



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

Eficiência da terapia fotodinâmica em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Maria Rita Ronqui

Araraquara - SP
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

Eficiência da terapia fotodinâmica em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Maria Rita Ronqui

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho”, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carla Raquel Fontana

Araraquara – SP
2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R773e Ronqui, Maria Rita
Eficiência da terapia fotodinâmica em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* / Maria Rita Ronqui – Araraquara, 2015
142 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e
Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Carla Raquel Fontana

1. Terapia fotodinâmica. 2. Azul de metileno. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Escherichia coli*. 5. Terapia combinada. I. Fontana, Carla Raquel, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

**Eficiência da terapia fotodinâmica em *Staphylococcus aureus* e
*Escherichia coli***

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Carla Raquel Fontana (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara

Prof^a Dr^a Ana Marisa Fusco Almeida

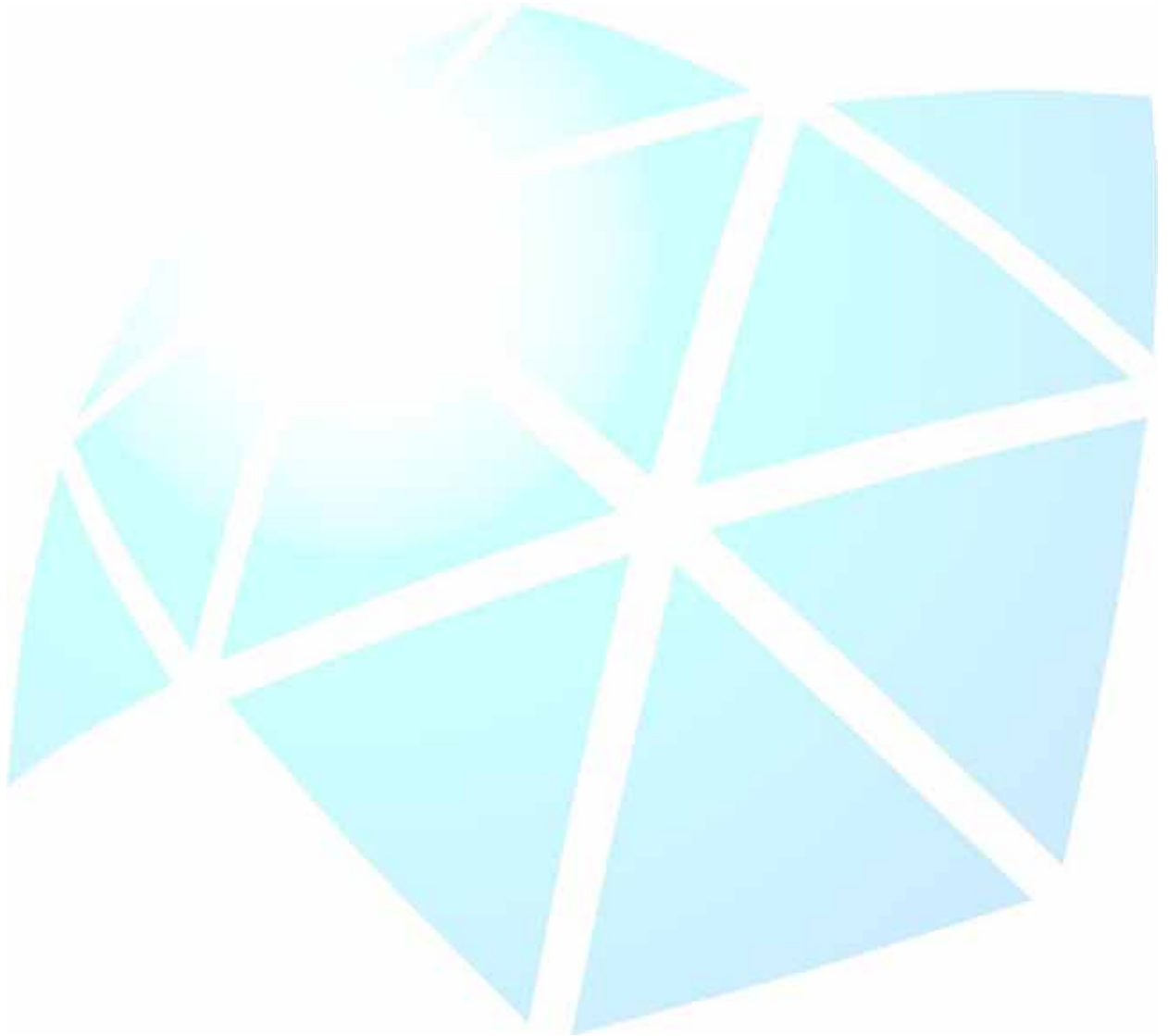
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – São Carlos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia.

Fomento: Bolsa CNPq



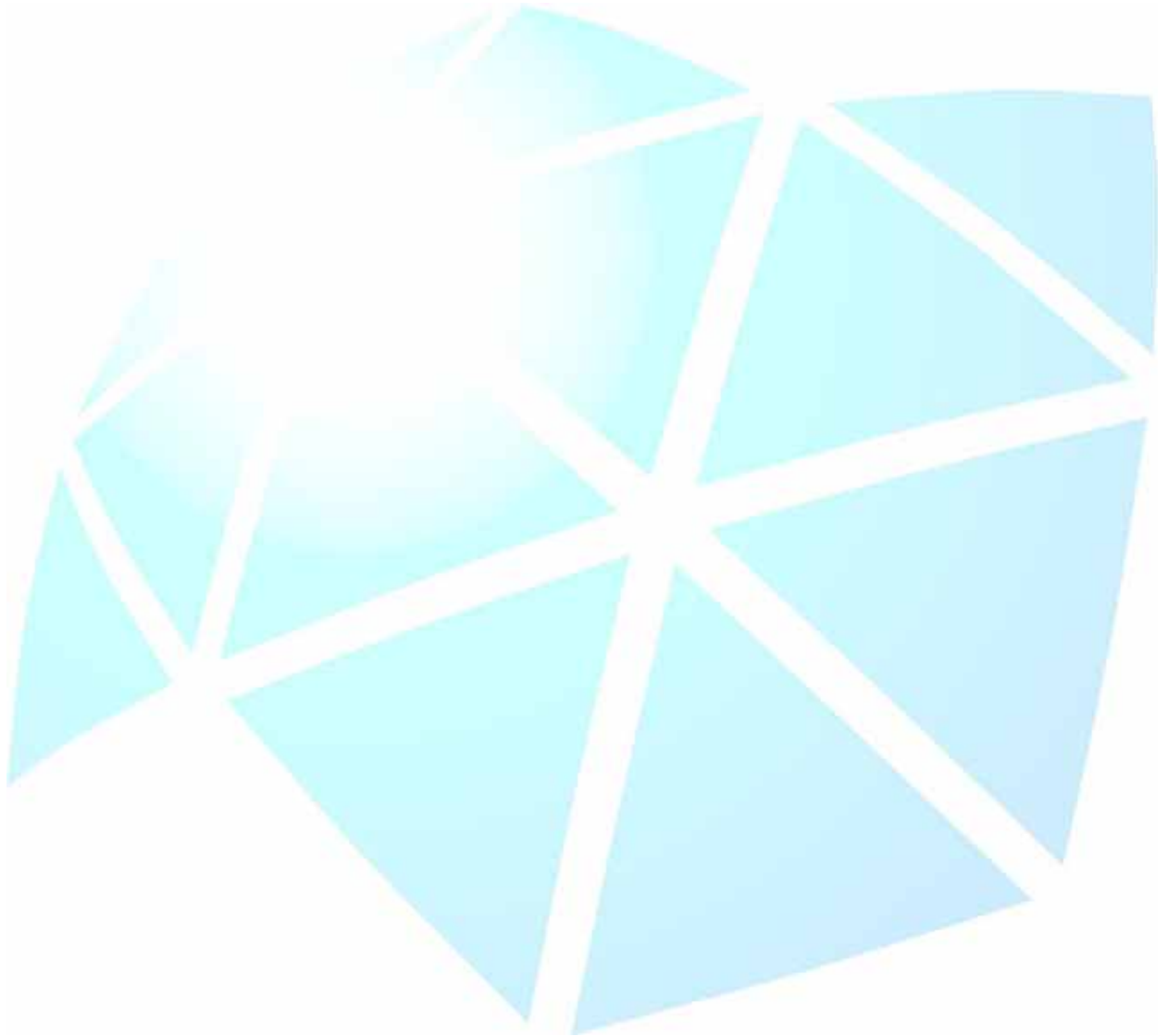
Dedicatórias

*A **Deus**, que em todo momento se fez e faz presente em minha vida, me capacitando e me dando a força e a fé necessárias para que eu pudesse completar essa jornada, me instruindo e mostrando a direção em momentos de decisão e me trazendo a paz em momentos de nervoso, ansiedade e preocupação.*

*Ao meu pai, **Nemer**, e à minha mãe, **Eliza**, muito obrigada por tudo o que fizeram e fazem por mim, e por estarem sempre ao meu lado me dando incentivo e apoio durante todo o mestrado. Para mim, vocês são exemplos, aos quais quero seguir por toda a minha vida. Amo vocês!*

Aos meus familiares, que sempre me incentivaram e me deram apoio, e que foram muito presentes em todos os momentos, transmitindo muito carinho.

Aos meus amigos, pela amizade, pelo carinho, atenção e também por sempre me ouvirem e dar conselhos quando precisei. Muito obrigada!



Agradecimientos

A DEUS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me dado forças para cursar com responsabilidade e dedicação esses dois anos de Mestrado na unesp, que me permitiu adquirir conhecimento para concluir este trabalho, porque sem a presença Dele eu não chegaria até aqui. muitas coisas aconteceram durante o período em que trabalhava nesta dissertação e, se hoje consegui terminá-la foi, sem dúvidas devido, ao grande amor de Deus por mim. Nestes anos eu pude experimentar Deus agindo nas pequenas coisas, pude ver que Ele nunca me abandonou, pude sentir Sua presença cuidando de cada etapa, pude evidenciar a Sua força para superar os obstáculos, pois desde o início este sonho foi consagrado a Ele. Por isso hoje eu quero louvar e agradecer a Deus pela realização deste sonho. Agradeço por ter me iluminado e por ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir e crescer. Obrigada Senhor, pelo amor que puseste em cada um que caminhou comigo nessa jornada.

A NOSSA SENHORA

Agradeço a Nossa Senhora, pois durante esses anos de mestrado muitas vezes supliquei a intercessão de Nossa Senhora, e sei que muitas graças eu obtive através dela. Por isso hoje eu quero agradecer à mãe de Jesus e minha mãe.

“...como Medianeira materna, Maria apresenta a Cristo os nossos desejos, as nossas súplicas e transmite-nos os dons divinos, intercedendo continuamente em nosso favor.”

(Papa João Paulo II)

AOS PAIS

A vocês, queridos pais, o meu agradecimento. Vocês são responsáveis por este momento tão marcante em minha vida. De vocês, recebi o dom mais precioso do universo: a Vida. Já por isso seria infinitamente grata. Mas vocês não se contentaram em me presentear apenas com ela. Revestiram-me de amor, carinho e dedicação, abriram as portas do meu futuro, iluminando-a com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o Estudo. Trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus. Não foram apenas pais, mas amigos e companheiros. Vocês, desde o começo acreditaram, incentivando-me sempre a busca de novos conhecimentos, me dando conselhos, e contribuindo para o meu crescimento. Obrigada pela paciência, compreensão, e por tudo que fizeram para que este momento pudesse se realizar. Esta vitória também é de vocês.

Pai, Mãe... Amo vocês!

AOS MEUS FAMILIARES

A sua presença, a sua companhia, o seu sorriso, as suas palavras e até mesmo a sua ausência, foram expressão de amor profundo. A vocês, que abriram mão de momentos de convívio, que sofreram minha ausência quando o dever e o estudo me chamaram.

A vocês que, agora, compartilham de minha alegria, neste fim de etapa, que sempre estiveram ao meu lado, nunca dispensando carinho. Agradeço especialmente minhas primas Gislaine, Elaine, Amanda, Giovania e Hemelly. Muito obrigada por todo carinho, apoio e conselhos, por sempre me ouvirem quando precisei, saibam que sempre podem contar comigo. Obrigada por serem especiais na minha vida, vocês foram muito importantes.

A vocês um abraço de carinho e obrigada!

A ORIENTADORA

Dedico um agradecimento especial à minha orientadora, a Professora Dra. Carla Raquel Fontana, que aceitou o desafio de me orientar no Mestrado, que muito me ensinou durante toda a realização deste trabalho. Muito obrigada pela paciência e dedicação que teve desde o primeiro momento até a conclusão deste trabalho, pela sabedoria que demonstrou me ensinando e me auxiliando para que eu chegasse até aqui. Agradeço também pela amizade, disponibilidade, apoio e incentivo, e pelos conselhos e conhecimento que me deixou. A você, meu carinho e gratidão!

A ELAINE

Quero agradecer a Elaine Toscano Miranda, principalmente pela sua paciência, me fazendo compreender melhor a vida e pelo seu compromisso de me mostrar os caminhos para o universo da pesquisa. E por todo carinho, amizade, dedicação, confiança e, por todo tempo destinado a me auxiliar em todas as minhas dificuldades. Que Deus te abençoe!

AOS PROFESSORES

Ensinar não é só transmitir conhecimento.

Ser professor é ser humano e amigo, guia e companheiro, é caminhar com o aluno passo a passo e transmitir a ele o segredo da caminhada. Ser professor é ser exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e, sobretudo de amor.

A vocês, professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da unesp, que sempre me acolheram com muito carinho e atenção, não medindo esforços para me orientar e não me deixando desanimar durante esses anos para a conclusão do Mestrado.

A vocês, professores maravilhosos, dedicados, amigos e profissionais, demonstro, agora, minha gratidão e meu sincero e carinhoso obrigada pelo conhecimento que me foi transmitido, pelas dúvidas esclarecidas, pela amizade e paciência que para comigo tiveram. Espero que sempre estejamos juntos para construir novas conquistas e que nossa amizade seja eterna.

AOS AMIGOS

Agradeço aos meus amigos da unesp, aos amigos dos Laboratórios de Bioquímica, Citologia, Hematologia e Imunologia por toda a ajuda, na qual foi de grande importância para a conclusão desse trabalho. Agradeço também aos amigos do Laboratório de Microbiologia, Ana Carolina, Tatiana, Leda, Laura, Lucas Zago. Partilhamos cada descoberta, desafio e conquista. Dividimos medo, incertezas e inseguranças... Mas somamos entusiasmo, forças e alegrias... Agradeço principalmente a minha grande amiga Tatiana. A sua presença tornou mais amena nossa jornada. Obrigada por tornar inesquecível essa formação. A partir de hoje, parte de nossa história vai ficando para trás, mas com certeza, tempo nenhum apagará o que juntas passamos, o que juntas vivemos! Tati, boa sorte no seu Doutorado!

Agradeço também aos meus amigos não da faculdade, por terem me proporcionado muitos momentos de entretenimento e diversão. Agradeço principalmente ao meu amigo Lucas Fávero. Muito obrigada por todo carinho, apoio, conselhos e ombro amigo, por sempre me ouvir quando precisei, pois sempre pude contar com você, com sua amizade, nos momentos sejam de dor ou de alegria. Obrigada por ser uma pessoa especial na minha vida, você foi muito importante, e sempre será, pois muitas vezes foi capaz de trazer mais alegria para os meus dias, principalmente quando estava desanimada e cansada. Quantas vezes você me disse: Calma, está acabando... Lucas, você já sabe que quando precisar pode contar comigo, sempre. E como diz uma música que gosto muito “Se eu tentasse definir, o quão especial tu és pra mim, palavras não teriam fim... que a fé de Deus nos faça eternos amigos.” Que Deus te abençoe!

Por último, mas não menos importante, agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da unesp, Araraquara/SP, e a todos os funcionários pelo apoio em instalações e subsídios para que eu pudesse concluir o Mestrado. Agradeço também ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo – USP de São Carlos pela realização da Microscopia Eletrônica de Varredura. À todos que de alguma forma contribuíram para que este sonho se tornasse realidade: Muito obrigada!

TUDO POSSO

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim
E ali estar*

*Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar*

*E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma há certeza da vitória*

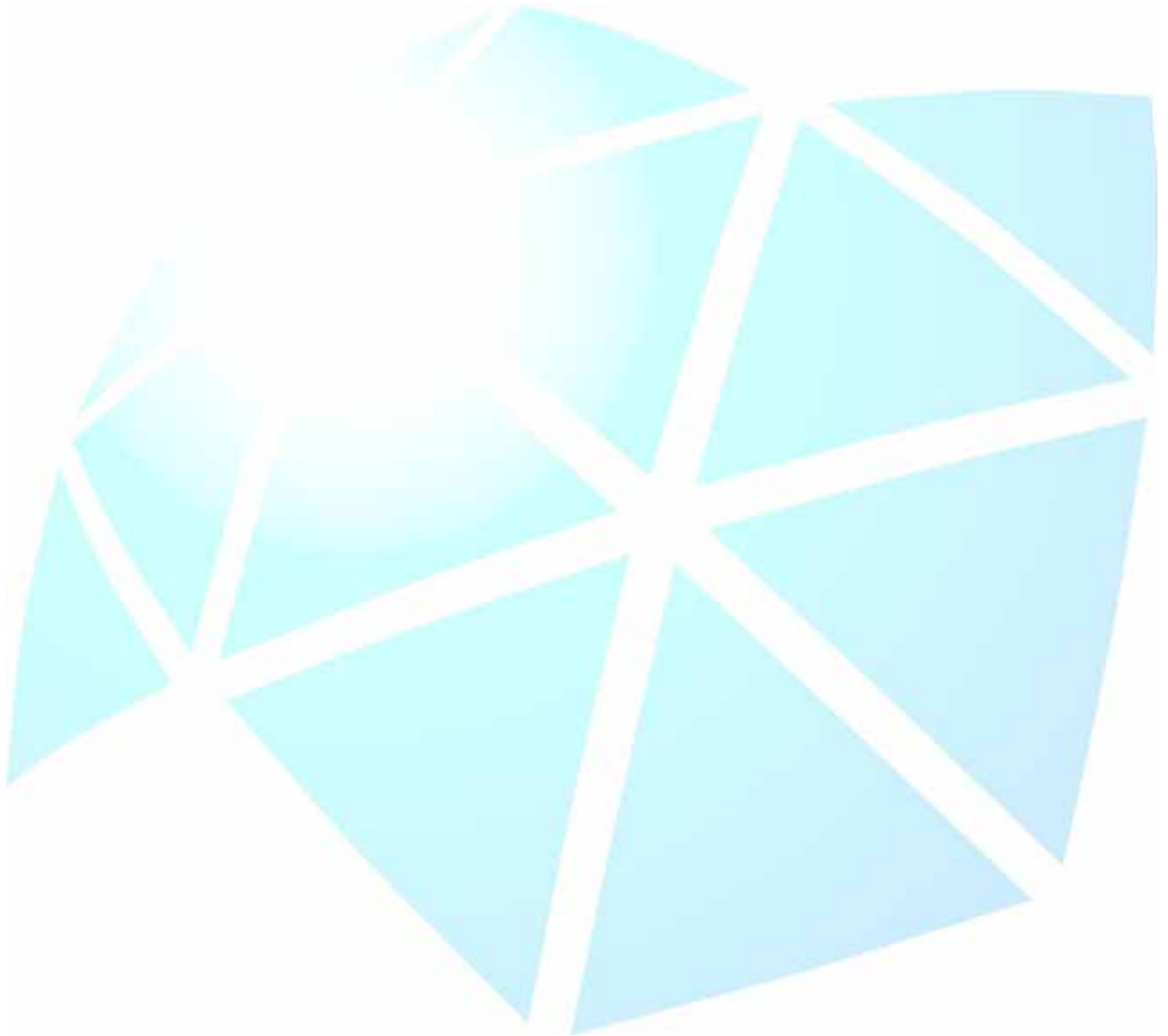
*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir*

*Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar*

*E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem*

*Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... em Jesus!*

(Celina Borges)



Capítulo 1

RESUMO

A ocorrência de uma variedade de agentes patogênicos resistentes aos antibióticos atuais continua a ser um problema, especialmente quando as infecções bacterianas estão crescendo em biofilme. Neste estudo, propomos o uso da terapia fotodinâmica (TFD) como monoterapia e também associada à antibioticoterapia como um tratamento alternativo. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da TFD mediada pelo azul de metileno (AM) em *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), como biofilme e em fase planctônica. Diferentes concentrações de fotossensibilizador (400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL) e fluência (2,8; 5,6; 11,2 22,4 J/cm²) foram testadas. Também realizamos experimentos que avaliaram o efeito sinérgico da terapia fotodinâmica e o antibiótico ciprofloxacina. Os efeitos bactericidas da TFD como monoterapia não foram estatisticamente aumentados com a concentração de fotossensibilizador, e bactérias em biofilmes foram menos afetadas que as da fase planctônicas. Entretanto, o efeito sinérgico da terapia fotodinâmica seguida de ciprofloxacina no biofilme aumentou a redução bacteriana. Em biofilme para *S. aureus*, utilizando 50 µg/mL de AM, irradiação 22,4 J/cm² e a concentração de 15,625 µg/mL de antibiótico, tivemos uma redução de 61,80%. Para *E. coli*, houve uma erradicação bacteriana em todas as concentrações testadas na TFD combinada com antibiótico, tanto a irradiação de 11,2 J/cm², como a irradiação 22,4 J/cm². O crescimento bacteriano foi observado apenas na concentração mais baixa do antibiótico testada, de 0,125 µg/mL, em concentrações de 50 e 25 µg/mL de AM.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, azul de metileno, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, terapia combinada.

ABSTRACT

The occurrence of a variety of pathogens resistant to current antibiotics remains the major problem especially when bacterial infections are growing in biofilm. In this study, we propose the use of photodynamic therapy (PDT) as monotherapy and also associated with antibiotic therapy as an alternative treatment. The aim of this study was to analyze the effects of PDT mediated by methylene blue (MB) on *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) as biofilm and planktonic phase. Different concentrations of photosensitizer (400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 g/mL), and fluency of 2.8; 5.6; 11.2 22,4J/cm² were tested. We also carried out experiments that evaluated the synergistic effect of photodynamic therapy and antibiotic ciprofloxacin. The bactericidal effects with PDT as monotherapy were not statistically increased with the concentration of photosensitizer and bacteria in biofilms were less than affect in the planktonic phase. Although, the synergistic effect of photodynamic therapy on biofilms followed by ciprofloxacin amplified the bacterial reduction. In biofilm for *S. aureus*, using 50 µg/ml MB, irradiation 22,4 J/cm² and the concentration of 15,625 µg/mL of antibiotic, got a reduction of 61,80%. For *E. coli*, there was a bacterial eradication at all concentrations tested in PDT combined with antibiotic, both the irradiation 11,2 J/cm² as the irradiation 22,4 J/cm². Bacterial growth was observed only in the lowest tested concentration of the antibiotic, 0,125 µg/mL, at concentrations of 50 and 25 µg/mL MB.

Keywords: Photodynamic therapy, methylene blue, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, combined therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do azul de metileno	30
Figura 2: Diagrama de Jablonski	32
Figura 3: Representação da parede celular de bactéria gram-positiva	38
Figura 4: Representação da parede celular de bactéria gram-negativa	39
Figura 5: Luz LED vermelha (660nm) utilizada no teste	49
Figura 6: IrradLED [®] – biopdi, 660nm	49
Figura 7: Valores médios de log ₁₀ entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 2,8J/cm ²), nos experimentos mono-espécie para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	60
Figura 8: Valores médios de log ₁₀ entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 5,6J/cm ²) em suspensão, nos experimentos mono-espécie para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	61
Figura 9: Valores médios de log ₁₀ entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 5,6J/cm ²) em suspensão, nos experimentos múltipla-espécie para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	62
Figura 10: Valores médios de log ₁₀ entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 5,6J/cm ²) em biofilme, para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	66
Figura 11: Valores médios de log ₁₀ entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 11,2J/cm ²) em biofilme, para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	67
Figura 12: Valores médios de log ₁₀ entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 22,4J/cm ²) em biofilme, para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	68

Figura 13: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Escherichia coli* . A) Aumento de 2500x, grupo Controle. B) Aumento de 2000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²..... 71

Figura 14: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Escherichia coli* . A) Aumento de 3000x, grupo Controle. B) Aumento de 3000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²..... 71

Figura 15: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Escherichia coli* . A) Aumento de 4000x, grupo Controle. B) Aumento de 4000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²..... 72

Figura 16: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Escherichia coli* . A) Aumento de 6000x, grupo Controle. B) Aumento de 6000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²..... 72

Figura 17: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus* A) Aumento de 2500x, grupo Controle. B) Aumento de 2500x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²..... 73

Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus* A) Aumento de 4000x, grupo Controle. B) Aumento de 4000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²..... 73

Figura 19: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus* A) Aumento de 5000x, grupo Controle. B) Aumento de 5000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²..... 74

Figura 20: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus*
A) Aumento de 8000x, grupo Controle. B) Aumento de 8000x, grupo PDT
concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2
J/cm² 74

Figura 21: Valores médios de log₁₀ entre os grupos Controle e PDT com efeito
combinado da TFD e tratamento com Ciprofloxacina em suspensão para *S.*
aureus e *E. coli*. B e D: Antibiótico após a TFD. A e C: TFD após o tratamento
com antibiótico 75

Figura 22: Valores médios de log₁₀ entre os grupos Controle e PDT com efeito
combinado da TFD e tratamento com Ciprofloxacina em biofilme para *S. aureus* e
E. coli 78

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g/mL}$: Microgramas por mililitro

μL : Microlitros

$^{\circ}\text{C}$: Graus Célsius

$\mu\text{g/mL}$: Micrograma por mililitro

μm : Micrometros

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AM: Azul de Metileno

ATCC: *American Type Culture Collection*

B. cepacia: *Burkholderia cepacia*

CI: Conversão Interna

CIS: Conversão Inter-sistemas

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DBPs: Subprodutos de desinfecção carcinogênicos

DNA: Acido Desoxirribonucleico

EPS: Matriz Exopolissacarídica

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

E. coli: *Escherichia coli*

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FTS: Fotossensibilizador

g/L : Gramas por litro

g/mol : Grama por mol

HOMO: *Highest Occupied Molecular Orbital*

J/cm^2 : Joules por centímetro quadrado

Laser: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LED: *Light Emitting Diode*

LPS: Lipopolissacarídeos

LUMO: *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

M: Molar

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MF: *Mc Farland*

MIC: Concentração Inibitória Mínima

mL: Mililitros

mW: Miliwatt

nm: Nanômetros

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PDT: *Photodynamic Therapy*

pH: Potencial Hidrogeniônico

PVC: Cloreto de Polivinil

RPM: Rotações por minuto

S₀: Estado fundamental singleto

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

TFD: Terapia Fotodinâmica

TSA: *Trypticase Soy Agar*

TSB: *Tryptic Soy Broth*

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

XTT: 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]2H-tetrazolium-carboxanilida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
1.1. Terapia Fotodinâmica	28
1.1.1. Histórico da Terapia Fotodinâmica	28
1.1.2. Fotossensibilizador Azul de Metileno	29
1.1.3. Fontes de Luz	31
1.1.4. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica	31
1.1.5. Algumas aplicações da Terapia Fotodinâmica	33
1.2. Efeito sinérgico da Terapia Fotodinâmica e Ciprofloxacino	35
1.3. Célula Bacteriana	37
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	40
1.3.2. Biofilme	41
2. OBJETIVOS	45
2.1. Objetivo Geral	45
2.2. Objetivos Específicos	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1. Preparação dos meios de cultura	46
3.2. Reativação e cultivo das cepas	46
3.3. Curva de crescimento bacteriano	47
3.4. Desenvolvimento do biofilme	47
3.5. Fotossensibilizador	48
3.6. Fonte de luz	48
3.7. Experimentos em Fase Planctônica (suspensão)	50
3.8. Avaliação da viabilidade celular	51
3.9. Experimentos em Biofilme	52
3.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53

3.11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	54
3.12. Avaliação do Sinergismo em suspensão: Antibiótico após a TFD	54
3.13. Avaliação do Sinergismo em suspensão: TFD após o Antibiótico	55
3.14. Avaliação do Sinergismo em biofilme: Antibiótico após a TFD	56
3.15. Análise Estatística dos Resultados	57
4. RESULTADOS	58
4.1. Curva de crescimento bacteriano	58
4.2. Experimentos em fase planctônica (suspensão)	59
4.3. Ensaio do XTT	64
4.4. Experimentos em Biofilme	65
4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura	70
4.6. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	75
4.7. Efeito combinado da TFD e tratamento com Ciprofloxacina em suspensão	75
4.8. Efeito combinado da TFD e tratamento com Ciprofloxacina em biofilme.....	77
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAS	92
8. ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Fotodinâmica

1.1.1. Histórico da Terapia Fotodinâmica

A utilização da luz como agente terapêutico tem sido empregada no tratamento de doenças desde a Antiguidade, pois há mais de 4000 anos atrás os egípcios tratavam vitiligo através da ingestão de plantas e exposição à luz do sol. Entretanto, a técnica de Terapia Fotodinâmica começou a ser empregada com sistemática científica somente bem recentemente. O médico grego Heródoto enfatizava a importância da exposição à luz solar para restauração da saúde (VAN DER MEULEN et al., 1997).

O conceito de morte celular induzido pela interação da luz e substâncias químicas é reconhecido há mais de cem anos. No ano de 1900, as primeiras experiências com tratamento fotodinâmico foram relatadas por Oscar Raab, um estudante de medicina, e seu professor, Herman Von Tappeiner, em Munique. Em 1900, Oscar Raab descreveu a ação do corante acridina sobre o protozoário *Paramécio*, demonstrando que no escuro não havia efeito enquanto que na presença de luz solar observava-se a morte deste protozoário. Durante uma tempestade com ocorrência de muitos raios houve alteração das condições luminosas do ambiente no momento dos experimentos, o que levou os autores a postular que esse efeito era causado pela transferência da energia da luz para a substância química. Nem a luz ou o corante isoladamente tiveram qualquer efeito aparente sobre os *Paramécios*, mas juntos foram altamente citotóxicos. A partir deste fato, que Von Tappeiner denominou de Ação Fotodinâmica, outros experimentos foram realizados com novos fotossensibilizadores. (PELOI, 2007; VOHRA et al., 2015).

A década de 90 marcou o recomeço da utilização da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana. A partir de 1992, Wilson et al., utilizaram a terapia fotodinâmica em bactérias orais. E finalmente, a partir de 2000, estudos clínicos “*in vivo*” começaram a ser realizados para tratamento da cárie dentária e biofilmes supra e subgengivais (ACKROYD et al., 2001).

A terapia fotodinâmica, principalmente a antimicrobiana, mostrou um grande avanço na última década. A constante busca por novos fotossensibilizadores e novas fontes de luz tende a ampliar ainda mais sua eficiência e suas aplicações clínicas (ACKROYD et al, 2001).

1.1.2. Fotossensibilizador Azul de Metileno

A essência da TFD provém da utilização de um fotossensibilizador com banda de absorção ressonante com o comprimento de onda de uma fonte de luz, objetivando provocar a necrose celular ou morte microbiana. Para Wainwright (1998) o agente fotossensibilizador ideal deve apresentar como características a estabilidade fisiológica, eficiência fotoquímica, seletividade pela célula alvo e mínimo efeito tóxico às células normais. Considerando que as bactérias possuem uma pequena carga elétrica negativa, teoricamente o fotossensibilizador ideal deveria ser catiônico (YAMADA JUNIOR, 2007).

No final do século XIX, o cientista alemão Ehrlich descreveu as propriedades do azul de metileno (AM), um composto tricíclico que mais tarde se tornaria o núcleo de um grupo de compostos derivados que, juntos, constituem as fenotiazinas. Os fenotiazínicos são corantes com grande propensão à formação de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio). O modo de ação dos fotossensibilizadores contra espécies microbianas, tanto aeróbias quanto anaeróbias, é mediado pelo oxigênio singlete, sem, no entanto, ser seletivo a elas (WAINWRIGHT et al., 1998).

O azul de metileno, fenotiazina heteroaromática tricíclica, com fórmula molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S$ e massa molar 319.85 g/mol, é um corante catiônico bem estabelecido como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica, esta classe de corantes exibe intensa absorção em comprimentos de onda de 600 a 660nm, região do espectro vermelho, radiação esta favorável a TFD por estar dentro da “janela foto-terapêutica” devido a sua eficiência quanto à penetração da luz em tecidos biológicos (ELGHNIJI et al., 2014; YAMADA JUNIOR, 2007). As bactérias

gram-positivas são muito mais sensíveis à ação fotodinâmica em relação às gram-negativas.

O azul de metileno, figura 1, é uma molécula que tem desempenhado importante papel em microbiologia e farmacologia. Dentre as pesquisas sobre o seu uso isolado inclui-se a malária e a esquisofrenia, sendo que já em 1891 Ehrlich empregou o AM com sucesso no tratamento da malária (AMARAL et al., 2010).

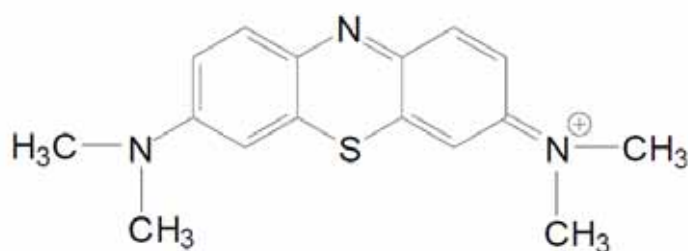


Figura 1: Estrutura do azul de metileno

Estudos recentes com o azul de metileno mostraram que este tem propriedades fotossensibilizantes com aplicações para a terapia fotodinâmica. O azul de metileno, além de barato e absorver na região da luz vermelha, produz espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido e oxigênio singlete (AMARAL et al., 2010; ELGHNIJI et al., 2014).

Pesquisas demonstraram que os fotossensibilizadores derivados da fenotiazina atuam em DNA e na membrana externa das espécies gram-negativas, fotossensibilizando tanto estas bactérias quanto as gram-positivas. Nas bactérias gram-negativas o azul de metileno, por ter um baixo peso molecular, se difunde através das porinas. Nas gram-negativas, a difusão é favorecida pela carga positiva do azul de metileno, que predominantemente interage com macromoléculas aniônicas de lipopolissacarídeo presentes na parede celular bacteriana (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003).

Segundo Fimple et al. (2008), aumentando a concentração do azul de metileno e a densidade de energia da luz (J/cm^2), há um aumento na destruição bacteriana. Os principais alvos desses fotossensibilizadores parecem ser

componentes do DNA e da membrana celular, causando aumento de sua permeabilidade.

1.1.3. Fontes de Luz

A terapia fotodinâmica pode ser realizada com a utilização de diferentes fontes de luz como, por exemplo, os Lasers (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e LED (*Light Emitting Diode*). Atualmente, com o desenvolvimento de novas tecnologias, as fontes de luz que se mostram eficientes e financeiramente viáveis para a utilização na terapia fotodinâmica são os LED. Por apresentarem banda espectral estreita, não causam aquecimento exacerbado, quando densidades de energia apropriadas são utilizadas (YAMAMOTO et al., 2013).

Para o uso em Terapia Fotodinâmica os LED oferecem vantagens quanto ao custo e a área que podem irradiar. A junção de vários LED permite supor que o sistema pode ser empregado, com maior potência luminosa, melhorando a eficiência dos tratamentos e, portanto, trazendo novas possibilidades do uso da TFD. Outro fator importante a ser considerado é o grande número de tipos de LED disponíveis no mercado (YAMAMOTO et al., 2013).

1.1.4. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

A interação da luz com a matéria é a base dos processos fotoquímicos, que ocorrem após a absorção de fótons por moléculas fotoativas, promovendo um elétron do orbital HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) para o LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), transição do estado fundamental para o excitado. Os processos moleculares que ocorrem no estado excitado são representados pelo diagrama de Jablonski (Figura 2), dentre os quais se têm a conversão interna (CI), fluorescência, conversão inter-sistemas (CIS) e a fosforescência. Quando uma molécula é excitada para o segundo estado excitado ela rapidamente relaxa por CI (a energia interna é perdida por colisão) para o

primeiro estado excitado, a partir do qual retorna ao fundamental novamente por CI ou por emissão de fluorescência. Outro processo competitivo para desativação da espécie excitada é a CIS, transição não radioativa entre dois níveis vibracionais de mesma energia e estados eletrônicos de multiplicidades diferentes. O decaimento do estado tripleto para o fundamental singlete S_0 pode ocorrer tanto por emissão fosforescente quanto por colisões. Outros mecanismos de desativação do estado excitado são: transferência de carga intramolecular, mudança conformacional, e interação no estado excitado com outras moléculas (transferência de elétron, transferência de próton, transferência de energia, formação de excímeros.) (OGBODU et al.; 2015; VALEUR, 2002).

