos resistentes mais notificados como agentes etiológicos de IPCSL em paciente de UTI, Brasil



Fonte: GVIMS/GGTES/ANVISA, 2017.

Em razão do contínuo crescimento do número de microrganismos resistentes as atuais classes de antibióticos, desencadeou-se a busca por métodos alternativos para tratar essas infecções, dos quais destaca-se a terapia fotodinâmica, uma técnica terapêutica imensamente estudada para a inativação de diversos microrganismos como as bactérias (HAMBLIN, 2016; KHARKWAL *et al.*, 2011; WAINWRIGHT, 2012).

### 3.6 O uso da luz como terapia alternativa para resistência bacteriana

Há muitos séculos os povos gregos, chineses, egípcios e indianos utilizavam a luz como técnica terapêutica para tratar diversas enfermidades, devido seu conhecimento acerca das propriedades curativas da luz. Um dos primeiros registros do seu uso para essa finalidade vem da Grécia a aproximadamente 3000 anos atrás (MUNIZ, 2018; CAFACE, 2020).

Como descrito anteriormente o uso da luz com finalidades terapêuticas é datado desde a antiguidade, entretanto foi em meados do século XX que sua aplicação começou a ser pesquisada, apresentando como marco inicial o trabalho de Oscar Raab e Herman Von Tappeiner que observaram a morte do protozoário, *Paramecium caudatum*, quando exposto à luz na presença da acridina, sendo essa descoberta o gatilho para o desenvolvimento do termo “ação fotodinâmica” por Tappeiner, em 1903 (FREITAS, 2018).

Atualmente, o emprego da luz é bastante amplo fazendo-se presente nas mais diferenciadas áreas, desde uma simples sinalização de trânsito, como o semáforo, até

sua aplicação na prática clínica, como no diagnóstico dos pacientes e na realização cirurgias, tendo seu uso crescendo cada vez mais com sua aplicação no intervalo de luz visível no intuito da inativação fotodinâmica em concomitância a um agente fotossensibilizador (PERUSSI, 2007; SILVA, 2017; MUNIZ, 2018; CAFACE, 2020).

### **3.6.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)**

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica terapêutica baseada na interação de três fatores, sendo eles a luz, em comprimento de onda adequado, uma substância fotossensível não tóxica, denominada fotossensibilizador (FS) e a presença de moléculas de oxigênio que culminam em uma reação gerando as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou a transferência de elétrons do FS para célula alvo levando a morte celular por dano oxidativo (DAI *et al.*, 2009; MROZ *et al.*, 2011).

Segundo Lim *et al.* (2012), esses fatores devem agir somente em conjunto, visto que quando isolados a luz ou o FS não podem apresentar efeito deletério aos substratos orgânicos.

### **3.6.2 Mecanismo de ação da TFD**

A ação da TFD ocorre mediante a um conjunto de fatores biológicos, químicos e físicos provenientes da aplicação de um FS seguida da irradiação de luz em comprimento de onda específico (PERUSSI, 2007; SILVA, 2017).

Com a aplicação do FS, a célula faz sua captação e o acumula no meio intracelular tornando-a sensível a luz de comprimento de onda adequado para o FS absorver, ocasionando uma resposta fototóxica capaz de levar a morte da célula-alvo por meio de danos oxidativo via geração de ERO, como o oxigênio singlete e radicais livres. As ERO exercem função fundamental na indução de apoptose e necrose de células eucarióticas, afetando diretamente apenas as estruturas e moléculas que circundam perto da sua área de formação (MROZ *et al.*, 2011; GUAN; LAN, 2018; ZAGO, 2018).

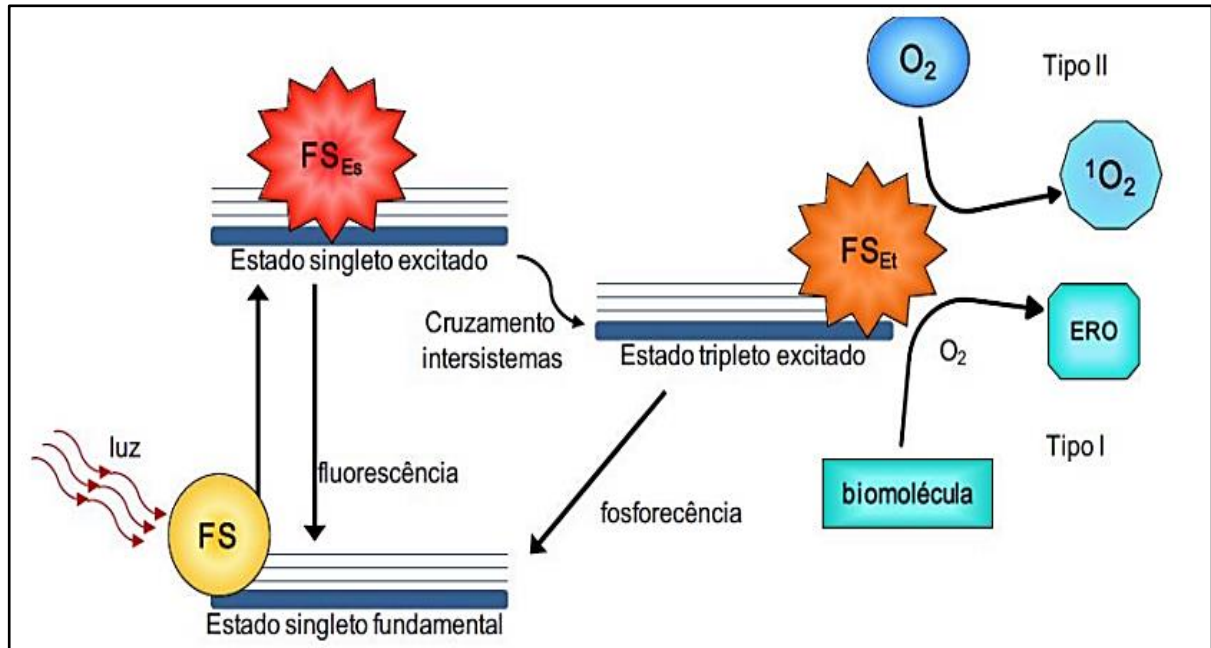
O mecanismo de ação da terapia baseia-se na excitação do FS por meio da exposição a luz levando-o a absorver fótons que o converte de um estado fundamental, chamado singlete, para um estado singlete excitado no qual o FS pode retornar ao estado fundamental pela emissão de um fóton de energia por meio de

processos radioativos (fluorescência) e não-radioativos (relaxações vibracionais) ou pode inverter seu *spin* através do processo de cruzamento intersistemas gerando o estado tripleto excitado. O estado tripleto excitado é capaz de reagir com o oxigênio molecular, que se encontra em seu estado fundamental, dando origem a duas reações denominadas tipo I e tipo II, exemplificadas na figura 5 (MACHADO, 2000; SILVA, 2007; BACELLAR *et al.*, 2018).

Os dois tipos de reações ocasionam um processo de injúria celular que sofre influência da tensão de oxigênio e da concentração do FS para a produção de biomoléculas citotóxicas que oxidam componentes celulares como o DNA, mitocôndrias, lisossomos, membranas celulares e núcleos de células alvo (CID *et al.*, 2016).

Na reação tipo I ocorre a interação do FS, em seu estado tripleto, com a estrutura alvo, devendo ser um substrato biológico suscetível a reações de oxidação ou redução, como a membrana celular, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Essa interação gera uma reação com a transferência de um elétron ou  $H^+$  originando os radicais livres e íons radicais que por sua vez reagem com o oxigênio presente no meio formando ERO, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Já na reação de tipo II, o FS, em estado tripleto excitado, reage diretamente com o oxigênio, em estado tripleto fundamental, transferindo energia a molécula e ocasionando um fenômeno denominado aniquilação tripleto-tripletto que forma o oxigênio singleto extremamente citotóxico e reativo (MACHADO, 2000; DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; KHARKWAL *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011; WEN *et al.*, 2017).

**Figura 5** - Esquema ilustrativo da reação de tipo I e tipo II da TFD



Fonte: Freitas, 2018.

As reações fotooxidativas podem alterar a permeabilidade celular gerando dano ao tecido desencadeando a morte celular por apoptose ou necrose. As reações de tipo I e II dependem de uma série de fatores como a constante dialética do tecido, pH, concentrações de substrato, ambiente fisiológico anóxico ou hipóxico (alta ou baixa quantidade de oxigênio), protocolos de irradiação e o FS utilizado, bem como sua afinidade de ligação com o substrato e a luz. Ambas reações ocorrem simultaneamente, entretanto conforme o oxigênio diminui a reação tipo I prevalece. (MACHADO, 2000; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; KHARKWAL *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011; KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

### 3.6.3 Dano celular gerado pelas ERO

Os radicais livres, como as ERO, normalmente produzidos pelo organismo, são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhado na sua última camada, conferindo-lhe reatividade. A produção endógena provém de diferentes vias como o metabolismo mitocondrial, inflamação, isquemia, atividade física e a via do ácido úrico, além disso fatores externos influenciam suas concentrações que aumentam quando o organismo é exposto a radiação, medicamentos, poluição, fumo entre outros. Se a

quantidade dessas moléculas se torna excessiva gera-se o estresse oxidativo que por consequência resulta na degradação de estruturas biológicas (ABDALLA; LIMA, 2001; KUMAR; PANDEY, 2015; RADI, 2018; GUAN; LAN, 2018).

Segundo Yanovsky *et al.* (2019), quando a célula sofre um dano oxidativo grave desencadeia-se o processo de morte celular com base em uma complexa interação de apoptose, necrose e autofagia, no qual as ERO funcionam de gatilho para a apoptose.

O oxigênio singleto gerado pela TFD interage com biomoléculas de duas formas, uma por meio de reações químicas e a outra pela transferência de energia via supressão física, ambas oxidam biomoléculas como lipídios, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos e moléculas com grupos tióis (SANTOS, 2020).

Mais especificamente, quando as espécies reativas de oxigênio entram em contato com as proteínas elas são capazes de ocasionar modificações nos aminoácidos, quebra da cadeia peptídica, aumento na degradação proteolítica e a inativação de enzimas. Quando em contato com lipídeos pode ocorrer a peroxidação lipídica e alterações na permeabilidade da membrana, já em relação ao DNA, pode acontecer o rompimento das fitas que compõem a molécula, processo de depurinação e despirimidinação ou mutações de bases (SANTOS, 2020).

#### **3.6.4 Fontes de luz**

Caracteriza-se como luz a onda magnética que se comporta como uma partícula, denominada fóton, capaz de interagir com os tecidos por meio de reflexão, refração, transmissão, absorção, espalhamento e fluorescência e de gerar efeitos fotoquímicos de propagação de energia, sendo exemplos o processo de fotossíntese e da TFD. A luz possui quatro aspectos relevantes que a define como volume (distribuição espacial), espectro (responsável pela coloração da luz), intensidade (expressa em Hertz) e a potência em Watts (SOUZA, 2011).

Como descrito anteriormente a luz é um dos três fatores que compõem a TFD, sendo importante para que ocorra o mecanismo de ação da terapia, desta forma é imprescindível que a escolha da fonte de luz seja adequada.