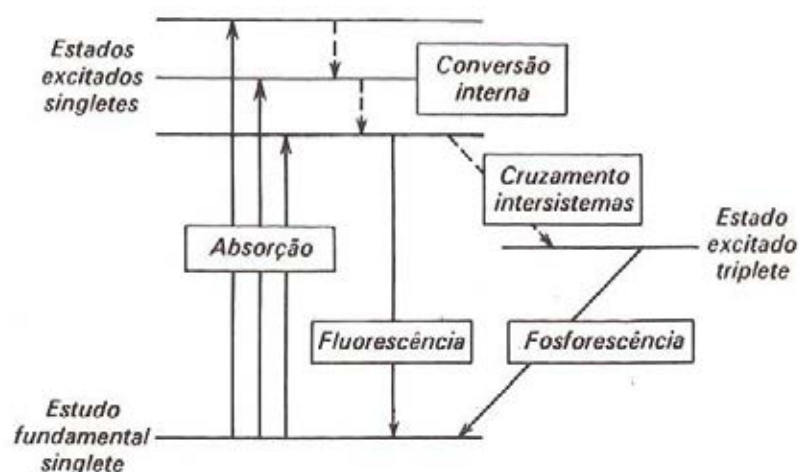


Figura 2: Diagrama de Jablonski (BUYTAERT et al., 2007)

A interação com substratos biológicos pode ocorrer via dois mecanismos principais, o mecanismo tipo I e o mecanismo tipo II (DOLMANS, FUKUMURA, JAIN, 2003).

Na TFD do tipo I a foto-oxidação ocorre pela transferência de elétron entre o estado excitado tripleto do FTS e o substrato. Esse processo leva a formação de íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em ERO. Os processos classificados como tipo II envolvem a transferência de energia do excitado tripleto do FTS para o oxigênio molecular, com a geração de oxigênio singlete (MACHADO, 2000).

No entanto, apesar das definições serem separadas, os mecanismos que envolvem as reações do tipo I e II ocorrem simultaneamente, e a razão entre ambos depende de diversos parâmetros, principalmente em relação às características e propriedades físico-químicas do FTS em solução, concentração de substrato e oxigênio, assim como a afinidade de ligação do FTS com o substrato (DOLMANS, FUKUMURA, JAIN, 2003). Contudo, o mecanismo comumente assumido como principal para a TFD passa pela geração do oxigênio singlete (MACDONALD, DOUGHERTY, 2001).

Devido à alta reatividade e pequeno tempo de vida das ERO e do oxigênio singlete, somente os substratos biológicos que estão próximos a área de produção dessas espécies são diretamente afetadas pela TFD. Dessa forma, a localização do FTS torna-se um fator primordial em estudos de liberação de fármaco para os tecidos doentes. Podemos ressaltar a importância da seletividade promovida pela sensibilização localizada destes fármacos. A ligação dos FTS com vários componentes biológicos pode influenciar em seu transporte, tempo de permanência em circulação na corrente sanguínea e sua retenção celular (DOLMANS, FUKUMURA, JAIN, 2003; OGBODU et al.; 2015).

A TFD tem sido aplicada na desinfecção da água, do sangue, na aplicação sobre parasitas patogênicos humanos, na odontologia em doenças periodontais e em micro-organismos da cárie, em ambientes hospitalares, em lesões de pele infectadas, e também no tratamento antimicrobiano de alimentos (LEI et al., 2014; PERUSSI, 2007).

1.1.5. Algumas aplicações da Terapia Fotodinâmica

Apesar do considerável progresso que tem sido obtido nos tratamentos de infecções, é preocupante o crescente número de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos no mundo todo, levando ao fim de um período chamado de “a era do antibiótico”. Assim, é importante se encontrar novas técnicas antimicrobianas contra a qual a bactéria não seja capaz de desenvolver resistência (DEMIDOVA, HAMBLIM, 2005). A TFD tem sido proposta como uma

destas terapias alternativas, sendo efetiva contra vírus, bactérias e fungos, especialmente em infecções localizadas. Em contraste com a TFD de câncer, onde o FTS usualmente é injetado na corrente sanguínea e se acumula no tumor, a TFD pode ser feita por aplicação local do FTS na área infectada por aplicação tópica, injeção intersticial ou aerosol. Foi mostrado que, *in vivo*, TFD reduz tremendamente os micro-organismos com pequeno efeito nos queratinócitos, constituindo-se assim uma alternativa segura para o tratamento antimicrobiano convencional (HAMBLIM, HASAN, 2004). A inativação de micro-organismos pela fotossensibilização é tipicamente um processo multi-alvo, conseqüentemente, a seleção de patógenos foto-resistentes é muito improvável e não foi observada experimentalmente (MAISCH, 2005)

O Tratamento fotodinâmico é um dos pouquíssimos métodos de desinfecção conhecidos até o momento, que pode ser bem sucedido em concentrados de células vermelhas do sangue. Devido ao advento da AIDS, tornou-se necessário a melhoria das técnicas de avaliação do sangue de doadores. Entretanto, devido à existência de períodos onde agentes infecciosos não podem ser detectados, é de grande importância a habilidade de desinfetar o sangue e seus derivados: plasma, plaquetas e células vermelhas do sangue. Torna-se necessário o uso de um procedimento padrão para possibilitar a desinfecção do sangue e seus produtos. Agentes fotodinâmicos baseados no núcleo fenotiazínico oferecem um excelente perfil com baixa toxicidade associada e efeitos colaterais no plasma. Azul de metileno é atualmente empregado em várias agências européias de desinfecção do plasma (WAINWRIGHT, 2002).

A purificação de água contaminada usando radiação solar na presença de fotossensibilizador e oxigênio dissolvido pode levar tanto à degradação de pesticidas quanto à morte de micro-organismos. Acher e colaboradores (1997) usaram AM dissolvido homoganeamente em água para experimentos de desintoxicação em condições de laboratório e em uma escala de planta piloto. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são patógenos altamente infecciosos que geralmente provocam doenças gastrointestinais e doenças infecciosas em humanos, com conseqüências potencialmente graves. Grandes interesses no desenvolvimento e implementação de vários materiais e métodos para a

desinfecção de bactérias patogênicas em água tem sido solicitado, com a preocupação crescente para a saúde pública e a qualidade do meio ambiente (KUN et al., 2011).

Os métodos e tecnologias usados para controle bacteriano em alimentos nem sempre são suficientemente eficientes e inteiramente isentos de danos ao homem e ao ambiente. As bem conhecidas tecnologias não térmicas podem alterar a estrutura de proteínas e polissacarídeos, causando mudanças na textura, aparência física e funcionalidade dos alimentos. Além disso, altas doses de radiação não ionizante podem causar leves mudanças de cor nas carnes. A fotossensibilização tem sido proposta como um método de inativação de micro-organismos patogênicos com bom custo-benefício e ecologicamente correto, uma vez que envolve dois elementos não tóxicos, corante e luz não ionizante em ambiente oxigenado, induzindo destruição dos micro-organismos, constituindo-se em uma promissora tecnologia biofotônica (LUKSIENE, 2005).

1.2. Efeito sinérgico da Terapia Fotodinâmica e ciprofloxacina

A susceptibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos e aos fotossensibilizadores torna-se reduzida quando os mesmos estão organizados em biofilme, já que este oferece vantagens para os micro-organismos, como aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e maior proteção contra o sistema imune do hospedeiro. O aumento de resistência a antibióticos levou ao aumento nas taxas de infecção (DONNELLY et al., 2008).

O Cloridrato de Ciprofloxacino, antibiótico sintético pertencente ao grupo dos quinolônicos, tem mecanismo de ação decorrente do bloqueio da função da DNA-girase, resultando em alto efeito bactericida sobre amplo espectro de micro-organismos. É efetivo, *in vitro*, contra os patógenos gram-negativos, inclusive *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e contra patógenos gram-positivos, tais como *Staphylococcus* e *Streptococcus*. O Cloridrato de Ciprofloxacino inibe a DNA-girase bloqueando o metabolismo bacteriano, uma vez que informações

vitais não podem mais ser lidas a partir do cromossomo bacteriano (SOUZA et al., 2004).

Estudos realizados por Ceri e colaboradores (1999) mostraram que o biofilme formado por *E. coli* mostrou ser mais resistente que a fase planctônica ao antibiótico ciprofloxacina. A MIC (concentração inibitória mínima) para o biofilme foi 1000 vezes maior que a MIC para a forma planctônica, ou mais. Já para *S. aureus*, A MIC para o biofilme foi de 100 a 1000 vezes maior que a MIC para a forma planctônica.

Embora seja bem conhecido que o uso de grandes quantidades de antibiótico na prática clínica é indesejável, uma vez que dão origem à seleção de cepas resistentes, pouco esforço tem sido feito para empregar a TFD a fim de aumentar a eficácia de tais antibióticos, reduzindo a dose necessária para combater infecções microbianas. Em um esforço para melhor combater essas defesas, pesquisas recentes têm sido voltadas especialmente para disruptores de biofilme e outros métodos de tratamento alternativo como a terapia fotodinâmica antimicrobiana, e estudos demonstraram efeitos inibitórios sinérgicos quando a TFD foi combinada com a terapia antibiótica.

O pré-tratamento dos biofilmes de *S. aureus* com TFD e, em seguida, a aplicação de vancomicina em concentrações inferiores a MIC faz com que haja uma desintegração da matriz do biofilme, permitindo a morte de bactérias quase totalmente (DI POTO et al., 2009). Malik e Nitzan (1995) testaram a combinação de diferentes porfirinas naturais e antibióticos para inativar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mostrando que na presença de porfirinas e antibióticos, a fotoinativação bacteriana foi maior do que quando a TFD foi utilizada sozinha.

Neste estudo, o efeito sinérgico da terapia fotodinâmica e ciprofloxacina foi proposto, pois, como dito anteriormente, as bactérias gram-positivas e bactérias em suspensão são muito mais sensíveis à ação da terapia fotodinâmica em relação às bactérias gram-negativas e bactérias em biofilme. Para explicitar estas diferenças apresentaremos o tópico 1.3.

1.3. Célula Bacteriana

As bactérias são micro-organismos unicelulares e variam em espessura entre 0,25 a 1,5 μ m, e em comprimento entre 1 e 10 μ m. Podem ser encontradas normalmente na boca, pele, intestino e também nos brônquios, e não provocam doença. Apresentam uma membrana plasmática recoberta por uma parede celular. Diferente das células eucarióticas, as bactérias não possuem organelas delimitadas por membranas (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2004). A parede celular das bactérias é uma estrutura rígida, formada por um complexo mucopeptídico, que dá forma à bactéria. A cápsula, que está presente principalmente em bactérias patogênicas é formada por polissacarídeos e tem consistência de muco. (MÜLLER, 2006).

A coloração de Gram, desenvolvida em 1884 pelo médico dinamarquês Christian Gram, é um dos métodos de coloração mais aplicados em Bacteriologia. Trata-se de um método de coloração diferencial, dado que permite dividir as bactérias em duas classes, gram-positivas (Figura 3) e gram-negativas (Figura 4). É, pois, uma ferramenta essencial na classificação e diferenciação de bactérias. Esta diferenciação baseia-se na diferente estrutura e composição, nomeadamente no diferente teor lipídico, da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas (BARUDIN et al. 2014; TORTORA et al., 2005).

A parede celular das bactérias gram-negativas tem um teor em lípidos elevado na sua membrana externa, para além de uma camada fina de peptidoglicano que circunda a membrana plasmática. Em consequência, durante o passo de diferenciação pelo álcool, parte dos lípidos é dissolvido pelo álcool, formando-se poros na parede por onde o corante primário (violeta de cristal) sai das células. Estas células ficam transparentes após o passo de diferenciação pelo álcool, sendo posteriormente coradas com o corante secundário (safranina). A parede celular das bactérias gram-positivas é constituída principalmente por uma camada grossa de peptidoglicano e o seu teor em lípidos é nulo ou muito baixo (em poucas espécies bacterianas). A camada de peptidoglicano atua, assim, como uma barreira impedindo a saída do corante primário e estas células ficam coradas de violeta escuro (TORTORA et al., 2005; YADAV et al., 2014).

Estudos destinados a comparar a eficiência da Terapia Fotodinâmica (TFD) entre bactérias gram-positivas e gram-negativas têm mostrado melhores resultados sobre bactérias gram-positivas, pelas dificuldades do fotossensibilizador (FTS) penetrar nas células bacterianas gram-negativas. A parede celular das bactérias gram-positivas é formada por uma camada porosa de peptidoglicano e ácido lipoteicóico, permitindo que o fotossensibilizador possa atravessá-la. As paredes celulares das bactérias gram-positivas contêm ácidos teicóicos, que consistem principalmente de um álcool (como o glicerol ou ribitol) e fosfato. Existem duas classes de ácidos teicóicos: ácido lipoteicóico, que atravessa a camada de peptidoglicano e está ligado à membrana plasmática, e ácido teicóico da parede, que está ligado à camada de peptidoglicano. Devido à sua carga negativa (proveniente do grupo fosfato), os ácidos teicóicos podem se ligar e regular o movimento de cátions (íons positivos) para dentro e fora da célula. Eles também podem assumir um papel no crescimento celular, impedindo a ruptura extensa da parede e a possível lise celular. É sabido que as bactérias gram-positivas possuem elevada susceptibilidade aos agentes antimicrobianos que pode ser elucidada pela membrana citoplasmática, que apesar de espessa é única e relativamente permeável (TRABULSI et al., 1999).

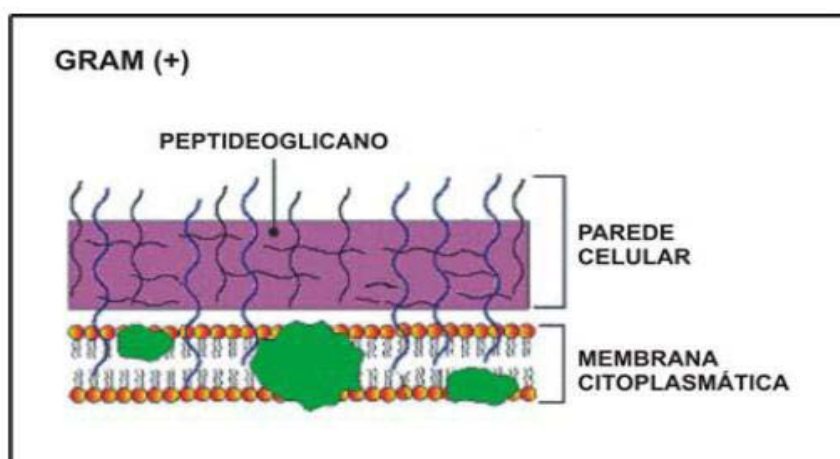


Figura 3: Representação da parede celular de bactéria gram-positiva (FERRONATO, SALMASO, 2010).

As paredes celulares das bactérias gram-negativas consistem em uma camada de peptidoglicano e uma membrana externa. O peptidoglicano está ligado a lipoproteínas (lipídeos covalentemente ligados a proteínas) na membrana

externa e está no periplasma, um fluido semelhante a um gel, entre a membrana externa e a membrana plasmática. Como as paredes celulares das bactérias gram-negativas contêm somente uma pequena quantidade de peptidoglicano, são mais suscetíveis ao rompimento mecânico. O periplasma possui enzimas e proteínas, como as enzimas hidrolíticas (proteases, nucleases e lípases) responsáveis pela quebra de macromoléculas, às quais a membrana citoplasmática é impermeável. Produzem, assim, moléculas menores que podem ser transportadas para o interior da bactéria. Também são encontradas no periplasma enzimas capazes de inativar drogas, tornando as bactérias resistentes a elas, como as betalactamases que inativam penicilinas. A membrana externa da célula gram-negativa consiste em lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolídeos. A membrana externa tem várias funções especializadas. Sua forte carga negativa é um fator importante na evasão da fagocitose e nas ações do complemento (causa lise de células e promove a fagocitose), dois componentes das defesas do hospedeiro. A membrana externa também não fornece uma barreira para todas as substâncias no ambiente, pois os nutrientes devem atravessá-la para garantir o metabolismo celular. Entretanto, a membrana externa das bactérias gram-negativas pode constituir uma barreira adicional à entrada de alguns antibióticos, sais de bile, enzimas digestivas, lisozimas e muitos corantes. Parte da permeabilidade parcialmente seletiva é devida a proteínas na membrana, denominadas porinas, que formam canais, e é regulada pelo tamanho das moléculas (MÜLLER, 2006, TORTORA et al., 2005; YADAV et al., 2014).

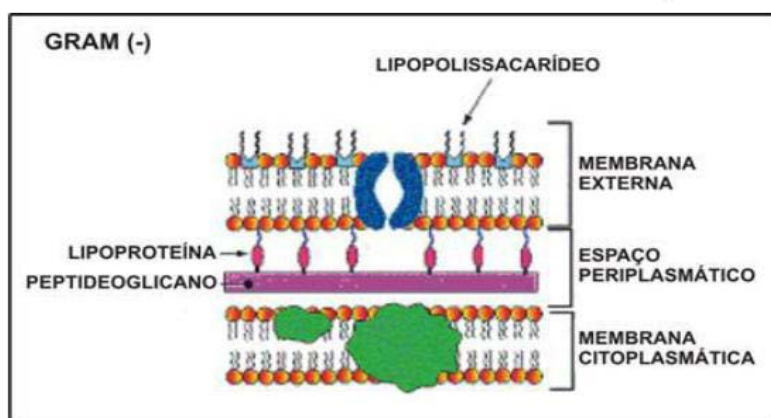


Figura 4: Representação da parede celular de bactéria gram-negativa (FERRONATO, SALMASO, 2010).

Apesar do considerável progresso que tem sido obtido nos tratamentos de infecções, é preocupante o crescente número de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos no mundo todo. São sugeridos tratamentos alternativos não só para controlar infecções por micro-organismos resistentes à antibioticoterapia, mas também para controlar qualquer tipo de infecção. Visto que a Terapia Fotodinâmica tem grande eficácia em induzir morte celular em procedimentos experimentais, muitos estudiosos também vêm aplicando tal terapia para induzir a morte de micro-organismos patogênicos (MANYAK, 1990; WAINWRIGHT et al., 1998; BARUDIN et al. 2014).

O aparecimento de uma grande variedade de patógenos resistentes aos agentes químicos faz com que haja um grande aumento da morbidade de infecções que eram facilmente tratadas no passado. Assim, é importante o desenvolvimento de novas técnicas antimicrobianas contra a qual esses micro-organismos não possuam capacidade de desenvolver resistência (MANYAK, 1990).

1.3.1. *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

O *Staphylococcus aureus* pertence ao gênero *Staphylococcus*, família *Micrococcaceae*, e apresenta-se como coco gram-positivo, não esporulado, imóvel, catalase positivo e anaeróbio facultativo, ou seja, podem viver em meios aeróbios, usando oxigênio, ou anaeróbios através de fermentação, mas crescem muito mais rápido aerobicamente. São bactérias esféricas que, à microscopia, aparecem como “cachos de uva”. O *S. aureus* é uma bactéria oportunista que coloniza a pele de 20 a 30% da população, é capaz de causar uma multiplicidade de doenças no homem e estão entre os maiores agentes causadores de infecção comunitária e hospitalar em todo o mundo (KIM et al., 2015; GOUVEIA, 2010).

Escherichia coli é o mais comum e mais importante membro do gênero *Escherichia*. É uma bactéria gram-negativa, que assume a forma de bacilo, anaeróbia facultativa, oxidase negativo, não formadores de esporos, pertencente à Família *Enterobacteriaceae*. A grande maioria dessas amostras é pertencente à microbiota intestinal dos seres humanos. Está associado a uma variedade de

doenças, podendo causar infecções intestinais e infecções extra-intestinais, como por exemplo infecções em feridas (GANGCUANGCO et al., 2015; MURRAY et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

Estudos relatam a formação do biofilme de linhagens de *Escherichia coli* patogênicas nas mais variadas superfícies, desde propileno até dispositivos cirúrgicos. Dentre as bactérias contaminantes de alimentos e relatadas como agentes causadores de doenças veiculadas por alimentos, pode-se mencionar *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Em estudos sobre a manutenção da qualidade e segurança de alimentos pode ser observada a preocupação com a formação de biofilmes microbianos em superfícies de equipamentos de aço inoxidável, cuja impregnação é capaz de comprometer a segurança e a qualidade dos alimentos, além de auxiliar no processo de corrosão de equipamentos e utensílios de aço inoxidável (MILLEZI, 2012). De acordo com Soto et al. (2007), biofilmes formados por essa bactéria podem produzir hemolisina causando inflamação nos dispositivos cirúrgicos e como consequência, dificultando ainda mais o tratamento.

Escherichia coli e *Staphylococcus aureus* quando associados são patógenos altamente infecciosos que geralmente provocam doenças gastrointestinais e doenças infecciosas em seres humanos, com consequências potencialmente graves. Grandes interesses no desenvolvimento e implementação de vários materiais e métodos para desinfecção destas bactérias patogênicas em água têm sido solicitado com a preocupação crescente para a saúde pública e a qualidade ambiental. Os métodos tradicionais como desinfetantes, cloro, ozônio, dióxido de cloro e cloraminas, podem produzir subprodutos de desinfecção carcinogênicos (DBPs). Desta forma, métodos alternativos de desinfecção são desejados (KIM et al., 2015; SHANG et al. 2011).

1.3.2. Biofilme

O biofilme pode ser definido como uma comunidade, única ou polimicrobiana, firmemente aderida a uma superfície biótica ou abiótica,

englobada por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos produzidos pelas próprias bactérias. Essas comunidades podem se formar em horas e, por serem tolerantes a agentes microbianos, tanto medicamentos, quanto desinfetantes, são difíceis de serem removidas (CICCIO, et al., 2015; UNB, 2009).

O estilo de vida microbiano na maioria dos ambientes naturais está associado a formação de biofilmes múltiplas espécies (ARMITAGE, 2004). No entanto, um biofilme também pode ser constituído por apenas uma espécie de bactéria. Os biofilmes constituídos de uma única espécie existem em uma variedade de infecções e implantes médicos. Mas a predominância na maioria dos ambientes é o biofilme múltiplas espécies (D'ACUNTO et al., 2015; SUNTHARALINGAM; CVITKOVITCH, 2005).

Os biofilmes são formados sobre superfícies. A adesão é facilitada pela excreção microbiana de uma matriz de exopolissacarídeos, algumas vezes referida como glicocálix. Nesse microambiente são formadas microcolônias, bem como canais de água entre e em volta das mesmas. Tal sistema de irrigação que se localiza em volta das microcolônias tem sido correlacionado com um sistema circulatório primitivo, no qual nutrientes são trazidos para dentro e produtos tóxicos são carregados para fora. As células microbianas suspensas em líquidos, que não estão em biofilmes, apresentam-se em estado planctônico (JAY, 2005; NAN; REN, 2015).

Um biofilme maduro pode levar de algumas horas até várias semanas para desenvolver-se, dependendo das condições de seu meio ambiente. A adesão de uma bactéria a uma superfície abiótica é, geralmente, mediada por interações inespecíficas (forças hidrofóbicas), enquanto que a adesão a um tecido vivo ou desvitalizado é normalmente mediada por mecanismos moleculares específicos de "ancoragem", nomeadamente através de lectinas, ligandos ou adesinas. A adesão primária de um organismo a uma superfície é um processo reversível que envolve a aproximação deste à superfície, de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade. Quando o micro-organismo atinge uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do

balanço final entre forças atrativas e repulsivas geradas entre as duas superfícies. A repulsão entre duas superfícies pode ser ultrapassada através de interações moleculares específicas mediadas por adesinas, que são proteínas localizadas em estruturas que irradiam da superfície celular. Foi ainda demonstrado que os mecanismos de mobilidade das células, dependentes de pili superficiais e do flagelo polar são fundamentais no processo de iniciação de um biofilme (IST, 2008; LEE et al., 2014).

Após a adesão primária, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeos que complexam os materiais da superfície e os receptores específicos localizados nos flagelos, pili ou fímbrias. Esses polissacarídeos extracelulares, com carga ou neutros, não só permitem a adesão da célula à superfície, mas também atuam como sistemas trocadores de íons, para captura e concentração de nutrientes da água. À medida que os nutrientes se acumulam, as células pioneiras se reproduzem e a colônia se estabelece originando microcolônias. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. As microcolônias também sintetizam matriz exopolissacarídica (EPS) e passam a atuar como substrato para a aderência de micro-organismos denominados colonizadores secundários, que podem se aderir diretamente aos primários ou promoverem a formação de coagregados com outros micro-organismos e então se aderirem aos primários (IST, 2008; KYAW, 2008; LEE et al., 2014).

Posterior à adesão irreversível da bactéria à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme. A densidade e complexidade do biofilme aumenta à medida que as células se dividem (ou morrem) e os componentes extracelulares gerados pelas bactérias interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar o glicocálix. Nesta fase, os biofilmes tornam-se altamente hidratados, formando-se estruturas abertas compostas por 73 a 98% (75-95%) de material não celular, incluindo exopolissacarídeo e canais por onde circulam os nutrientes. Este conteúdo aquoso torna o biofilme com aspecto gelatinoso e escorregadio. A rede de polímeros capta outras células e seus resíduos, ou seja, os colonizadores secundários, agregando mais volume ao biofilme. O biofilme nesta fase apresenta alta atividade metabólica (IST, 2008;

MEDONLINE, 2008). Quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas do biofilme começam a liberar células em estado planctônico, que se podem rapidamente dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em outros locais. É extremamente difícil a remoção de biofilmes já constituídos, em função da forte adesão gerada pelas bactérias à superfície (KYAW, 2008; NAN; REN, 2015).

Segundo Donnelly et al. (2008) a susceptibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos e aos fotossensibilizadores torna-se reduzida quando os mesmos estão organizados em biofilme, pois este oferece vantagens para os micro-organismos, como aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e maior proteção contra o sistema imune do hospedeiro.

A adesão bacteriana e a conseqüente formação de biofilme possuem um papel importante na patogênese, representando um grande obstáculo para a saúde humana, sendo causa comum de infecções persistentes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Uma das mais importantes características dos biofilmes bacterianos é a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos. Bactérias que vivem nessas comunidades são frequentemente de 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica, indicando que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência de bactérias planctônicas aos mesmos agentes (DAVIES, 2003). Dessa maneira, micro-organismos que apresentam suscetibilidade a determinados antimicrobianos em testes laboratoriais convencionais são, na verdade, altamente resistentes aos mesmos, quando na forma de biofilmes e, como consequência, doenças envolvendo biofilmes são geralmente crônicas e difíceis de tratar (ACKER et al., 2014; STEWART, 2002).

É neste contexto que, na busca incansável de alternativas para ação antimicrobioana no combate a micro-organismos resistentes, se insere a terapia fotodinâmica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica *in vitro* na redução bacteriana de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade no escuro do fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25µg/mL.
- Avaliar a redução via TFD nas cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 em suspensão e biofilme (mono-espécie).
- Avaliar o efeito da PDT da associação de *S. aureus* e *E. coli* (múltipla-espécie) em suspensão e biofilme.
- Avaliar a atividade metabólica dos biofilmes através do teste de redução do XTT.
- Analisar possíveis mudanças morfológicas após a Terapia Fotodinâmica por técnica de microscopia de varredura.
- Avaliar o efeito sinérgico da TFD e antibiótico ciprofloxacina em suspensão e biofilme para *S. aureus* e *E. coli*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação dos meios de cultura

Para a preparação das placas de agar, o meio TSA foi preparado utilizando 40g/L de *Trypticase Soy Agar* para 1000mL de água destilada. O meio foi autoclavado e deixado resfriar para verter nas placas. Este agar foi utilizado para preparar placas de cultura convencionais e para preencher os poços das placas de 96 poços com o volume de 150 μ L de meio por poço para o desenvolvimento dos biofilmes múltipla-espécie (*S. aureus* e *E coli*) e mono-espécie (*S. aureus* ou *E coli*). Após a geleificação do agar, as placas foram devidamente embaladas em filme de PVC e mantidas em geladeira por no máximo 7 dias antes da utilização. Para a preparação do TSB (*Tryptic Soy Broth*), o meio TSB foi preparado utilizando 30g/L de *Tryptic Soy Broth* para 1000mL de água destilada. O meio foi autoclavado e mantido em geladeira por no máximo 7 dias antes da utilização.

O agar Mueller Hinton, foi preparado utilizando 38g de pó em 1 litro de água destilada. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. O caldo Mueller Hinton foi preparado dissolvendo-se 21 gramas em 1000mL de água destilada. O meio também foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

3.2. Reativação e cultivo das cepas

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Manguinhos, RJ, Brasil.

As cepas foram inoculadas com auxílio de uma alça estéril em um tubo de ensaio contendo 5mL de TSB. O tubo foi incubado a 37°C por 24 horas e após este período foi observada uma turvação no meio de cultura indicando viabilidade microbiana. Após a reativação das cepas, foi feita a semeadura pela técnica de estrias, para obtenção de colônias isoladas, em placas de TSA. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foram selecionadas 3 a 5

colônias as quais foram transferidas para um tubo com 2,0mL de TSB. O tubo foi incubado a 37°C por 24 horas.

O inóculo bacteriano foi preparado em caldo TSB, de modo a produzir uma leve turvação, de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de *McFarland*. Para o ajuste do inóculo, foram pipetados 200µL de caldo TSB em um poço de microplaca e 200µL da suspensão bacteriana em outro poço. A absorbância foi medida utilizando Espectrofotômetro (Biotek®) com comprimento de onda de 620nm. A leitura do intervalo entre as duas absorbâncias deve variar de 0,08 a 0,10, que corresponde à escala 0,5 de *McFarland* (isto significa que há aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

3.3. Curva de crescimento bacteriano

Foi realizada a curva de crescimento de acordo com Calabrese (2012). Foi preparada a suspensão bacteriana na escala 0,5 de MF, como descrito anteriormente. Para o branco, foi utilizado o caldo Mueller Hinton. A partir da suspensão bacteriana, foi pipetado 200µL em um poço de microplaca de 96 poços e realizada a leitura em espectrofotômetro a 620nm, e o tubo com a suspensão foi colocado novamente em estufa. Este ensaio teve duração de 12 horas, sendo que a cada 30 minutos uma alíquota do tubo mantido em estufa era coletada e feita a leitura em espectrofotômetro a 620nm.

3.4. Desenvolvimento do biofilme

No desenvolvimento do biofilme, placas com 96 poços foram previamente preparadas com 150µL do TSA ou Mueller Hinton descrito acima e o desenvolvimento do biofilme *in vitro* foi de acordo com Som et al. (2004) e Fontana et al. (2009). Para iniciar o crescimento do biofilme, pipetar 150µL da amostra bacteriana escala 0,5 de *McFarland* e cuidadosamente preencher cada poço da placa. A incubação do biofilme foi feita em aerobiose a 35°C por cinco dias. Nas primeiras 48 horas de incubação, não realizamos nenhuma troca de

meio. Somente a partir do terceiro dia, aspiramos o meio antigo e renovamos diariamente os nutrientes de cada poço colocando 150 μ L de TSB.

3.5. Fotossensibilizador

Neste estudo, foi utilizado como fotossensibilizador o azul de metileno (*Methylene Blue Sigma, St Louis, MO*), um corante orgânico com propriedades fluorescentes e fotossensibilizadora (JOCKUSCH et al., 1996). Em ambiente protegido da luz, o azul de metileno foi dissolvido em solução tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para permitir concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 μ g/mL. No biofilme também foi testada a concentração de 400 μ g/mL. Estas sete soluções de azul de metileno em diferentes concentrações foram preparadas imediatamente antes do uso. Os tubos contendo as soluções foram envolvidos em papel alumínio para manter o fotossensibilizador sem exposição à luz durante a realização dos experimentos. O tempo de incubação com o azul de metileno foi de 5 minutos para experimentos em suspensão e para biofilme, e para experimentos em biofilme também foi feita a incubação por 10 minutos nas concentrações de 200, 100 e 50 μ g/mL.

3.6. Fonte de luz

Como fonte de luz utilizamos LED (*light-emitting diode*) vermelhos, com potência de saída de 1,5 mW cada diodo e comprimento de onda de 660nm (Figura 5). Foi utilizada também uma fonte de luz composta de 48 LED e comprimento de onda de 660nm (IrradLED[®] – biopdi, São Carlos, SP, Brasil) (Figura 6). A luz foi entregue de maneira a cobrir toda extensão do poço irradiado. O formato de feixe gerado por este sistema permitiu uma irradiação pontual pelo *spot* uniformemente circular formado. De acordo com a potência de cada LED, com as dimensões do campo de irradiação e com o tempo de exposição da luz, definiremos a fluência (densidades de energia) empregada. Cada placa recebeu apenas um tipo de tratamento para não haver qualquer interferência durante a irradiação.

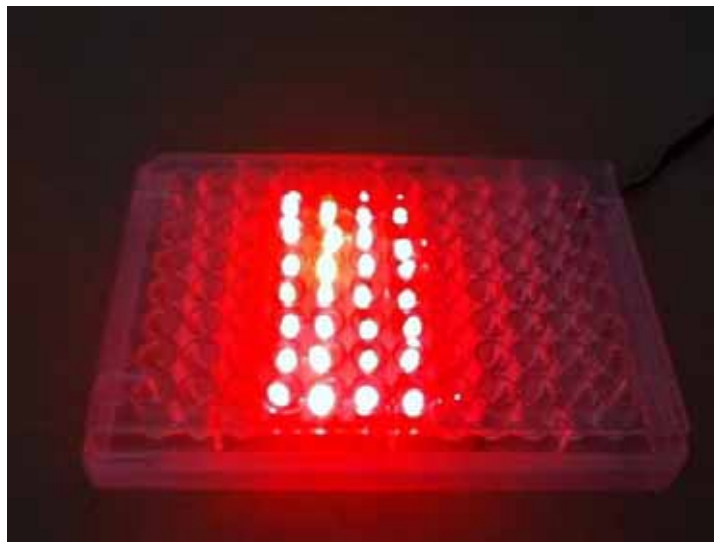


Figura 5: Luz LED vermelha (660nm).



Figura 6: IrradLED[®] – biopdi, 660nm.

Os experimentos foram realizados tanto em fase planctônica (suspensão) quanto em biofilme, utilizando *S. aureus* e *E. coli* separadamente (mono espécie) e também associados (*E. coli* + *S. aureus*). Para todas as condições experimentais, os grupos estudados foram Controle: L-F- (sem luz, sem fotossensibilizador), Fotossensibilizador: L-F+ (sem luz, com fotossensibilizador), Luz: L+F- (com luz, sem fotossensibilizador) e PDT (*Photodynamic therapy*): L+F+

(com luz, com fotossensibilizador). Foram utilizadas as irradiações de 2,8; 5,6; 11,2 e 22,4J/cm².

3.7. Experimentos em Fase Planctônica (suspensão)

Nos grupos Controle e Fotossensibilizador, para cada concentração do azul de metileno do grupo Fotossensibilizador e para o Controle foi adicionado 1mL do inoculo na escala 0,5 de *McFarland* (ajustado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620nm) em um tubo de *Eppendorf*. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm (rotações por minuto) por 15 minutos para remoção do excesso de meio de cultura. Removeu-se o excesso de meio de cultura e adicionou-se 1mL de cada concentração do azul de metileno em seus respectivos tubos contendo o *pellet* bacteriano. Para o Controle, o azul de metileno foi substituído por TSB. Em seguida os tubos foram homogeneizados, envolvidos em papel alumínio para manter o fotossensibilizador sem exposição à luz e mantidos em temperatura ambiente (20 a 25°C) por 25 minutos, para manter as mesmas condições do grupo PDT.

Para cada concentração do azul de metileno e para o Controle foi preparada uma sequencia de tubos de *Eppendorf* enumerados de 1 a 4. Nos tubos com número 1, foi adicionado 990µL de TSB e nos tubos de 2 a 4 foi adicionado 900µL de TSB. Após os 25 minutos, foram transferidos 10µL das soluções homogeneizadas de cada concentração e do Controle para o tubo 1, a partir do qual foram transferidos 100µL para o tubo 2, e repetiu-se o procedimento até o tubo 4, a fim de obter-se concentrações bacterianas seriadas na ordem de 10⁶, 10⁵, 10⁴, e 10³ UFC/mL. Após as diluições, plaqueamos as suspensões bacterianas que foram espalhadas nas placas com auxílio de alças de vidro estéreis. As placas foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C por 24 horas. Os procedimentos de semeadura foram realizados em triplicatas. Após 24 horas de incubação, realizou-se a contagem de UFC.

Nos grupo Luz e PDT, para cada concentração do azul de metileno do grupo PDT e para o grupo Luz foi adicionado 1mL do inoculo na escala 0,5 de

McFarland (ajustado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620nm) em um tubo de *Eppendorf*. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos para remoção do excesso de meio de cultura. Removeu-se o excesso de meio de cultura e adicionou-se 1mL de cada concentração do azul de metileno em seus respectivos tubos contendo o pellet bacteriano. Para o grupo Luz, o azul de metileno foi substituído por TSB. Em seguida os tubos foram homogeneizados, envolvidos em papel alumínio para preencher o tempo de incubação do FTS ou TSB pelo tempo de 5 minutos.

Para a aplicação da Terapia Fotodinâmica, após os 5 minutos as suspensões bacterianas foram transferidas para placa de 96 poços. Cada poço refere-se a uma concentração do azul de metileno do grupo PDT e ao grupo Luz, recebendo 200µL da suspensão, sendo que para cada grupo foram feitos 5 poços. Como Fonte de Luz foram utilizados LED vermelhos. A luz foi entregue de maneira a cobrir toda extensão do poço irradiado. O formato de feixe gerado por este sistema permitiu uma irradiação pontual pelo *spot* uniformemente circular formado. Cada placa recebeu apenas um tipo de tratamento para não haver qualquer interferência durante a irradiação.

Após a irradiação, o conteúdo dos 5 poços foi reunido e diluições seriadas foram realizadas. Cem microlitros das suspensões bacterianas foram espalhadas nas placas de TSA com auxílio de alças de vidro estéreis. As placas foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C por 24 horas. Os procedimentos de semeadura foram realizados em triplicatas. Após 24 horas de incubação, realizou-se a contagem de UFC.

3.8. Avaliação da viabilidade celular

O metabolismo celular foi avaliado por meio do ensaio de redução do 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil]2H-tetrazolium-carboxanilida (XTT). O XTT (sal amarelo) é reduzido, por enzimas presentes nos mesossomos das bactérias metabolicamente ativas, a uma formazana, monitorada espectrofotometricamente. Para o ensaio do XTT, a solução estoque de XTT foi preparada utilizando-se água ultra pura, a uma concentração de 1mg/ml e mantida a -70 °C até o momento do

experimento. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4mM, imediatamente antes de cada experimento. O preparo da solução de XTT/Menadiona seguiu as seguintes proporções: 158µL de PBS glicosado, 40µL de XTT (1mg/ml) e 2µL de Menadiona a 0,4mM. Foram avaliados os grupos Controle (F-L-), Luz (F-L+) e PDT (F+L+) com azul de metileno nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25µg/mL e fluência de 56J/cm² em biofilme.

Para a realização do ensaio do XTT, o AM que estava em contato com as células do biofilme foi removido e 200µL de solução de XTT foi adicionada nas placas. As placas foram incubadas no escuro a 37°C por 3 horas. Após o tempo de incubação, uma alíquota de 100µL do sobrenadante com ou sem o produto da redução do XTT de cada orifício foi transferida para uma placa de leitura. A absorbância foi determinada por espectrofotometria em 492nm.

3.9. Experimentos em Biofilme

O biofilme foi desenvolvido *in vitro* em placas de 96 poços conforme descrito anteriormente. O biofilme desenvolvido e não submetido a nenhuma forma de terapia, chamamos de grupo controle. Diferentes concentrações de azul de metileno (400; 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL) foram testadas em biofilme. Para o grupo Controle, 150µL de TSB foi aplicado sobre o biofilme e incubado por 5 ou 10 minutos, simulando os mesmos procedimentos realizados para os grupos teste. Após o período de incubação, os biofilmes foram removidos com auxílio de uma pipeta, e colocamos a amostra deste biofilme em *Eppendorfs* devidamente identificados para posteriormente serem submetidos a diluições seriadas. Da mesma forma, este procedimento foi repetido para os outros grupos. Aplicamos o fotossensibilizador ou o caldo fresco de TSB, realizamos as devidas irradiações, e colocamos as amostras em tubos *Eppendorf* específicos.

Depois de realizar o tratamento indicado para cada poço, diluições seriadas foram realizadas. Da mesma maneira que o experimento em suspensão, foi realizada a contagem das UFC em placas de TSA.

3.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para o preparo das amostras para a documentação ao MEV, as suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 18 horas, em caldo Mueller-Hinton, para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, adicionando-se caldo Mueller-Hinton até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de *McFarland* (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620nm para confirmação da concentração de micro-organismos.

A seguir, foi dispensado 600µL dessa suspensão, nos poços de uma placa de microtitulação de 12 poços nos quais se havia depositado uma lamínula redonda de 13mm de diâmetro. Incubou-se à temperatura ambiente por 72 horas para formação dos biofilmes microbianos sobre as lamínulas sem agitação. Após 72 horas, foi realizada a troca do meio de cultura e foi incubado por mais 24 horas. Logo após as amostras foram submetidas à TFD, com irradiação de 11,2 J/cm² e concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno. Para o controle, foi utilizado o biofilme não tratado.

Decorrido esse tempo, lavou-se cuidadosamente as lamínulas com Tampão Fosfato 0,1M pH 7,4 estéril. Prosseguiu-se a lavagem (três vezes) com Tampão Fosfato 0,1M pH 7,4 estéril, dando continuidade à técnica indistintamente para biofilmes tratados ou não. Para tal, adicionaram-se, então a cada poço, 1 mL de glutaraldeído 3% e paraformaldeído a 2%, em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,4 para fixação das amostras. A seguir, submeteu-se em três lavagens com solução-tampão pura. Decorrido esse tempo, o material foi submetido à desidratação em crescentes concentrações de álcool etílico (50%, 60%, 70%, 80% 90%, 100%) (REED, 1996; RAMAGE et al., 2002) durante 30 minutos a cada concentração. Em seguida as amostras foram secas em dessecador com sílica por 72 horas, analisadas e eletromicrografadas em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi TM3000 *Scanning Electron Microscope*) operado em 15 KV. Estes ensaios foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça (Instituto de Física da USP – São Carlos)

3.11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade de ciprofloxacina sobre o crescimento bacteriano foi determinada através do método da microdiluição, de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) para bactérias aeróbicas.

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 18 horas, em caldo Mueller-Hinton, para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, adicionando-se caldo Mueller-Hinton até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de *McFarland*. Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em caldo Mueller-Hinton, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

Orifícios de microplacas foram preenchidos com 100µL de caldo Mueller-Hinton contendo concentrações de ciprofloxacina variando, para *S. aureus* de 0,015 a 8µg/mL e para *E. coli* de 0,00025 a 0,125µg/mL, e 100µL da suspensão bacteriana.

A inibição do crescimento induzida pelo antimicrobiano foi determinada através da diferença de absorvância em 620nm obtida antes e após incubação da placa por 24 horas, a 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, por três vezes. Para o controle do crescimento, 100µL da mesma suspensão bacteriana foram adicionados a 100µL do caldo Mueller-Hinton.

3.12. Avaliação do Sinergismo em suspensão: Antibiótico após a TFD

Foram testadas para suspensão as concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL de Azul de Metileno determinadas de acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados somente com a TFD. Foi realizada a irradiação a $2,8\text{J}/\text{cm}^2$, determinada de acordo com os resultados obtidos na irradiação de $5,6\text{J}/\text{cm}^2$. A TFD foi realizada da mesma forma que o item 3.7. Após

a TFD, foram transferidos para um *Eppendorf* o volume de três orifícios contendo 200µL de suspensão bacteriana cada para centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos para retirada do Azul de Metileno, e foi realizada uma lavagem com caldo Mueller-Hinton. Em seguida, foi adicionado 600µL de caldo Mueller-Hinton para ressuspender os micro-organismos. Foram transferidos 100µL da amostra de cada concentração testada do Azul de Metileno para um *Eppendorf* contendo 100µL do antibiótico, e para o grupo Controle 100µL de caldo Mueller-Hinton. Para suspensão, foram testadas a CIM e três concentrações sub-inibitórias para *S. aureus* que foram 0,5µg/mL (MIC); 0,25µg/mL (I); 0,125µg/mL (II) e 0,0625µg/mL (III) respectivamente e para *E. coli* 0,004 µg/mL (MIC); 0,002µg/mL (I); 0,001µg/mL (II) e 0,0005µg/mL (III) respectivamente. Em seguida as amostras tratadas previamente com a TFD e em contato com as concentrações de ciprofloxacina citadas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram submetidas a diluições seriadas conforme descrito anteriormente, e as suspensões bacterianas foram espalhadas em placas de Agar Mueller-Hinton e incubadas por 24 horas a 37°C.

3.13. Avaliação do Sinergismo em suspensão: TFD após o Antibiótico

Foram testadas para suspensão as concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL de Azul de Metileno determinadas de acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados somente com a TFD. Foi realizada a irradiação a 2,8J/cm², determinada de acordo com os resultados obtidos na irradiação de 5,6J/cm².

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 18 horas, em caldo Mueller-Hinton, para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, adicionando-se caldo Mueller-Hinton até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de *McFarland* (aproximadamente 1,0 x 10⁸ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620nm para confirmação da concentração de micro-organismos. As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 13000rpm por 10 minutos para retirada do caldo Mueller-Hinton, e em seguida foi adicionado 1mL das seguintes concentrações de ciprofloxacina

para *S. aureus* que foram 0,5µg/mL (MIC); 0,25µg/mL (I); 0,125µg/mL (II) e 0,0625µg/mL (III) e para *E. coli* 0,004µg/mL (MIC); 0,002µg/mL (I); 0,001µg/mL (II) e 0,0005µg/mL (III). As amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação, foi realizada a TFD conforme descrito anteriormente.

3.14. Avaliação do Sinergismo em biofilme: Antibiótico após a TFD

O biofilme foi desenvolvido *in vitro* em placas de 96 poços conforme descrito anteriormente. Foram testadas para biofilme as concentrações de 200; 100; 50 e 25µg/mL de Azul de Metileno determinadas de acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados somente com a TFD. Foi realizada a irradiação a 22,4 e 11,2J/cm², determinada de acordo com os resultados obtidos na irradiação de 11,2J/cm². A TFD foi realizada da mesma forma que o item 3.9. Após a TFD, foram transferidos para um *Eppendorf* o volume de três orifícios contendo o biofilme, sendo removidos com auxílio de uma pipeta, para centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos para retirada do Azul de Metileno, foi realizada uma lavagem com caldo Mueller-Hinton. Em seguida, foi adicionado 600µL de caldo Mueller-Hinton para ressuspender os micro-organismos. Foram transferidos 100µL da amostra de cada concentração testada do Azul de Metileno para um *Eppendorf* contendo 100µL do antibiótico, e para o grupo Controle 100µL de caldo Mueller-Hinton. Para biofilme, foram testadas as cinco concentrações sub-inibitórias multiplicadas por 1000. Para *S. aureus* foram utilizadas as concentrações de 250 (I); 125 (II); 62,5 (III); 31,25 (IV) e 15,625µg/mL (V) respectivamente e para *E. coli* 2 (I); 1 (II); 0,5 (III); 0,25 (IV) e 0,125µg/mL (V) respectivamente. Em seguida as amostras tratadas previamente com a TFD e em contato com as concentrações de ciprofloxacina citadas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram submetidas a diluições seriadas conforme descrito anteriormente, e as suspensões bacterianas foram espalhadas em placas de Agar Mueller-Hinton e incubadas por 24 horas a 37°C.

3.15. Análise Estatística dos Resultados

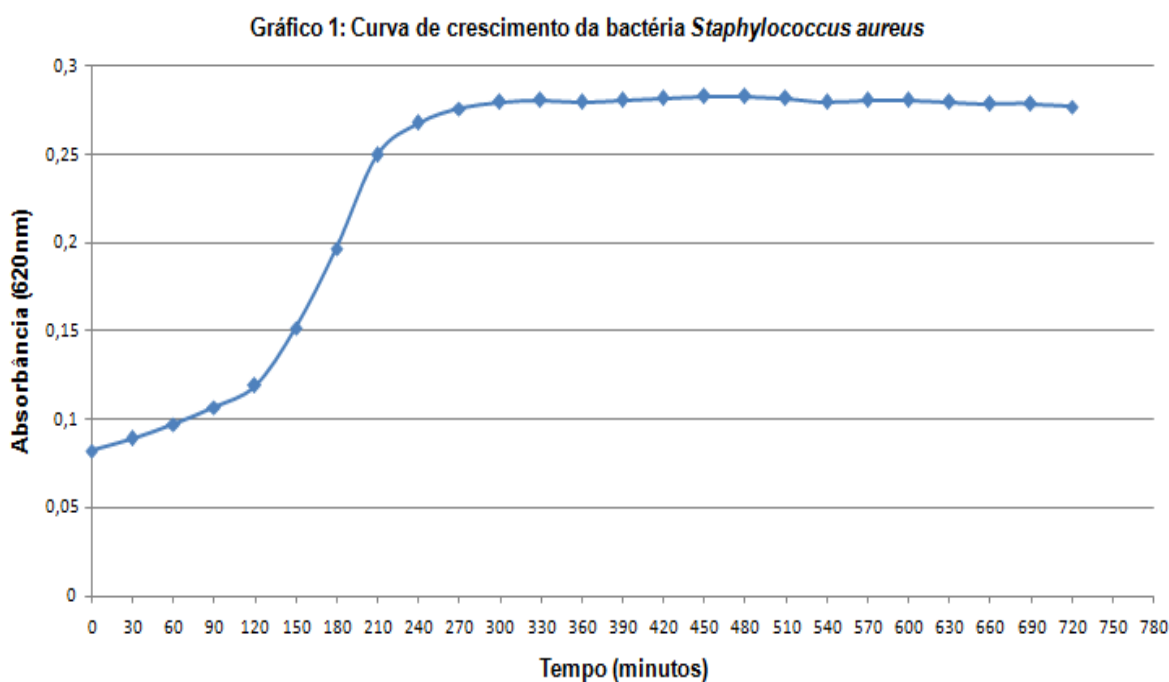
Como os valores de UFC/mL são extremamente elevados, estes foram transformados em logaritmo (de base 10) para a análise pretendida neste trabalho. Como os valores de UFC/mL são extremamente elevados, estes foram transformados em logaritmo (de base 10) para a análise pretendida neste trabalho. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). Foi realizada análise estatística ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey, usando *GraphPad Prism*[®] *Version 5.01 software* (*GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA*).

4. RESULTADOS

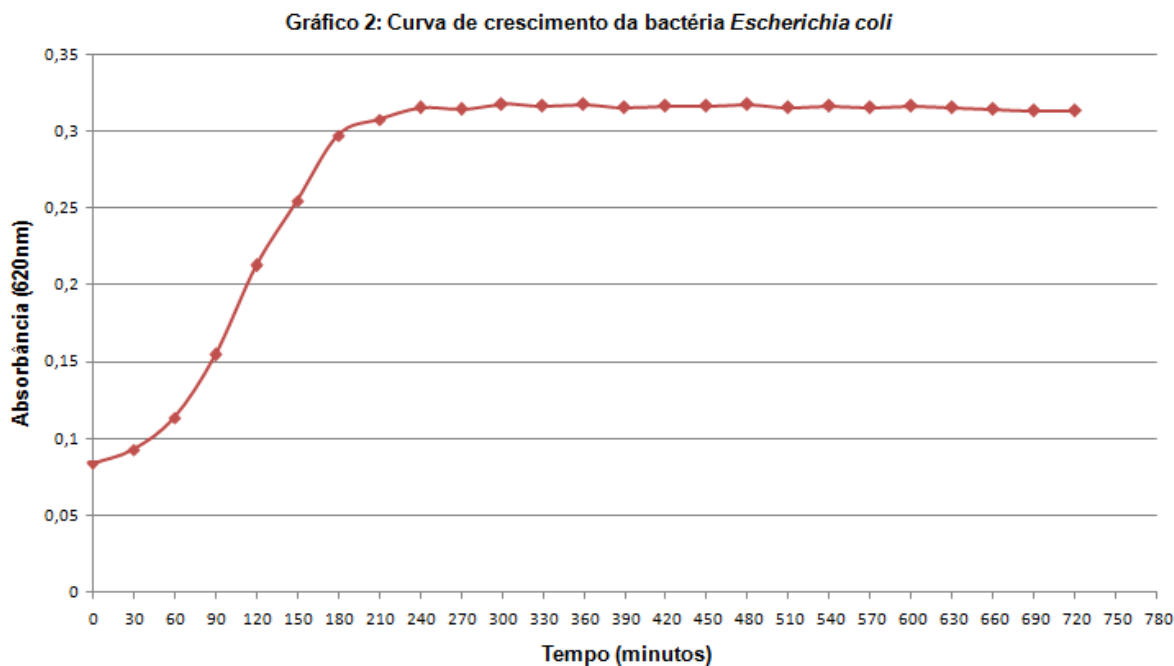
Como os valores de UFC/mL são extremamente elevados, estes foram transformados em logaritmo (de base 10) para a análise pretendida neste trabalho. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). Foi realizada análise estatística ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey.

4.1. Curva de crescimento bacteriano

Foram realizados experimentos para se obter a curva padrão de crescimento das cepas utilizadas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).



O gráfico 1 mostra a curva de crescimento bacteriano para *S. aureus*. O gráfico mostra que a bactéria se encontra na fase lag (fase de adaptação), até 90 minutos. De 90 a 240 minutos observamos que a bactéria se encontra na fase logarítmica, de divisão máxima, entrando na fase estacionária em 240 minutos.



O gráfico 2 mostra a curva de crescimento bacteriano para *E. coli*. O gráfico mostra que a bactéria se encontra na fase lag (fase de adaptação), até 30 minutos. De 30 a 240 minutos observamos que a bactéria se encontra na fase logarítmica, de divisão máxima, entrando na fase estacionária em 240 minutos.

4.2. Experimentos em fase planctônica (suspensão)

Os grupos analisados em fase planctônica (suspensão) foram: L-F-, L-F+, L+F- e L+F+. Para o grupo controle (L-F-) nenhum FTS ou luz foi aplicado. Para analisar a toxicidade do FTS no escuro (L-F+) utilizamos o FTS azul de metileno nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL.

No grupo L+F-, nenhum FTS foi utilizado e aplicamos as fluências de 2,8J/cm² (Figura 7) e 5,6J/cm² (Figura 8) para experimentos mono-espécie em suspensão. Para os experimentos múltipla-espécie, fluência de 5,6J/cm² foi utilizada (Figura 9).

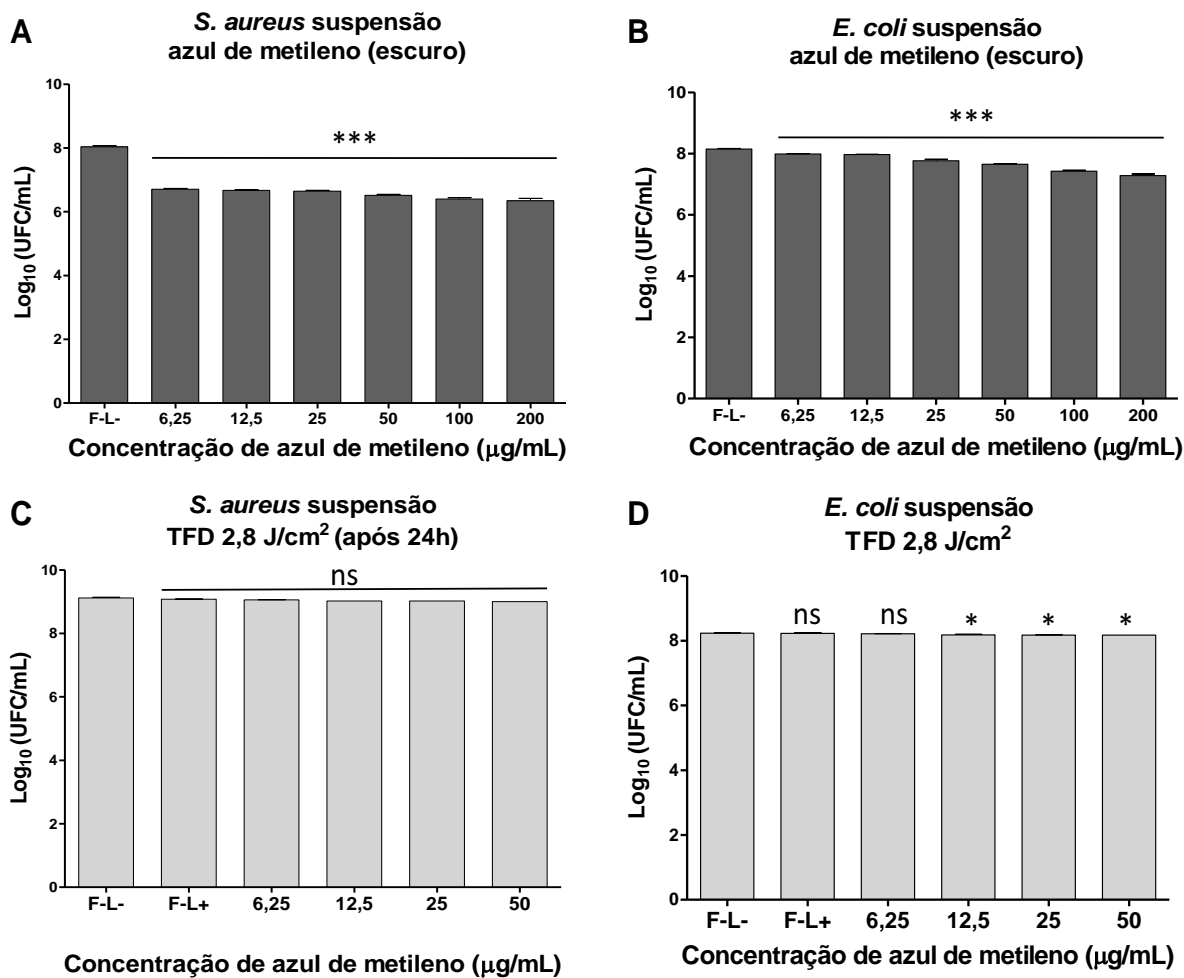


Figura 7: Valores médios de log_{10} entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 2,8J/cm²), nos experimentos mono-espécie para *S. aureus* e *E. coli*.

As colunas representam os valores médios de log_{10} e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle (ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

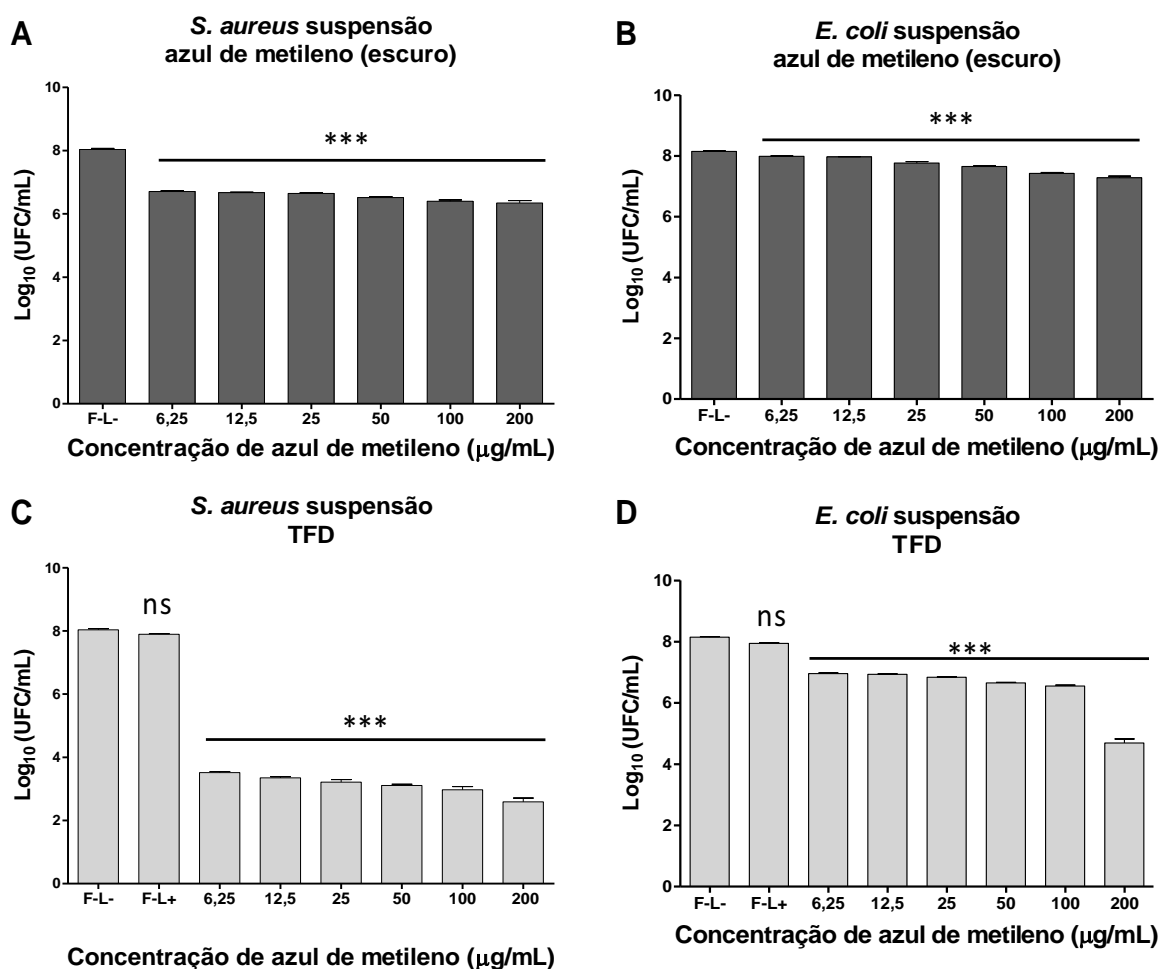


Figura 8: Valores médios de \log_{10} entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD $5,6\text{J}/\text{cm}^2$) em suspensão, nos experimentos mono-espécie para *S. aureus* e *E. coli*.

As colunas representam os valores médios de \log_{10} e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle (ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

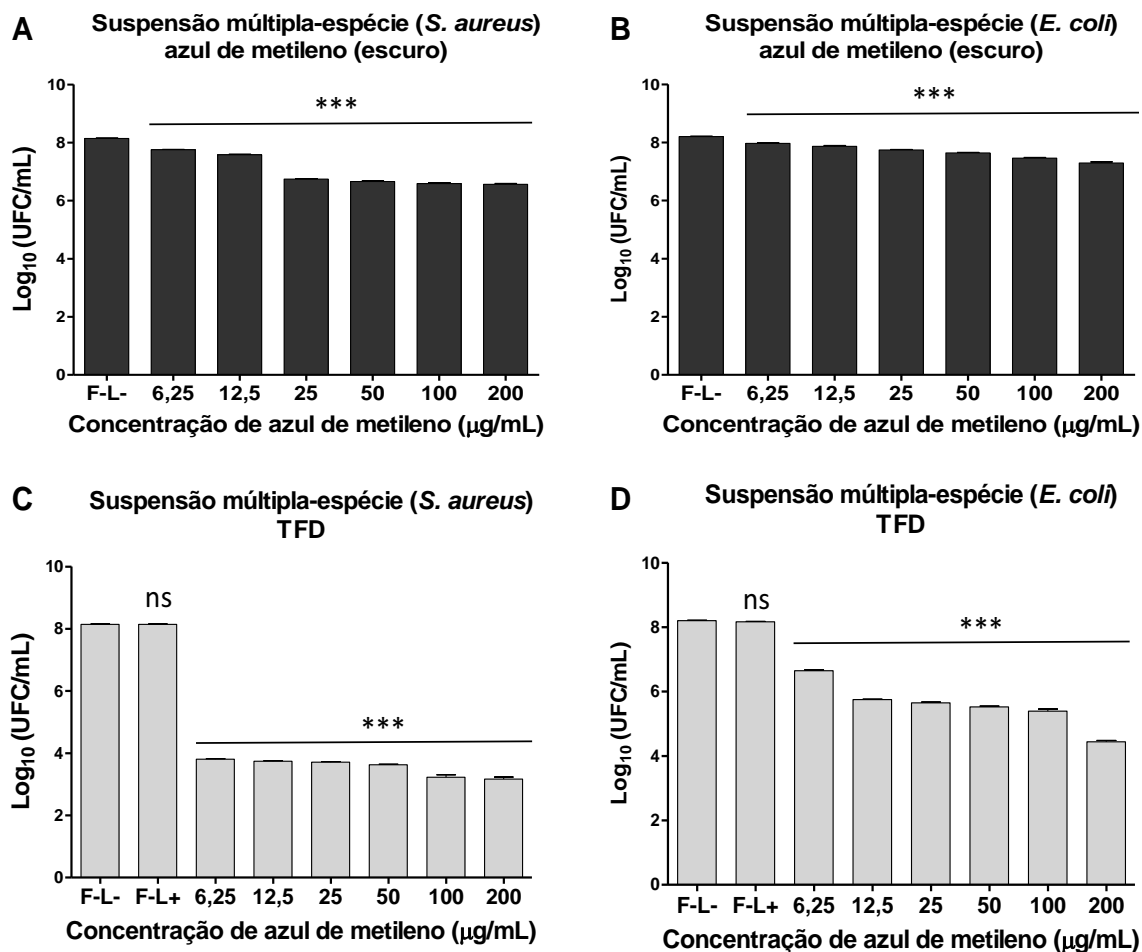


Figura 9: Valores médios de \log_{10} entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD $5,6\text{J}/\text{cm}^2$) em suspensão, nos experimentos múltipla-espécie para *S. aureus* e *E. coli*.

As colunas representam os valores médios de \log_{10} e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle (ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

Para os experimentos em fase planctônica (ou suspensão) para *S. aureus*, não foi observada uma alta toxicidade do fotossensibilizador no Grupo FTS mesmo quando utilizamos o AM na concentração de $200\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 25 minutos de incubação, encontramos uma sobrevivência de 6,35 log (redução de 1,69 log) e 6,56 log (redução de 1,58 log) nos experimentos mono-espécie (Figura 8) e múltipla-espécie (Figura 9) respectivamente. Na concentração de $6,25\mu\text{g}/\text{mL}$ encontramos uma sobrevivência de 6,71 log e 7,76 log nos experimentos mono-espécie (Figura 8) e múltipla-espécie (Figura 9) respectivamente.

De acordo com os resultados, observamos que para o grupo L+F+, onde a terapia fotodinâmica foi aplicada, obtivemos uma maior redução bacteriana.

O *S. aureus* em suspensão teve eliminação de 4,53 log no experimento mono-espécie (Figura 8) e 4,33 log no experimento múltipla-espécie (Figura 9) quando, após a sensibilização com azul de metileno, irradiamos as amostras com fluência de 5,6J/cm² na concentração de 6,25µg/mL de azul de metileno, que foi a menor concentração testada. Na concentração de 200µg/mL, obtivemos uma redução de 5,55 log e 4,97 log nos experimentos mono-espécie e múltipla-espécie respectivamente.

Utilizando a irradiação de 2,8J/cm², não foi observada redução bacteriana para *S. aureus* nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL após a incubação das amostras por 24 horas (Figura 7). Nesta fluência (2,8J/cm²) foi necessário incubar por 24 horas para manter as mesmas condições experimentais dos testes de sinergismo (PDT + ciprofloxacina). Esta incubação causou uma recuperação bacteriana verificada com o aumento das UFC/mL neste grupo.

Analisando somente o efeito da luz, (Grupo L+F-), onde não houve a utilização de nenhum fotossensibilizador, somente a irradiação com a luz LED, não foi observada redução bacteriana tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli* nos experimentos realizados mono-espécie (Figura 8) e múltipla-espécie (Figura 9) na irradiação de 5,6J/cm² e também não houve redução bacteriana nos experimentos mono-espécie na irradiação de 2,8J/cm² (Figura 7).

Para os experimentos em fase planctônica (ou suspensão) para *Escherichia coli*, não foi observada toxicidade do fotossensibilizador em nenhuma concentração testada. Analisando apenas o efeito do fotossensibilizador na concentração de 200µg/mL, após 25 minutos de incubação, encontramos uma sobrevivência de 7,28 log (redução de 0,87 log) e 7,28 log (redução de 0,91 log) nos experimentos mono-espécie (Figura 8) e múltipla-espécie (Figura 9) respectivamente. Na concentração de 6,25µg/mL encontramos uma sobrevivência de 7,99 log e 7,97 log nos experimentos mono-espécie (Figura 8) e múltipla-espécie (Figura 9) respectivamente.

A *Escherichia coli* em suspensão sofreu redução de 3,46 log no experimento mono-espécie (Figura 8) e 3,76 log no experimento múltipla-espécie (Figura 9) quando, após a sensibilização com azul de metileno, irradiamos as amostras com fluência de 5,6J/cm² na concentração de 200µg/mL de azul de metileno, que foi a maior concentração testada. A redução bacteriana não foi muito significativa nas demais concentrações testadas. Utilizando a fluência de 2,8J/cm² não foi observada redução bacteriana nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL respectivamente (Figura 7).

4.3. Ensaio do XTT

O gráfico 3 apresenta os valores da absorbância do XTT para as espécies *E. coli* e *S. aureus* após condições experimentais avaliadas.

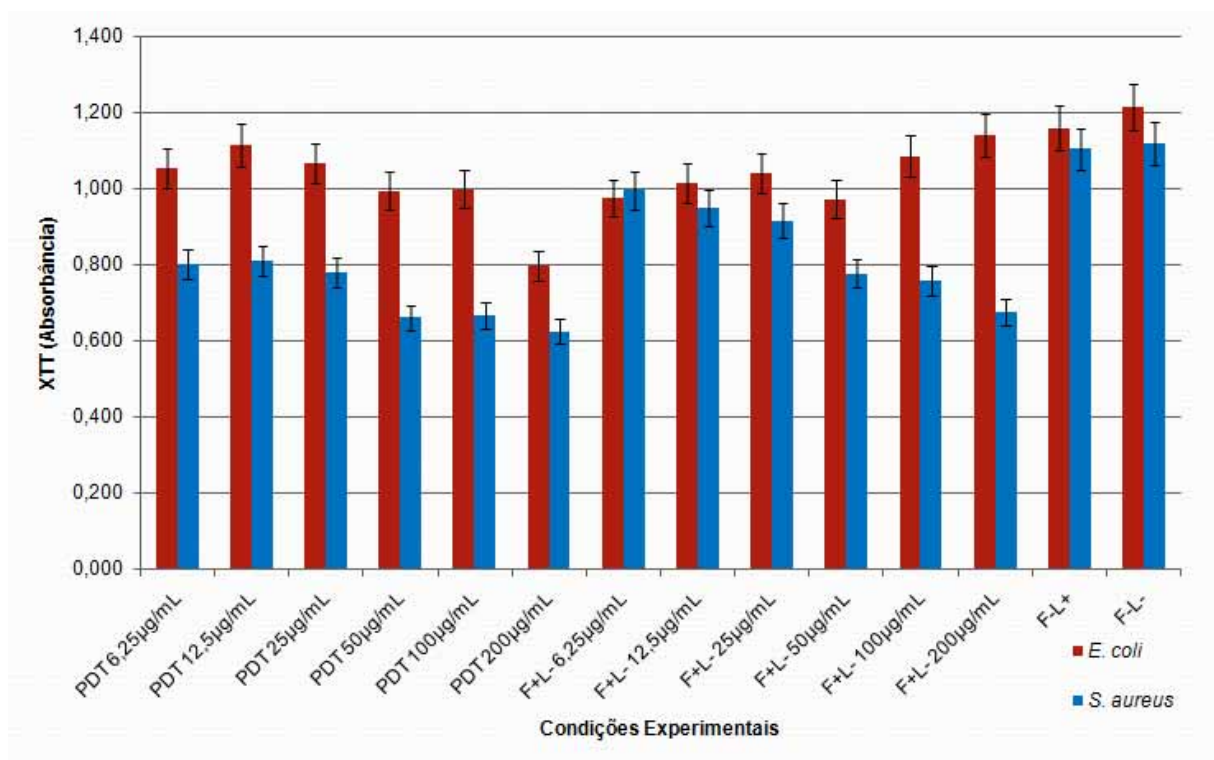


Gráfico 3: Gráfico contendo os valores da absorbância do XTT para as espécies *E. coli* e *S. aureus* após condições experimentais avaliadas.

As comparações múltiplas entre as médias mostraram que a PDT (F+L+) promoveu redução significativa na viabilidade de todas as cepas, em relação ao

grupo Controle. Os valores para o ensaio do XTT no grupo PDT foram significativamente inferiores aos valores do grupo Controle (F-L-) em todas as cepas. Tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*, a redução foi maior na concentração de 200 μ g/mL.

4.4. Experimentos em Biofilme

Os grupos analisados em biofilme foram: L-F-, L-F+, L+F- e L+F+. Para o grupo controle (L-F-) nenhum fotossensibilizador ou luz foi aplicado. Para analisar a toxicidade da droga no escuro (L-F+) utilizamos o fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μ g/mL. No grupo L+F-, nenhum fotossensibilizador foi utilizado e aplicamos a irradiação na fluência de 5,6J/cm², 11,2J/cm² e 22,4J/cm². Para o grupo PDT (L+F+) utilizamos o fotossensibilizador na concentração de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μ g/mL associados à irradiação de 5,6J/cm². Para as concentrações de 200; 100 e 50 μ g/mL também foi aplicada a irradiação na fluência de 11,2J/cm² e para as concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25 μ g/mL foi aplicada a irradiação na fluência de 22,4J/cm².