Com base na literatura existente, as fontes de luz capazes de serem utilizadas na aplicação da terapia abrangem os lasers, lâmpadas halógenas de amplo espectro e as luzes emitidas por diodo (*light-emitting diode* - LEDs) que apresentam o melhor

custo benefício, maior facilidade de aplicação, devido ao fato de apresentarem formatos variados, propiciando seu uso em áreas maiores o que a diferencia nesse aspecto do laser (CHEN *et al.*, 2012; SABINO, 2016; ZAGO, 2018).

### 3.6.5 Fotossensibilizadores

Define-se como fotossensibilizadores as substâncias capazes de interagir com luz de modo a ocasionar o efeito fotodinâmico, que compreende a geração de espécies reativas e oxigênio. Os FS são corantes biológicos de uso seguro sendo empregado na medicina a mais de cem anos e capazes de induzir a apoptose em mitocôndrias, necrose em lisossomos e membranas celulares ocasionando desta forma a morte celular (SILVA, 2007; CID *et al.*, 2016; NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019).

Os FS compõem um dos pilares para o sucesso da TFD, desta forma é de extrema importância escolher adequadamente essa substância. Fundamentalmente um bom FS não pode ocasionar citotoxicidade significativa na ausência da luz, devendo ser uma molécula biologicamente estável com absorção de luz dentro do espectro eletromagnético visível, além disso é relevante considerar que a substância fotossensível apresente as seguintes propriedades listadas abaixo (SIMPLICIO *et al.*, 2002; ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; BELLI, 2020).

- Propriedades fotofísicas favoráveis;
- Alto rendimento quântico;
- Adequada farmacocinética;
- Alta solubilidade em sistemas fisiológicos;
- Alta seletividade;
- Tempo longo de vida no estado tripleto, para gerar maior quantidade de oxigênio singleto;
- Baixo fotobranqueamento ou fotodegradação, mantendo a eficiência da TFD;
- Seja de fácil síntese e baixo custo;
- Possua uma hidrossolubilidade considerável para ser transportado pelo organismo.

Segundo Abrahamse e Hamblin (2016), uma vasta gama de moléculas é utilizada como FS para TFD, como por citação os derivados fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina) e tetrapirrólicos (porfirinas e clorinas). Além disso, de acordo com

Muniz (2018) a utilização da curcumina como FS tem sido eficaz quando empregada para terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa).

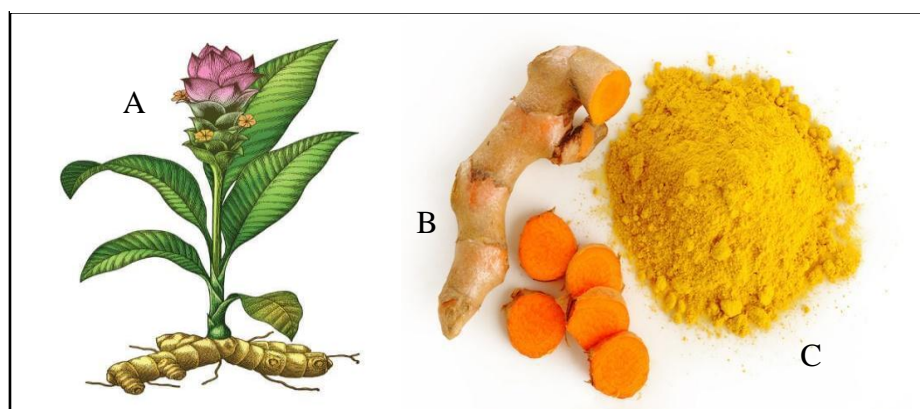
### 3.7 Curcumina

Desde a Pré-História, diversas populações utilizavam partes dos vegetais para fins medicinais, seja na diminuição da dor ou no tratamento de doenças. Os estudos acerca dos mecanismos de ação de compostos naturais, com o objetivo de aliá-los a medicina, tem contribuído para a ampliação do conhecimento sobre a utilização farmacológica dos princípios ativos de origem vegetal, colaborando para que os produtos naturais se destaquem na área de desenvolvimento de fármacos (LAMEIRA; PINTO, 2008; GOEL *et al.*, 2008).

De acordo com Elavarasu *et al.* (2016), as plantas com propriedades medicinais têm sido empregadas no tratamento de inúmeras doenças, sendo a cúrcuma um produto natural com relevante valor medicinal.

Comumente conhecida no Brasil pelos termos cúrcuma ou açafrão da terra, é uma planta de origem asiática que possui em seu rizoma um composto polifenólico natural, denominado curcumina, ilustrado na figura 6 (RAI *et al.*, 2008).

**Figura 6** - Cúrcuma (A), rizoma da cúrcuma (B) e curcumina em pó (C)



Fonte: Adaptado de Google imagens, 2021.

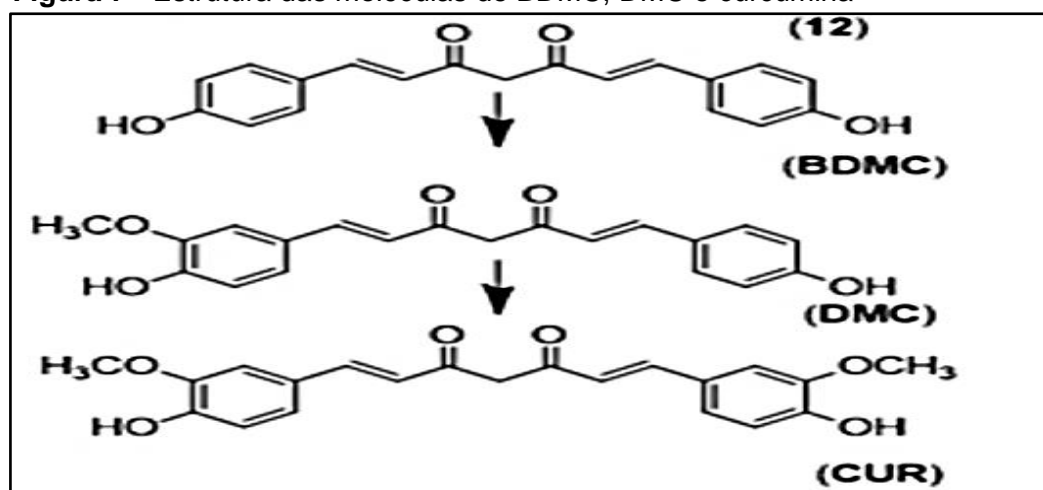
A curcumina é um pigmento amarelo-alaranjado presente no rizoma da planta *Cúrcuma Longa*, geralmente é utilizada como tempero na culinária asiática; para fins medicinais na China; na área de cosmética e como suplemento fitoterápico devido às suas propriedades como ação anti-inflamatória, antifúngica, anticarcinogênica, antioxidante, antibacteriana, imunostimulante, antiviral, antiespasmódica,

hepatoprotetora, antialérgica, anticoagulante, antifertilidade, antidiabético, antiprotozoário, antifibrótico, antivenenoso, antiulceroso, cicatrizante, hipotensivo e hipocolesterolêmica. O pigmento apresenta também efeito benéfico no tratamento de doenças respiratórias, como asma e bronquite, e em outros transtornos como anorexia, doenças hepáticas e sinusite (PINTO, 2013; CARNEIRO, 2014; BATISTA; CATAO, 2019).

Existem três compostos principais, os curcuminóides, são eles o diferucilmetano, desmetoxicurcumina (DMC), e bisdemetoxicurcumina (BDMC), sendo os dois últimos os intermediários biossintéticos da curcumina. As estruturas desses compostos podem ser visualizadas na figura 7 (NAGPAL; SOOD, 2013; NAGASRI *et al.*, 2015; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

A estrutura química da curcumina confere à molécula uma forte insolubilidade em água, em pH ácido e neutro, sendo solúvel em metanol, acetona e dimetilsufóxido (DMSO). Atualmente a curcumina presente no mercado é composta de 75 a 80% de curcumina, 15 a 20% de DMC e 3 a 5% de BDMC (AHMED; GILANI, 2014; GHOSH; BANERJEE; SIL, 2015).

**Figura 7** - Estrutura das moléculas de BDMC, DMC e curcumina



Fonte: Adaptado de SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015.

Dentre as propriedades medicinais da curcumina, algumas delas podem ser potencializadas com a exposição a luz, demonstrando que este composto se configura como um bom FS, apresentando absorção máxima de luz no espectro visível do azul em 430 nm, sendo destacado sua ação antimicrobiana como fator em potencial para terapia fotodinâmica antimicrobiana (PRIYADARSINI, 2009; PINTO, 2013; BERND, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017; SANTEZI; REINA; DOVIGO, 2018).

Um estudo realizado por Tonon *et al.* (2015), o potencial da curcumina como FS na TFDa contra cepas de *Streptococcus mutans*, em modelos de suspensão planctônica, obteve como resultado a redução bacteriana de 70% quando comparada aos grupos controles (sem irradiação com curcumina e com irradiação sem curcumina), demonstrando que a TFD utilizando a curcumina como FS, na luz azul, exerce efeito antibacteriano significativo.

Uma pesquisa conduzida por Donato *et al.* (2017), comparou a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana da curcumina com o FS Photogem<sup>®</sup>, em cavidade bucal. No estudo coletou-se uma amostra de saliva de um grupo controle (sem uso dos FS), de um grupo com uso de curcumina e um grupo com aplicação do Photogem<sup>®</sup> para realizar a contagem de unidades formadoras de colônia após 24 horas do tratamento, com base nos resultados o autor conclui que a curcumina apresentou uma eficácia significativamente superior ao Photogem<sup>®</sup> em seus experimentos.

### **3.8 Terapia fotodinâmica x antibioticoterapia**

Segundo Piñeiro *et al.* (2019), caracteriza-se como antibioticoterapia todo tratamento realizado com antimicrobianos designado a indivíduos que possuam sintomas característicos de infecção com a finalidade de proporcionar a cura clínica, eliminando uma doença infecciosa, ou de combater um agente patogênico de um determinado foco infeccioso (cura microbiológica).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) a resistência antimicrobiana ocorre de forma natural com o passar dos anos, entretanto o uso indiscriminado de antibióticos está acelerando esse processo. Os antibióticos são substâncias naturais ou sintéticas que apresentam a função de inibir ou eliminar células bacterianas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Os fármacos com função antibiótica são utilizados para tratar além de infecções bacterianas as enfermidades geradas por vírus, fungos, protozoários e parasitas, entretanto por mais benefícios que possam apresentar é importante ressaltar que essas substâncias, além de apresentar a preocupante problemática da resistência bacteriana possui efeitos colaterais (GUAN; LAN, 2018).

Dentre os efeitos colaterais que o uso de algumas classes de antibióticos, como a quinolonas, acarreta ao paciente náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal,

dispepsia, gases, erupções cutâneas, cefaléia, tonturas e até convulsões. Além disso, outro fármaco, a polimixina, pode causar efeitos mais severos como neurotoxicidade e nefrotoxicidade, fatores que limitam seu uso (SANTOS *et al.*, 2019; SANTIAGO, 2019).

Além dos efeitos adversos causados pelos antibióticos, a resistência bacteriana merece atenção, uma vez que a produção desses fármacos demanda um longo período de tempo e milhões de dólares para estar disponível no mercado, ressaltando que mesmo os melhores esforços são lentos em comparação ao crescimento de cepas multirresistentes (SOARES; GARCIA, 2018).