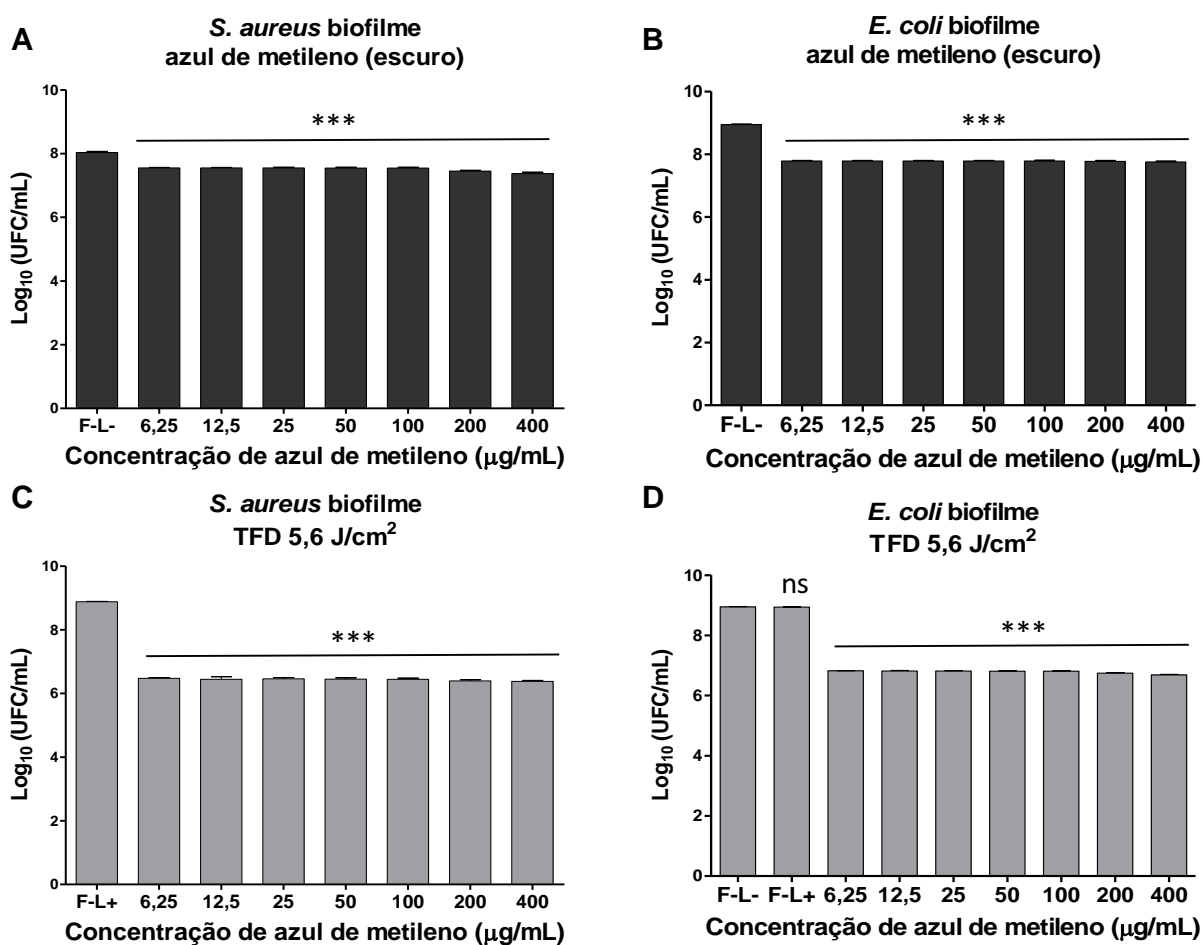


Figura 10: Valores médios de log₁₀ entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 5,6J/cm²) em biofilme, para *S. aureus* e *E. coli*.

As colunas representam os valores médios de log₁₀ e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle (ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: não significativo.

Para *S. aureus*, nos experimentos em biofilme, não foi observada uma alta toxicidade no grupo FTS em nenhuma das concentrações testadas. A toxicidade do fotossensibilizador no escuro, mesmo na maior concentração de 400µg/mL, não causou toxicidade alta, apresentando uma taxa de sobrevivência de 7,37 log (redução de 1,51 log). Na concentração de 200µg/mL obtivemos uma sobrevivência de 7,45 log (Figura 10).

Considerando a irradiação com luz LED como procedimento único (Grupo L+F-), não foi observada redução bacteriana para as amostras que receberam a

irradiação na fluência de $5,6\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 10), $11,2\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 11) e $22,4\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 12).

Para os experimentos do grupo terapia fotodinâmica em biofilme (L+F+), observamos uma sobrevivência de 6,38 log (redução de 2,56 log) e 6,39 log (redução de 2,55 log) quando usamos 400 e $200\mu\text{g}/\text{mL}$ de azul de metileno, respectivamente, por 5 minutos de incubação e fluência de $5,6\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 10). A incubação por 10 minutos também não apresentou uma redução significativa.

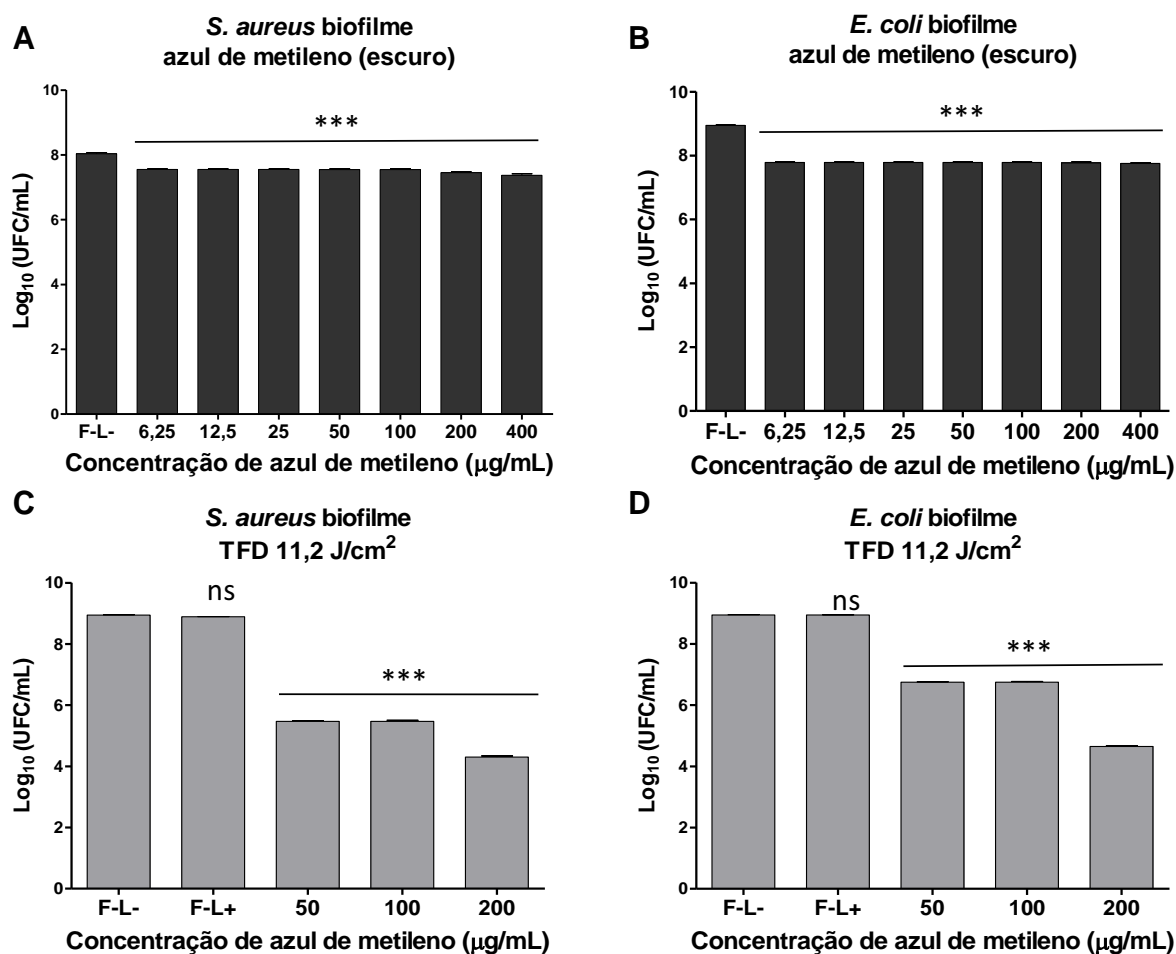


Figura 11: Valores médios de log_{10} entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD $11,2\text{J}/\text{cm}^2$) em biofilme, para *S. aureus* e *E. coli*.

As colunas representam os valores médios de log_{10} e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle (ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

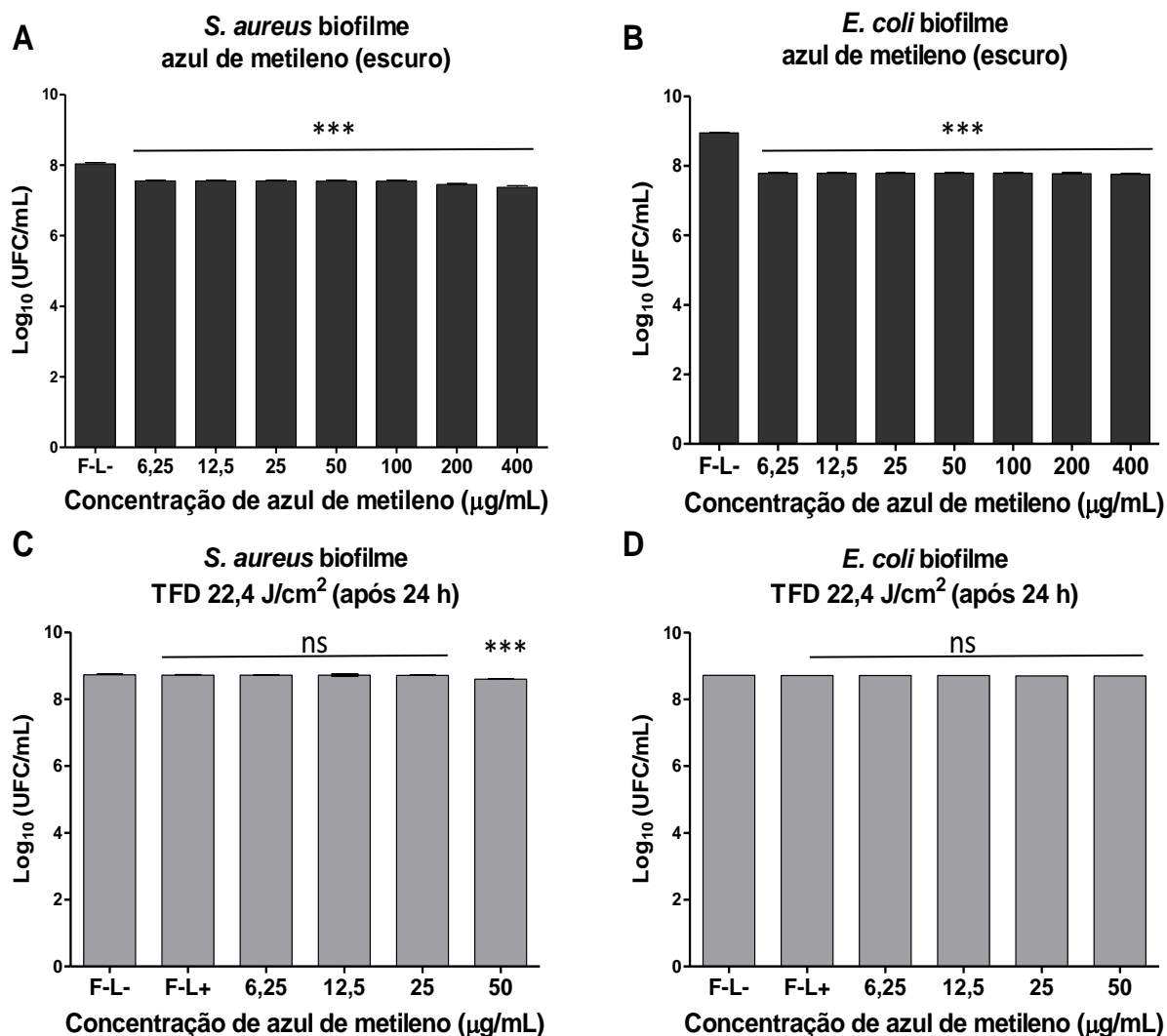


Figura 12: Valores médios de \log_{10} entre os grupos Controle, Luz, FTS e PDT (TFD 22,4J/cm²) em biofilme, para *S. aureus* e *E. coli*.

As colunas representam os valores médios de \log_{10} e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle (ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

Buscando alcançar melhor redução em biofilme do *S. aureus* por meio da terapia fotodinâmica, testamos o azul de metileno na concentração de 200, 100 e 50µg/mL, aumentando os parâmetros de irradiação em 11,2J/cm². Com a maior fluência, obtivemos uma redução significativa em torno de 4,65 log de bactérias do biofilme na concentração de 200µg/mL. Porém, utilizando 100µg/mL atingimos 3,48 log de redução das bactérias em biofilme (Figura 11). Utilizando a irradiação

de 22,4J/cm² não foi observada redução bacteriana nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL (Figura 12).

Para os experimentos em biofilme, não foi observada uma alta toxicidade para *Escherichia coli* no grupo FTS. O fotossensibilizador no escuro, mesmo na maior concentração de 400µg/mL, não causou toxicidade, apresentando uma taxa de sobrevivência de 7,37 log (redução de 1,57). Na concentração de 200µg/mL obtivemos uma taxa de sobrevivência de 7,45 log (redução de 1,49 log) (Figura 10).

Considerando a irradiação com luz LED como procedimento único (Grupo L+F-), não foi observada redução bacteriana significativa para as amostras que receberam a irradiação na fluência de 5,6J/cm² (Figura 10), 11,2J/cm² (Figura 11) e 22,4J/cm² (Figura 12).

Para os experimentos do grupo terapia fotodinâmica em biofilme (L+F+), observamos uma sobrevivência de 6,39 log (redução de 2,59 log) quando usamos 200µg/mL de azul de metileno por 5 minutos de incubação e fluência de 5,6J/cm² (Figura 10). A incubação por 10 minutos também não apresentou uma redução significativa.

Buscando alcançar também uma melhor redução em biofilme de *Escherichia coli* por meio da terapia fotodinâmica, testamos o azul de metileno na concentração de 200, 100 e 50µg/mL, aumentando os parâmetros de irradiação em 11,2J/cm². Com a maior fluência, obtivemos uma redução de 4,3 log de bactérias do biofilme na concentração de 200µg/mL. Porém, utilizando 100µg/mL atingimos somente 2,2 log de redução das bactérias em biofilme (Figura 11). Utilizando a irradiação de 22,4J/cm² não houve redução bacteriana nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL (Figura 12). Neste grupo (22,4J/cm²) o período de incubação por 24 horas necessário para manter as mesmas condições experimentais dos testes de sinergismo (PDT + ciprofloxacina) proporcionou um crescimento bacteriano, e por isso não observamos redução.

No biofilme múltipla-espécie, o *S. aureus* apresentou um redução no grupo PDT e no grupo FTS, que não pode ser atribuída à ação eficaz da terapia, visto que no grupo controle essa diminuição também pôde ser observada, sugerindo

uma relação de concorrência entre o *S. aureus* e *E. coli*. Buscando melhores resultados, o biofilme múltipla-espécie também foi realizado na proporção de 25% de *E. coli* e 75% de *S. aureus* e de 12,5% de *E. coli* e 87,5% de *S. aureus*, porém também houve a eliminação de *S. aureus*, inclusive no grupo Controle.

4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi realizada nesse trabalho a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para analisar possíveis mudanças morfológicas após a Terapia Fotodinâmica na concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e irradiação de 11,2J/cm².

A Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou o rompimento da estrutura do biofilme e uma diminuição no número de células quando as amostras foram tratadas com a Terapia Fotodinâmica, utilizando a irradiação de 11,2J/cm² e concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno (Grupo PDT). Os biofilmes visualizados no grupo PDT revelaram-se dispersos, alguns com apenas o desenvolvimento de muitas microcolônias, e não um biofilme denso e compacto como nas amostras do grupo Controle. As figuras a seguir mostram que a Terapia Fotodinâmica é capaz de promover a ruptura do biofilme bacteriano, tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*, verificada pela descontinuidade da estrutura do biofilme.

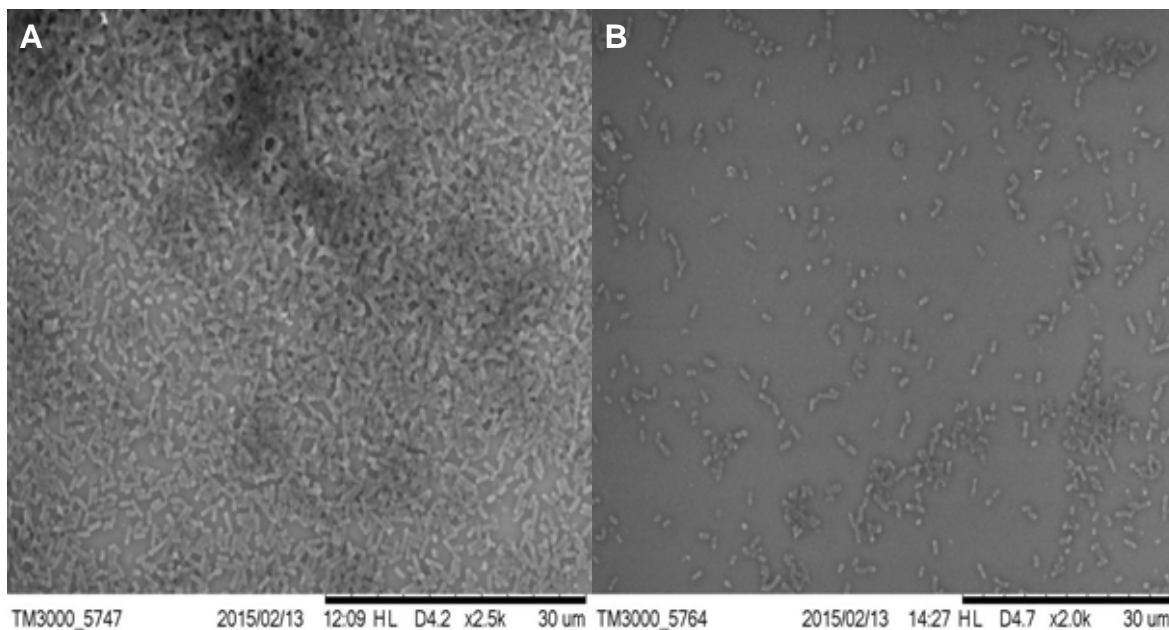


Figura 13: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Escherichia coli*. A) Aumento de 2500x, grupo Controle. B) Aumento de 2000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²

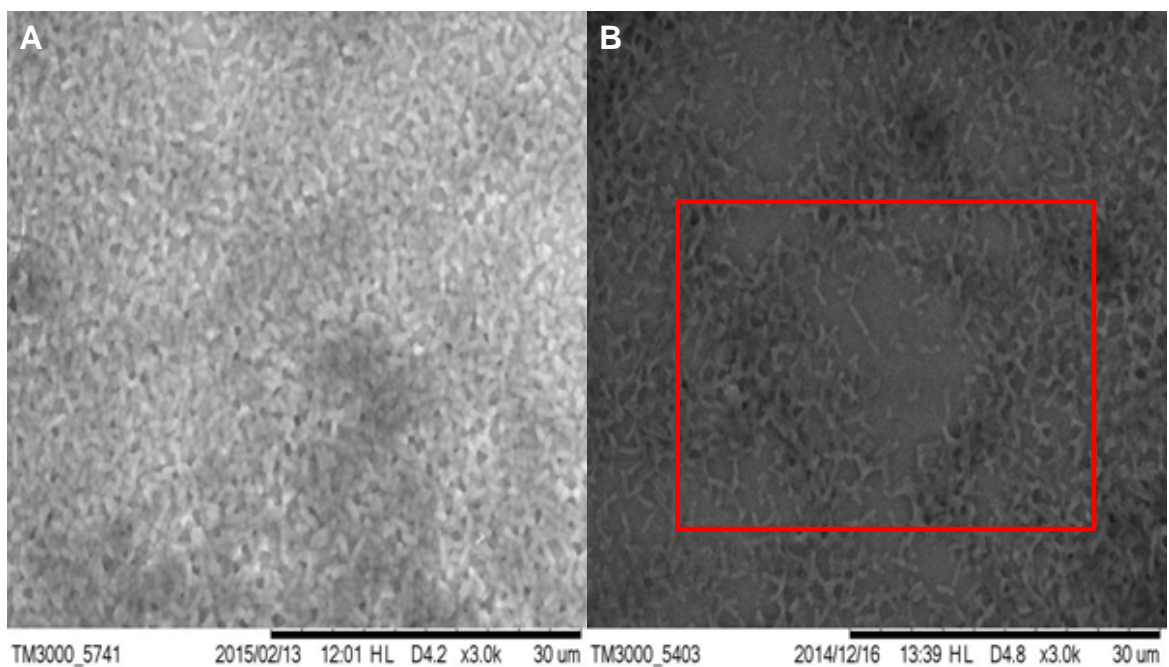


Figura 14: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Escherichia coli*. A) Aumento de 3000x, grupo Controle. B) Aumento de 3000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²

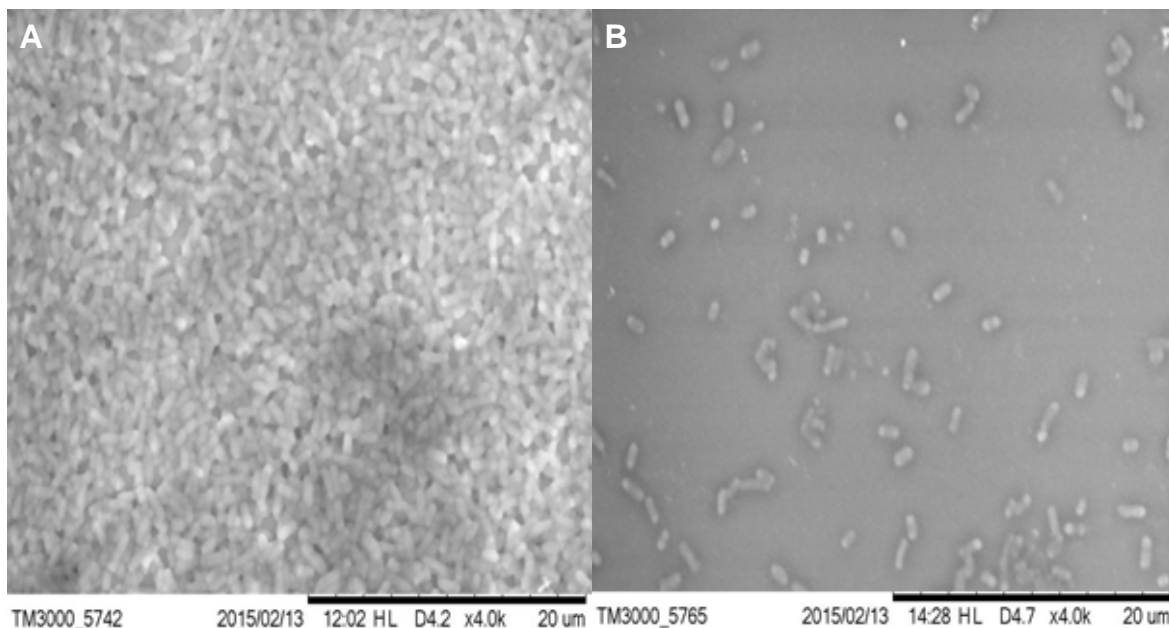


Figura 15: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Escherichia coli*. A) Aumento de 4000x, grupo Controle. B) Aumento de 4000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²

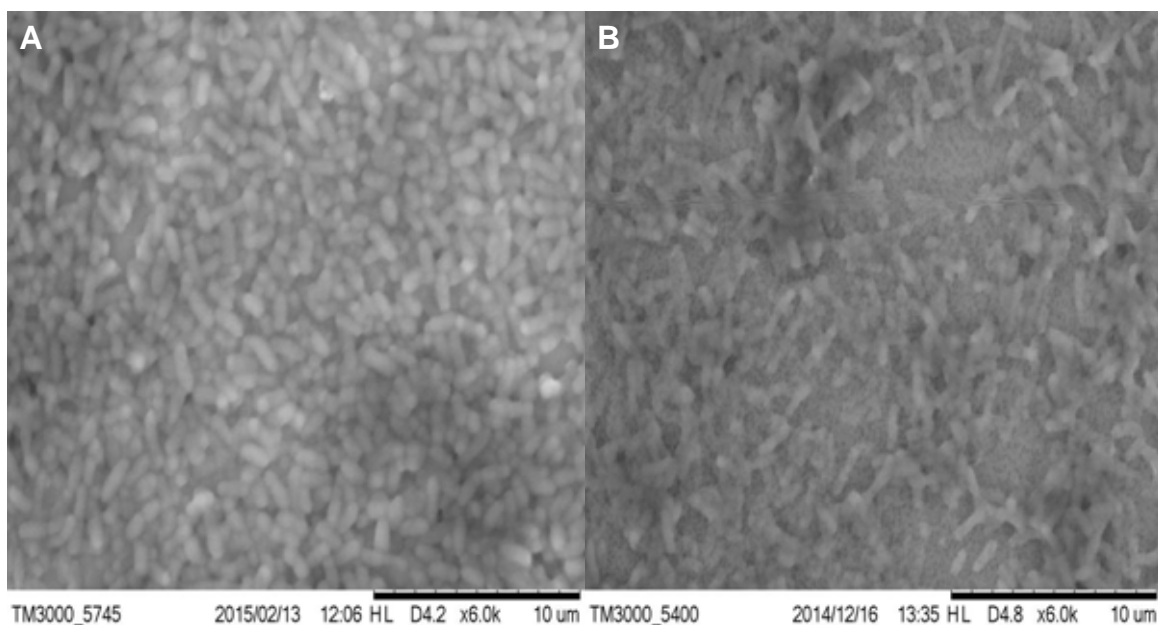


Figura 16: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Escherichia coli*. A) Aumento de 6000x, grupo Controle. B) Aumento de 6000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²

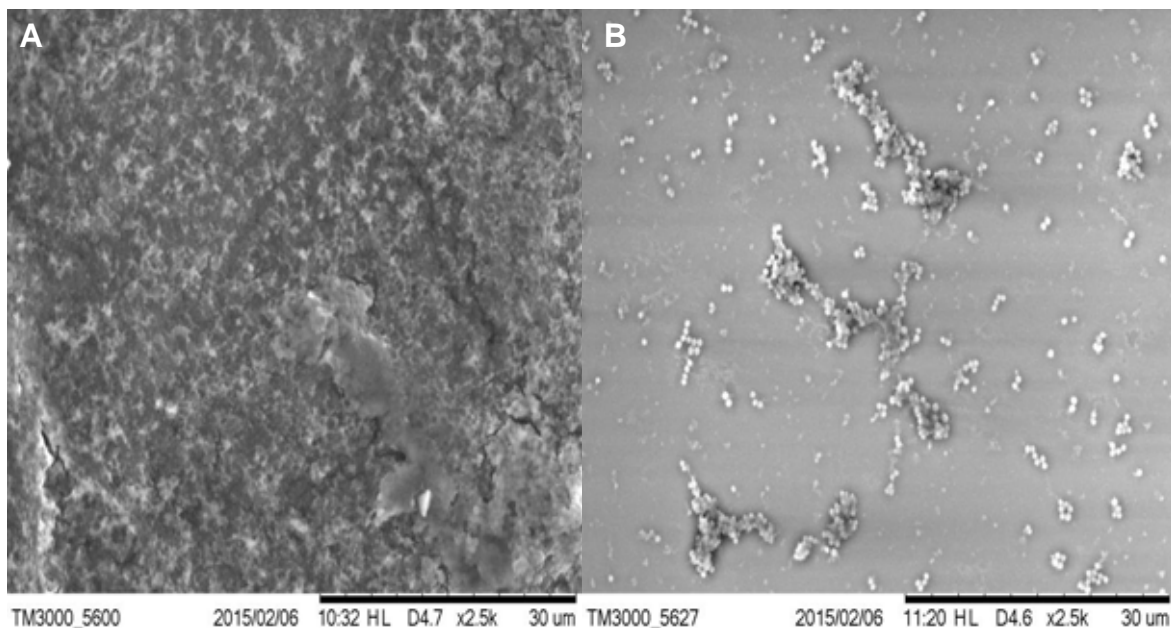


Figura 17: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus* A) Aumento de 2500x, grupo Controle. B) Aumento de 2500x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²

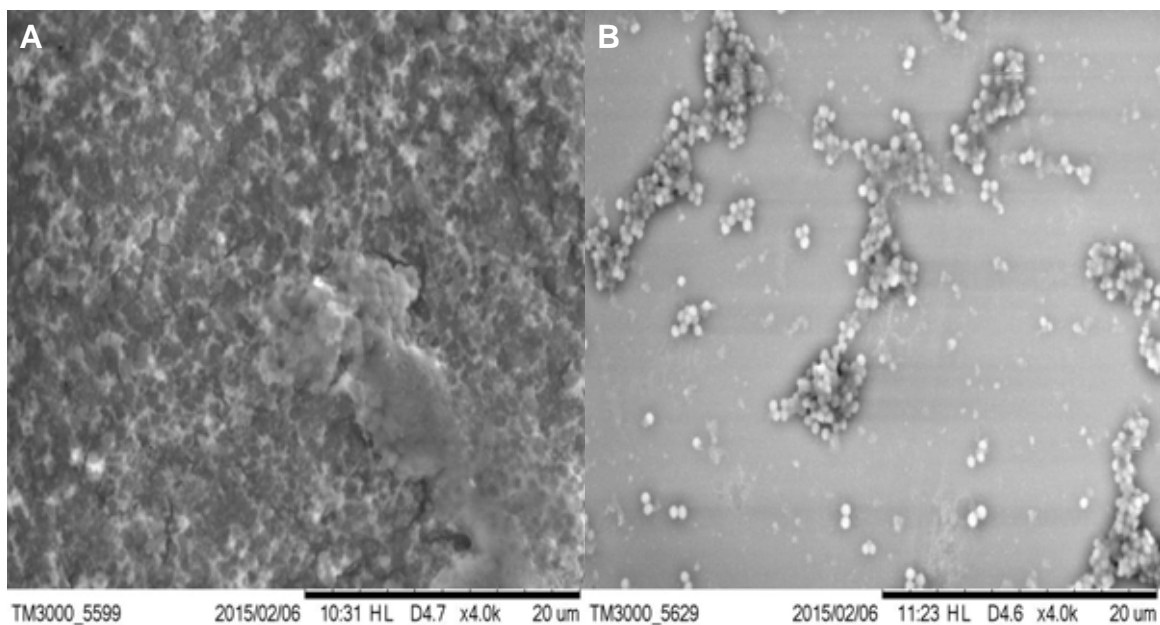


Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus* A) Aumento de 4000x, grupo Controle. B) Aumento de 4000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²

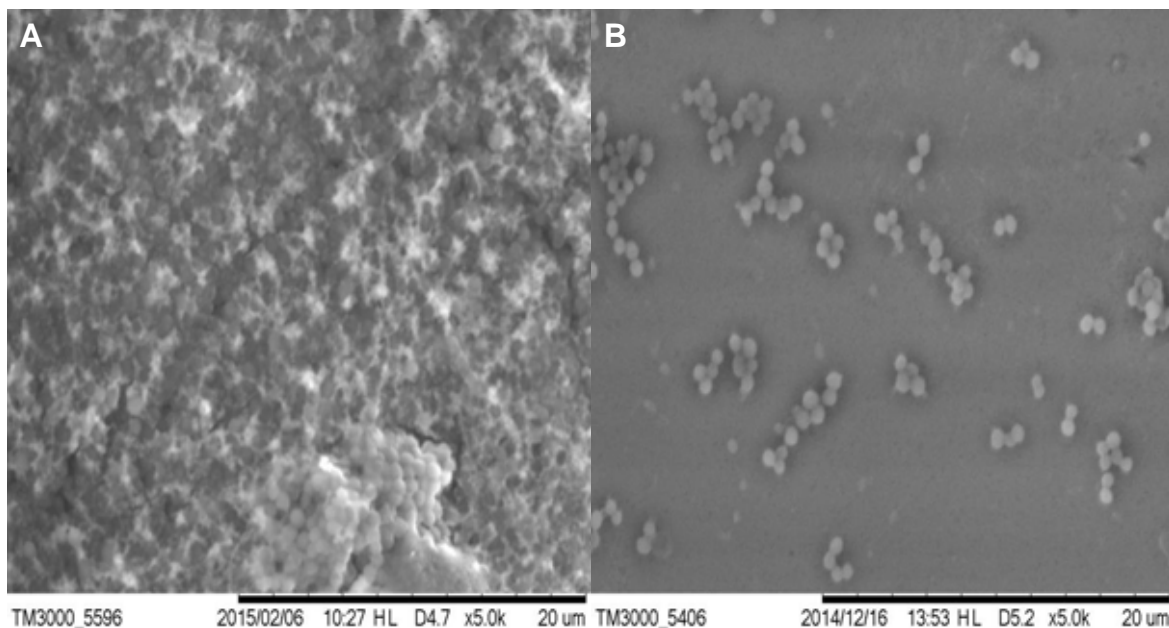


Figura 19: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus* A) Aumento de 5000x, grupo Controle. B) Aumento de 5000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²

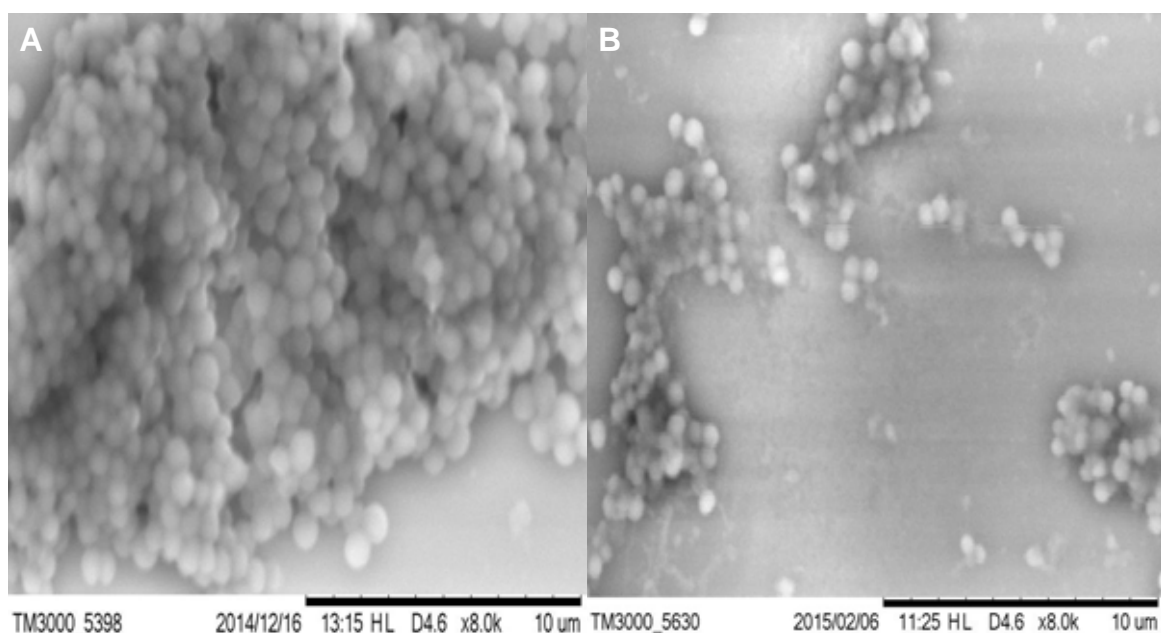


Figura 20: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus* A) Aumento de 8000x, grupo Controle. B) Aumento de 8000x, grupo PDT concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e fluência de 11,2 J/cm²

4.6. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi definida como sendo a menor concentração do antimicrobiano que promoveu um declínio no valor da absorvância, o qual foi mantido nas concentrações seguintes. A CIM de ciprofloxacina para *S. aureus* foi de 0,50µg/mL e de 0,004µg/mL para *E. coli*.

4.7. Efeito combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina em suspensão

Neste trabalho foi avaliado o efeito da combinação da terapia fotodinâmica com o antibiótico ciprofloxacina na redução bacteriana em suspensão.