Em comparação, o mecanismo de ação da TFD promove a formação de moléculas altamente reativas, ERO, as quais sua reatividade com as moléculas orgânicas caracteriza-se como inespecífica, tornando qualquer macromolécula da célula um alvo em potencial para ação fotodinâmica. Desta maneira a grande variedade de alvos celulares dificulta o desenvolvimento de resistência a TFD, sendo esse fator uma de suas maiores vantagens (AMARAL *et al.*, 2010).

Segundo Cassidy *et al.* (2010), a morte ocasionada por sítios não específicos torna incapaz o desenvolvimento de resistência a TFD por parte dos microrganismos. Em complemento os aspectos como a alta reatividade e o curto período de meia-vida das ERO, dificultam a expressão de mecanismos de proteção bacteriana (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; AKLOV *et al.*, 2006).

## 4 JUSTIFICATIVA

Atualmente, estima-se que 99% das bactérias presentes na natureza encontram-se em agregados de biofilme e que a maior parcela das doenças infecciosas está associada com o desenvolvimento dessas comunidades sésseis (FRÉDÉRIC; MICHEL; SELENA, 2018).

Segundo Moormeier e Bayles (2017), no decorrer dos anos os estudos sobre biofilmes bacterianos, formados por patógenos humanos, assumiu-se como um fator de extrema relevância para a saúde pública em decorrência da sua resistência contra o sistema imunológico do hospedeiro e de substâncias antibióticas.

A resistência aos antibióticos afeta aproximadamente meio milhão de indivíduos com infecções bacterianas que provém de cepas multirresistentes, esse fato dificulta o tratamento e a cura do paciente (LOUREIRO *et al.*, 2016; COSTA; JÚNIOR, 2017; OPAS, 2018).

Além do impacto social é incontestável as consequências econômicas, um estudo realizado em uma UTI brasileira revelou que o valor médio da permanência de um paciente com IRAS em tratamento com antibiótico é de cerca de US\$1.514,79 (LARA *et al.*, 2017).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS), disponibilizou uma lista de agentes patogênicos que necessitam rapidamente de novos tratamentos, dentre as bactérias listadas, destaca-se *S. aureus*, ocupando a classificação de prioridade alta, apresentando resistência a metilina com sensibilidade intermediária e resistente à vancomicina.

Em decorrência desse cenário a busca por métodos terapêuticos alternativos para o tratamento antimicrobiano torna-se essencial, visto que com o avanço no crescimento de cepas multirresistentes pode ocorrer o esgotamento das ações terapêuticas existentes. O biofilme é considerado um mecanismo de resistência que dificulta a erradicação das cepas bacterianas, desta forma a pesquisa sobre o potencial antimicrobiano e antibiofilme da TFD, com a utilização da curcumina como FS, caracteriza-se como um caminho promissor a ser seguido, visto que, segundo Rancan (2017) a curcumina apresenta atividade antibiofilme quando associada a terapia.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção e manutenção das cepas

A cepa clínica de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, amostra nasal (PBNS02SA), utilizada para os experimentos foi doada pelo Laboratório Oswaldo Cruz de São José dos Campos que possui parceria com o Laboratório de Fotobiologia aplicada à Saúde da Universidade do Vale do Paraíba desde outubro de 2015.

Após a obtenção a cepa foi repicada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubada em estufa durante 24 horas a 37°C. Ao término do período de incubação, as amostras foram acondicionadas em freezer a -4°C em suspensão de caldo BHI contendo 5% de glicerol.

### 5.2 Preparo do fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado para os experimentos foi a curcumina da (PDT Pharma - Cravinhos - SP). O preparo da curcumina iniciou-se com a pesagem, na ausência de luz, de 50 mg do FS, diluído em um Becker com 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), em ambiente estéril. Após esse procedimento adicionou-se 9 mL de álcool etílico 99% e filtrou o FS, formando a solução de estoque com a concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Para formar a concentração de trabalho estabelecida diluiu-se a solução de estoque em PBS.

### 5.3 Formação do biofilme

Para a formação do biofilme utilizou-se *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina de cepa nasal, foi adicionado caldo BHI em um tubo contendo a bactéria, com posterior incubação na estufa durante 24 horas a aproximadamente 37° C.

Após a incubação, o tubo foi centrifugado a 6000 rpm, ou 2822,4 rcf, durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado no final do processo e adicionou-se 3 mL de PBS com posterior homogeneização no vortex. Repetiu-se o processo de centrifugação, a 3500 rpm, ou 2200 rcf, por 15 minutos e submissão ao vortex e após a homogeneização foi padronizado a amostra em 10<sup>8</sup> células/mL no Espectrofotômetro Varian Cary 50 Bio UV-VIS.

Em seguida a padronização, em uma placa de poços, foi acrescentado 225  $\mu\text{L}$  da bactéria em 2 mL caldo BHI, logo após incubou-se a placa durante 24 horas em uma estufa a 37°C.

Ao término da incubação, o caldo BHI presente na placa foi descartado e foi adicionado 1 mL PBS, o qual foi retirado com o auxílio da pipeta para remover as células fracamente aderidas. O processo foi repetido e no final adicionou-se 2 mL de caldo BHI na placa e a incubou por mais 24 horas.

#### 5.4 Grupos experimentais

Os grupos experimentais utilizados estão exemplificados na tabela 1 e são divididos em grupo controle escuro formado por amostras sem irradiação e sem adição do fotossensibilizador, as amostras FS com adição de curcumina e sem irradiação. E o grupo irradiado que compreende as amostras LED, com adição de solução tampão fosfato-salina (PBS) e as amostras TFD com o fotossensibilizador.

**Tabela 1 - Grupos Experimentais.**

		Divisão dos grupos experimentais			
		Irradiação		Adição de curcumina	
		Sim	Não	Sim	Não
<b>Grupo escuro</b>	Controle escuro		x		x
	FS		x	x	
<b>Grupo Irradiado</b>	LED	x			x
	TFD	x		x	

#### 5.5 Internalização da curcumina pelas células de *S. aureus* por Microscopia Confocal

Para avaliar a internalização do fotossensibilizador pelas células bacterianas, formou-se o biofilme, em lamínulas circulares, conforme o protocolo descrito em 5.3. Após a formação adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de curcumina na concentração de 80  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  com posterior incubação de 20 minutos a 37°C, as amostras não foram submetidas a irradiação.

Ao final do período de incubação, retirou-se a curcumina e adicionou-se 300 µL de paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. Ao término do tempo, o paraformaldeído foi removido e ocorreu a montagem da lâmina.

Para montagem da lâmina utilizou-se uma gota de Entellan® (Merck) para cada lâmina de amostra, todo o procedimento foi realizado na ausência de luz e as amostras foram examinadas em microscópio Confocal LSM 700 Zeiss, com excitação em 405 nm.

## **5.6 Aplicação da terapia fotodinâmica**

Para a aplicação da terapia o caldo presente na placa de poços foi descartado e em seguida foi adicionado o FS na concentração de trabalho de 80 µg.mL<sup>-1</sup>. Após esse processo incubou-se o FS durante 20 minutos, em estufa, ao esgotar o tempo aplicou-se o protocolo da TFD, com a luz LED em comprimento de onda de 450 nm, densidade de potência de 110 mW/cm<sup>2</sup> e dose de 50 J/cm<sup>2</sup>.

## **5.7 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia**

Após a aplicação da terapia, o biofilme foi desprendido por meio de ação mecânica, com auxílio de alças descartáveis, e em seguida realizou-se a diluição seriada em placa de 96 poços. Posteriormente a este processo, a diluição foi plaqueada em técnica de gota em placas de petri com meio ágar BHI e incubado em estufa, durante 24 horas, para posterior contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

## **5.8 Avaliação da atividade metabólica pelo teste de Resazurin**

Para a aplicação do teste avaliação da atividade metabólica utilizou-se o corante resazurin, preparado na ausência da luz, sendo diluído a 0,66%, em seguida a solução foi homogeneizada, filtrada e armazenada em ambiente refrigerado sem exposição à luz.

Após a aplicação da TFD, o caldo BHI presente na placa foi removido e adicionou-se 100 µL de PBS e 2 µL do reagente resazurin (Sigma), posteriormente

incubou-se em estufa durante 4 horas para a leitura dos resultados, em espectroscopia de fluorescência, realizada no leitor de microplacas por multidetecção da marca Synergy™, na excitação 528/20nm e emissão 645/40nm.

Outra leitura realizada para o resultado desse experimento é a leitura visual que se baseia na alteração da coloração azul original do corante resazurin para a cor rosa, proveniente da reação química de oxirredução do resazurin em resorfurina.

## **5.9 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), fixou-se a amostra em 2 mL de uma solução composta de paraformaldeído a 4% (Dinâmica), glutaraldeído a 2,5% (Dinâmica), tampão cacodilato a 0,1 mM (Electron Microscopy Sciences), cloreto de cálcio a 1 mM e H<sub>2</sub>O de osmose reversa durante 1 hora, com posterior processo de desidratação realizado com a adição de 1 mL de solução crescente de álcool (10, 25, 50, 75 e 90%) durante 20 minutos e 1 hora com álcool absoluto. Em seguida as placas foram submetidas a um processo de secagem em estufa a 37°C durante 24 horas.

Após a secagem completa, as amostras foram metalizadas e levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura, MEV EVO MA 10 Acoplado EDX, da Central de Laboratórios Multiusuário no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba para obtenção das fotomicrografias.

## **5.10 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio**

A produção de espécies reativas de oxigênio foi determinada utilizando a sonda reagente 2,7 diacetato de diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA - Thermo Fisher Scientific), diluído em PBS estéril a partir de uma solução estoque de 1,5 mM de DCFH<sub>2</sub>-DA até uma concentração de trabalho de 20 µM.

O biofilme foi incubado com a curcumina durante 20 minutos com posterior lavagem com PBS. Após esse processo adicionou-se as amostras 100 µL do reagente DCFH<sub>2</sub>-DA, e as amostras foram incubadas durante 30 minutos à 37°C. Em seguida prosseguiu-se com a irradiação. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao leitor de microplacas por multidetecção (Synergy™) para leitura dos resultados com excitação a 485 nm e emissão a 530 nm.

### **5.11 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos ANOVA One Way, tukey, por meio do software Bioestat 5.0 considerando valor de  $p < 0,01$ .

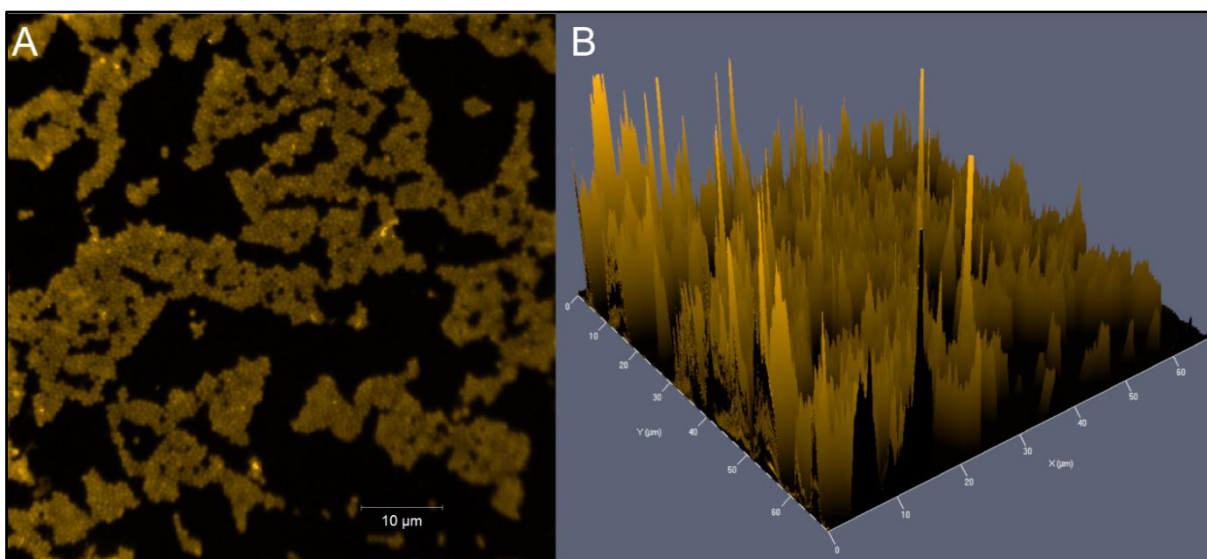
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Análise da internalização do fotossensibilizador por microscopia confocal

A figura 8 representa as imagens obtidas por meio da microscopia confocal de biofilme de cepa MRSA, com o objetivo de avaliar a internalização da curcumina na célula bacteriana.

Por meio das imagens, nota-se que a cepa MRSA internalizou o FS, sendo possível observar a fluorescência emitida pela curcumina, associada à morfologia de arranjos em cocos, característico dos *Staphylococcus*, confirmando assim a interação entre a curcumina e a célula bacteriana.

**Figura 8** - Imagens de Microscopia Confocal de biofilme de MRSA, com incubação de curcumina no escuro, onde (A) apresenta a internalização da curcumina pela célula bacteriana e (B) apresenta a intensidade da fluorescência com imagem em 2,5 D.

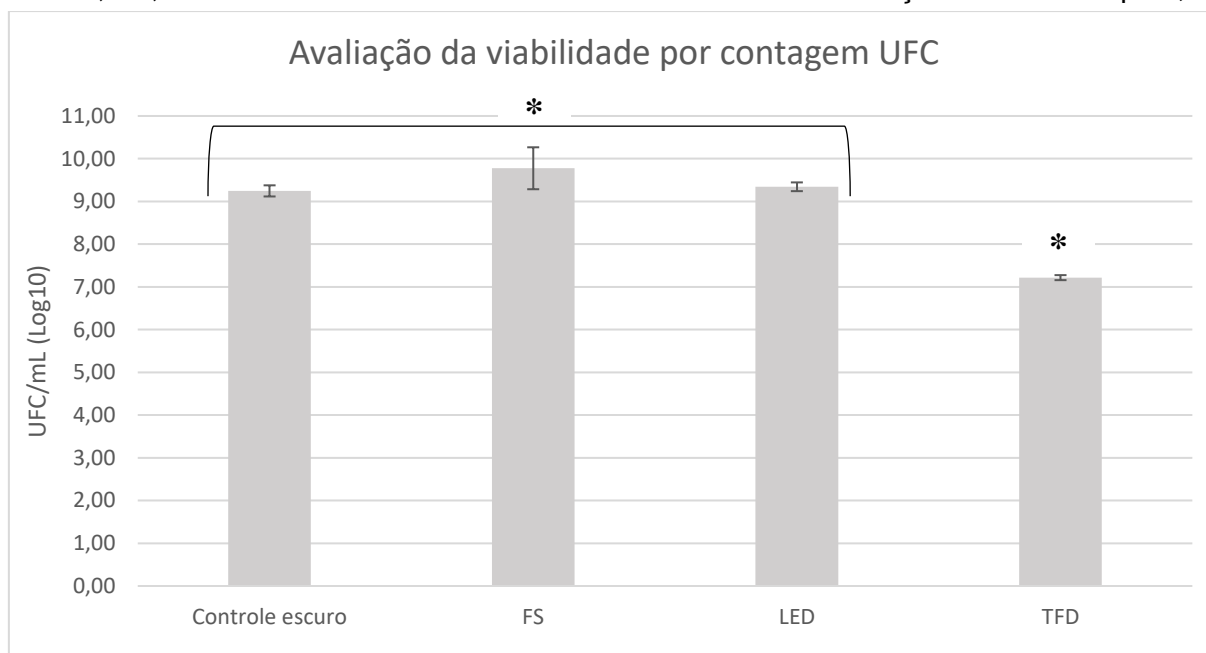


Fonte: Próprio autor.

### 6.2 Avaliação do crescimento bacteriano após aplicação da Terapia Fotodinâmica

A figura 9 representa as médias dos valores em número de unidades formadoras de colônias apresentadas em  $\log_{10}$ , dos grupos controle escuro, FS, LED e o grupo TFD, com aplicação da terapia.

**Figura 9** - Valores médios de UFC/mL para cepa MRSA, constando os grupos Controle escuro, FS, LED e TFD. Sendo os símbolos \* identificando a diferença estatística de  $p \leq 0,01$



Fonte: Próprio autor.

Com base na análise dos resultados estatísticos, foi possível observar que o grupo FS, com concentração de  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , não apresentou diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle escuro, demonstrando que o fotossensibilizador utilizado não causou citotoxicidade nas células bacterianas.

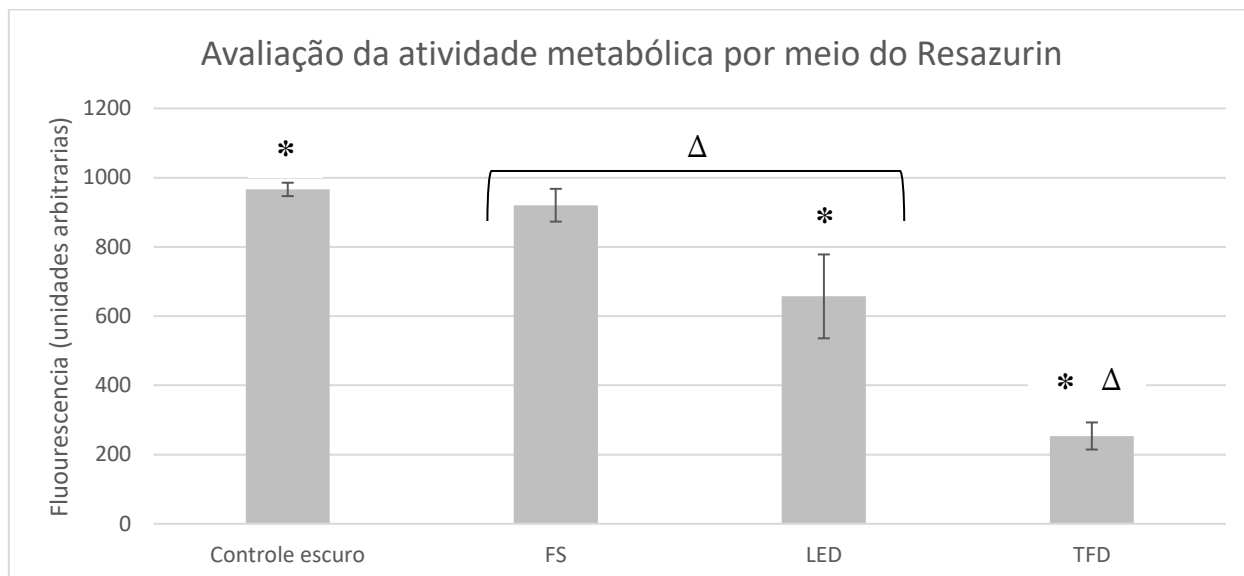
No grupo LED, em  $50 \text{ J/cm}^2$ , também não foi observada redução significativa quando comparado ao grupo controle escuro e ao grupo FS, evidenciando que a fluência de luz e a densidade de potência utilizadas não são citotóxicas.

Analisando os resultados do grupo TFD, quando comparado aos demais grupos, houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) de UFC com os demais grupos, indicando que a TFD aplicada nos parâmetros testados foi capaz de reduzir a viabilidade bacteriana. Os dados podem ser observados na figura 9.

### 6.3 Avaliação da atividade metabólica com Resazurin

Os resultados da avaliação da atividade metabólica bacteriana pela oxirredução do corante resazurin estão representados por valores de fluorescência que se encontram na figura 10 e por meio de leitura visual esquematizada na figura 11.

**Figura 10** - Atividade metabólica por metabolização do resazurin em fluorescência, sendo os símbolos \* e  $\Delta$  equivalentes a  $p \leq 0,01$ , representando a diferença estatística entre os grupos



Fonte: Próprio autor.

Com base na análise estatística, foi possível perceber que não houve diferença significativa na atividade metabólica entre os grupos controle escuro e FS. Comparando o grupo controle escuro aos grupos LED e TFD, notou-se a redução significativa ( $p < 0,01$ ) da atividade metabólica.

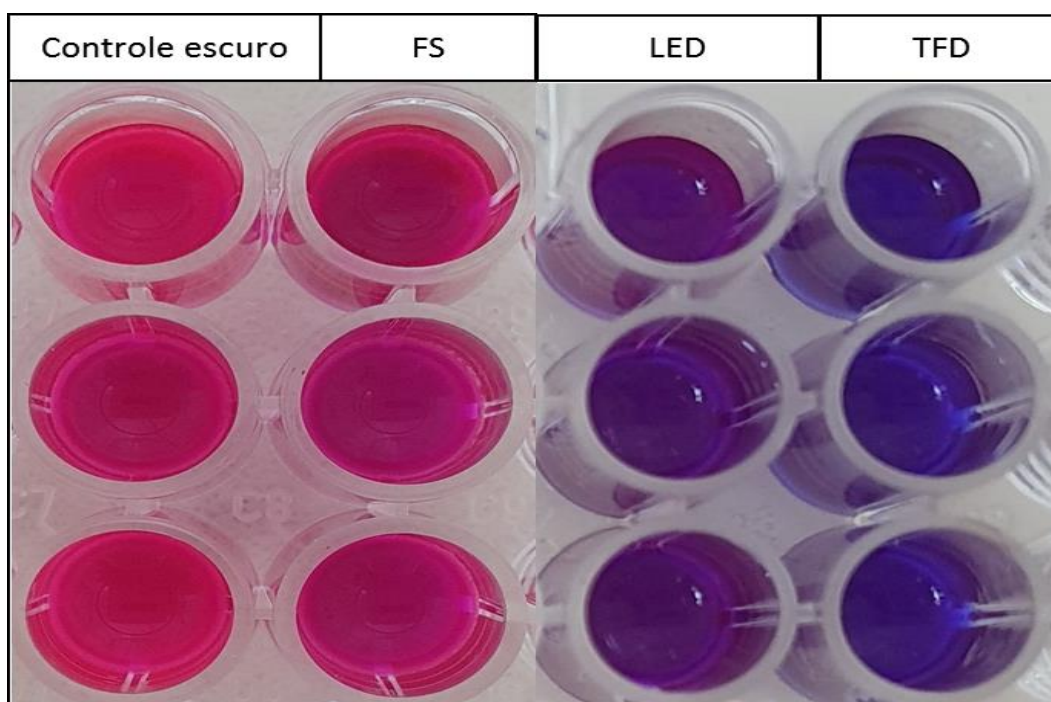
Ao analisar os resultados apresentados na figura 10, é possível observar que o grupo TFD, comparado aos demais grupos, apresentou diferença significativa ( $p < 0,01$ ), indicando redução da atividade metabólica bacteriana após a aplicação da TFD.