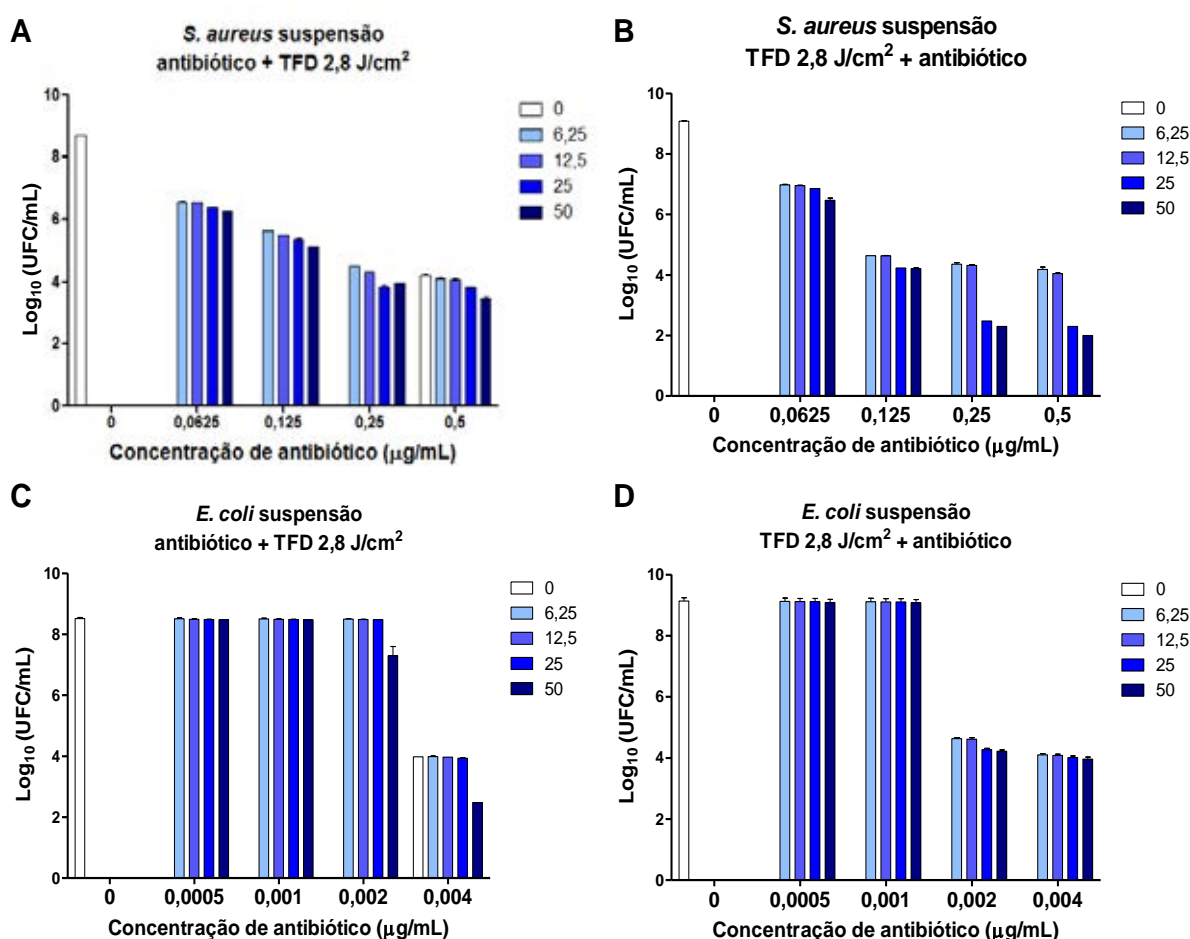


Figura 21: Valores médios de \log_{10} entre os grupos Controle e PDT com efeito combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina em suspensão para *S. aureus* e *E. coli*. B e D: Antibiótico após a TFD. A e C: TFD após o tratamento com antibiótico.

Antibiótico após a TFD:

Foram testadas para suspensão as concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL de Azul de Metileno, e foi realizada a irradiação a 2,8J/cm². Foram testadas a CIM e três concentrações sub-inibitórias para *S. aureus* que foram 0,5µg/mL (MIC); 0,25µg/mL (I); 0,125µg/mL (II) e 0,0625µg/mL (III) respectivamente e para *E. coli* 0,004 µg/mL (MIC); 0,002µg/mL (I); 0,001µg/mL (II) e 0,0005µg/mL (III) respectivamente.

Para *S. aureus*, utilizando a CIM, obtivemos uma redução de 7,08 log; 6,78 log; 5,04 log e 4,89 log nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL de AM respectivamente. Utilizando a primeira concentração sub-inibitória (I), obtivemos uma redução de 6,78 log e 6,6 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL respectivamente. Na segunda concentração sub-inibitória (II), foi observada redução bacteriana de 4,88 log e 4,85 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL respectivamente. Porém, utilizando a terceira concentração sub-inibitória (III), obtivemos uma redução de apenas 2,61 log na concentração de 50µg/mL e 2,22 log na concentração de 25µg/mL (Figura 21).

Para *E. coli*, utilizando a CIM, obtivemos uma redução de 5,17 log; 5,12 log; 5,05 log e 5,03 log nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL de AM respectivamente. Utilizando a primeira concentração sub-inibitória (I), obtivemos uma redução de 4,91 log e 4,86 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL respectivamente. Porém, utilizando a segunda concentração sub-inibitória (II), obtivemos uma redução de apenas 0,6 log na concentração de 50µg/mL e 0,01 log na concentração de 25µg/mL (Figura 21).

TFD após o tratamento com antibiótico:

Foram testadas para suspensão as concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL de Azul de Metileno, e foi realizada a irradiação a 2,8J/cm². Foram testadas a CIM e três concentrações sub-inibitórias para *S. aureus* que foram 0,5µg/mL (MIC); 0,25µg/mL (I); 0,125µg/mL (II) e 0,0625µg/mL (III) respectivamente e para *E. coli* 0,004 µg/mL (MIC); 0,002µg/mL (I); 0,001µg/mL (II) e 0,0005µg/mL (III) respectivamente.

Para *S. aureus*, utilizando somente o antibiótico na CIM, sem a associação com a TFD, obtivemos uma redução de 4,47 log. Utilizando a CIM em combinação com o antibiótico, foi observada uma redução de 5,25 log; 4,87 log; 4,65 log e 4,58 log nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL de AM respectivamente. Utilizando as concentrações de 50 e 25µg/mL de azul de metileno, na primeira concentração sub-inibitória (I), obtivemos uma redução de 4,75 log e 4,86 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL respectivamente. Porém, utilizando a segunda concentração sub-inibitória (II), obtivemos uma redução de 3,57 log na concentração de 50µg/mL e 3,33 log na concentração de 25µg/mL (Figura 21).

Para *E. coli*, utilizando somente o antibiótico na CIM, sem a associação com a TFD, obtivemos uma redução de 4,53 log. Utilizando a CIM em combinação com o antibiótico, foi observada uma redução de 6,03 log; 4,58 log; 4,54 log e 4,53 log nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL de AM respectivamente. Porém, utilizando a primeira concentração sub-inibitória (I), a redução bacteriana foi de apenas 1,22 log e 0,03 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL de AM (Figura 21).

4.8. Efeito combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina em biofilme

Neste trabalho foi avaliado o efeito da combinação da terapia fotodinâmica com o antibiótico ciprofloxacina na redução bacteriana em biofilme. Considerando a resistência bacteriana do biofilme ao tratamento com a TFD, argumentou-se que, se os biofilmes fossem modificados pelo tratamento da TFD, as bactérias iriam se destacar e serem dispersas do biofilme, e se tornariam mais suscetíveis ao antibiótico. Para avaliar essa hipótese, os biofilmes foram tratados com a TFD e em seguida submetidos ao tratamento com a ciprofloxacina.

Foram testadas as concentrações de 200; 100; 50 e 25µg/mL de Azul de Metileno e foi realizada a irradiação a 22,4 e 11,2J/cm², determinada de acordo com os resultados obtidos na irradiação de 11,2J/cm². Para biofilme, foram testadas as cinco concentrações sub-inibitórias multiplicadas por 1000. Para *S.*

aureus foram utilizadas as concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,625µg/mL respectivamente e para *E. coli* 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125µg/mL respectivamente.

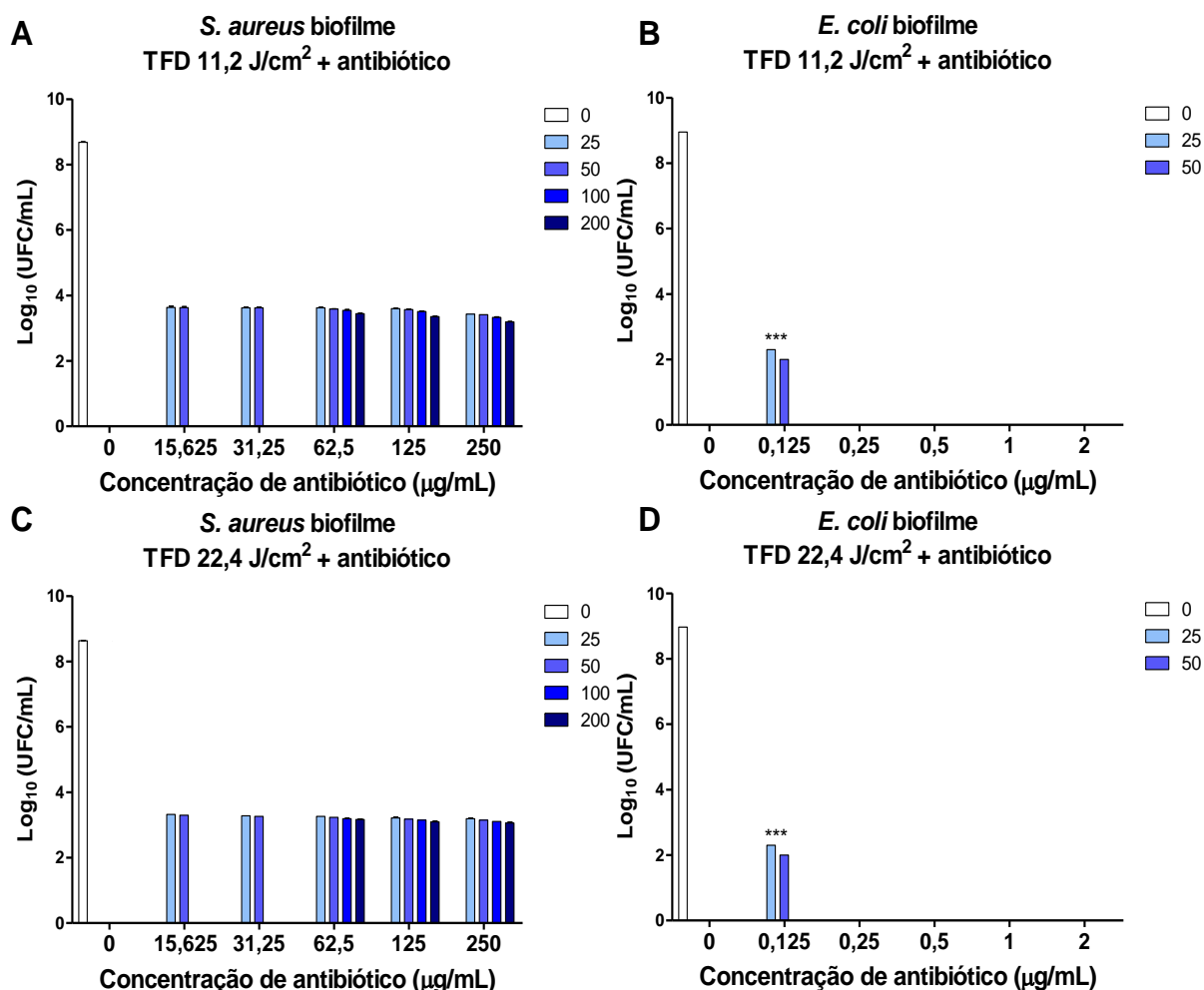


Figura 22: Valores médios de \log_{10} entre os grupos Controle e PDT com efeito combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina em biofilme para *S. aureus* e *E. coli*.

As colunas representam os valores médios de \log_{10} e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle (ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: não significativo.

Para *S. aureus*, utilizando a irradiação de 22,4J/cm² e concentração de 62,5µg/mL de antibiótico, obtivemos uma redução de 5,47 log; 5,44 log; 5,4 log e 5,1 log nas concentrações de 200; 100; 50 e 25µg/mL de Azul de Metileno. Utilizando a irradiação de 11,2J/cm², também obtivemos altas reduções de 5,24 log; 5,14 log; 5,09 log e 6,06 log nas mesmas concentrações de Azul de Metileno respectivamente (Figura 22).

Utilizando o Azul de Metileno na concentração de 50 e 25 μ g/mL, irradiação de 22,4J/cm², e o antibiótico na concentração de 15,625 μ g/mL, que foi a menor concentração testada para biofilme, obtivemos uma redução de 5,37 log e 5,32 log, respectivamente. Porém, na irradiação de 11,2J/cm², também obtivemos reduções significativas de 5,1 log e 5,05 log na concentração de 50 e 25 μ g/mL respectivamente, e concentração de 15,625 μ g/mL de antibiótico (Figura 22).

Para *E. coli*, na terapia sinérgica houve uma redução bacteriana em todas as concentrações a partir de 0,25 μ g/mL de Antibiótico, tanto na irradiação de 11,2J/cm² (Figura 22 B) quanto na irradiação de 22,4J/cm² (Figura 22 D). Uma sobrevivência de 2 log e 2,3 log foi observada apenas na menor concentração de antibiótico (0,125 μ g/mL) testado, quando a TFD foi realizada com concentrações de 50 e 25 μ g/mL de Azul de Metileno respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de estratégias para combater bactérias que crescem em biofilmes é uma tarefa desafiadora, uma vez que essas bactérias são muito mais resistentes à terapia antimicrobiana. A terapia fotodinâmica pode ser uma opção terapêutica promissora para controlar eficazmente o crescimento de biofilmes microbianos. No entanto, como outras terapias antimicrobianas, a TFD é geralmente menos eficaz contra micro-organismos que crescem nos biofilmes, do que contra células planctônicas. Assim, existe uma necessidade de desenvolver uma abordagem terapêutica que possa aumentar a sensibilidade do micro-organismo com os métodos estabelecidos, combinando os vários modos de ação antimicrobiana para alcançar um efeito sinérgico. Um dos benefícios das terapias combinadas é que elas podem reduzir o desenvolvimento de resistência aos fármacos, uma vez que é menos provável que um agente patogênico tenha resistência simultaneamente a vários tratamentos. Outra vantagem é a possibilidade de usar drogas em combinação com menor concentração de efeitos colaterais e toxicidades decrescentes (TARASZKIEWICZ et al., 2012). No presente estudo foram avaliados os efeitos da terapia fotodinâmica com azul de metileno em monoterapia e terapia combinada de TFD e antibióticoterapia mediada por ciprofloxacina. Diferentes protocolos foram testados e o efeito da ordem (Antibiótico após a TFD ou PDT após o tratamento com antibióticos) também foi avaliado.

O aparecimento de uma grande variedade de patógenos resistentes aos agentes químicos faz com que haja um grande aumento da morbidade de infecções que eram facilmente tratadas no passado. Assim, é importante o desenvolvimento de novas técnicas antimicrobianas contra a qual esses micro-organismos não possuam capacidade de desenvolver resistência. Diversos estudos também relatam a aplicabilidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana *in vitro* visado a redução bacteriana (BARUDIN et al., 2014; DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004).

A TFD parte do princípio de que a interação da luz de comprimento de onda adequado com um composto não tóxico ou com baixa toxicidade

(fotossensibilizador) e oxigênio resultam em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células, a partir de dois tipos de reações: I) Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres. II) Transferência de energia ao oxigênio resultando em oxigênio *singlete*. O oxigênio *singlete* é como são conhecidos os três estados eletronicamente excitados imediatamente superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental. O oxigênio *singlete* reage com aproximadamente todos os componentes celulares, sendo os compostos orgânicos insaturados, suscetíveis à ação de oxigênio *singlete*. Uma das primeiras barreiras ao oxigênio *singlete* acaba sendo a membrana celular rica em lipídios insaturados que podem ser danificados, e uma vez que isto ocorre há inviabilidade da célula (OGBODU et al., 2015; PERUSSI, 2007).

A penetração de antibióticos no biofilme normalmente é muito prejudicada. Para aumentar a eficiência do tratamento, fatores que levam à inibição do crescimento do biofilme, a perturbação do biofilme, ou erradicação do biofilme estão sendo procurados. Estes fatores podem incluir enzimas, nanopartículas metálicas, extratos de plantas e também a Terapia Fotodinâmica. Todos estes fatores influenciam a estrutura do biofilme, através de vários mecanismos (BARUDIN et al., 2014; TARASZKIEWICZ et al., 2012).

Muitos estudos demonstram que as bactérias gram-positivas são mais facilmente susceptíveis a fotoinativação (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; SHANG et al., 2011), concordando com os resultados obtidos neste trabalho. A camada de peptidoglicano e ácido lipoteicoico na parede celular de bactérias gram-positivas permite a difusão do fotossensibilizador, já nas bactérias gram-negativas esta parede age como uma barreira física e funcional entre as células e o meio biológico (SHANG et al., 2011). Foi observado que a aplicação de fotossensibilizadores com carga catiônica, como por exemplo o AM, aumentam a susceptibilidade das bactérias gram-negativas à ação fotodinâmica. (WAINWRIGHT et al., 1998; USACHEVA et al., 2003). Desta forma, micro-organismos incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas são fotoinativados por AM.

A literatura mostra vários fotossensibilizadores com propriedades promissoras para o uso em TFD. Um dos FTS tradicionais que tem sido utilizado para uma diversidade de aplicações, incluindo TFD, é o azul de metileno (GABRIELLI et al., 2004). Variações das concentrações de azul de metileno, de 6,25 a 400µg/mL foram testados neste estudo. A avaliação da toxicidade no escuro foi conduzida na ausência de irradiação. O azul de metileno tem sido aprovado para utilização pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento dos níveis de metahemoglobina em um modo não fotodinâmico. No entanto, quando ativado, o azul de metileno produz um elevado rendimento quântico de oxigênio singlete na janela terapêutica (600 a 900nm) (WU et al., 2009).

Nos experimentos em fase planctônica o teste de toxicidade foi realizado variando a concentração do AM, na ausência de irradiação. Para *S. aureus* e *E. coli*, o tratamento sozinho com AM nas concentrações testadas não foi bactericida em nenhuma das concentrações, assim como experimento realizado por Carvalho (2012) onde o efeito isolado do fotossensibilizador azul de metileno na ausência de irradiação não apresentou efeito bactericida. Uma das características do fotossensibilizador é não ser tóxico na ausência de luz.

Nossos resultados relacionados com a irradiação com o LED como procedimento único (L+F-), não demonstrou redução nas UFC quando os parâmetros de irradiação utilizados durante a irradiação foram de 2,8J/cm² e 5,6J/cm². Experimentos realizados por Peli (2007) e Carvalho (2012) mostraram que para *S. aureus* e *E. coli* não foi observado inibição de crescimento com a exposição a luz LED sozinha, estando de acordo com nossos experimentos.

Observamos que em todas as concentrações testadas o grupo PDT apresentou reduções bacterianas significativas para *S. aureus* em suspensão, na irradiação de 5,6J/cm². O *S. aureus* em suspensão teve redução de 4,53 log no experimento mono-espécie e 4,33 log no experimento múltipla-espécie na concentração de 6,25µg/mL de azul de metileno. Para os resultados obtidos com a cepa *E. coli*, a maior concentração testada de azul de metileno (200µg/mL)

causou uma redução de 3,46 log. No entanto, utilizando 6,25µg/ml, apenas 1,19 log de redução foi obtido.

Com relação à eficiência da inativação bacteriana, sabe-se que bactérias gram-positivas são geralmente mais susceptíveis à TFD e as espécies gram-negativas são mais resistentes a muitos fotossensibilizadores comumente usados em TFD (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; ELGHNIJI et al., 2014), concordando com os resultados obtidos.

O azul de metileno, um corante orgânico que pertence à família da fenotiazina, tem propriedades fotossensibilizantes estabelecidas e vem sendo usado em terapia fotodinâmica. Sahu e colaboradores (2009) estudaram as alterações morfológicas induzidas pela TFD em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* através de microscopia de força atômica. As imagens mostraram que a TFD promoveu alterações morfológicas em ambas as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Para *S. aureus*, a TFD promoveu perda de contacto entre a parede celular e a membrana sem alterações dimensionais significativas para as células. Para *E. coli*, as dimensões da célula foram significativamente alteradas, indicando que a TFD promoveu danos para a membrana citoplasmática, reduzindo conseqüentemente o volume da célula, devido à perda do conteúdo citoplasmático.

Para melhorar a redução bacteriana, o efeito sinérgico da associação da TFD com ciprofloxacina foi analisado. Nossos resultados mostraram que essa associação pode oferecer várias vantagens, especialmente quando a TFD precede o antibiótico. Nesse caso, concentrações sub-inibitórias (abaixo da CIM) de ciprofloxacina e concentrações mais baixas de AM combinada com fluências mais baixas podem ser utilizadas para promover maiores reduções bacterianas.

Em resumo, para experimentos em fase planctônica, a eficiência de inativação bacteriana através da TFD é evidente e ainda mais satisfatória quando a TFD é combinado com um antibiótico, provando que o efeito sinérgico dessas terapias pode ser uma abordagem nova de tratamento.

Utilizando o antibiótico após a TFD, para *S. aureus*, na CIM, obtivemos uma redução de 7,08 log e 6,78 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL. Utilizando a primeira concentração sub-inibitória (I), obtivemos também altas reduções de 6,78 log e 6,6 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL respectivamente. Para *E. coli*, utilizando a CIM, obtivemos uma redução de 5,17 log e 5,12 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL de AM respectivamente. Utilizando a primeira concentração sub-inibitória (I), obtivemos uma redução de 4,91 log e 4,86 log nas concentrações de 50 e 25µg/mL respectivamente. Nestes testes, foi realizada a irradiação a 2,8J/cm².

Os resultados mostraram que, quando o antibiótico é associado com a Terapia Fotodinâmica, pode-se utilizar concentrações mais baixas que a CIM, já que a primeira concentração sub-inibitória também apresentou reduções bacterianas tanto para *S. aureus* como para *E. coli*. Nossos resultados também mostram que, com a associação, podem ser utilizadas concentrações mais baixas de AM e também uma irradiação menor, já que somente a TFD, na irradiação de 5,6J/cm² e concentração de 200µg/mL, obtivemos uma redução de 5,55 log para *S. aureus* e 3,76 log para *E. coli* e, em associação, obtivemos redução de 6,7 log e 4,91 log na concentração de 50µg/mL, irradiação a 2,8J/cm², para *S. aureus* e *E. coli* respectivamente.

Utilizando a TFD após o tratamento com o antibiótico, encontramos reduções bacterianas mais baixas do que quando foi realizado primeiro a TFD e depois a exposição ao antibiótico.

Neste estudo foi avaliada a atividade metabólica dos biofilmes através do teste de redução do XTT. Foi verificado que a diminuição do metabolismo celular das cepas avaliadas não foi acompanhada da diminuição da contagem de células viáveis. Em estudo desenvolvido por Khot, et al., 2008, onde foi avaliado o ensaio do XTT *versus* o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) após tratamento com Anfotericina B, os autores verificaram que a diferença das estimativas das células viáveis com base em UFC/mL *versus* o ensaio metabólico do XTT se origina de uma perturbação na velocidade de crescimento das células danificadas pela exposição à Anfotericina B, mas, no entanto, ainda são capazes

de formarem colônias. As células expostas a Anfotericina B e que ainda eram capazes de formar colônias, apresentaram uma grande variedade de tamanhos, enquanto que as células não tratadas produziram colônias com uma distribuição de tamanho relativamente semelhante. Na maioria das avaliações baseadas em ensaios de metabolismo, as células com taxas metabólicas e/ou crescimento mais lento contribuem proporcionalmente menos para uma estimativa global da viabilidade. Em contraste, as células produtoras de colônias contribuem igualmente para a estimativa de viabilidade baseados nas células viáveis (UFC/mL) independentemente do tamanho da colônia. Assim, parece plausível ser pobre a correspondência relativa entre os ensaios metabólicos e de viabilidade celular (UFC) para as células em fase estacionária, em comparação com células na fase exponencial, o que poderia ter se originado a partir da recuperação relativamente lenta de células em fase estacionária após a exposição à Anfotericina B.

Neste estudo, como dito anteriormente, fizemos experimentos aplicando a terapia fotodinâmica tanto em fase planctônica (suspensão) quanto em biofilme. Como esperado, nossos resultados em suspensão foram bem diferentes dos resultados nos testes com biofilme. Estas diferenças podem ser facilmente compreendidas se analisarmos o conceito atual de biofilme e comunidade bacteriana. Por muito tempo foi considerado que as bactérias viviam de forma isolada. Porém, nas últimas décadas observou-se que existe não apenas associação, como também a comunicação entre as bactérias. Esse tipo de comportamento comunitário permite a formação de uma estrutura multicelular complexa denominada biofilme (D'ACUNTO et al., 2015; SOM et al., 2004). Nossos resultados confirmam de maneira muito clara a diferença existente entre o tratamento para redução de bactérias em biofilme ou em fase planctônica.

Para os experimentos em biofilme, o teste de toxicidade foi realizado variando a concentração do AM, na ausência de irradiação. Para *E. coli* e *S. aureus*, o tratamento sozinho com AM nas concentrações testadas não causou redução bacteriana em nenhuma das concentrações, mesmo na maior, de 400µg/mL, mostrando que o azul de metileno não foi tóxico em nenhuma concentração. Considerando a irradiação com luz LED como procedimento único

(Grupo L+F-), nenhuma redução bacteriana foi observada para as amostras que receberam a irradiação na fluência de 5,6J/cm², 11,2J/cm² e 22,4J/cm². Estudos realizados por Carvalho (2012), utilizando somente luz LED, irradiação na fluência de 1,2J/cm², 3,6J/cm² e 7,2J/cm², sem a presença de fotossensibilizador, mostraram que não houve redução bacteriana. Em estudo realizado por Mang et al. (2012), a irradiação a 30J/cm² e 60 J/cm² também não causou redução bacteriana.

Os resultados relacionados com os experimentos nos quais utilizamos a irradiação com a luz LED (grupo L+F+), fluência de 5,6J/cm², não obtivemos redução significativa nas UFC em nenhuma das concentrações testadas, tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Escherichia coli*, mesmo na maior concentração de 400µg/mL de AM. Na estrutura do biofilme, a bactéria está protegida em uma matriz de glicoproteína e polissacarídeo produzida pelos constituintes microbianos. A organização das células microbianas em diferentes camadas do biofilme pode oferecer proteção aos micro-organismos nas camadas mais internas, contribuindo para a resistência aos fatores ambientais como antimicrobianos e corantes (NAN; REN, 2014; SOM et al., 2004).

Buscando melhores resultados, aumentamos o tempo de incubação com o azul de metileno para 10 minutos nas concentrações de 200; 100 e 50µg/ml. Porém, as reduções também não foram muito significativas tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Escherichia coli*.

Neste trabalho, na busca de uma maior redução bacteriana no biofilme, aumentamos a irradiação para 11,2J/cm², utilizando as concentrações de 200; 100 e 50µg/mL. Tanto para *S. aureus* como para *E. coli*, a redução foi significativa utilizando a concentração de 200µg/mL. Com a irradiação de 11,2J/cm², obtivemos uma redução de 4,65 log de *S. aureus* e 4,3 log de *E. coli*. De acordo com Giusti et. al. (2008), o aumento da fluência de energia promove um aporte maior de fótons na região-alvo que irão interagir de maneira mais intensa com as moléculas de AM e, conseqüentemente, gerar uma cascata de ERO maior e por final um efeito bactericida mais pronunciado.

Nas demais concentrações de Azul de Metileno testadas, a redução bacteriana foi baixa. Utilizamos também a irradiação de 22,4J/cm², nas concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL, porém, a taxa de sobrevivência foi alta em todas as concentrações de Azul de Metileno.

No biofilme múltipla-espécie, o *Staphylococcus aureus* apresentou um redução no grupo PDT, que não pode ser atribuída à ação eficaz da terapia, visto que no grupo controle essa diminuição também pôde ser observada, sugerindo uma relação de concorrência entre o *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Nossos resultados estão de acordo com Millezzi et al. (2012) e Rendueles et. al. (2011), mostrando que *E. coli* predominou sobre o *S. aureus* no biofilme múltipla-espécie.

Rendueles et al. (2011) mostraram que 20% dos extratos de biofilme testados continham moléculas que antagonizam o crescimento ou a adesão de bactérias. Eles caracterizaram um composto, produzido por uma *E. coli* comensal, para o qual a atividade é detectada somente no extrato de biofilme. As análises bioquímicas e genéticas mostraram que este composto corresponde a um novo tipo de polissacarídeo de alto peso molecular, cuja produção associada ao biofilme é regulada pela proteína RfaH. Eles demonstraram que a atividade antiadesão desse polissacarídeo era restrita a bactérias gram-positivas e que a sua produção reduzia a suscetibilidade à invasão e promovia a rápida exclusão de *S. aureus* de biofilmes mistos *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados também mostraram que biofilmes contêm moléculas que contribuem para a dinâmica das comunidades bacterianas mistas, e que são desconhecidas ou mal detectadas em sobrenadante planctônicos.

Estudos realizados por Millezzi (2012) mostraram que em biofilme existe uma relação de competição entre *S. aureus* e *E. coli*, com predominância de *E. coli* sobre *S. aureus* concordando com nossos resultados. Pompermayer et al. (2000) demonstrou que também há uma competição entre *S. aureus* e *E. coli* na aderência a polipropileno, com predominância de *E. coli* e redução no número de *S. aureus*. Em nosso trabalho avaliamos a curva de crescimento bacteriano, mostrando que a *E. coli* entra em fase logarítmica uma hora antes que a bactéria

S. aureus, e provavelmente produz o polissacarídeo que promove a exclusão de *S. aureus* do biofilme múltiplo.

Foram observadas neste trabalho alterações morfológicas nos biofilme induzidas pela TFD em *S. aureus* e *E. coli*. As imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram que a TFD promoveu alterações morfológicas no biofilme bacteriano em ambas as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Para *S. aureus*, a TFD promoveu perda de contato entre a massa do biofilme, com espalhamento e danos de agregação. Para *E. coli*, após a TFD, a confluência do biofilme foi alterada pelo rompimento da estrutura densa e homogênea, vista apenas no grupo controle.

Imagens de microscopia confocal realizadas por Di Poto et al. (2009) mostraram biofilmes submetidos a fotossensibilização, mostrando um aumento da permeabilidade das células bacterianas a iodeto de propídio, o que indica que a membrana da célula pode ser um local importante de fotodano. É possível que a lesão das membranas bacterianas pode comprometer os contatos célula-célula ou interações célula-matriz, que conduz a uma perda de células a partir dos biofilmes. Além disso, a presença de células mortas em toda a espessura do biofilme implica que não há qualquer obstáculo à difusão do fotossensibilizador e a penetração da luz. Além de matar bactérias em biofilmes, a TFD apresenta uma segunda ação importante que levou ao desprendimento celular, e consequente ruptura da arquitetura do biofilme. Portanto, Di Poto et al. (2009) realizaram procedimentos experimentais onde a ação do TFD em biofilmes estafilocócicos foi combinada com tratamento com vancomicina, e descobriram que a combinação da TFD e vancomicina foi mais eficaz do que qualquer agente sozinho.

Neste trabalho foi avaliado o efeito da combinação da terapia fotodinâmica com o antibiótico ciprofloxacina na redução bacteriana em biofilme, mostrando que a combinação foi mais eficaz do que somente o tratamento com a TFD. Para *S. aureus*, utilizando a irradiação de $11,2\text{J}/\text{cm}^2$, obtivemos redução de 5,24 log, utilizando o azul de metileno na concentração de $200\mu\text{g}/\text{mL}$ e $62,5\mu\text{g}/\text{mL}$ de ciprofloxacina, enquanto que somente a TFD promoveu uma redução de 4,65 log, na mesma irradiação e concentração de azul de metileno. Para *E. coli* a redução

foi ainda maior, pois somente a TFD promoveu uma redução de 4,3 log na concentração de 200µg/mL e irradiação de 11,2J/cm². Já na irradiação de 11,2J/cm², foi observado crescimento bacteriano somente na menor concentração testada de antibiótico, de 0,125µg/mL, nas concentrações de 50 e 25µg/mL, onde foi observada uma redução de 6,95 log e 6,65 log respectivamente.

Estudos realizados por Ceri e colaboradores (1999) mostraram que a MIC (concentração inibitória mínima) para o biofilme de *E. coli* foi 1000 vezes maior que a MIC para a forma planctônica. Já para *S. aureus*, a MIC para o biofilme foi de 100 a 1000 vezes maior que a MIC para a forma planctônica. Neste estudo, associando a TFD com o antibiótico ciprofloxacina obtivemos redução de 5,24 log para *S. aureus*, na concentração de 200µg/mL de Azul de Metileno e 62,5µg/mL de ciprofloxacina, irradiação de 11,2J/cm², mostrando que associada com a TFD, a concentração de ciprofloxacina foi apenas 125 vezes maior que a MIC. Já para *E. coli* a redução bacteriana foi maior, pois associando a TFD com o antibiótico, na concentração de 50µg/mL de Azul de Metileno e 0,125µg/mL de ciprofloxacina, que é somente 31,25 vezes mais que a MIC, obtivemos redução de 6,25 log.

Cassidy e colaboradores (2001) determinaram que um aumento do efeito bactericida poderia ser obtido por uma combinação da TFD e tratamento com antibiótico. As cepas do complexo *Burkholderia cepacia* foram inicialmente expostas a TFD e depois a seis antibióticos frequentemente usados para tratar infecção pulmonar pelo complexo *B. cepacia*. Após o pré-tratamento com a TFD, o aumento da atividade bactericida foi aparente para todos os antibióticos, com nenhum antagonismo observado entre TFD e tratamento antibiótico.

Estudos anteriores também investigaram o efeito da TFD sobre a suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* à vancomicina, mostrando um efeito sinérgico da TFD e o tratamento antibiótico. Ambos os estudos mostraram que a TFD aumentou a susceptibilidade à vancomicina, pois a TFD causa a ruptura da matriz protetora do biofilme que envolve as células bacterianas, tornando-as suscetíveis ao antibiótico (DI POTO et al., 2009; SBARRA et al., 2009).

O desenvolvimento de estratégias para combater bactérias crescendo em biofilmes é uma tarefa desafiadora, já que estas bactérias são muito mais resistentes a terapias antimicrobianas. A Terapia fotodinâmica pode ser uma opção terapêutica muito promissora para controlar eficazmente o crescimento de biofilmes microbianos. No entanto, como outras terapias antimicrobianas, a TFD é geralmente menos eficazes contra micro-organismos que crescem em biofilmes do que contra células planctônicas. Deste modo, existe uma necessidade de desenvolver uma abordagem terapêutica que iria aumentar a sensibilidade do micro-organismo a métodos já estabelecidos, combinando vários modos de ação antimicrobiana para alcançar um efeito sinérgico, como a combinação da TFD com antibióticos. (TARASZKIEWICZ et al., 2013). E nossos resultados mostraram que a combinação da TFD e ciprofloxacina foi mais eficaz do que somente o tratamento com a TFD.

6. CONCLUSÕES

Com relação à eficiência da inativação bacteriana, as bactérias gram-positivas foram mais susceptíveis à TFD que as espécies gram-negativas. Observamos que o grupo PDT apresentou reduções bacterianas mais eficientes do que o grupo FTS tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*. Os experimentos mono e múltipla-espécie tiveram resultados similares, mostrando que a associação não favoreceu nem prejudicou o efeito da PDT. Para o biofilme múltipla-espécie, o *S. aureus* apresentou uma redução nos grupos Luz, PDT e FTS que não pode ser atribuída à ação eficaz da terapia, visto que no grupo Controle essa diminuição também pode ser observada, sugerindo uma relação de concorrência entre o *S. aureus* e *E. coli*. Para o ensaio do XTT, os valores do grupo PDT foram significativamente inferiores aos do grupo Controle. Nos experimentos de sinergismo, para suspensão, quando o antibiótico é associado com a TFD (TFD + ciprofloxacina), pode-se utilizar concentrações mais baixas que a CIM, já que a primeira concentração sub-inibitória apresentou reduções para *S. aureus* e *E. coli*. Nossos resultados nos permitem concluir que a ordem TFD + ciprofloxacina foi mais eficiente do que a ordem ciprofloxacina + TFD. Na MEV os biofilmes visualizados no grupo PDT revelaram-se dispersos, e não um biofilme denso e compacto como nas amostras do grupo Controle. Redução volumétrica das colônias de *S. aureus* foi visualizada no grupo PDT. O biofilme mostrou resistência à TFD, entretanto a combinação TFD + ciprofloxacina foi mais eficaz na redução bacteriana do que somente a TFD como mono-terapia.

7. REFERÊNCIAS

- ACHER, A.; FISCHER, E.; TURNHEIM, R.; MANOR, Y. "Ecologically Friendly Wastewater Disinfection Techniques", **Water Research**, v. 31, n. 6, p. 1398-1404, 1997.
- ACKER, H.V.; DIJCK, P.V.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends Microbiology**. v. 22, p. 326–333, 2014.
- ACKROYD, R.; KELTY, C; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**. v.74, p.656-669, 2001.
- AMARAL, R.R.; AMORIM, J.C.F.; NUNES, E.; SOARES, J.A; SILVEIRA, F.F.; Terapia fotodinâmica na endodontia - revisão de literatura. **RFO, Passo Fundo**, v. 15, n. 2, p. 207-211, 2010.
- ARMITAGE, G.C. Basic features of biofilms--why are they difficult therapeutic targets? **Ann R Australas Coll Dent Surg**, v. 17, p.30-34, 2004.
- BARUDIN, N.H.A.; SREEKANTAN, S.; ONG, M.T.; LAI, C.W. Synthesis, characterization and comparative study of nano-Ag–TiO₂ against Gram-positive and Gram-negative bacteria under fluorescent light. **Food Control**. v. 46, p. 480-486, 2014.
- BESSELINK, G.A.J.; VAN ENGELENBURG, F.A.C.; EBBING, I.G.; HILARIUS, P.M.; DE KORTE, D.; VERHOEVEN, A.J.; **Vox Sanguinis**, v. 85, p. 25, 2003
- CALABRESE, A.P.M. **Estudo da inativação de *Propionibacterium acnes* por fotodinamização de hipericina**. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, 2012.
- CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **J Photochem Photobiol B**. v. 78, p.1-6. 2005.

CARVALHO, D.P.L. **Terapia fotodinâmica no controle de micro-organismos isolados de feridas infectadas: estudo *in vitro***. 2012. 53f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Universidade do Vale do Paraíba, 2012.

CASSIDY, C.M.; DONNELLY, R.F.; ELBORN, J.S.; MAGEE, N.D.; TUNNEY, M.M.; Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) in combination with antibiotics for treatment of *Burkholderia cepacia* complex infection. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 106, p. 95-100, 2012.

CERI, H., OLSON, M.E., STREMICK, C., READ, R.R., MORCK, D., BURET, A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

CICCIO, P.D.; VERGARA, A.; FESTINO, A.R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**. v. 50, p. 930-936, 2015.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6 th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infectious. **Science**, v. 284, p. 1318- 1322, 1999.

D'ACUNTO, B.; FRUNZOA, L.; KLAPPER, I.; MATTEI, M.R.; Modeling multispecies biofilms including new bacterial species invasion. **Mathematical Biosciences**. v. 259, p. 20–26, 2015.

DAVIES, D.G.; Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DEMIDOVA, T.N., HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 17, n. 3, p. 245-254, 2004.

DI POTO, A.; SBARRA, M.S.; PROVENZA, G.; VISAI, L.; SPEZIALE, P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defense mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms, **Biomaterials**, v. 30, n. 18, p. 3158-3166, 2009.

DOLMANS, D.E.; FUKUMURA, D.E.; JAIN, R. Photodynamic therapy for cancer. **Nature**, v. 3, p. 380-387, 2003.

DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiol Res**, v. 163, n. 1, p.1-12, 2008.

ELGHNIJI, k.; KSIBI, M.; ELALOUI, E. Sol-gel reverse micelle preparation and characterization of N-doped TiO₂: Efficient photocatalytic degradation of methylene blue in water under visible light. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v.18, p. 178–182, 2012.

ESMERINO, L.A.; GONÇALVES, L.G.; SCHELESKY, M.E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. UEPG Biol. **Health Sci**, Ponta Grossa, v. 9, n. 1, p. 31-39, mar. 2003.

FERRONATO, G.R.; SALMASO, M.H.S. **Avaliação de atividade antimicrobiana de espécies de macrófitas aquáticas da região de Curitiba**. 2010. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Química Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

FIMPLE, J.; FONTANA, C.; FOSCHI, F.; RUGGIERO, K.; SONG, X.; PAGONIS, T.; Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **J Endod**, v. 34, n. 6, p.728-734, 2008.

FONTANA, C.R.; ABERNETHY, A.D.; SOM, S.; RUGGIERO, K.; DOUCETTE, S.; MARCANTONIO, R.C.; BOUSSIOS, C.I.; KENT, R.; GOODSON, J.M.; TANNER, A.C.; SOUKOS, N.S. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **J Periodontal Res.**, v. 44, n. 6, p.751-759, 2009.

GABRIELLI, D.E.; BELISLE, D.; SEVERINO, A.J.; KOWALTOWSKI, M.S. Binding, aggregation, and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochem. Photobiol.** v. 79, p. 227-232, 2004.

GANGCUANGCO, L.M.; ALEJANDRIA, M.; HENSON, K.E.; ALFARAZ, L.; ATA, R.M.; LOPEZ, M.; SANIEL, M. Prevalence and risk factors for trimethoprim–sulfamethoxazole-resistant *Escherichia coli* among women with acute uncomplicated urinary tract infection in a developing country. **International Journal of Infectious Diseases.** v. 34, p. 55-60, 2015.

GELATTI, L.C.; BONAMIGO, R.R.; BECKER, A.P.; AZEVEDO, P.A. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Porto Alegre, v. 84, n. 5, p. 501-506, out. 2009.

GIUSTI, J.S.M.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A.C.; HELMERSON, K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomedicine Laser Surg**, v. 26, n.4, p.281-287, 2008.

GOUVEIA, C.M.F. ***Staphylococcus aureus* adquirido na comunidade, em Idade pediátrica: resistência aos antimicrobianos, importância da Leucocidina de Panton-Valentine, caracterização molecular e correlação com a clínica.** 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

HAMBLIN, M.R.; HASAN, T.; Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol.** v. 3, n. 2, p. 436-450, 2004.

HENDERSON, B.W.; MAYHEW, E. Experience with the liposomal delivery of the photosensitizer isoBoSiNc. **Proc SPIE**, v.1203, p. 126-135, 1990.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. **Crescimento microbiano em biofilmes**. Publicado em 18/11/2005, Revisto em 03/04/2008. Disponível em <<http://www.escola.pt/topico.asp?id+354>>. Acesso em 03 de novembro de 2014.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711 p.

JOCKUSCH, S.; LEE, D.; TURRO, N.J.; LEONARD, E.F. Photo-induced inactivation of viruses: adsorption of methylene blue, thionine, and thiopyronine on Qbeta bacteriophage. **Proc Natl Acad Sci**, v. 93, p.7446-7451, 1996.

KENNEDY, J.C. Introduction. In: POTTIER, R.; KRAMMER, B.; STEPP, H.; BAUMGARTNER, R. Photodynamic therapy with ALA A clinical handbook. Cambridge: **RSC Publishing**, p. 1-14, 2006.

KHOT, P.D.; SUCI, P.A.; TYLER, B.J. *Candida albicans* viability after exposure to amphotericin B: Assessment using metabolic assays and colony forming units. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, n. 3, p. 268-274, 2008.

KIM, N.J.; AHN, K.B.; JEON, J.H.; YUN, C.H.; FINLAY, B.B.; HAN, S.H. Lipoprotein in the cell wall of *Staphylococcus aureus* is a major inducer of nitric oxide production in murine macrophages. **Molecular Immunology**. v. 65, p. 17–24, 2015.

KYAW, C.M. **Biofilmes Microbianos**. Disponível em www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm>. Acesso em 05 de janeiro de 2015.

LEE, J.H.; KIM, Y.G.; RYU, S.Y.; CHO, M.H.; LEE, J. Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba* extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Materials Science and Engineering**. v. 51, p. 356–361, 2015.

LEI, X.; LIU, B.; HUANG, Z.; WU, J.A. Clinical study of photodynamic therapy for chronic skin ulcers in lower limbs infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Arch Dermatol**. v. 307, n.1, p.49 - 55, 2014.

LUKSIENE, Z.; PECIULYTE, D.; JURKONIENE, S.; PURAS, R. Inactivation of possible fungal food contaminants by photosensitization, **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, p. 1-7, 2005.

MACDONALD, I.J; DOUGHERTY, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **Jounal of Porphyrins Phthalocyanines**, v. 5, p. 105-129, 2001.

MACEDO, J.A.B.; MILKNET. **Biofilmes Bacterianos: Uma Preocupação Para a Indústria de Alimentos**. Disponível em: <www.milknet.com.br>. Acesso em 04.set.2006.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. N. PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, 10 ed. São Paulo: Pearson-Prentive Hall, 2004.

MAISCH, T.; Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 4, p. 1542-1552, 2005.

MALIK, Z.; LADAN, H.; NITZAN, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. **J Photochem~Photobiol B**, v. 14, p. 262-266, 1992.

MALIK, Z.; NITZAN, Y. Synergistic Antibiotic Compositions Containing a Perphyrin and an Antibiotic. **WO Patent**, v. 463, 1995.

MANG, T.S.; TAYAL, D.P.; BAIER, R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. **Lasers Surg Med**. v. 44, n. 7, p. 588-596, 2012.

MANYAK, M.J. Photodynamic therapy: present concepts and future applications. **Cancer J**, v. 3, p. 104-109, 1990.

MEDONLINE. Medicina on Line.. Biofilme: um velho problema, uma nova batalha. **Revista Virtual de Medicina**. Disponível em <www.medonline.com.br>. Acesso em 7 de setembro de 2014.

MELO, W.C.M.A.; PERUSSU, J.R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v. 33, n. 3, p.331-340, 2012.

MILLEZI, A.F.; **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. 113f. Tese (Doutorado em Microbiologia de alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MILLEZI, F.M.; PEREIRA, M.O.; BATISTA, N.N.; CAMARGOS, N.; AUAD, I.; CARDOSO, M.D.G.; PICCOLI, R.H. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**, v. 32, p. 351-359, 2012.

MÜLLER, F. **Terapia Fotofinâmica antimicrobiana contra bactérias gram-positivas: estudo comparativo entre fotossensibilizantes**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NAN, L.; YANG, K.; REN, G. Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. **Materials Science and Engineering**. v. 51, p. 356–361, 2015.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia oral e imunologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

OGBODU, R.O.; LIMSON, J.L.; PRINSLOO, E.; MYOKONG, T. Photophysical properties and photodynamic therapy effect of zinc phthalocyanine-spermine-single walled carbon nanotube conjugate on MCF-7 breast cancer cell line. **Synthetic Metals**. v. 204, p. 122–132, 2015.

PELOI, L.S.; **Estudos da aplicação do corante azul de metileno em terapia fotodinâmica**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

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

PHOENIX, D.A.; HARRIS, F. Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterials of the future? **Trends Mol Med**, v. 9, n.7, p. 283-285, 2003.

RAAB O. On the effects of fluorescent substances on infusoria. **Z Biol.**, v. 39, p.524-546, 1990.

RAMAGE, G.; WALLE, K.V.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2475–2479, 2001.

REED, S.J.B. **Electron microprobe analysis and scanning electron microscopy in geology**. Cambridge University Press: New York, 1996, 201 p.

RENDUELES, O.; TRAVIER, L.; LATOUR-LAMBERT, P. Screening of *Escherichia coli* Species Biodiversity Reveals New Biofilm-Associated Antiadhesion Polysaccharides, **mBio**, v. 2, n. 3, 2011.

RIBEIRO, P.F. **Avaliação de novas estratégias de aplicação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana in vitro: cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2009. 22f. Programa Institucional de Iniciação Científica - Relatório Final De Atividades. UTFPR – Campus Curitiba. Curitiba, 2010.

SAHU K.; BANSAL H.; MUKHERJEE C.; SHARMA M.; GUPTA P.K. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J Photochem Photobiol B**, v. 96, p. 9-16, 2009.

SANTOS, A.C.M.; PIGNATARI, A.C.C.; SILVA, R.M.; ZIDKO, A.C.M.; GALES, A.C. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SANTOS, A.L. *et al*. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, Dec. 2007.

SBARRA, M.S.; ARCIOLA, C.R.; DI POTO, A.; SAINO, E.; ROHDE, H.; SPEZIALE, P.; VISAI, L. The photodynamic effect of tetra-substituted N-methyl-pyridyl-porphine combined with the action of vancomycin or host defense mechanisms disrupts *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Int J Artif Organs.**, v. 32, n. 9, p.:574-583, 2009.

SHANG, K.; AI, S.; MA, Q.; TANG, T.; YIN, H.; HAN, H. Effective photocatalytic disinfection of *E. coli* and *S. aureus* using polythiophene/MnO₂ nanocomposite photocatalyst under solar light irradiation. **Desalination**. v. 278, p. 173–178, 2011.

SHIH, M.H.; HUANG, F.C. Effects of Photodynamic Therapy on Rapidly Growing Nontuberculous *Mycobacteria* Keratitis. **IOVS**, v. 52, n. 1, 2011.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações, e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

SOM, S.; GOODSON, J.M.; ABERNETHY, A.; RUGGIERO, K.; DUNHAM, J.; SKOBE, Z.; ROGERS, R.A.; TEGOS, G.; HAMBLIN, M.R.; DOUKAS, A.G.; SOUKOS, N.S. Characterization and validation of a dental plaque microcosm laboratory biofilm. **J. Dent. Res.**, v. 83, 2004.

SOTO, S.M.; SMITHSON, A.; MARTINEZ, J.A.; HORCAJADA, J.P.; MENSA, J.; VILA, J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. **Journal of Urology**, v. 177, n.1, p.365–368, 2007.

SOUKOS, N.S.; CHEN, P.S.; MORRIS, J.T.; RUGGIERO, K.; ABERNETHY, A.D.; SOM, S.; FOSCHI, F.; DOUCETTE, S.; BAMMANN, L.L.; FONTANA, C.R.; DOUKAS, A.G.; STASHENKO, P.P. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **J Endod.**, v. 32, n.10, p. 979-984, 2006.

SOUZA, M.V.N; ALMEIDA, M.V.; SILVA, A.D.; COURI, M.R.C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz, **Rev. Bras. Farm.**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2004.

STERNBERG, E.D., DOLPHIN, D., BRUCKNER C., Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy, **Tetrahedron**, v. 54, p. 4151-4202, 1998.

STEWART, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 107-113, 2002.

SUNTHARALINGAM, P.; CVITKOVITCH, D.G. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. **Trends Microbiol**, v.13, p. 3-6, 2005.

TAMASHIRO, E. *et al.* Biofilmes bacterianos em rinosinusite crônica: o que este conceito muda na abordagem terapêutica. **RBM ORL**, v. 4, p. 130-135, 2008.

TARASZKIEWICZ, A.; GRZEGORZ, F.; MARIUSZ, G.; NAKONIECZNA, J. Innovative Strategies to overcome biofilm Resistance. **Hindawi**, v. 2013, p. 1-13, 2012.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999.

TUITE, E.M.; KELLY, J.M. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. **J Photochem Photobiol B.**, v. 21, n.2-3, p.103-124, 1993.

UNB. **Biofilmes Microbianos**. Desenvolvida por KYAW, C. M. Disponível em: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html> Acesso em: 04.jul.2009.

USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. **Lasers Surg Med**, v. 33, p.311-319, 2003.

VALEUR, B. BERBERAN-SANTOS, N. **Molecular fluorescence principles and applications**. Rio de Janeiro: WILEY, Weinheim, 2002.

VAN DER MEULEN, F.W.; IBRAHIM, K.; STERENBORG, H.J.; ALPHEN, L.V.; MAIKOE, A.; DANKERT, J. Photodynamic destruction of *Haemophilus parainfluenzae* by endogenously produced porphyrins. **J Photochem Photobiol B**, v.40, p. 204-208, 1997.

VIANELLO, M.A. **Caracterização genotípica de fatores de virulência e seu regulador agr em cepas de Staphylococcus aureus sensíveis a oxacilina**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

VOHRA, F.; AL-KHERAIF, A.A.; QADRI, T. HASSAN, M.I.A.; AHMED, A.; WARNAKULASURIYA, S.; JAVED, F. Efficacy of photodynamic therapy in the management of oral premalignant lesions. A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 12, p. 150-155, 2015.

WAINWRIGHT, M. The emerging chemistry of blood product disinfection. **Chemical Society Reviews**, v. 31, p. 128-136, 2002.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D.A.; LAYCOCK, S.L.; WAREING, D.R.; WRIGHT, P.A. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 160, p. 177-181, 1998.

WALDVOGEL, F. *Staphylococcus aureus*. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles & Practice of Infectious Diseases. **Churchill Livingstone-PA**, v. 2, p. 2069-2079, 2000.

WATANABE, D.S.A.; MICHELIN, L.A.; MONTELLI, A.C. Infecção urinária por *Escherichia coli* – correlação de características clínicas, patogênicas e sorogrupos. **Rev.Bras.Patol.Clin.** v. 27, n. 4, p.111-117, 1991.

WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr. Microbiol.** v.25, p.77-81, 1992.

WU, J.; XU, H.; TANG, W.; KOPELMAN, R.; PHILBERT, M.A.; XI, C. Eradication of bacteria in suspension and biofilms using methylene blue-loaded dynamic nanoplateforms. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53, n. 7, p. 3042-3048. 2009.

YADAV, H.M.; OTARI, S.V.; BOHARA, R.A.; MALI, S.S.; PAWAR, S.H.; DELEKAR, S.D. Synthesis and visible light photocatalytic antibacterial activity of nickel-doped TiO₂ nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology.** v. 294, p. 130–136, 2014.

YAMADA JÚNIOR, A.M.; **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica em periodontite induzida em ratos.** 2007. 91f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

YAMAMOTO, M.; NAGANO, T.; OKURA, I.; ARAKANE, K.; URANO, Y.; MATSUMOTO, K. Production of singlet oxygen on irradiation of a photodynamic therapy agent, zinc-coproporphyrin III, with low host toxicity. **Biometals**, v. 16, p. 591-597, 2003.

ZHU, T.C.; FINLAY, J.C. Prostate PDT Dosimetry. **Photodiagnosis and Photodynamic. Therapy**, v. 3, p. 234-246, 2006.

8. ANEXOS

Fluxogramas de realização dos experimentos em suspensão e biofilme, com as concentrações de Azul de Metileno e doses de luz utilizadas para *S. aureus* e *E. coli*, utilizando a TFD como mono-terapia e também tratamento combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina, com as concentrações testadas do antibiótico.

8.1. Fluxograma de realização dos experimentos em suspensão e biofilme para *S. aureus* e *E. coli*

As figuras 23 e 24 mostram os fluxogramas de realização dos experimentos em suspensão e biofilme, com as concentrações de Azul de Metileno e doses de luz utilizadas para *S. aureus* e *E. coli*, utilizando a TFD como mono-terapia.

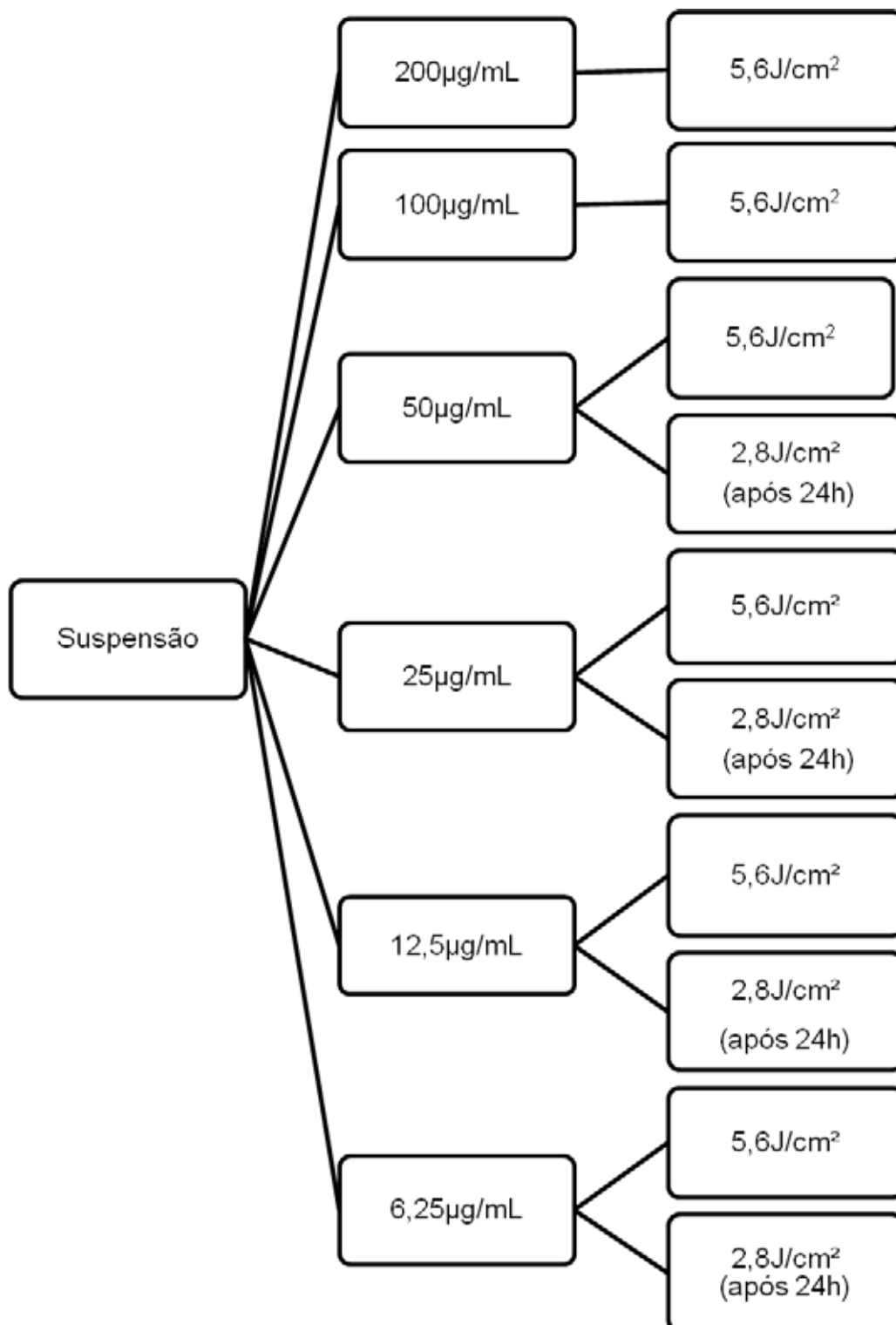


Figura 23: Fluxograma de realização dos experimentos em suspensão para *S. aureus* e *E. coli*

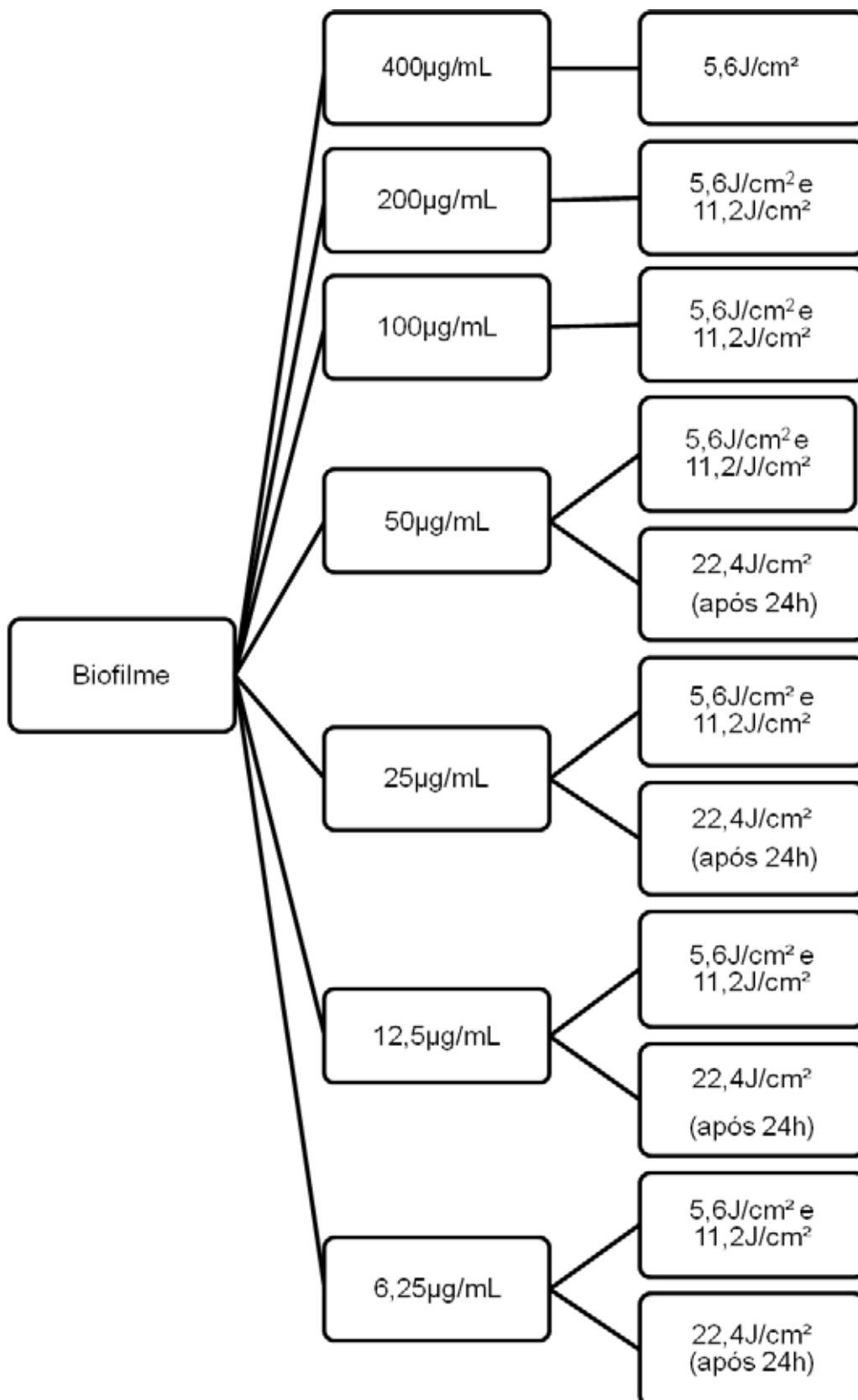


Figura 24: Fluxograma de realização dos experimentos em biofilme para *S. aureus* e *E. coli*

8.2. Fluxograma de realização dos experimentos em suspensão e biofilme para *S. aureus* e *E. coli* no tratamento combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina

As figuras 25, 26 e 27 mostram os fluxogramas de realização dos experimentos em suspensão e biofilme, com as concentrações de Azul de Metileno testadas para *S. aureus* e *E. coli*, utilizando tratamento combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina, com as concentrações testadas do antibiótico.

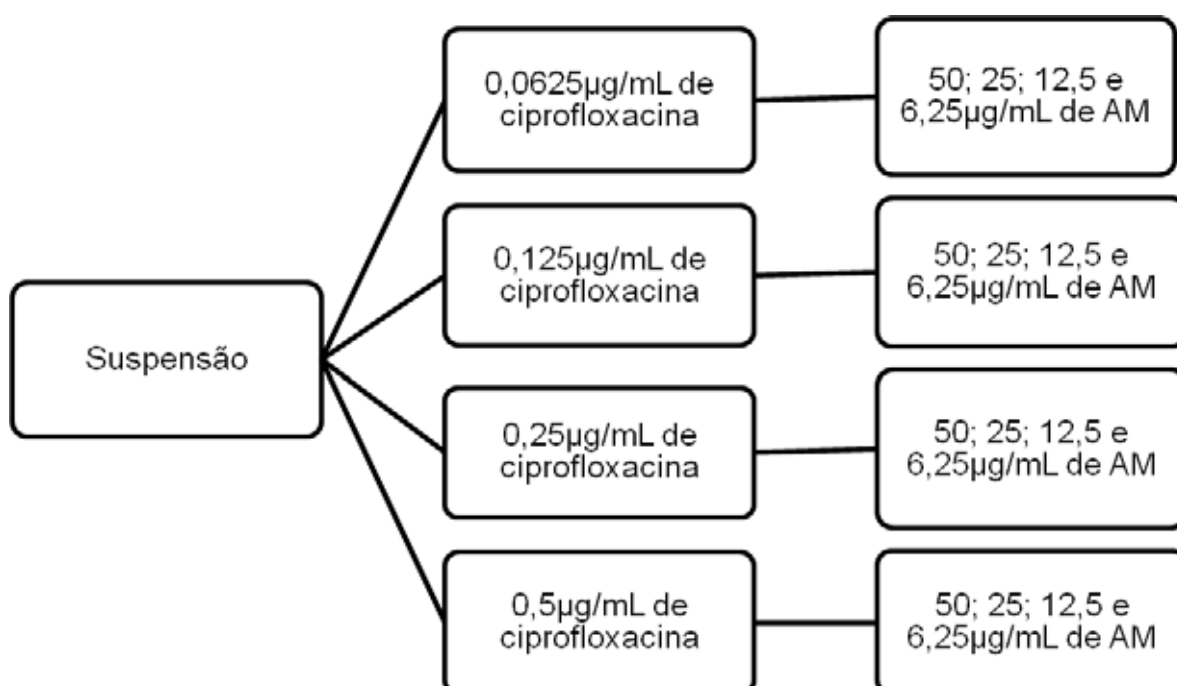


Figura 25: Fluxograma de realização dos experimentos em suspensão para *S. aureus* e *E. coli*, no tratamento combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina

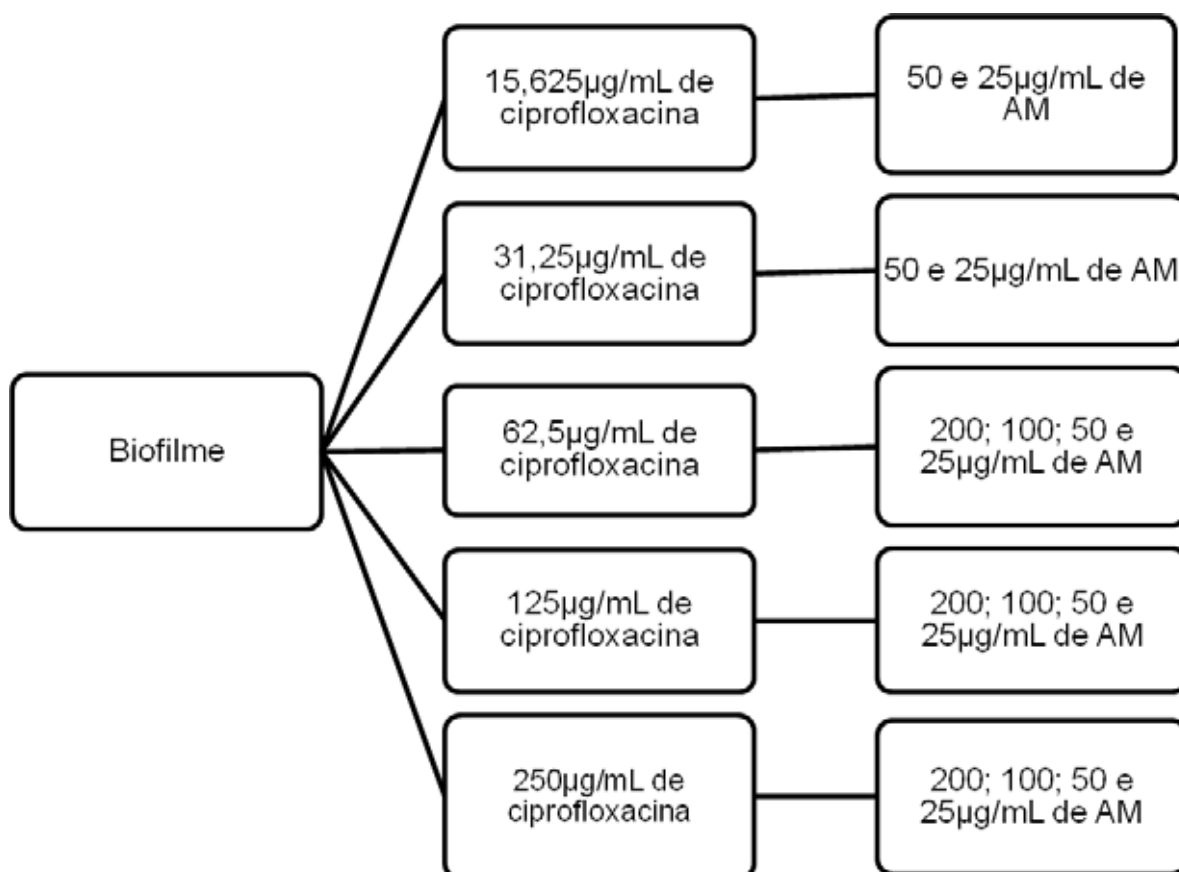


Figura 26: Fluxograma de realização dos experimentos em biofilme para *S. aureus*, no tratamento combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina

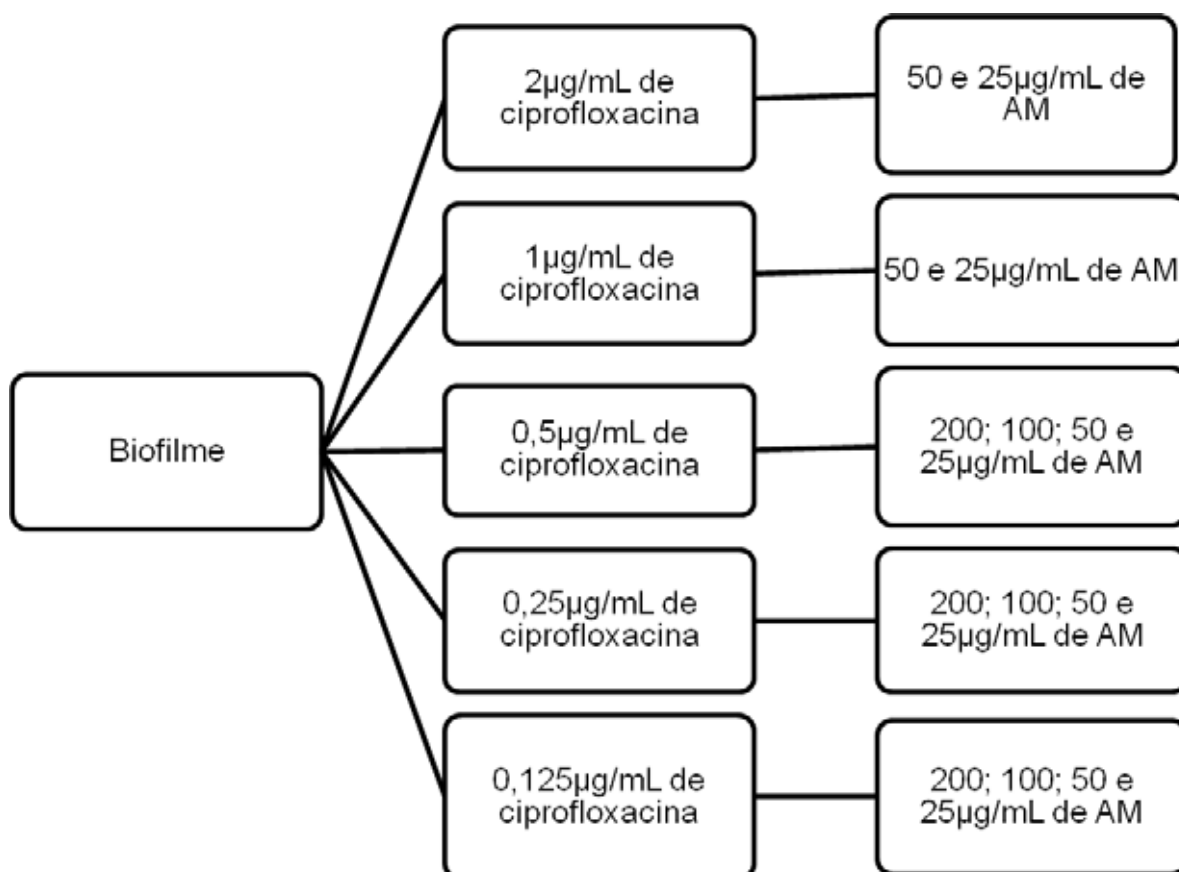
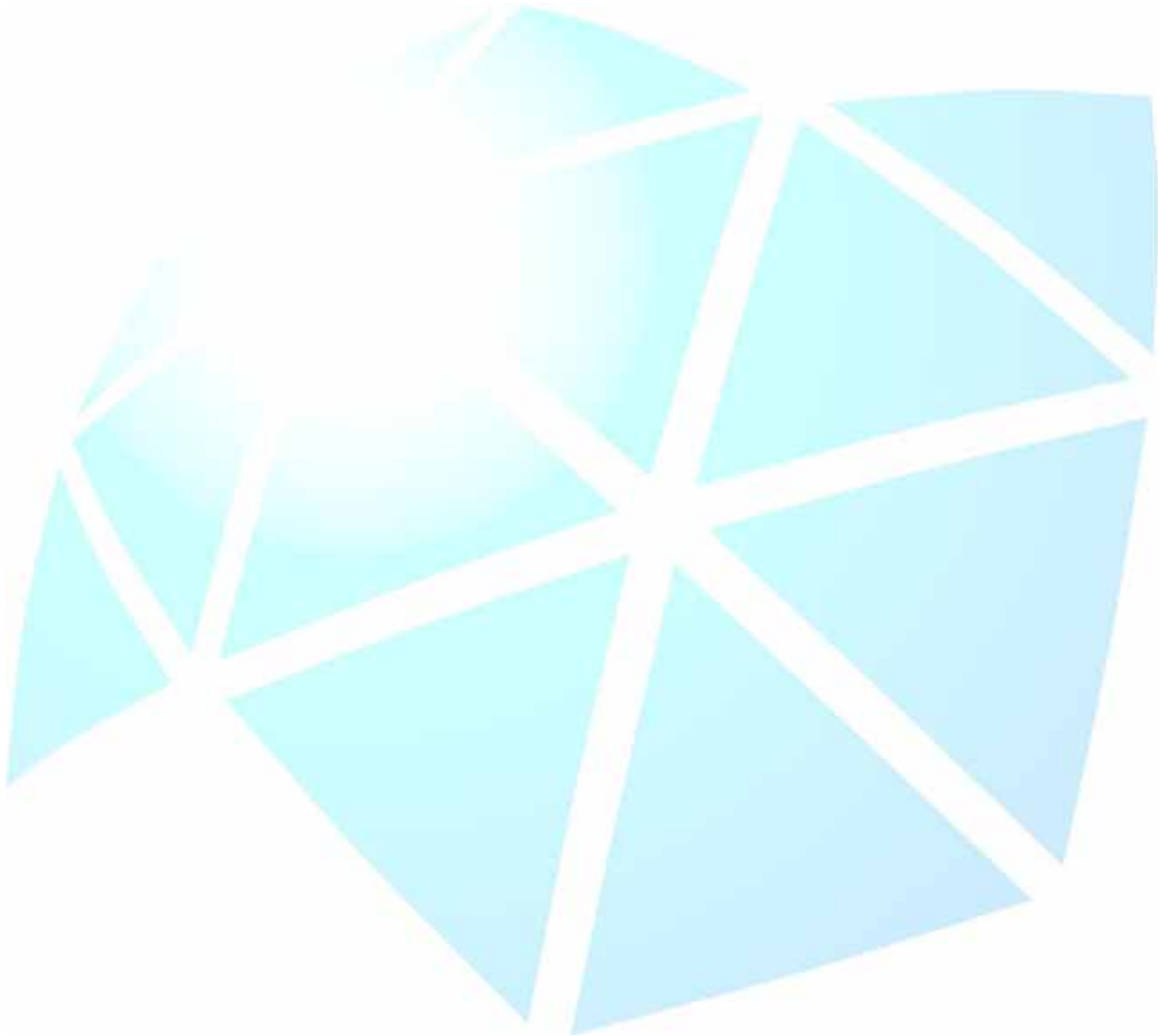


Figura 27: Fluxograma de realização dos experimentos em biofilme para *E. coli*, no tratamento combinado da TFD e tratamento com ciprofloxacina



Capítulo 2

Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin

Maria Rita Ronqui¹, Tatiana Maria Starck Fogaça de Aguiar Coletti¹, Laura Marise de Freitas¹, Elaine Toscano Miranda¹, Carla Raquel Fontana¹

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Univ. Estadual Paulista (UNESP). Rua Expedicionários do Brasil 1621, Araraquara, São Paulo, Zip code: 14801-902, Brazil

Maria Rita Ronqui ritaronqui@hotmail.com

Tatiana Maria Starck Fogaça de Aguiar Coletti tatistarck@ig.com.br

Laura Marise de Freitas lfmarise@gmail.com

Elaine Toscano Miranda toscae@fcar.unesp.br

Corresponding Author: Carla Raquel Fontana: fontanacr@fcar.unesp.br

Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Araraquara,

São Paulo, Zip code: 14801-902, Brazil

Phone (55) 16 3301-5727

Abstract

The occurrence of a variety of pathogens resistant to current antibiotics remains the major problem especially when bacterial infections are growing in biofilm. In this study, we propose the use of photodynamic therapy (PDT) as monotherapy and also associated with antibiotic therapy as an alternative treatment. The aim of this study was to analyze the effects of PDT mediated by methylene blue (MB) on *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) as biofilm and planktonic phase. Different concentrations of photosensitizer (400; 200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25 $\mu\text{g/mL}$), and fluence of 2.8; 5.6; 11.2; 22.4 J/cm^2 were tested. We also carried out experiments that evaluated the synergistic effect of photodynamic therapy and the antibiotic ciprofloxacin. The bactericidal effects of PDT as monotherapy were not statistically increased with the concentration of photosensitizer and bacteria in biofilms were less affect than in the planktonic phase. Although not concentration-dependent the disruption effect of PDT on biofilms was clearly illustrated by control and tested specimens examined under the scanning electron microscope (SEM). The best results were obtained after synergistic effect of photodynamic therapy on biofilms followed by ciprofloxacin that amplified to 5.4 log for *S. aureus* biofilm and approximately 7 log for *E. coli* biofilm reduction.