O grupo LED também apresentou diferença significativa ao ser comparado com o grupo controle escuro e FS, demonstrando a influência da luz na atividade metabólica bacteriana, visto a diminuição da fluorescência.

Ao analisar visualmente os grupos experimentais, não irradiados (controle escuro e FS), observou-se a ocorrência de alteração da cor do corante resazurin de azul para rosa, indicando presença de células viáveis. Já em relação aos grupos irradiados em  $50 \text{ J/cm}^2$  (LED e TFD), notou-se que ambos foram capazes de reduzir a metabolização do corante pelas células bacterianas, principalmente o grupo LED que manteve a coloração mais próxima à original do resazurin, indicando ausência e/ou diminuição da quantidade de células viáveis.

Já o grupo LED apesar de apresentar redução na metabolização, sua coloração diferiu-se mais quando comparada ao grupo TFD, tornando-se mais arroxeada. Em comparação, os grupos sem irradiação alteraram nitidamente a coloração do corante evidenciando a cor rosa resultante da metabolização do resazurin, esquematizada na figura 11.

**Figura 11** - Leitura visual da metabolização do corante resazurin, identificada pela alteração da coloração original azul do corante para coloração rosa proveniente da metabolização do corante



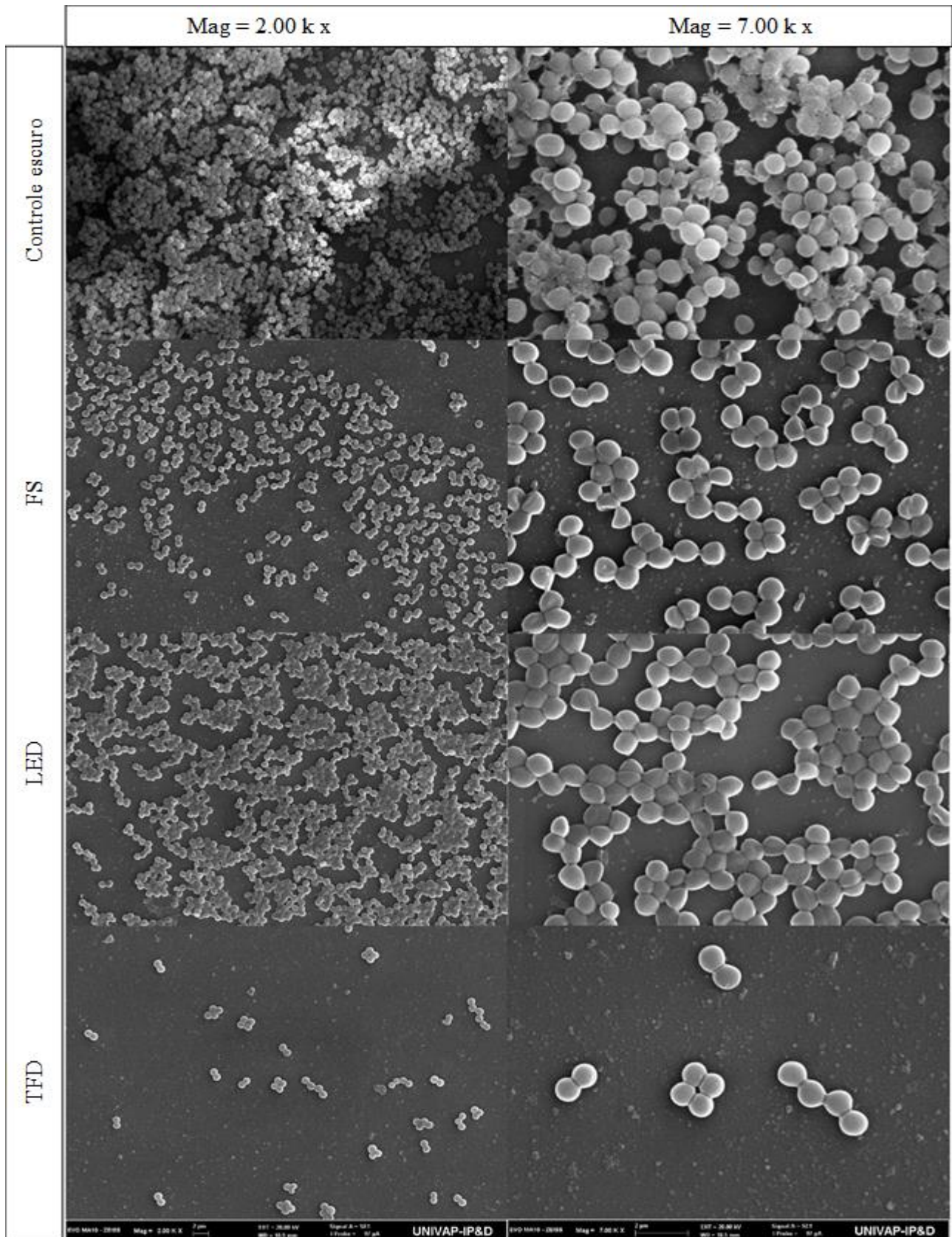
Fonte: Próprio autor.

#### 6.4 Análise da morfologia bacteriana por Microscopia Eletrônica de Varredura

A figura 12 apresenta as micrografias obtidas por MEV dos grupos experimentais, onde é possível observar a formação de biofilme, caracterizado pela presença de matriz de polímeros extracelulares presente no controle escuro. Observou-se a alteração do biofilme após a TFD, corroborando com os resultados da redução de viabilidade bacteriana e da atividade metabólica.

Evidenciou-se que a luz e o FS, quando isolados, não alteraram a morfologia bacteriana apresentando ausência de citotoxicidade, também observada na contagem de UFC. Além disso, por meio das micrografias, demonstra-se que a TFD é capaz de afetar o biofilme de cepa MRSA, levando a redução bacteriana.

**Figura 12** - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de biofilme de cepa MRSA, dos grupos Controle escuro, FS, LED e TFD.



Fonte: Próprio autor.

## 6.5 Análise da produção de Espécies reativas de oxigênio

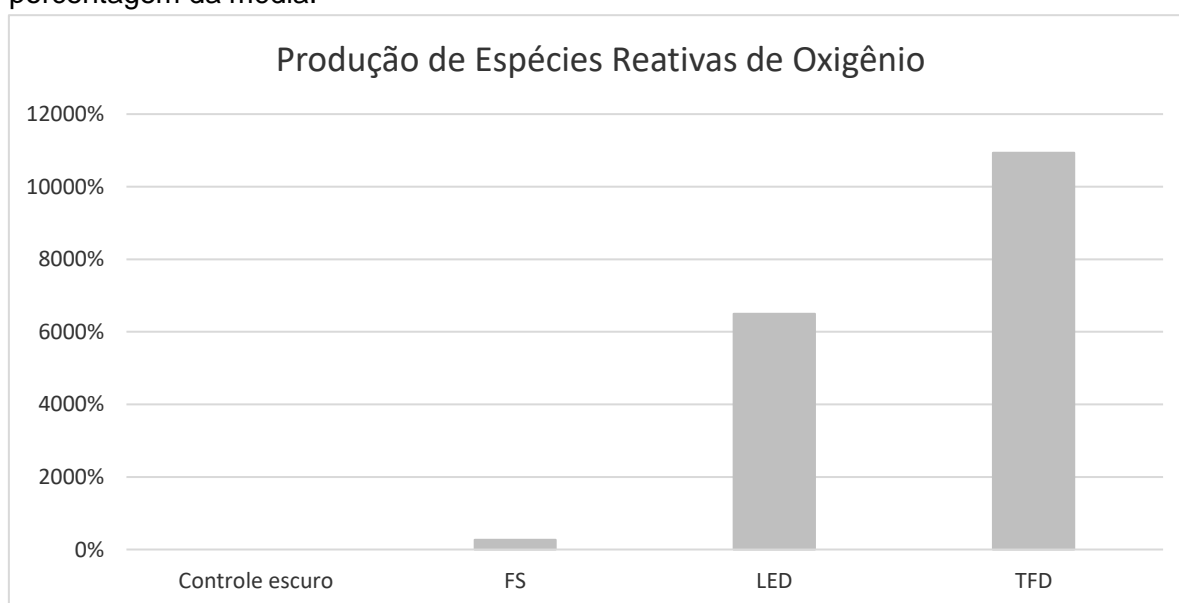
A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio após a TFD nos parâmetros estabelecidos pode ser observada na figura 13. Os valores em porcentagem foram realizados adotando o valor do grupo controle escuro como 100%, para os demais grupos os valores foram definidos por meio da técnica matemática regra de três simples.

Observa-se que a TFD proporcionou aumento na quantidade de ERO, quando comparou-se o grupo TFD com o grupo controle foi possível notar um aumento de 10.933% de fluorescência, apresentando diferença significativa ( $p < 0,01$ ). Já ao comparar o grupo FS e LED com o grupo controle, notou-se um aumento de 267% e 6500%, respectivamente, demonstrando diferença significativa para ambos os grupos.

Ao avaliar os resultados do grupo LED e FS em relação ao grupo TFD, observa-se que o grupo TFD exibe diferença significativa com aumento de 168,2% em comparação ao LED e 4.094,75% em relação ao FS.

Em relação ao aumento na produção de ERO pelo grupo LED observado quando comparado aos grupos controle escuro e PS, esse fato pode ser atribuído ao efeito da luz azul, altamente energética, que pode causar maior formação de ERO, se comparada a outros comprimentos de onda.

**Figura 13** - Produção de espécies reativas de oxigênio após aplicação da terapia, dado em porcentagem da média.



Fonte: Próprio autor.

## 7 DISCUSSÃO

No atual cenário de resistência bacteriana aos fármacos existentes, a terapia fotodinâmica apresenta-se como uma opção promissora que vem demonstrando ser eficaz no controle microbiológico por promover a morte de microrganismos (PRAZMO *et al.*, 2016; CAFACE, 2020).

Os biofilmes bacterianos apresentam, de acordo com Saxena *et al.* (2019), um aumento na resistência aos antibióticos de até 1.000 vezes comparando com as bactérias planctônicas. Em complemento, o biofilme apresenta um mecanismo capaz de modificar a expressão genética levando a produção de bombas de efluxo para antibióticos que age contra o agente bactericida fazendo com que a célula bacteriana devolva o fármaco para o meio extracelular impedindo o mesmo de realizar sua função (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

Diferentemente do problema que o biofilme pode acarretar com efluxo de fármacos, como dito anteriormente por Alav *et al.* (2018), impedindo o acúmulo dos mesmos no meio intracelular bacteriano, por meio da Microscopia Confocal foi possível perceber que a curcumina não apresenta essa desvantagem visto que a mesma consegue ser internalizada pelas células bacterianas.

O estudo de Júnior (2019) avaliou as propriedades de curcumina em diferentes soluções aquosa referente ao processo de internalização dessas moléculas tanto em bactérias de cultura planctônicas quanto de biofilme. O autor utilizou *S. aureus*, dentre outras bactérias gram-positivas e gram-negativas. Segundo seus resultados, o tempo que a curcumina leva para internalizar na célula bacteriana planctônica é menor que em células em agregados de biofilme, entretanto em ambas culturas bacterianas a curcumina consegue ser internalizada pelo *S. aureus*. O estudo ressalta que a partir de seus resultados a curcumina pode ser eliminada de forma eficiente pelo organismo, sendo um fator importante para a substância ser considerada um bom FS.

Ainda de acordo com Junior (2019), uma dose de luz de 9 J/cm<sup>2</sup> ocasiona danos irreversíveis a parede celular bacteriana induzindo a maior internalização de curcumina ativada pela luz, que segundo o autor aumenta a quantidade de curcumina no interior das células de forma a gerar mais espécies reativas de oxigênio causando uma inativação mais eficiente de biofilmes. Visto que o presente estudo utiliza dose de 50 J/cm<sup>2</sup>, acredita-se que evidenciando a internalização da curcumina pelas células bacterianas por meio dos resultados das imagens de microscopia confocal esse fato

pode ter ocorrido.

Neste estudo, a aplicação da terapia fotodinâmica em  $50 \text{ J/cm}^2$  com a curcumina como fotossensibilizador em concentração de  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foi capaz de inibir o crescimento, em média de 2,03 logs do biofilme de cepa MRSA.

Em relação a redução em Log obtidas pela avaliação do crescimento bacteriano após a terapia contidas no presente estudo, ao comparar com os resultados de Penha *et al.*, (2017), que também avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica mediada pela curcumina contra cepas de *S. aureus*, nota-se que a redução encontrada de 3,5 Logs sobressai a obtida neste estudo. Associa-se esse fato a diferença na fluência, onde os autores utilizaram fluências de 139, 278 e  $417 \text{ J/cm}^2$ , ocorrendo na última fluência a erradicação das células bacterianas. Essa erradicação pode estar associada não só ao efeito fotodinâmico da terapia, mas também ao efeito térmico, devido à alta fluência e ao fato da luz azul ser muito energética, visto o tempo de irradiação de 10, 20 e 30 minutos respectivo de cada fluência.

Entretanto, o estudo de Penha *et al.* (2017) foi realizado em cultura de células planctônicas, já o presente estudo utiliza células bacterianas em agregados de biofilme, podendo esse fator influenciar na redução em Log após aplicação da TFD, visto que quando em biofilme as bactérias são mais resistentes. Contudo, por mais que os protocolos sejam diferentes, o estudo realizado por Penha *et al.* (2017) reforça a susceptibilidade das cepas de *S. aureus* a terapia fotodinâmica com curcumina.

Em comparação, um estudo conduzido por Sampaio *et al.* (2016) em cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, avaliou o efeito da TFDa utilizando parâmetros semelhantes ao deste estudo, com a luz azul e a curcumina, em cinco concentrações diferentes. O estudo demonstrou que a maior redução bacteriana, de 81%, ocorreu na concentração de  $75 \mu\text{g/ml}$  com fluência de  $50 \text{ J/cm}^2$ , entretanto o método de análise diferiu, sendo utilizado a leitura de absorvância ao invés de contagem de unidade formadora de colônia, de qualquer forma os resultados encontrados no estudo de Sampaio corroboram com os deste estudo e com parâmetros de irradiação estabelecidos.

Já uma pesquisa mais recente, realizada por Freitas *et al.* (2019), em cepas de *S. aureus* sensível à metilicina (MSSA) e MRSA, avaliou *in vitro* o potencial da curcumina como FS na TFDa. O estudo obteve resultados promissores, os quais demonstraram que a TFDa com curcumina é capaz de reduzir o crescimento das cepas MSSA e MRSA, não tendo sua eficácia afetada pelo padrão de resistência da

bactéria.

O padrão de redução do crescimento de cepa MRSA encontrado por Freitas *et al.*, (2019) após a aplicação da terapia fotodinâmica mediada pela curcumina pode ser fortalecido pelos resultados obtidos no presente estudo com o experimento de metabolização de resazurin, aplicado com a finalidade de quantificar a viabilidade celular do biofilme, sendo um indicador de atividade metabólica.

A avaliação da atividade bacteriana por metabolização do resazurin, um corante indicador de oxidorredução é capaz de identificar alterações no pH do meio proveniente do crescimento bacteriano, por meio da conversão pela ação de enzimas microbianas do resazurin em resorfurina, a qual emite fluorescência, desta forma é um parâmetro relacionado a viabilidade celular (SANDEBERG *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2021).

Com base nos resultados encontrados, foi possível constatar que por meio da leitura visual e de fluorescência que o grupo Controle escuro, quando comparado ao grupo TFD, apresentou nítida alteração da cor resultante da metabolização do corante resazurin. O grupo TFD se manteve próxima a coloração original azul, indicando a eficácia da terapia mediada pela curcumina frente ao biofilme de cepa MRSA, também identificada pela contagem de UFC e visualizada nas micrografias eletrônicas realizadas pela microscopia eletrônica de varredura.

Ao analisar o resultado da metabolização do resazurin, notou-se que o grupo LED apresentou redução significativa do metabolismo bacteriano quando comparado ao grupo Controle escuro, esse fato pode estar associado a influência da luz na atividade bacteriana, sendo esse achado fortalecido pelo estudo de Rupel *et al.* (2019), o qual demonstrou o efeito antibacteriano apresentado pela luz azul, ao aplicá-la em cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, observando a inibição do crescimento bacteriano mesmo sem a adição de substâncias fotossensíveis.

Ao mesmo tempo em que a avaliação de metabolização do corante resazurin indicou o efeito antibacteriano da luz azul, a avaliação de viabilidade por contagem de UFC não apresentou essa diferença entre o grupo LED e Controle escuro. Associa-se esse fato ao baixo potencial de penetração da luz azul que inibe parcialmente e transitoriamente o crescimento bacteriano. Além disso, é descrito na literatura que a eficácia da luz azul em cepa MRSA depende da densidade bacteriana (RUPEL *et al.*, 2019).

Levando em consideração que os experimentos possuem tempos de leitura de

resultados diferentes, sendo o resazurin em 4 horas e a contagem de UFC em 24 horas, supõe-se que o efeito antibacteriano da luz azul seja mais evidente na metabolização do resazurin do que na contagem de UFC, visto que o efeito de redução do crescimento pode ter sido transitório no grupo LED.

O estudo de Galo *et al.* (2020) corrobora para a suposição de diferença na redução bacteriana encontrada nos experimentos deste estudo, visto que o autor ao empregar a luz LED azul, em  $54,32 \text{ J/cm}^2$ , em culturas de *S. aureus* demonstrou que baixas fluências de luz LED azul não é suficiente para ocasionar supressão eficaz em *S. aureus*, sendo possível que as colônias afetadas sejam capazes de se adaptar e continuar sua proliferação, fato que pode ter ocorrido na contagem de UFC devido ao maior tempo para leitura do resultado.

Em concordância com estudo Freitas *et al.* (2019), que revelou que TFDa foi capaz de modificar o padrão de adesão bacteriana evitando a formação de biofilmes, em ambiente experimental, as micrografias eletrônicas obtidas pela microscopia eletrônica de varredura, fortalecem a evidência apresentada pelos autores por demonstrar por meio de imagens a nítida atividade antibiofilme da TFD mediada pela curcumina frente ao biofilme, que caracteriza-se pela redução das células bacterianas e desaparecimento da matriz de polímeros extracelular.

Sabe-se que a produção de ERO é um fator determinante para eficácia da TFD, as ERO geradas nos meios intracelular e extracelular são capazes de reduzir biofilme bacteriano, demonstrando uma vantagem da TFD em comparação aos tratamentos convencionais, os quais diversos fármacos não conseguem penetrar nas células, demonstrando limitações desse tratamento (ABDULRAHMAN *et al.*, 2020).

No presente estudo observou-se um aumento da produção de ERO no grupo LED quando comparado ao grupo controle escuro, sendo associado esse resultado ao efeito oxidativo da luz azul e sua alta energia. O estudo de Freitas (2018), também demonstra aumento no número de ERO gerado pela aplicação da luz azul em seu grupo irradiado (sem FS) e TFD em relação ao grupo controle escuro.

O aumento na produção de ERO apresentado pelo grupo TFD em comparação ao Controle escuro, pode ser atribuído ao fato de que ao irradiar a curcumina, em comprimento de onda adequado, ocasiona-se a formação de ERO, como oxigênio singlete e radicais de peróxido de hidrogênio, conferindo a ela fototoxicidade. Já o aumento de ERO no grupo FS pode estar associado ao fato da curcumina possuir efeito oxidativo (PRIYADARSINI, 2014; FREITAS, 2018).

As espécies reativas de oxigênio oxidam as biomoléculas dos microrganismos levando a danos biológicos. Os resultados deste estudo evidenciam o aumento de ERO no grupo LED e TFD no biofilme de cepa MRSA ao ser comparado ao grupo controle escuro e FS, demonstrando o efeito fototóxico da curcumina associado à sua característica oxidativa.

Ao analisar os resultados obtidos no presente estudo como a metabolização do corante resazurin, a avaliação de crescimento bacteriano após a terapia (UFC/ Log), as micrografias eletrônicas provenientes da microscopia eletrônica de varredura e a produção de ERO, é possível corroborar os resultados dos experimentos fortalecendo a afirmação da eficácia antibacteriana da terapia mediada pela curcumina frente o biofilme de *S. aureus* resistente à metilina, devido ao fato de que ambos evidenciaram a redução do crescimento bacteriano.

Evidenciou-se por meio deste estudo que a TFD mediada pela curcumina foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano do biofilme de cepa MRSA, fato que caracteriza a terapia como um promissor método alternativo para o tratamento de infecções bacterianas que contribui para a diminuição do uso de antibióticos.

## 8 CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que o uso da curcumina como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica frente ao biofilme de cepa MRSA nos protocolos estabelecidos foi capaz de ocasionar:

- A internalização da curcumina pela célula bacteriana em agregado de biofilme na concentração de trabalho e no tempo de incubação utilizado;
- A diminuição do número de unidades formadoras de colônias após a aplicação da terapia, evidenciando a redução bacteriana;
- A formação de biofilme com o protocolo utilizado, bem como a redução bacteriana, com a perda da matriz de polímeros extracelular, evidenciada nas micrografias de MEV;
- A diminuição da metabolização do corante resazurin, indicando a redução da atividade metabólica após a terapia;
- O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio após a terapia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABDALLA, D. S. P.; LIMA, E. S. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- ABDULRAHMAN, H. *et al.* Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 30, p. 101645, 2020.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.
- AHMED, T.; GILANI, Anwarul-Hassan. Therapeutic potential of turmeric in Alzheimer's disease: curcumin or curcuminoids? **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 4, p. 517-525, 2014.
- AKLOV, O. E. *et al.* Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. **Medical Laser Application**, v. 21, n. 4, p. 251-260, 2006.
- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.
- ALMEIDA, P. P. *et al.* Photodynamic therapy controls of *Staphylococcus aureus* intradermal infection in mice. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 6, p. 1337-1342, 2017.
- AMARAL, R. R. *et al.* Terapia fotodinâmica na endodontia: revisão de literatura. **RFO UPF**, v. 15, n. 2, p. 207-211, 2010.
- ANDRÉ, L. S. P. **Estudo dos efeitos causados pela deleção de genes relacionados ao biofilme de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) in vitro e sobre a virulência em modelo experimental de roedores.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2019.
- ANITHA, V. *et al.* Comparative evaluation of natural curcumin and synthetic chlorhexidine in the management of chronic periodontitis as a local drug delivery: a clinical and microbiological study. **Indian. J. dent. Res.**, v. 26, n. 1, p. 53-56. Jan-Feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.4103/0970-9290.156806>
- ANVISA. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviço de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana do ano de 2017.** Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiZTFiOGRhOTYtYzZjOS00NmZmLWE5MWUtN2RkNDhiZGJiOGE1IiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWZjMjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9>. Acesso em: 19 fev. 2020.