Keywords: Photodynamic therapy, methylene blue, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, combined therapy.

1. Introduction

Microorganisms growing in biofilms have been found to be relatively resistant to antimicrobial therapy. The heterogeneous structure composed of bacteria attached which are bound to a surface, surrounded by an extracellular matrix and which display phenotypic traits not observed in their planktonic counterparts can explain how biofilm protects the bacteria within against the host's immune mechanisms and antimicrobial agents. It has been shown that *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains are able to adhere to and form biofilms on different biomaterials and medical devices [1]. As an opportunistic pathogen *S. aureus* can cause a variety of self-limiting to life-threatening diseases. It is one of the most common causes of skin, soft-tissue, and nosocomial infection. Complications with staphylococcal infection at other sites, or complications of surgical procedures as deep infections include endocarditis, peritonitis, necrotizing pneumonia, bacteremia, meningitis, osteomyelitis, septic arthritis, and infections of bones, joints and organs. *Escherichia coli* is a well-known member of human intestinal tract that harbours a diverse and complex microbial community, but it is also known to cause infectious endocarditis [2], urinary tract infections [3], bacteremia as well as sepsis [4].

The biofilm formation of *S. aureus* and *E. coli* strains on surface of synthetic implants may also cause a serious complication as deep surgical site infection encompassing the implant. Generally, the use of large amounts of antibiotics for long periods is undesirable in clinical practice. An effort to improve the therapeutic results and reduce the occurrence of undesirable side effects directed recent research to search efficient ways to cause biofilm disturbance via alternative methods of treatment, such as photodynamic therapy (PDT) [5, 6].

Shortening, PDT is a treatment based on the interaction of light, photosensitizing agents and oxygen, leading to target cell death via oxidative damage. Light sources for PDT can be either lasers or LED (Light Emitting

Diode), but due to several advantageous characteristics, including lower cost approach when compared to laser systems, LED are rapidly gaining popularity as light sources used in PDT. Currently, with the development of new technologies, LED with a suitable spectrum overlapping the absorption spectrum of a photosensitizer and a sufficient intensity can be applied for PDT. This therapy modality involves the use of photosensitizer molecules excited by a specific wavelength of light and which then leads to the production of singlet oxygen, highly toxic to cells. Since bacteria have a small negative charge theoretically ideal photosensitizer should be cationic [7].

In summary, photodynamic therapy has been advocated an alternative to antimicrobial treatment, either in combination with traditional methods or alone, arising as a non-complex modality with little side effects [8]. In this study we aimed to evaluate the effect of PDT individually in suspension and biofilm as monotherapy and its synergistic effect in combination with ciprofloxacin. Associating PDT and ciprofloxacin can bring their individual advantages together improving bacterial reduction as long as reducing antibiotic concentration and photosensitizer toxicity.

2. Materials and Methods

Bacterial inoculum preparation. In this study we used American Type Culture Collection reference strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922), provided by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Manguinhos, RJ, Brazil. A single colony of the respective *S. aureus* or *E. coli* strains were inoculated into 5 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) and incubated for 24 hours at 37°C. Afterwards, when the bacterial culture reached the log phase of growth, for adjustment of the inoculum, the absorbance was measured using spectrophotometer (Biotek®, Winooski, VT, USA) with a wavelength of 620 nm. The interval of absorbance reading was considered a range from 0.08 to 0.10, which corresponds to a 0.5 McFarland scale.

Biofilm development. Under aerobic conditions, the bacteria was dispersed and added to TSB. For biofilm development, according to published model [9], 96-well plates were previously prepared with 150 μL of TSA (Trypticase Soy Agar) or Mueller-Hinton agar. One-hundred and fifty microliters of the inoculum (approximately 10^8 bacteria) was carefully pipetted to fill the agar wells in each 96-well plate. The plates were then incubated aerobically at 35°C for five days. After an initial incubation period of 48 hours, the liquid medium was carefully aspirated from each well and the biofilms were replenished with fresh broth. Then, fresh TSB was added daily into each well, very slowly, to avoid disruption of the biofilm.

Photosensitizer. Methylene blue (Sigma Co., St. Louis, USA;) was dissolved in Phosphate Buffered Saline (PBS) to give solutions at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ before use and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for biofilm only. The absorption spectra of methylene blue was recorded from 400 to 700 nm using quartz cuvettes with a 1-cm path length using a Lambda 1050 UV/Vis/NIR spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and was characterized by a long-wavelength maximum at 665 nm.

Light source. A compact red light-emitting diode (LED) array-based illumination system at 660 nm with a homogeneous illumination area and a cooling device, composed of 48 LED with variable intensities (IrradLED[®] – biopdi, São Carlos, SP, Brazil) was used. The distance between the LED and the plate allowed an even distribution of light on each well. The power density of the incident radiation was measured using a power meter (Coherent[®], Santa Clara, CA, USA). The light energy fluence used in this study for bacterial suspensions were 2.8 and 5.6 J/cm^2 and biofilms were 5.6; 11.2 e 22.4 J/cm^2 . The following groups were used: 1. L-MB- (control group), 2. L+ MB- (treated only with light; light group), 3. L-MB+ (treated only with methylene blue; MB group), and 4. L+ MB+ (treated with methylene blue and light; photodynamic therapy group). Groups 1 and 3 were kept in plates at room temperature and covered with aluminum foil during irradiation of groups 2 and 4.

Planktonic phase. Tubes with 1 mL of inoculum were centrifuged at 13000 rpm for 15 minutes to add 1mL of methylene blue for the MB and PDT groups. For Light and Control group, methylene blue was replaced by TSB and samples were homogenized and wrapped in aluminum foil to complete the incubation time (25 minutes of drug incubation for MB group and 5 minutes for PDT group). Following incubation, bacterial suspensions were placed in the wells of 96-well plates and exposed to light of 660 nm from above at room temperature. During photodynamic therapy, 96-well plates remained covered with a lid, and special care was taken not to disturb the plates. After illumination of the appropriate wells, bacterial suspensions underwent serial dilutions in TSB and 100- μ L aliquots were plated on TSA plates and then incubated under aerobic conditions for 1 day.

Biofilms. Biofilms were developed as described before. There was one plate for control and MB groups and other plates for PDT and Light group to avoid light exposure of adjacent wells. 96-well plates containing the *S. aureus* biofilms or *E. coli* biofilm were exposed to TSB (light and control group) and methylene blue at concentrations of 400; 200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25 μ g/mL for 5 min at PDT group. Those wells were then simultaneously irradiated with red light.

During photodynamic therapy, 96-well plates remained covered with a lid and were not disturbed. After illumination, adherent bacteria were gently scraped from TSA in each well using a sterile bacteriological loop to remove the biofilm and dispersed in TSB. The same experienced researcher removed all of the biofilms to ensure that the scrapings collected the entire biofilm and did not add variability to the results. Samples were submitted to serial dilutions and 100- μ L aliquots were spread over the surface of TSA plates. The plates were incubated aerobically at 37°C for 1 day.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The ciprofloxacin activity on bacterial growth was determined by the microdilution method. It was conducted based on normalization M7-A6 according to the recommendations given in the

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) document for aerobic bacteria [10].

Evaluation of synergism in planktonic phase: ciprofloxacin after PDT. The MIC plus three sub-inhibitory concentrations (I, II and III) of ciprofloxacin were tested as follows: for *S. aureus* concentrations were 0.5 µg/mL (MIC); 0.25 µg/mL (I); 0.125 µg/mL (II) and 0.0625 µg/mL (III); for *E. coli*, 0.004 µg/mL (MIC); 0.002 µg/mL (I); 0.001 µg/mL (II) and 0.0005 µg/mL (III). MB concentrations of 50; 25; 12.5 and 6.25 µg/mL were tested and light irradiation was performed at 2.8 J/cm², conditions determined according to the results obtained from PDT assays using energy fluence of 5.6 J/cm². After PDT, 100 µL of each MB sample were transferred to a microtube containing 100 µL of ciprofloxacin; control group was transferred to a microtube containing 100 µL of Mueller-Hinton broth. Samples were then incubated at 37°C for 24 hours and, after that, submitted to serial dilution and plated on Mueller-Hinton agar plates, also at 37°C for 24 hours.

Evaluation of synergism in planktonic phase: PDT after ciprofloxacin. PDT and antibiotic conditions were the same as described above. For the assay, bacterial suspensions were standardized from a 18 hour culture to a 0.5 McFarland scale turbidity (approximately 1.0 x 10⁸ CFU/mL) by adding Mueller-Hinton broth to the culture tube. OD at 620 nm was checked to confirm microorganism concentration (OD range from 0.08 to 0.1). Bacterial suspensions were centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes and the pellets were suspended in 1 mL of each ciprofloxacin concentration (MIC, I, II or III). Samples were incubated at 37°C for 24 hours. Following, PDT was performed as previously described.

Evaluation of synergism in biofilms: ciprofloxacin after PDT. Biofilms were developed in 96-well plates as described above. MB concentrations tested were 200; 100; 50 and 25 µg/mL and energy fluences were 11.2 and 22.4 J/cm², determined according to PDT results obtained on biofilms. Ciprofloxacin concentrations tested were all five sub-inhibitory concentrations multiplied for a factor of 1,000 (I, II, III, IV and V): for *S. aureus*, de 250 (I); 125 (II); 62.5 (III);

31.25 (IV) and 15.625 µg/mL (V); and for *E. coli*, 2 (I); 1 (II); 0.5 (III); 0.25 (IV) and 0.125 µg/mL (V). After PDT, 100 µL of each MB sample were transferred to a microtube containing 100 µL of each ciprofloxacin concentration; control group was transferred to a microtube containing 100 µL of Mueller-Hinton broth. Samples were then incubated at 37°C for 24 hours and, after that, submitted to serial dilution and plated on Mueller-Hinton agar plates, also at 37°C for 24 hours.

Scanning Electron Microscopy. Bacterial suspensions were standardized from 18 hours culture in Mueller-Hinton broth for *S. aureus* and *E. coli* to achieve approximately 1.0×10^8 CFU/mL. In a 13mm diameter glass coverslip, 600 µL of the suspension was dispensed and incubated at room temperature for 72 hours for biofilm growth without agitation. After 72 hours, the replacement of culture medium was performed and incubated for additional 24 hours. Following biofilm formation, samples were submitted to PDT irradiation with $11.2\text{J}/\text{cm}^2$ and the concentration of 200 µg/mL of MB. Untreated biofilm was used as control. After treatments (PDT and Control) coverslips were thoroughly washed with 0 sterile 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The washing procedure was repeated three times and 1mL of 3% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4 was added. Then, three washes with pure buffer solution were carried out. Dehydration was carried out increasing concentrations of ethanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) [11,12]. Following dehydration samples were dried in a desiccator with silica for 72 hours and analyzed in a scanning electron microscope (model HITACHI TM3000)

3. Results

Minimum Inhibitory Concentration. MIC was measured by determining the optical density (OD) and defined as the lowest concentration of antibiotic allowing no growth after 24 hours of incubation that caused a decline in the value of the absorbance. The MIC of ciprofloxacin for *S. aureus* was 0.50 µg/mL and 0.004 µg/mL for *E. coli*.

Planktonic phase. In mono-species assays with *S. aureus* and *E. coli*, MB at 200 µg/mL showed no dark toxicity (MB group); reductions of 1.69 log (21%) and 0.87 log (11%) for *S. aureus* and *E. coli*, respectively, were observed (Fig. 1). Multiple species assays (*S. aureus* + *E. coli*) resulted in a reduction of 1.58 log (19%) and 0.91 (11%) at MB group (Fig 2). Analyzing the effect of light individually (L+MB-), we did not observe significant bacterial reduction either for *S. aureus* or *E. coli* at all fluencies tested (Fig 1 and Fig 3).

PDT (L+MB+) for *S. aureus* at all MB concentrations tested and irradiation of 5.6 J/cm² showed bacterial reductions above 50%, including the lower concentration used (6.25 µg/mL) on mono-specie experiment (Fig.1) The maximum reduction was 7.79% (5.45 log) for MB at 200 µg/mL. However, for *E. coli* at highest concentration (200 µg/mL) a reduction of 42% (3.46 log) at fluence of 5.6 J/cm² was achieved (Fig.1). Carrying out irradiation at 2.8 J/cm², no reduction was observed on both strains (Fig.3).

Biofilm phase. For both *S. aureus* and *E. coli* dark toxicity was not observed in any of the tested MB concentrations (MB group) (Fig 4). Reductions observed for Light group at 5.6, 11.2 J/cm² and 22.4 J/cm² were negligible, peaking at 0.67% (log 12:06) (Fig 4, 5 and 6).

For PDT group, killing of 28.52% (2.55 log) and 25.27% (2.26 log) for *S. aureus* and *E. coli*, respectively, was achieved when using 200 µg/mL of MB and 5.6 J/cm² energy fluence (Fig 4).

To improve PDT effect, the parameters of concentration and irradiation were changed. MB at 200, 100 and 50 µg/mL was also tested in combination with 11.2 J/cm². At the highest concentration (200 µg/mL), *S. aureus* biofilm reduction of 51.95% (4.65 log) and *E. coli* biofilm reduction of 48.04% (4.3 log) was obtained (Fig. 5). Concentrations of 50, 25 and 12.5 and 6.25 µg/mL associated with 22.4 J/cm² were not enough to cause biofilm reduction (Fig 6).

Combined effect of PDT and ciprofloxacin

- Planktonic phase (PDT + ciprofloxacin)

PDT followed by ciprofloxacin. For *S. aureus*, performing PDT with MB concentrations of 50 and 25 µg/mL followed by the first sub-inhibitory concentration of ciprofloxacin (I) resulted in a bacterial reduction of 74.67% and 72.69% (6.78 and 6.6 log), respectively. However, using the third sub-inhibitory concentration (III) reduction dropped to 28.74% (2.61 log) with 50 µg/mL of MB and 24.45% (2.22 log) with 25 µg/mL of MB. For *E. coli*, using the first sub-inhibitory concentration (I) we obtained a reduction of 53.78% and 53.23% (4.91 and 4.86 log) at MB concentrations of 50 and 25 µg/mL, respectively. However, using the second sub-inhibitory concentrations (II) resulted in a reduction of only 0.66% (0.06 log) at 50 µg/mL of MB and 0.33% (0.03 log) at 25 µg/mL of MB (Fig 7).

Ciprofloxacin followed by PDT. For *S. aureus*, using MB concentrations of 50 and 25 µg/mL in the first sub-inhibitory concentration of ciprofloxacin (I) resulted in a reduction of 54.66% and 55.93% (4.75 and 4.86 log), respectively. However, when using the second sub-inhibitory concentration (II), we observed a reduction of 41.08% (3.57 log) at a MB concentration of 50 µg/mL and 38.32% (3.33 log) at a MB concentration of 25 µg/mL. For *E. coli*, using the MIC in combination with antibiotic, we observed reductions of 70.86% (6.3 log) 53.82% (4.58 log), 53.35% (4.54 log) and 53.23% (4.53 log) at MB concentrations of 50; 25; 12.5 and 6.25 µg/mL, respectively. However, using the first sub-inhibitory concentration (I), the bacterial reduction was only 14.34% and 0.35% (1.22 and 0.02 log) at MB concentrations of 50 and 25 µg/mL, respectively (Fig 7).

- Biofilm phase (PDT + ciprofloxacin)

The synergistic effect was carried out using 200; 100; 50 e 25 µg/mL of MB and fluencies of 22.4 e 11.2 J/cm² and all five sub-inhibitory ciprofloxacin concentrations multiplied by a factor of 1,000.

For *S. aureus*, with ciprofloxacin at 62.5 µg/mL and fluence of 11.2J/cm² reductions of 60.37% and 59.22% (5.24 and 5.14 log) were obtained with MB at 200 and 100 µg/mL, respectively. Only when increasing PDT fluence for 22.4 J/cm² a slightly better result was obtained via synergistic effect, resulting in 63.38% and 63.03%,(5.47 and 5.44 log) of reduction. Ciprofloxacin at lowest concentration tested (15.625 µg/mL) in association with PDT at 11.2 J/cm² caused 58.55% and 57.99% (5.9 and 5.05 log) reduction of *S. aureus* biofilm when 50 and 25 µg/mL of MB was applied, respectively. In association with 22.4 J/cm² the reductions increased to 61.80% and 61.57% (5.34 and 5.32 log).

For *E. coli*, after synergistic therapy we observed bacterial survival only at ciprofloxacin concentration of 0.125 µg/mL (sub-inhibitory V). Results were not dependent of energy fluence and varied only accordingly to MB concentrations, leading to reductions of 22.3% (2 log; 50 µg/mL of MB) and 25.64% (2.3 log; 25 µg/mL of MB) (Fig 8).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The biofilm morphology changes of *S. aureus* and *E. coli* biofilms before and after photodynamic therapy under parameters of 200 µg/mL of methylene blue and fluence of 11.2 J/cm² were evaluated.

SEM showed a disruption of biofilm structure and a reduction in the cell number when samples were treated with PDT. PDT group biofilms were dispersed, with the development of several micro-colonies, and not a dense and compact biofilm as observed for the control group (Fig 9 and 10).

4. Discussion

The development of strategies to combat bacteria growing in biofilms is a challenging task, since those bacteria are much more resistant to antimicrobial therapy. Photodynamic therapy (PDT) may be a promising therapeutic option for effectively control the growth of microbial biofilms. However, as other antimicrobial therapies, PDT is generally less effective against microorganisms

growing in biofilms than against planktonic cells. Thus, a need exists to develop a therapeutic approach that would increase the sensitivity of microorganism to established methods, combining the various modes of antimicrobial action to achieve a synergistic effect. One benefit of combination therapies is that they may reduce development of drug resistance, since a pathogen is less likely to have resistance to multiple treatments simultaneously. Another advantage is the possibility to use drugs in combination with lower concentration diminishing side effects and toxicity [13]. In the present study we evaluated the effects of photodynamic therapy with Methylene Blue as monotherapy and combination therapy of PDT and antibiotic-therapy mediated by ciprofloxacin. Different protocols have been tested and the effect of order (Antibiotic after PDT or PDT after treatment with antibiotics) was also evaluated.

The literature shows numerous photosensitizers (PS) with promising PDT properties for PDT proposes. One of the traditional PS that has been used for a diversity of applications, including PDT, is methylene blue (MB) [14]. Variations of methylene blue concentrations from 6.25 to 200 µg/mL were tested in this study (L-MB+ group). Dark toxicity evaluation was conducted in the absence of irradiation. For *E. coli* and *S. aureus*, treatment with MB alone was not bactericidal at any concentration tested. This dye has been approved for use by the United States Food and Drug Administration (FDA) for treatment of methemoglobinemia in a nonphotodynamic mode. However, when activated, MB produces a high quantum yield of singlet oxygen in the therapeutic window (600 to 900nm). When coupled with its inherently low toxicity, MB is a promising candidate for use as a PDT agent [15].

Our results related to the irradiation with the LED as a single procedure (L+MB-), showed no reduction in the CFU when the irradiation parameters used were 2.8 J/cm² and 5.6 J/cm². Experiments have shown that for *S. aureus* and *E. coli* growth inhibition was not observed with exposure to red LED light, which is consistent with our experiments [1,16].

Caring out photodynamic therapy (L+MB+) we observed that all concentrations tested of MB results significant reductions in *S. aureus*

suspension from 56.34% to 67.78% (4.53 to 5.45 log) submitted to 5.6J/cm² of light. For *E. coli* strain, the highest concentration tested (200 µg/mL) present reduction of 42% (3.46 log). These reductions were prominent on Gram positive strain as shown by literature [17, 18, 19].

To improve the bacterial reduction, the synergist effect of associating PDT with ciprofloxacin was analyzed. Our results show that such association can offer several advantages, especially when PDT precedes the antibiotic. In that case, sub-inhibitory concentrations (below MIC) of ciprofloxacin and lower concentrations of MB combined with lower fluencies may be used to yield the highest bacterial reductions.

In summary for planktonic experiments the efficiency of bacterial inactivation via PDT is evident and even more satisfactory when PDT is combined with an antibiotic, proving that the synergistic effect of those individual therapies can be a novel treatment approach.

For biofilm experiments, MB group (L-MB+) at maximum of 400 µg/mL and Light group (L+MB-) maximum of 22.4 J/cm² did not show any bacterial reduction. A recent study shows that LED irradiation at 30 J/cm² and 60 J/cm² did not cause bacterial killing, consistent with our findings. [20].

S. aureus and *E. coli* biofilm showed resistance to photodynamic therapy (L+MB+), with no killing at fluence of 5.6 J/cm² at all MB concentrations. Increasing fluence to 11.2 J/cm² the reduction obtained for *S. aureus* was 51.95% (4.65 log) and *E. coli* had 48.04% (4.3 log) of reduction both with MB at 200 µg/mL. Incomplete bacterial killing by photodynamic therapy is not limited to methylene blue. In a reported study [21], a conjugate between the photosensitizer chlorine6 and poly-L-lysine failed to eradicate microorganisms completely in dental plaque scrapings.

Better reductions were obtained by increasing energy fluence due to a greater input of photons being delivered at target region, which allows for MB molecules to interact more intensively with the surroundings and, consequently, generate a major ROS cascade leading to a greater bactericidal effect [22].

The ability of many bacteria to form biofilms provides it an important virulence factor. The bacteria surrounded by a biofilm are more difficult to be reduced than those in the planktonic form and, once a biofilm is established, it becomes a source of contamination for products and surfaces. In vitro studies indicated that bacterial strains growing in biofilms may become 10-1,000 times more resistant to the effects of sanitizers than the same strain in planktonic form. Moreover, biofilms are capable of releasing planktonic cells from the outer layers, enabling persistent bacterial infection [23].

Previous studies have shown that *E. coli* biofilms are more resistant to the antibiotic ciprofloxacin than its planktonic phase. The MIC found to biofilms was 1,000 times higher than planktonic phase MIC of ciprofloxacin, or even higher. For *S. aureus*, biofilm MIC of ciprofloxacin was from 100 to 1,000 times greater than planktonic phase MIC [23]. Ciprofloxacin chloridrate, a synthetic antibiotic belonging to the fluoroquinolones class, inhibits DNA gyrase, blocking bacterial metabolism provided that vital information can no longer be read from the bacterial chromosome. Ciprofloxacin is effective, *in vitro*, against gram-negative and gram-positive pathogens, like *E. coli* and *S. aureus* [24].

Although, photodynamic therapy was less effective in the treatment of bacteria within dense biofilms and the bacterial cells present in a biofilm have an increased resistance to antibiotic the association of PDT and ciprofloxacin improved biofilm bacteria killing. Our results show that the combination of photodynamic therapy with the antibiotic ciprofloxacin was more effective than PDT in monotherapy in reducing the biofilm.

PDT as monotherapy for *S. aureus* (at 11.2 J/cm² and 200 µg/mL of MB) resulted in a reduction of 51.95% (4.65 log). On the other hand, synergistic effect of that therapy with 62.5 µg/mL of ciprofloxacin led to a reduction of 60.37% (5.24 log). For *E. coli*, PDT as monotherapy (at 11.2 J/cm² and 200 µg/mL of MB) promoted a 48.04% reduction (4.3 log). By diminishing MB concentrations to 25 and 50 µg/mL and ciprofloxacin concentration to 0.125 µg/mL the reductions obtained were 74.3% (6.67 log) and 77.65% (6.97 log), respectively.

A previous study showed that pre-treatment of *S. aureus* biofilms with PDT followed by vancomycin application in concentrations lower than the MIC led to a biofilm matrix disruption, allowing for the killing of bacteria almost entirely [25]. Other studies also investigated the effect of PDT on the susceptibility of *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to vancomycin, showing a synergistic effect between PDT and antibiotic treatment. Both studies showed that PDT increased susceptibility to vancomycin due to PDT-induced disruption of biofilm protective matrix that involves bacterial cells, making them susceptible to the antibiotic [25, 26], supporting our results and emphasizing the role of PDT and antibiotic combination as a strategy to improve the therapy effects over biofilms.

Biofilm morphological changes induced by PDT in *S. aureus* and *E. coli* were also observed. The SEM images showed that the PDT promoted morphological changes on both gram-positive and gram-negative bacterial biofilm. For *S. aureus*, PDT promoted loss of contact between the biofilm mass with scattering and damage of aggregation. For *E. coli*, after PDT the confluence was amended by disruption of dense and homogeneous structure (mat structure) seen only in the control group.

Confocal microscopic images performed by Di Poto et al. (2009) showed biofilms submitted to photosensitization, revealing an increase of permeability of bacterial cells to propidium iodide, which indicates that cell membrane may be an important local of photodamage. It is possible that bacterial membrane damage compromises the cell-to-cell contacts and/or cell-matrix interactions, leading to a loss of cells from the biofilms. Besides that, the presence of dead cells in the whole biofilm density implies that there is no obstacle to PS and/or antibiotic diffusion and light penetration [25].

5. Conclusion

Regarding the efficiency of bacterial inactivation, gram-positive bacteria were more susceptible to PDT than gram-negative species. We observed that

PDT groups presented bacterial reductions higher than other groups tested. Biofilm bacteria showed resistance to photodynamic therapy; however, the synergistic effect of combined therapy (PDT + ciprofloxacin) overcame that inconvenience. For planktonic phase, when the antibiotic is applied after PDT lower concentrations of ciprofloxacin (lower than the MIC) could be used, since the first sub-inhibitory concentration led to bacterial reduction both to *S. aureus* and *E. coli*.

We also evaluated the effect of combining the PDT with ciprofloxacin on biofilms, which resulted in a more effective treatment than PDT as monotherapy. On scanning electron microscopy of biofilms we could observe the PDT-treated samples were sparse and some of them presented only micro-colonies and not a dense and compact biofilm as observed for control group samples.

6. Author's disclosure of potential conflicts of interest

The authors indicate that there are no potential conflicts of interest.

7. Acknowledgments

Financial support from FAPESP 2012/21203-4 (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES and CNPq is gratefully acknowledged. We also thank Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça (Photonics Group – Institute of Physics - University of São Paulo - IFSC, USP) for scanning electron microscopy analyses.

8. References

[1] CARVALHO, D.P.L. **Terapia fotodinâmica no controle de micro-organismos isolados de feridas infectadas: estudo *in vitro***. 2012. 53f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Universidade do Vale do Paraíba, 2012.

- [2] LAURIDSEN, T.K.; ARPI, M.; FRITZ-HANSEN T.; FRIMODT-MØLLER, N.; BRUUN, N.E. Infectious endocarditis caused by *Escherichia coli*. **Scand J Infect Dis**. v. 43, p. 545-546. 2011. doi: 10.3109/00365548.2011.554432.
- [3] CHANG, S.K.; LO, D.Y.; WEI, H.W.; KUO, H.C. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from canine urinary tract infections. **J Vet Med Sci**. v. 77, n. 1, p. 59-65. 2015 doi: 10.1292/jvms.13-0281.
- [4] CHAKRABORTY, A.; ADHIKARI, P.; SHENOY, S.; SARALAYA, V. Genomic analysis and clinical importance of *Escherichia coli* isolate from patients with sepsis. **Indian J Pathol Microbiol**. V. 58, n. 1, p. 22-26. doi: 10.4103/0377-4929.151161.
- [5] MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- [6] SANTOS, A.C.M.; PIGNATARI, A.C.C.; SILVA, R.M.; ZIDKO, A.C.M.; GALES, A.C. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.
- [7] YAMADA JÚNIOR, A.M.; **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica em periodontite induzida em ratos**. 2007. 91f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- [8] GOUVEIA, C.M.F. **Staphylococcus aureus** adquirido na comunidade, em Idade pediátrica: resistência aos antimicrobianos, importância da Leucocidina de Panton-Valentine, caracterização molecular e correlação com a clínica. 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.
- [9] FONTANA, C.R.; ABERNETHY, A.D.; SOM, S.; RUGGIERO, K.; DOUCETTE, S.; MARCANTONIO, R.C.; BOUSSIOS, C.I.; KENT, R.; GOODSON, J.M.; TANNER, A.C.; SOUKOS, N.S. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **J Periodontal Res.**, v. 44, n. 6, p.751-759, 2009.

- [10] CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6 th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.
- [11] REED, S.J.B. **Electron microprobe analysis and scanning electron microscopy in geology**. Cambridge University Press: New York, 1996, 201 p.
- [12] RAMAGE, G.; WALLE, K.V.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2475–2479, 2001.
- [13] TARASZKIEWICZ, A.; GRZEGORZ, F.; MARIUSZ, G.; NAKONIECZNA, J. Innovative Strategies to overcome biofilm Resistance. **Hindawi**, v. 2013, p. 1-13, 2012.
- [14] GABRIELLI, D.E.; BELISLE, D.; SEVERINO, A.J.; KOWALTOWSKI, M.S. Binding, aggregation, and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochem. Photobiol.** v. 79, p. 227-232, 2004.
- [15] Wu, J.; Xu, H.; Tang, W.; Kopelman, R.; Philbert, M.A.; Xi, C. Eradication of bacteria in suspension and biofilms using methylene blue-loaded dynamic nanoplateforms. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 53, n. 7, p. 3042-3048. 2009. doi: 10.1128/AAC.01604-08.
- [16] PELOI, L.S.; **Estudos da aplicação do corante azul de metileno em terapia fotodinâmica**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- [17] O'RIORDAN, K.; AKILOV, O.E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 2, n. 4, p. 247-226. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00099-2

- [18] RIBEIRO, P.F. **Avaliação de novas estratégias de aplicação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana *in vitro*: cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2009. 22f. Programa Institucional de Iniciação Científica - Relatório Final De Atividades. UTFPR – Campus Curitiba. Curitiba, 2010.
- [19] DEMIDOVA, T.N., HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 17, n. 3, p. 245-254, 2004.
- [20] MANG, T.S.; TAYAL, D.P.; BAIER, R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. **Lasers Surg Med**. v. 44, n. 7, p. 588-596, 2012. doi: 10.1002/lsm.22050.
- [21] SOUKOS, N.S.; MULHOLLAND, S.E.; SOCRANSKY, S.S.; DOUKAS, A.G. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Lasers Surg Med**. v. 33, p. 161–168, 2003.
- [22] GIUSTI, J.S.M.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A.C.; HELMERSON, K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomedicine Laser Surg**, v. 26, n.4, p.281-287, 2008.
- [23] CERI, H., OLSON, M.E., STREMICK, C., READ, R.R., MORCK, D., BURET, A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.
- [24] SOUZA, M.V.N; ALMEIDA, M.V.; SILVA, A.D.; COURI, M.R.C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz, **Rev. Bras. Farm.**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2004.
- [25] DI POTO, A.; SBARRA, M.S.; PROVENZA, G.; VISAI, L; SPEZIALE, P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defense mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms, **Biomaterials**, v. 30, n. 18, p. 3158-3166, 2009.

[26] SBARRA, M.S.; ARCIOLA, C.R.; DI POTO, A.; SAINO, E.; ROHDE, H.; SPEZIALE, P.; VISAI, L. The photodynamic effect of tetra-substituted N-methylpyridyl-porphine combined with the action of vancomycin or host defense mechanisms disrupts *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Int J Artif Organs.**, v. 32, n. 9, p.:574-583, 2009.