BACELLAR, I. *et al.* Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 30, p. 9606-9615, 2018.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 42f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BARRETO, M.F; PICOLI, S.U. *Staphylococcus* em um hospital de Porto Alegre (RS). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.4, p.285-287, 2008.

BARROS, M. M. A. *et al.* O enfermeiro na prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 15-21, 2016.

BATISTA, A. L. A.; CATÃO, M. H. C. O uso da Curcumina (Curcuma Longa) no tratamento periodontal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 29, n. 1, p. 21-30, 2019.

BELLI, L. P. A. **Desenvolvimento de fotossensibilizador metaloporfirínico para potencial terapia fotodinâmica**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

BERGIN, S. P. *et al.* Bacteremia, Sepsis, and Infective Endocarditis Associated with *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 409, p. 263–296, 2017.

BERND, A. Visible light and/or UVA offer a strong amplification of the anti-tumor effect of curcumin. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 183-189, 2014.

CAFACE, R. A. **Caracterização da interação e incorporação de fotossensibilizadores em células de *Candida albicans* para inativação fotodinâmica**. 2020. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2020.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais Acad. Bras. Ciênc.**, v.91, 2019. doi: 10.1590/0001-3765201920190105.

CANSIAN, T.M. A enfermagem e o controle da infecção cruzada. **Rev. Bras. Enf.**, DF, v. 30, p. 412-422, 1977. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-71671977000400412](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71671977000400412). Acesso em: 10 set. 2019.

CARNEIRO, D. M. **Ayurveda: saúde e longevidade na tradição milenar da Índia**. Pensamento: São Paulo, 2009.

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

CATÃO, R.M.R. *et al.* Prevalência de infecções hospitalares por *Staphylococcus aureus* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. **Journal of Nursing UFPE/Revista de Enfermagem UFPE**, v. 7, n. 8, p. 5257-5264, 2013.

CECCONI, M. *et al.* Sepsis and septic shock. **Lancet** (London, England), v. 392, n. 10141, p. 75–87, 07 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION *et al.* **CDC/NHSN surveillance definitions for specific types of infections**. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threatreport-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.

CHEN, D. *et al.* Light-Emitting Diode-Based Illumination System for In Vitro Photodynamic Therapy. **International Journal of Photoenergy**, v. 2012, n. 6, p. 1-6, 2012.

CID, M. F. *et al.* Eficacia de terapia fotodinâmica como complemento de terapia convencional periodontal versus terapia convencional en el tratamiento de pacientes adultos con periodontitis crónica: Una revisión sistemática con metaanálisis. **International journal of odontostomatology**, v. 10, n. 2, p. 315-323, 2016.

COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

COSTA, A.L.P. **Resistência bacteriana aos antibióticos: uma perspectiva do fenômeno biológico, suas consequências e estratégias de contenção**. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

COSTA, C. M. F. C. G. **Resistência aos antibióticos em *Staphylococcus aureus*: uma revisão**. 2019. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal, 2019.

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

DAI, T. *et al.* Photodynamic therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3929–3934, 2009.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 375–80, 2003.

DONATO, H. A. R. *et al.* Clinical comparison of two photosensitizers for oral cavity decontamination. **Photomedicine and laser surgery**, v. 35, n. 2, p. 105-110, 2017.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**. v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.

ELAVARASU, S. *et al.* Evaluation of superoxide dismutase levels in local drug delivery system containing 0.2% curcumin strip as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis: A clinical and biochemical study. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 8, n. Sup. 1, p. S48, 2016.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL - ECDC. **Health care-associated infections acquired in intensive care units - Annual epidemiological report 2016**. Sweden: ECDC, 2016. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/infections-acquired-intensive-care-units-annual-report-2016>. Acesso em: 24 nov. 2021.

FISMAN, D. *et al.* Geographical variability in the likelihood of bloodstream infections due to gram-negative bacteria: correlation with proximity to the equator and health care expenditure. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114548, 2014.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FRÉDÉRIC, L. J., MICHEL, B.; SELINA, T. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. **Materials** (Basel), v. 11, n. 10, p. 1802, 2018. <https://doi.org/10.3390/ma11101802>

FREITAS, G. D. *et al.* Uso de diferentes métodos no controle do desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*: uma revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e40310212546-e40310212546, 2021.

FREITAS, L. M. **Combinação da terapia fotodinâmica a peptídeos antimicrobianos: efeitos e mecanismos**. 2018. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2018.

FREITAS, M. A. A. **Potencial da terapia fotodinâmica com curcumina na inativação de cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes aos antibióticos**: estudo *in vitro*. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2018.

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

GALO, I. D. C. *et al.* Atraso no crescimento de *Staphylococcus aureus* após exposição à baixas fluências de luz azul (470 nm). **Brazilian Journal of Biology**, v.81, n. 2, p. 370, 2020. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.226473>

GARDETE, S.; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 2836–40, 2014.

GARNICA, M. **Prevenção e controle de infecção em situações especiais Pacientes imunodeprimidos (onco-hematológicos) e Manejo de cateteres de longa permanência**. Rio de Janeiro: AECIHERJ, 2016.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food Chem Toxicol.**, v. 83, p. 111–124, 2015.

GIROTI, A. L. B. *et al.* Hospital infection control programs: assessment of process and structure indicators. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 52, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1980-220X2017039903364>

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.

GUAN, G.; LAN, S. Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. **BioMed research international**, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1290179>

GUIMARÃES, D. O. *et al.* Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUIMARÃES, J. N. A.; HORÁCIO, B.O.; TERRA, A. T. J. A atuação do profissional farmacêutico no controle das infecções hospitalares. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 78-89, 2017.

GUO, Y. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1–11, Mar. 2020.

GUPTA, P. *et al.* Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, Jan. 2016.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67–73, 2016.

HAWIGER, J.; VEACH, R. A.; ZIENKIEWICZ, J. New paradigms in sepsis: from prevention to protection of failing microcirculation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, n. 10, p. 1743-1756, 2015.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: o estado da arte. Artigo de Revisão. **Arquivos de medicina**, Porto, Portugal, v. 27, n. 1, p. 27-36, fev. 2013.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE - ILAS. **O que é sepse. Brasil**, 2018. Disponível em: <https://www.ilas.org.br/o-que-e-sepse.php>. Acesso em: 24 maio 2021.

JØRGENSEN, P. S. Antibiotic resistance is the next great global challenge - we must act now. **Word Economic Forum**, 2016. Disponível em: <https://www.weforum.org/agenda/2016/09/antimicrobial-resistance-is-the-next-global-commons-issue/>. Acesso em: 24 maio 2021.

JORI, G. *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, n. 5, p.468–481, 2006.

JUNIOR, F. F. P. **Interação e Internalização de curcumina em culturas bacterianas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade São Paulo, São Carlos, 2019.

KHARKWAL, G. B. *et al.* Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–67, 2011.

KLEIN, G.; GOULART, L.S. Prevalência de Staphylococcus aureus multirresistentes em amostras biológicas do Laboratório Osvaldo Cruz, Uruguaiana-RS. **Rev. Bras. Farm**, v. 89, n.2, p. 121-124, 2008.

KOMMEREIN, N. *et al.* Development and characterization of an oral multispecies biofilm implant flow chamber model. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196967>. 2018.

KUMAR, S.; PANDEY A.K. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbs. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**, v. 7, n. 6, p. 438-457, 2015. DOI: <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2015/16284>.

KUMAR, S., VARELA, M. F. Molecular Mechanisms of bacterial Resistance to antimicrobial Agents. **chemotherapy**, v. 14, n. 18, p. 522-534, 2013.

KURLEND, J.; GRINHOLC, M. Alternative therapies in Staphylococcus aureus diseases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 2, p. 171–184, 2012.

KWIATKOWSKI S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations, **Biomedicine and pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018. DOI: [10.1016/j.biopha.2018.07.049](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049).

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: EMBRAPA, 2008. p. 19-26.

LARA, F. L. O. *et al.* Custos da antibioticoterapia em pacientes adultos com infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 3, n. 4, 2017. DOI: <https://doi.org/10.26694/repis.v3i4.662>.

LI, Y. H.; TIAN, X. L. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms: Bacterial Cooperation and Competition. **Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria**, v. 2, p. 1197–1205, 2016.

LIM, M.E. *et al.* Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1912–1920, 2012.

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

LOUREIRO, R.J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016. DOI: 10.1016/j.rpsp.2015.11.003

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, p. 105-129, 2001., DOI: 10.1002/jpp.328.

MACHADO, A. D. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.

MACHADO, A. *et al.* Cost-effectiveness of linezolid versus vancomycin in mechanical ventilation-associated nosocomial pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 3, p. 191-200, 2005.

MACHADO, F. R. *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, 1 nov. 2017.

MAMISUKA, E. **Projeto de resistência microbiana em serviços de saúde, Staphylococcus**. [S.I.]: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, 2005.

MARTINS, A.F. *et al.* Manual: Controle e monitoramento de microrganismos multirresistentes. **Journal of Infection Control**, v. 2, n. 4, 2013. Disponível em: <https://jic-abih.com.br/index.php/jic/article/view/58/pdf>. Acesso em: 24 maio 2021.

MENEGUIN, S.; TORRES, E. A.; POLLO, C. F. Fatores associados à infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 73, 2020.

MENOITA, E. *et al.* Biofilmes: conhecer a entidade. **Journal of aging and innovation**, Lisboa, v.1, n. 3, p. 23-32, abr. 2012.

MOHAMMED, Y. H. E. *et al.* Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 339–347, out. 2018.

MONDAL, S. *et al.* Stability of curcumina in diferente solvente and solution media: UV-visible and steady-state fluourescence specrtal study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 158, p. 212-218, 2016.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organismo. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365–376, May 2017.

MORAES, F.M.; RAU, C. Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS): impacto na saúde e desafios para seu controle e prevenção. **Revista Científica da PUC Goiás**, v. 6, n. 2, p. 89-95, 2016.

MROZ, P. *et al.* Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 7, n. 1, p. 75-91, 2011.

MUNIZ, Igor Pereira Ribeiro. **Efetividade *in vitro* de diferentes protocolos de terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada por porfirina e curcumina frente a biofilmes de cepas padrão e clínicas de *acinetobacter baumannii***. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista – BA, 2018.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica**. [s.l.]: Elsevier Brasil, 2006.

NABER, C. K. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. s4, p. S231–S237, 2009.

NAGASRI, M. *et al.* Efficacy of curcumin as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis patients: A clinical and microbiological study. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 7, n. Sup. 2, p. S554, 2015.

NAGPAL, M.; SOOD, S. Role of curcumin in systemic and oral health: An overview. **Journal of natural science, biology, and medicine**, v. 4, n. 1, p. 3, 2013.

NAPOLITANO, L. M. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 117–125, mar. 2018.

NASCIMENTO, I. R. *et al.* Biofilmes bacterianos: colonização e identificação de micro-organismos causadores de infecção em cateter venoso central. **Programa de Iniciação Científica-PIC/UniCEUB-Relatórios de Pesquisa**, v. 2, n. 1, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5102/pic.n2.2016.5586>

NELSON, K.M. *et al.* The essential medicinal chemistry of Curcumin. **J. Med. Chem.**, v.60, n.5, p. 1620-1637, 2017. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975.

NICOL, M. *et al.* Unsaturated Fatty Acids Affect Quorum Sensing Communication System and Inhibit Motility and Biofilm Formation of *Acinetobacter baumannii*. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 214, 2018.

NÚÑEZ, S. C; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. **PDT: Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. 253 p.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance** : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. [UK: UK Government], 2014. (Review on Antimicrobial Resistance).

O'NEILL, J. How to stop antibiotic resistance threatening global growth. **World Economic Forum**, 02 Dec 2015. Disponível em:

<https://www.weforum.org/agenda/2015/12/how-to-stop-antibiotic-resistance-threatening-global-growth/>. Acesso em: maio 2021.

O'NEILL, J. **Tackling Drug-Resistant Infections Globally**: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance. [UK: UK Government], 2016. Disponível em: <https://wellcomecollection.org/works/thvwsuba/items>. Acesso em: maio 2021.

OLIVEIRA, K. R. *et al.* Infecções hospitalares relacionadas ao *staphylococcus aureus* e seus mecanismos de patogenicidade: uma revisão. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FASB, 17., 2019, Barreiras, Bahia, **ANAIS ELETRÔNICO CIC** [...]. Barreiras, Bahia: FASB, 2019. v. 17, n. 1.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA D.F.; PICCOLI R.H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 277-84, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antimicrobial resistance**. Genebra: OMS; 2018. Disponível em: Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acesso em: 27 nov. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE. (OMS). **Publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. 2017. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812). Acesso em: 16 set. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Módulo de princípios de epidemiologia para o controle de enfermidades. Módulo 1**: apresentação e marco conceitual. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; Ministério da Saúde, 2010.

ORGANIZAÇÕES PAN AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Novos dados revelam níveis elevados de resistência aos antibióticos em todo o mundo**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Microbiol Spectr**, v. 6, n. 4, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.

OTTO, M. Staphylococcus epidermidis: a major player in bacterial sepsis? **Future Microbiology**, v. 12, p. 1031–1033, 2017.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de saúde pública**, v. 48, p. 995-1001, 2014.

PAHARIK, A.E.; HORSWILL, A.R.; The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. **Microbiol Spectr**, v.4, n.2, p. 1-48, 2016.

PAHISSA, A. **Infecciones producidas por Staphylococcus áureus**, 1º ed. Barcelona: ICG Marge, 2009.183 p.

PANESSO, D. et al. Methicillin-susceptible, Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1844–1848, 2015.

PENHA, C. B. et al. Inativação fotodinâmica de bactérias de origem alimentar e de deterioração de alimentos pela curcumina. **Food Sci. Technol.**, v.76, p. 198–202, 2017.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, São Carlos, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PIÑEIRO, L. et al. Tratamiento antibiótico dirigido en infecciones por Mycoplasma genitalium: análisis de mutaciones asociadas con resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 37, n. 6, p. 394-397, 2019.

PINTO, G. C. S. **Eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em biofilmes de Staphylococcus aureus suscetível e resistente à meticilina**. 2013. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Araraquara 2013.

PRAZMO, E. J. et al. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. **Advances in clinical and experimental medicine**, v. 25, n. 4, p. 799-807, 2016.

PRIYADARSINI, I. K. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81-95, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001>.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091-20112, 2014.

RADI R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxyxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>.

RAI, D. et al. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity, **Biochemical Journal**, v. 410, n. 1, p. 147–155, 2008.

RANCAN, F. L. **Efeito de terapia fotodinâmica utilizando curcumina como fotossensibilizante sobre o biofilme de S. gordonii formado sobre superfícies lisa e rugosa de titânio**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

RIBEIRO, M. S. et al. Laser em Baixa Intensidade. *In*: MAIO, Mauricio de (Org.). **Tratado de medicina estética**. São Paulo: Roca, 2011. p. 945–953.

RUPEL, K. *et al.* A luz laser azul inibe a formação de biofilme in vitro e in vivo, induzindo o estresse oxidativo. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2019.

SABINO, C. P. *et al.* The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 72-78, 2016.

SAMPAIO, F. J. P. *et al.* Quimioterapia antimicrobiana fotodinâmica (PACT) contra microrganismos orais com uso de LED azul associado à curcumina. **Proc. SPIE**, n. 9695, **Mechanisms of Photobiomodulation Therapy**, n.11, p.96950O, Mar. 2016. doi: 10.1117/12.2213515

SANDBERG, M. E. *et al.* Pros and cons of using resarurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, p. 104-106, 2009.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections-A Review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 21, p. 409–415, Jan. 2018.

SANTIAGO, Reginágela Oliveira *et al.* Interações entre quinolonas versus leite e derivados: inefetividade terapêutica. **Mostra Científica da Farmácia**, v. 5, 2019. Disponível em: <http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/mostracientificafarmacia/article/view/2997/2560>. Acesso em: 24 maio 2021.

SANTOS, A.L. *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v.43, n.6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, D. M. *et al.* Novas abordagens experimentais para o combate de infecções causadas por Staphylococcus aureus. **Rev. Investig. Biomed.**, São Luís, v. 10, n.1, p.93-100, 2018.

SANTOS, Diego Dantas Lopes. **Inativação fotodinâmica utilizando-se curcumina conjugada a Pluronic® F-127 sobre biofilme de Streptococcus mutans**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP. Araraquara, 2019.

SANTOS, J. P. C. L. *et al.* Potencial antimicrobiano do extrato etanólico da casca de Stryphnodendron barbatimam (Mart.) ante microrganismos de interesse médico-odontológico. **RSBO**, v. 18, n. 1, p. 23–30, 2021. Disponível em: <http://periodicos.univille.br/index.php/RSBO/article/view/1449>. Acesso em: 24 maio. 2021.

SANTOS, P.F. **Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS): pacientes imunocomprometidos**. 2018. Monografia (Graduação em Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente), FAEMA, Ariquimes, RO, 2018.

SANTOS, T. V. S. **Terapia fotodinâmica: uma revisão dos conceitos gerais e dos avanços de novos sistemas carreadores desenvolvidos com base na**

**nanotecnologia**. 2020. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

SANTOS, A. *et al.* Prevalência, perfil microbiológico e sensibilidade aos antimicrobianos de bacilos Gram-negativos não fermentadores em pacientes internados em hospital terciário de João Pessoa–2015. **J. Infect. Control**, v.8, n. 3, p. 96-101, jul-set. 2019.

SATO, Y. *et al.* Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194556, 2018.

SAXENA, P. *et al.* Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. **Indian J. Microbiol.**, v.59, p. 3–12, 2019. DOI: 10.1007/s12088-018-0757-6.

SCHIESARI-JUNIOR, A. *et al.* Infecções por bactérias formadoras de biofilme: breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Interna**, v.2 n. 1 p. 37-47, Cantanduva -São Paulo, 2015.

SILVA, M. L. **Controle de infecção relacionada a assistência à saúde (IRAS):** revisão sistemática do período de 2017 A 2018. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina), Centro Universitário São Lucas, Porto Velho, 2018.

SILVA B. G. B. **Efeito de extratos metanólicos de *Calliandra dysantha Benth.* (Fabacea) sobre o biofilme de *Staphylococcus aureus*.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, Patos de Minas, 2019.

SILVA, A.P. **Novas estratégias para o diagnóstico de onicomicose e tratamento por terapia fotodinâmica.** 2018. 197p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

SILVA, A. A. *et al.* **Plano de Prevenção e Controle de Bactérias Multirresistentes (BMR) para os Hospitais do Estado de São Paulo.** Precauções e Isolamento. [São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica], 2014.

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** São Paulo, SP: Blucher, 2017.

SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2007.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002.

SOARES, I. C.; GARCIA, P. DA C. Resistência Bacteriana: a relação entre o consumo indiscriminado de antibióticos e o surgimento de superbactérias. **Revista Científica de Medicina da Faculdade Atenas**, Paracatu, MG, v.6, n.1, 2018.

SOUZA, C. N. **Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares in vivo**. 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SOUZA, L. P. **Os desafios na prevenção e controle de infecção hospitalar a âmbito institucional: uma discussão a partir da análise do cenário de uma instituição de saúde brasileira**. 2014. Monografia (Bacharelado em Saúde Coletiva), Universidade de Brasília, Ceilândia - DF, 2014.

SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. Vancomycine resistance in staphylococci. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 3, p. 430-8, 2002.

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* Curcumina, o Pó Dourado do Açafão-Da-Terra: Introspecções Sobre Química e Atividades Biológicas. **Química Nova**, v. 38, p. 538-552, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. Caps. 1; 5.

TONON, C. C. *et al.* Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. **The journal of contemporary dental practice**, v. 16, p. 1-6, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

VASCONCELOS, D. V.; OLIVEIRA, T. B.; ARAUJO, L. L. N. O uso de antimicrobianos no âmbito hospitalar e as atribuições do farmacêutico na comissão de controle de infecção hospitalar (CCIH). **Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, v. 4, n. 2, p. 48-62, 2015.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic medicine and infection control. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 787–788, 2012.

WATANABE, É. M. *et al.* Impacto das infecções relacionadas à assistência à saúde em pacientes acometidos por trauma. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, Sup. 1, p. 89-98, 2015.

WEN, X. *et al.* Potassium iodide potentiates antimicrobial photodynamic inactivation mediated by rose bengal in in vitro and in vivo studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00467-17, 2017.

WHO - World Health Organization. **Health care-associated infections**: fact sheet. Geneva: World Health Organization, 2011. Disponível em: [who.int/gpsc/country\\_work/gpsc\\_ccisc\\_fact\\_sheet\\_en.pdf](http://who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf). Acesso em 25 maio. 2021.

WHO - World Health Organization. **No Time to Wait**: Securing the future from drug-resistant Infections. Report to the secretary-general of the United Nations. Geneva: World Health Organization, 2019. Disponível em: [https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-fromdrug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7\\_6](https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-fromdrug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6). Acesso em 25 maio. 2021.

WRÓBLEWSKA, M.; STRUŻYCKA, I.; MIERZWIŃSKA-NASTALSKA, E. Significance of biofilms in dentistry. **Przegląd epidemiologiczny**, v. 69, n. 4, p. 739-744, 2015.

YANOVSKY R. L. *et al.* Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature, **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 35, n. 5, p. 295-303, 2019. DOI: 10.1111/phpp.12489.

ZAGO L. H. P. **Avaliação da redução e resistência bacteriana via múltiplos ciclos de terapia fotodinâmica**. 2018. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2018.