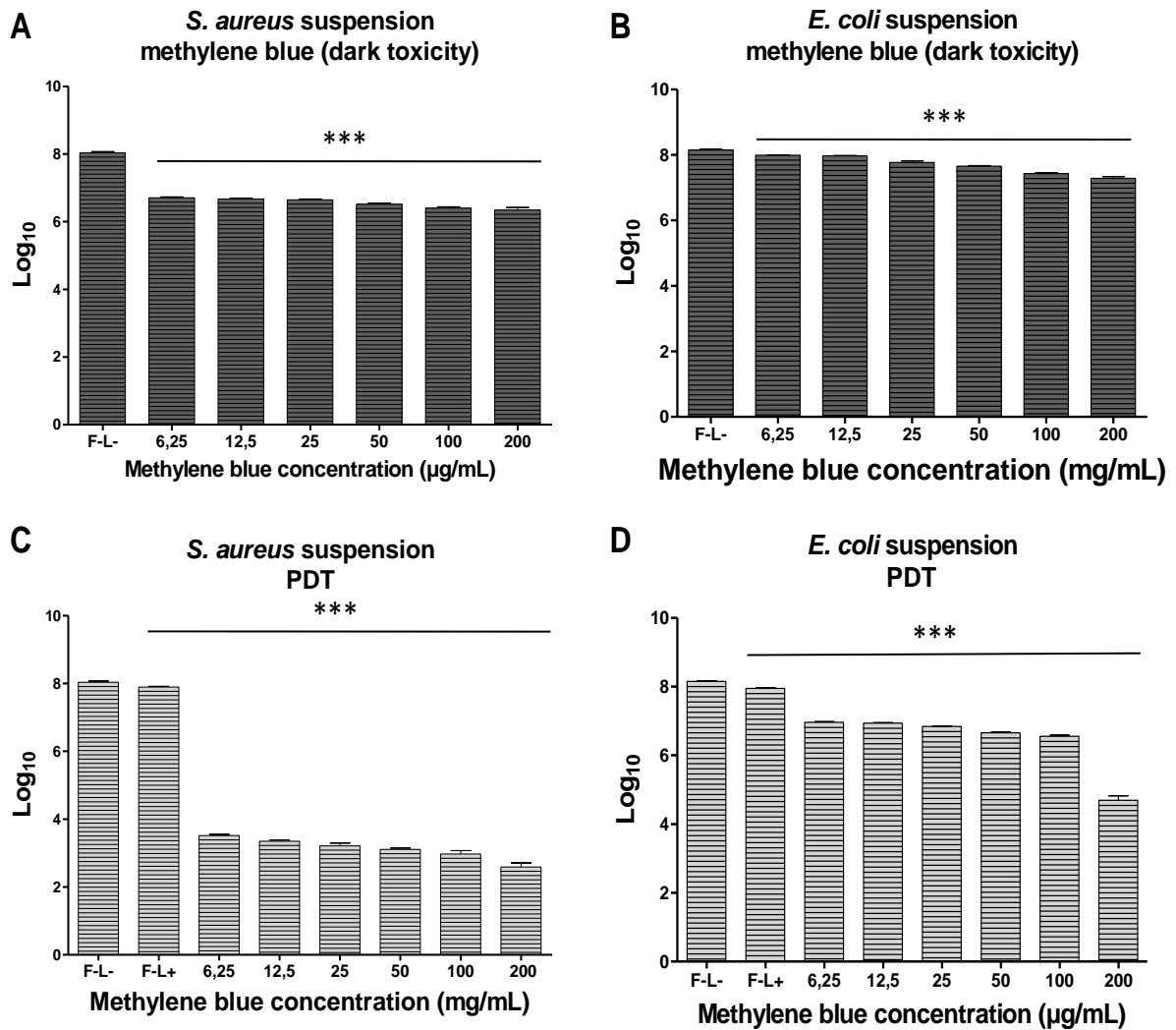


Figure 1: Mean values of log₁₀ between groups Control, Light, MB and PDT (PDT 5,6 J/cm²) in suspension in single-species experiments for *S. aureus* and *E. coli*.

The columns represent the average values of log₁₀ and bars represent the standard deviation. The asterisks represent statistical difference between the groups and the control (one-way ANOVA with Tukey's post-test). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: not significant.

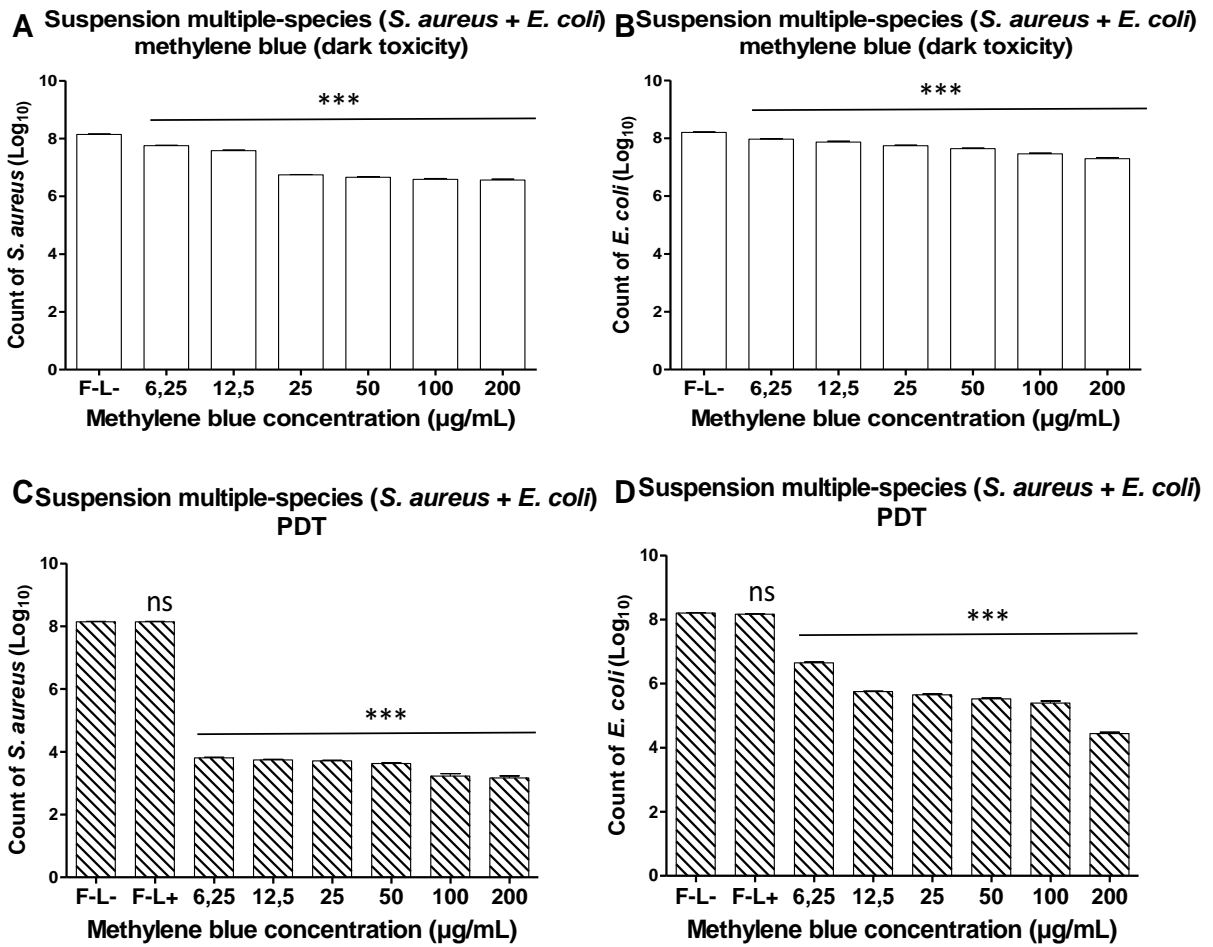


Figure 2: Average values of log₁₀ between groups Control, Light, MB and PDT (PDT 5,6 J/cm²) in suspension in multiple-species experiments (*S. aureus* + *E. coli*). A and C: Count of *S. aureus*. B and D: Count of *E. coli*.

The columns represent the average values of log₁₀ and bars represent the standard deviation. The asterisks represent statistical difference between the groups and the control (one-way ANOVA with Tukey's post-test). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: not significant.

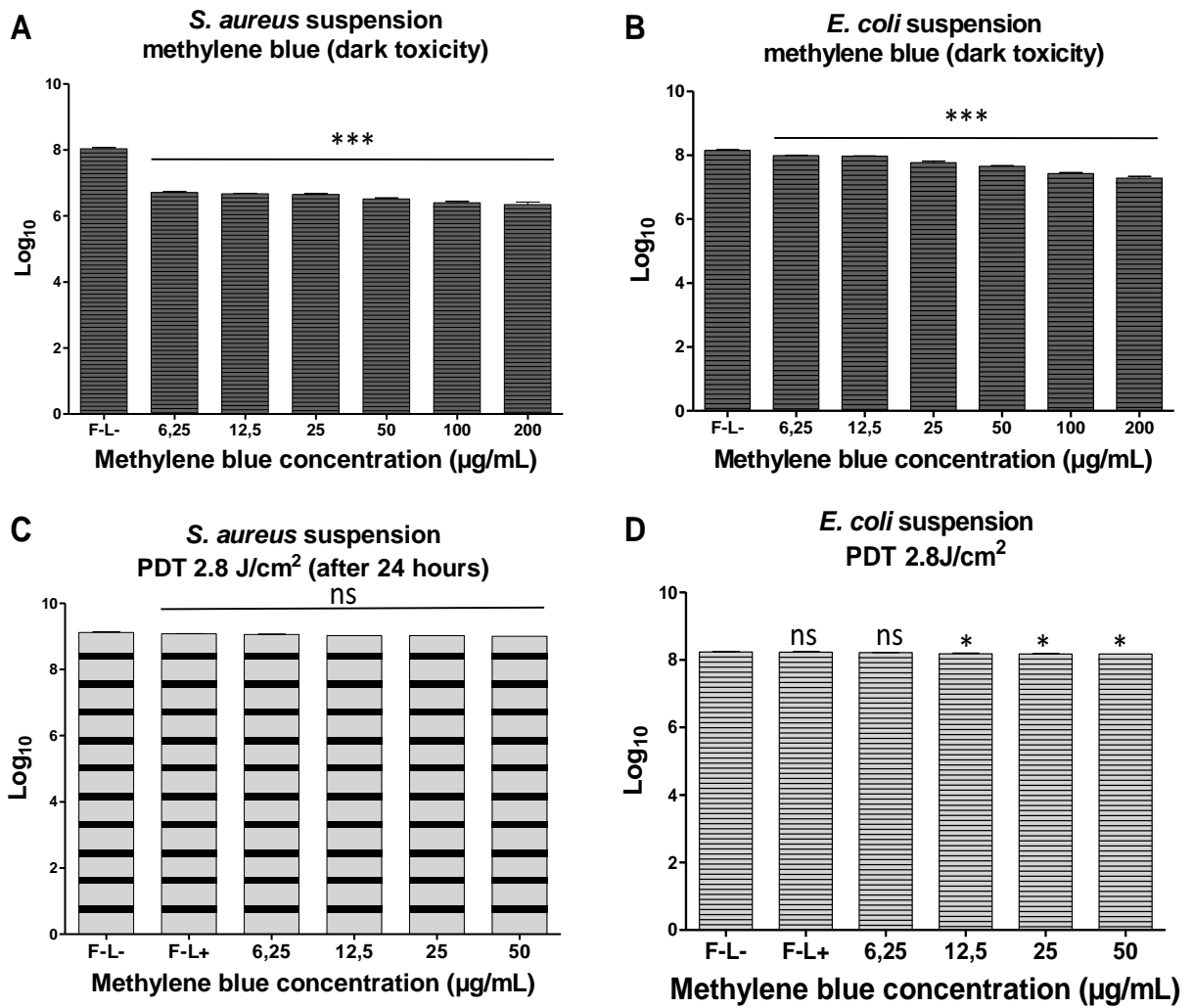


Figure 3: Mean values of log₁₀ between the groups Control, Light, MB and PDT (PDT 2,8 J/cm²), the mono-species experiments for *S. aureus* and *E. coli*.

The columns represent the average values of log₁₀ and bars represent the standard deviation. The asterisks represent statistical difference between the groups and the control (one-way ANOVA with Tukey's post-test). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: not significant.

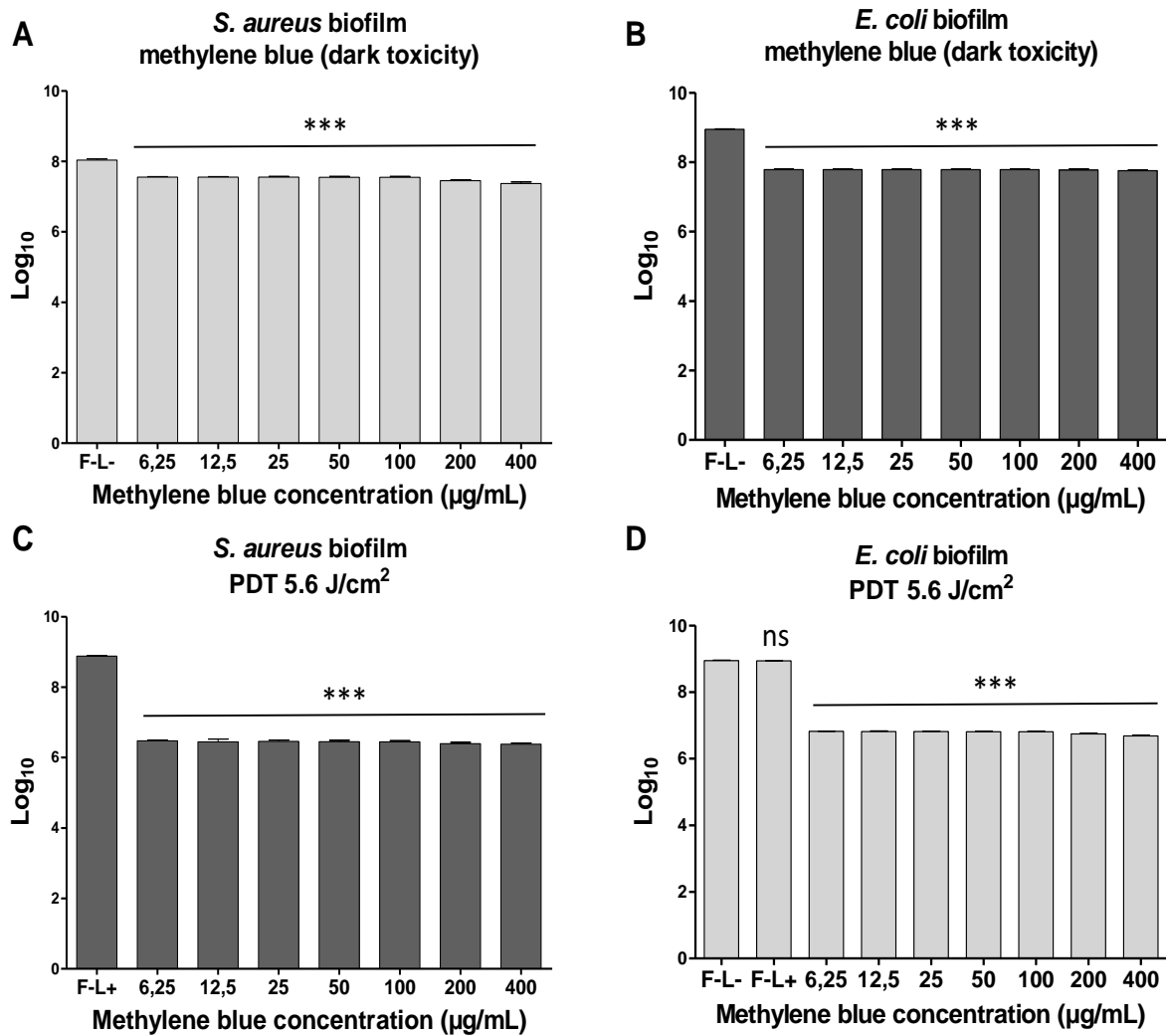


Figure 4: Mean values of log₁₀ between groups Control, Light, MB and PDT (PDT 5,6 J/cm²) on biofilm, for *S. aureus* and *E. coli*.

The columns represent the average values of log₁₀ and bars represent the standard deviation. The asterisks represent statistical difference between the groups and the control (one-way ANOVA with Tukey's post-test). * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns: not significant.

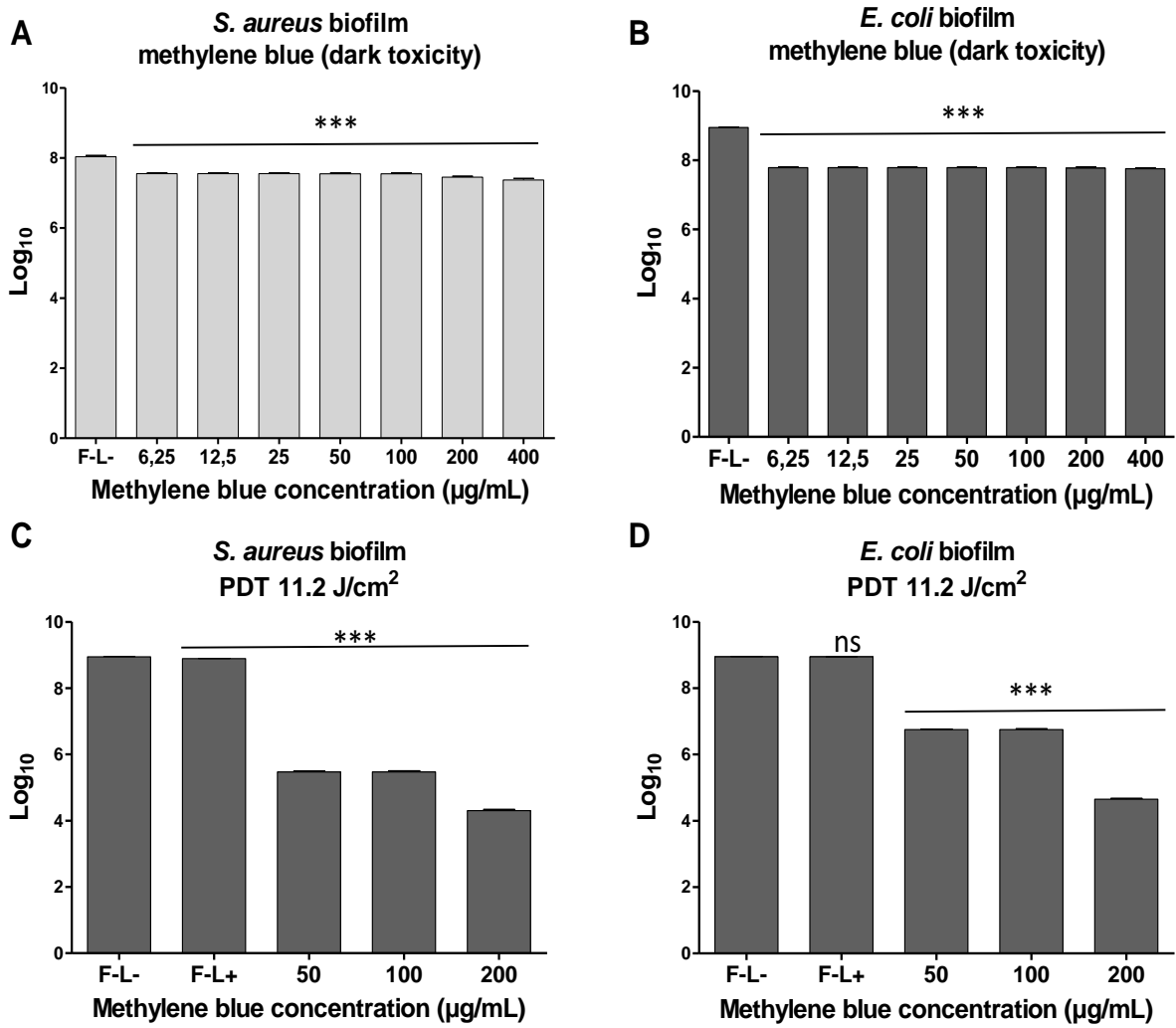


Figure 5: Mean values of log₁₀ between groups Control, Light, MB and PDT (PDT 11,2 J/cm²) on biofilm, for *S. aureus* and *E. coli*.

The columns represent the average values of log₁₀ and bars represent the standard deviation. The asterisks represent statistical difference between the groups and the control (one-way ANOVA with Tukey's post-test). * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns: not significant.

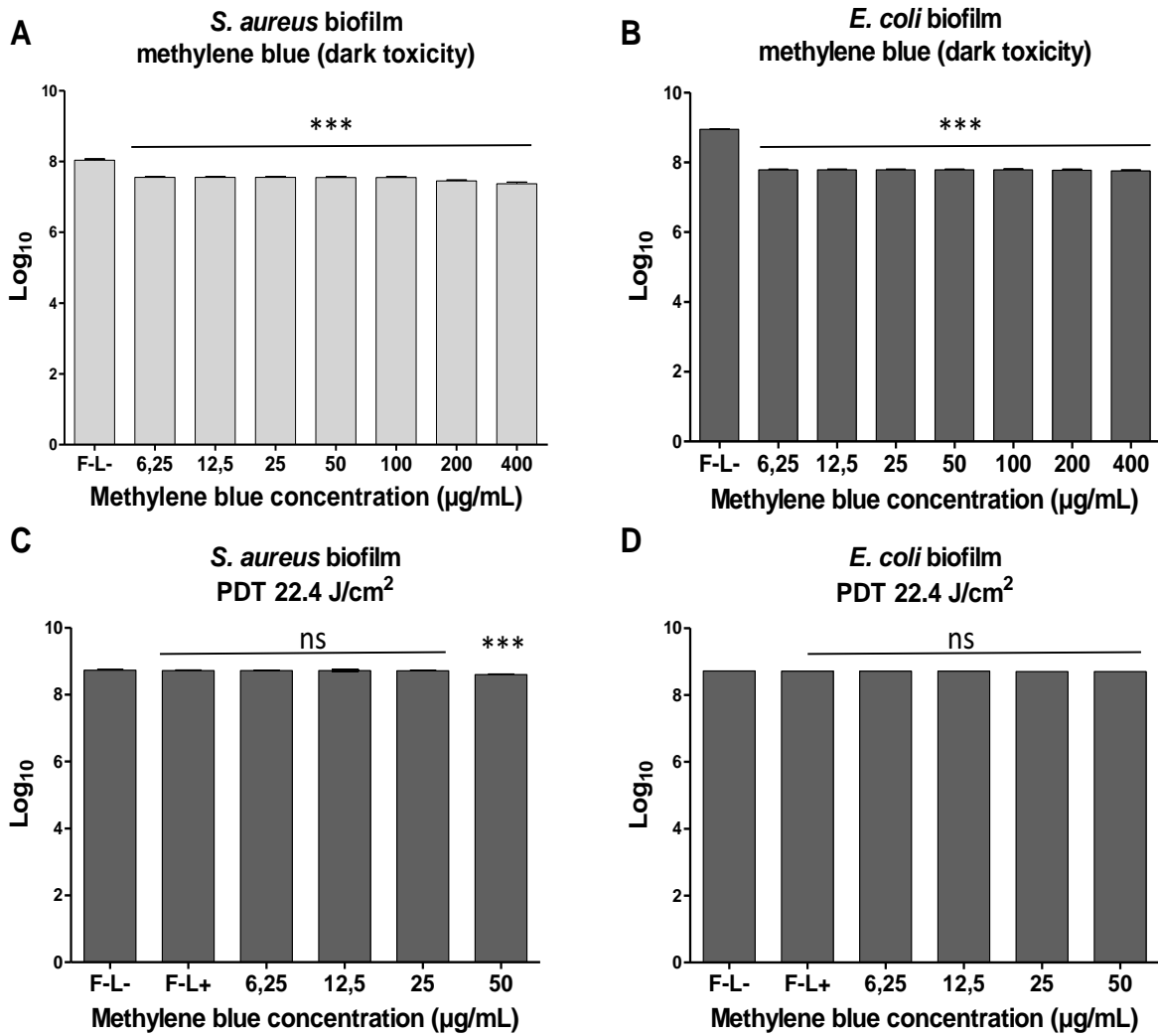


Figure 6: Mean values of log₁₀ between groups Control, Light, MB and PDT (PDT 22,4 J/cm²) on biofilm, for *S. aureus* and *E. coli*.

The columns represent the average values of log₁₀ and bars represent the standard deviation. The asterisks represent statistical difference between the groups and the control (one-way ANOVA with Tukey's post-test). * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns: not significant.

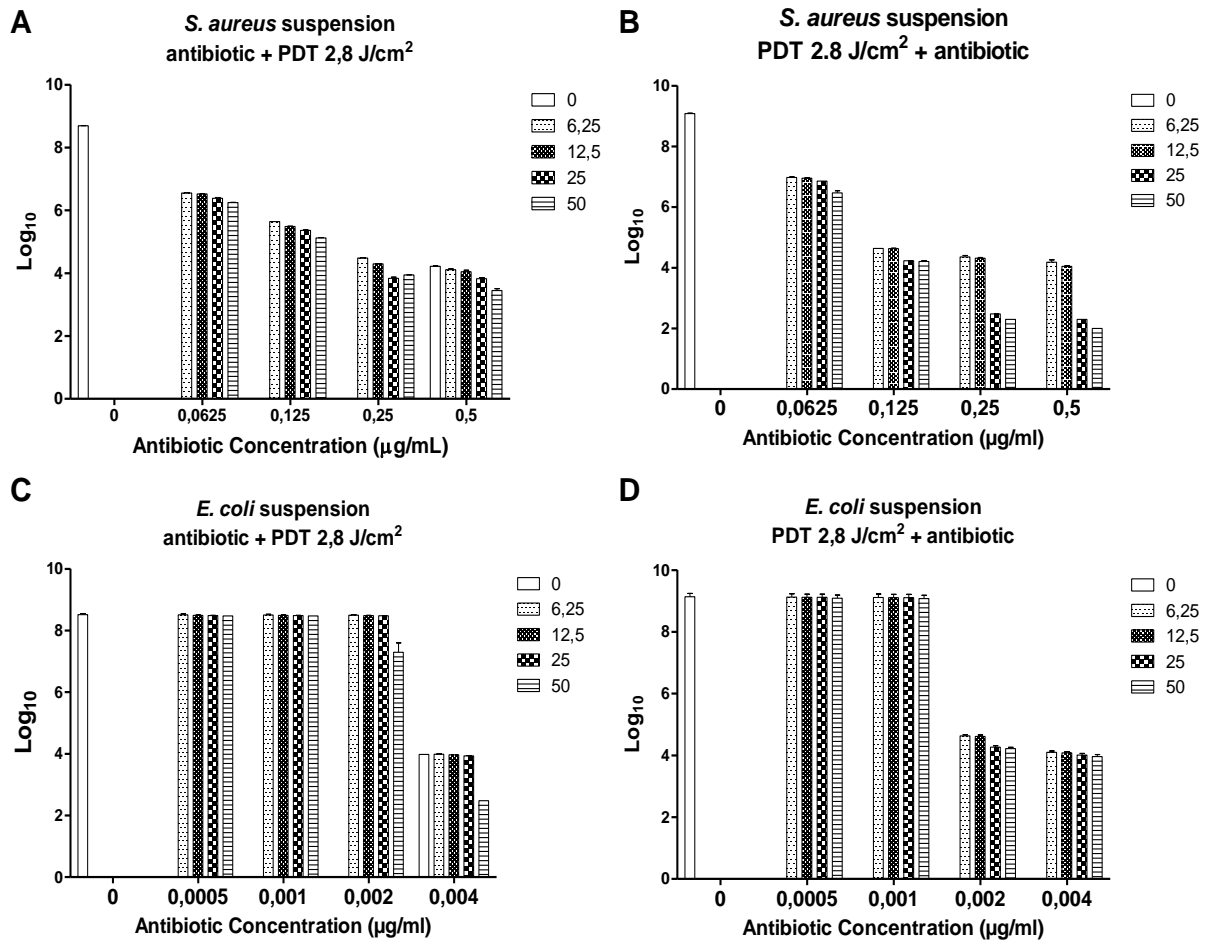


Figure 7: Mean values of the \log_{10} between PDT and groups Control and combined effect of PDT treatment and suspended ciprofloxacin for *S. aureus* and *E. coli*. B and D: Antibiotic after PDT. A and C: after PDT treatment with antibiotics.

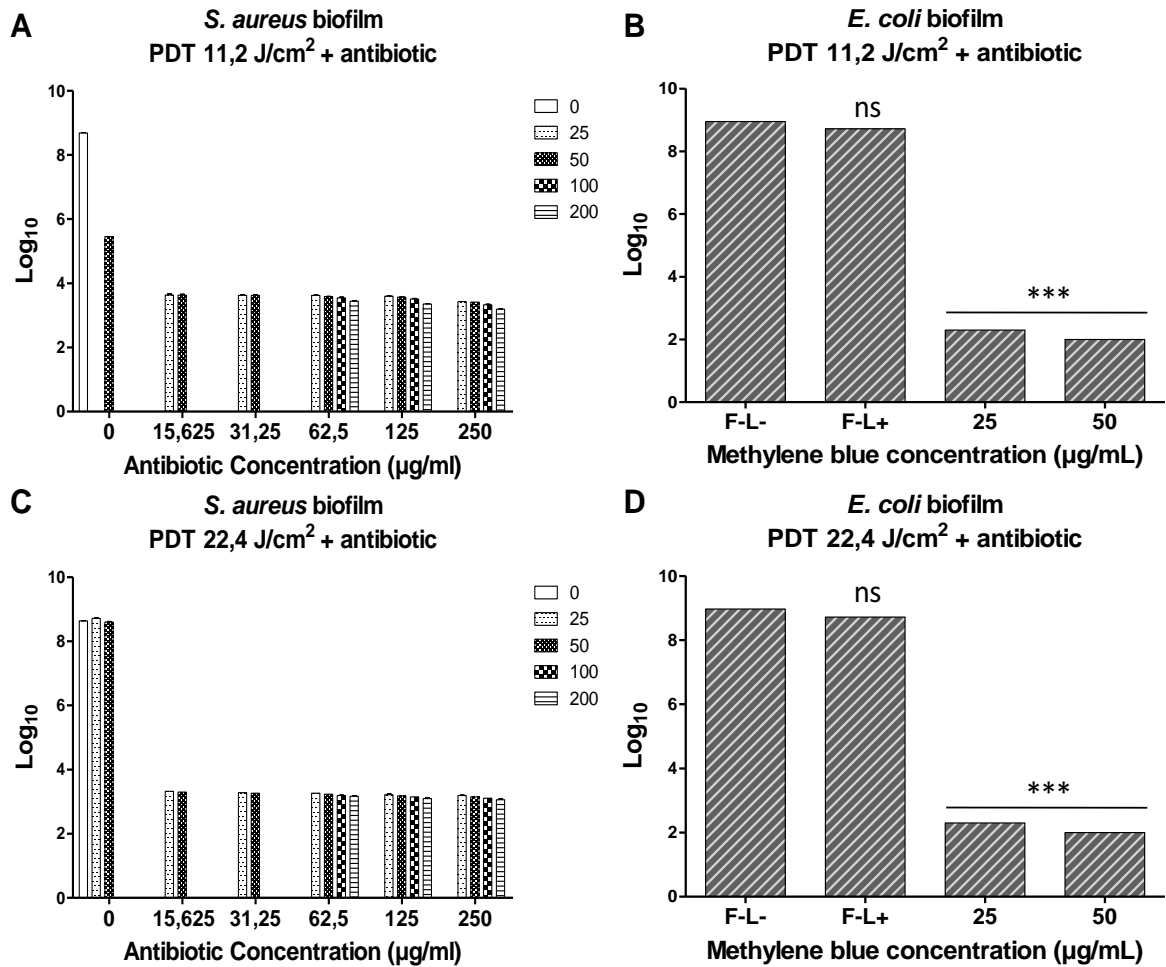


Figure 8: Mean values of the log₁₀ between Control and PDT groups and combined effect of PDT on biofilm treatment with ciprofloxacin for *S. aureus* and *E. coli*.

The columns represent the average values of log₁₀ and bars represent the standard deviation. The asterisks represent statistical difference between the groups and the control (one-way ANOVA with Tukey's post-test). * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; ns: not significant.

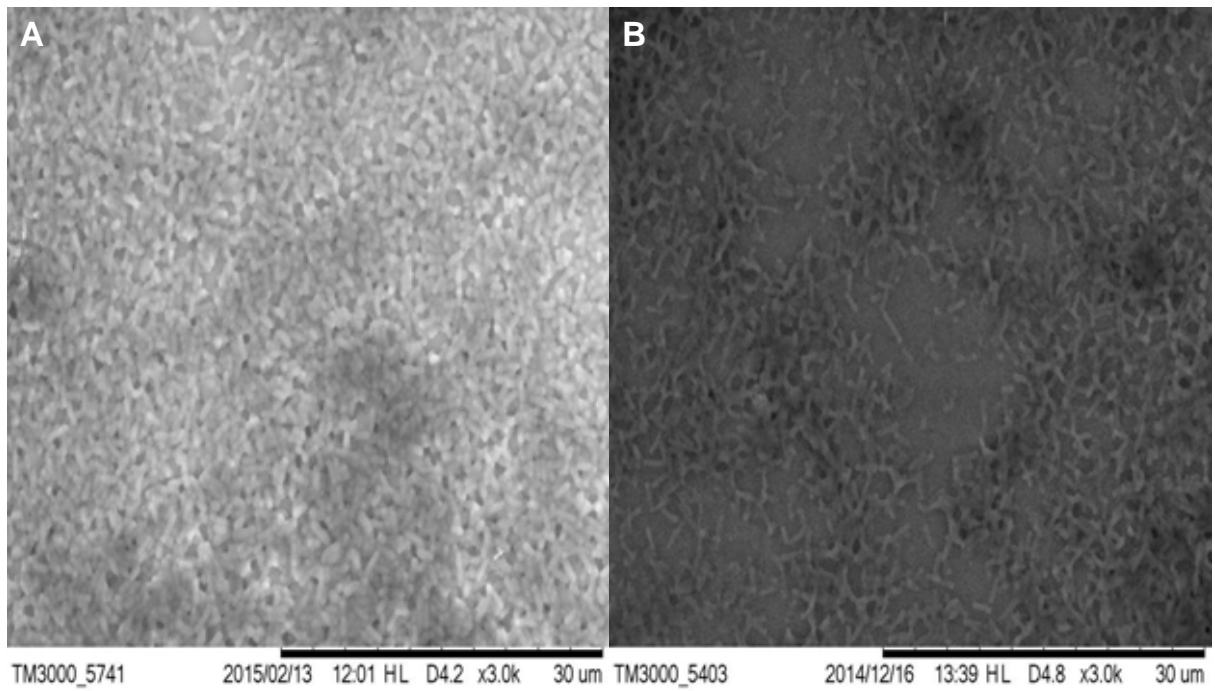


Figure 9: Scanning Electron Microscopy (SEM) of *Escherichia coli*. A) Increase of 3000x, Control group. B) Increase 3000x PDT group concentration of 200 µg/mL of methylene blue and creep of 11.2 J/cm²

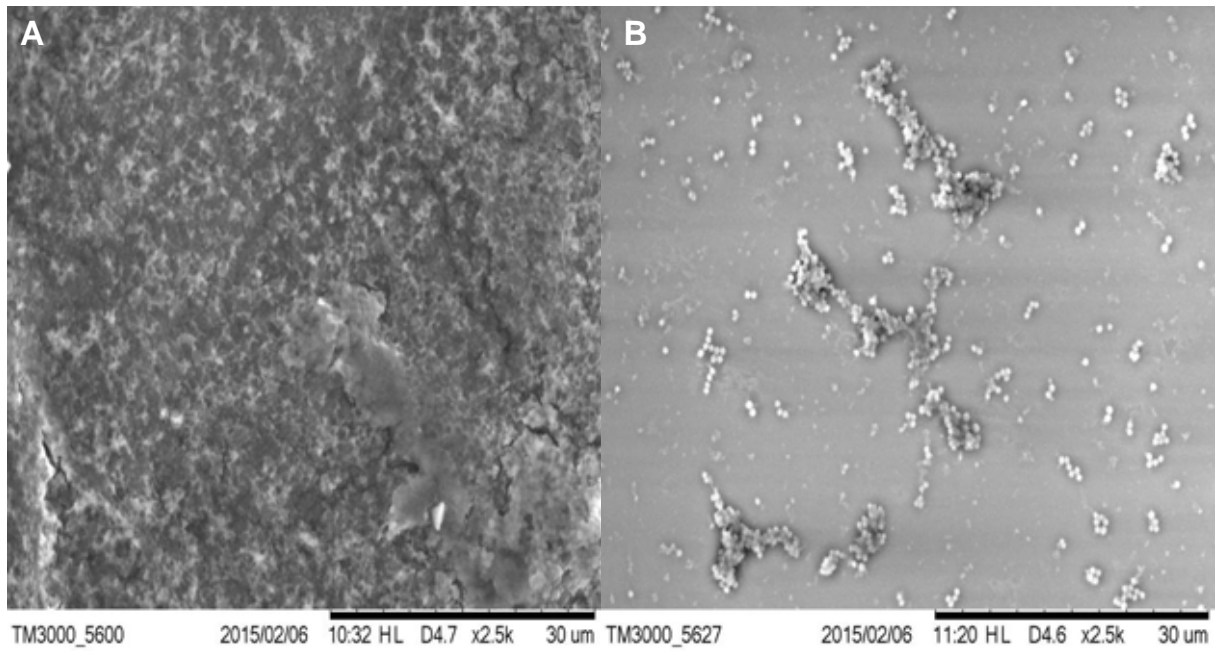


Figure 10: Scanning Electron Microscopy (SEM) of *Staphylococcus aureus* A) Increase of 2500x, Control group. B) Increase 2500x PDT group concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ of methylene blue and creep of 11.2 J/cm^2