

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

**Maria Lucia Frade**

**Hidrogéis como sistema de liberação de  
fotossensibilizador para terapia fotodinâmica contra  
*Cutibacterium (Propionibacterium) acnes***

Processo CNPq nº 133456/2016-1

Araraquara- SP  
2018

**Maria Lucia Frade**

**Hidrogéis como sistema de liberação de  
fotossensibilizador para terapia fotodinâmica contra  
*Cutibacterium (Propionibacterium) acnes***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós - graduação em Biociências e Biotecnologias aplicadas à Farmácia, da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana  
Coorientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara- SP  
2018

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**F799h** Frade, Maria Lucia  
Hidrogéis como sistema de liberação de fotossensibilizador para terapia fotodinâmica contra *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* / Maria Lucia Frade – Araraquara, 2018.  
102 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e  
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Microbiologia.

Orientadora: Carla Raquel Fontana.  
Coorientador: Marlus Chorilli.

1. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 2. Acne vulgar. 3. *Cutibacterium acnes*. 4. Azul de metileno. 5. Hidrogel. I. Fontana, Carla Raquel, orient. II. Chorilli, Marlus, coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



MARIA LÚCIA FRADE

HIDROGÉIS COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR PARA TERAPIA  
FOTODINÂMICA CONTRA Cutibacterium (Propionibacterium) acnes

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Araraquara, 30 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA

CARLA RAQUEL FONTANA

ANA CLAUDIA PAVARINA

NATALIA MAYUMI INADA

*Com todo meu amor, dedico esse trabalho aos meus pais,  
Armando e Vera pelo amor incondicional, apoio e incentivo aos estudos  
e em todas as decisões da minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e proteção, pelas pessoas especiais e oportunidades que colocou em meu caminho.*

*Aos meus pais, por nunca medirem esforços para que eu estudasse, pelo incentivo, amor e compreensão nesta etapa tão importante da minha vida e em todas as outras. O apoio de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.*

*À minha orientadora Carla, pelos conhecimentos compartilhados, prestatividade, confiança e por sempre me orientar de forma carinhosa. Obrigada pela compreensão e por sempre me incentivar a superar minhas dificuldades. Você tem minha eterna gratidão, respeito e amizade.*

*Ao meu Coorientador Marlus, pelos seus ensinamentos e ter aberto as portas do laboratório onde foi possível realizar parte deste trabalho. Muito obrigada!*

*À técnica Elaine, pela disponibilidade e prestatividade em ajudar nas atividades do laboratório, sempre. Gratidão à você!*

*Aos amigos do laboratório de microbiologia, Sarah, Lucas, Laura, Laís, Virgínia e Willian por poder compartilhar momentos de alegria, de aflições, conquistas e principalmente experiências e conhecimentos. Sou grata pela amizade, companheirismo e ajuda de vocês!*

*Aos alunos do Laboratório de Farmacotécnica em especial à Giovana e Camila pelo suporte, ensinamentos e por toda ajuda nos experimentos!*

*A todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara –UNESP.*

*Ao Cnpq (número do processo: 133456/2016-1), pelo apoio financeiro.*

*“However difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you just don't give up.”*

*“Por mais difícil que a vida possa parecer, sempre há algo que você pode fazer e ter sucesso. O que importa é que você simplesmente não desista.”*  
*(Stephen Hawking)*

## RESUMO

A acne vulgar é uma das dermatoses mais frequentes em jovens e a infecção causada pela bactéria *Cutibacterium acnes* (antigo *Propionibacterium acnes*) tem importante papel na patogênese da acne. Existem várias opções de tratamento que variam de acordo com a gravidade da doença, porém são associados com reações indesejadas e resistência aos antimicrobianos. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) então é proposta como tratamento alternativo para inativar *C. acnes* juntamente com a incorporação do fotossensibilizador (FS) em uma formulação tópica para otimizar a terapia. Este trabalho objetivou avaliar a eficácia *in vitro* da TFDa mediada pelo azul de metileno (AM) incorporado em hidrogel de quitosana e poloxamer (HG-AM) contra *C. acnes* em fase planctônica e biofilme. A viabilidade celular após TFDa foi avaliada através da quantificação das colônias formadas por mililitro de amostra (UFC/mL). Para caracterizar estruturalmente os HGs foram realizadas as análises oscilatórias e de comportamento de fluxo em reômetro de estresse controlado com geometria placa-cone e a bioadesão em pele de orelha de porco utilizando um texturômetro. A análise estatística dos dados feita foi a Análise de Variância (one way ANOVA) com pós-teste de Tukey. Os resultados deste estudo mostrou que a TFDa contra *C. acnes* foi eficaz utilizando HG-AM em fase planctônica. A concentração bactericida mínima foi de 12,5 µg/mL associada a uma fluência de 90 J/cm<sup>2</sup>. O biofilme de *C. acnes* não foi totalmente eliminado pela TFDa com HG-AM nas condições testadas. A máxima redução microbiana alcançada com o HG-AM foi de 1,9 log<sub>10</sub> com 75 µg/mL do FS utilizando 150 J/cm<sup>2</sup> e 30 minutos de pré-incubação do biofilme com o HG-AM. O HG a 0,25% de quitosana (HG1) mostrou-se adequado para aplicação na superfície da pele pois concentrações maiores de quitosana aumentam a elasticidade do hidrogel, podendo atrasar a liberação do FS. A incorporação do AM não afetou suas características reológicas e bioadesivas de forma significativa. Foi possível concluir que a TFDa mediada por HG-AM foi mais eficiente do que AM em solução para a redução total da carga microbiana em fase planctônica nas mesmas condições.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Acne vulgar. *Cutibacterium acnes*. Azul de metileno. Hidrogel.



## ABSTRACT

Acne vulgaris is one of the most frequent dermatosis in young people and the infection caused by the bacteria *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*) plays an important role in the pathogenesis of acne. There are several treatments options that vary according to the severity of the disease, but are associated with unwanted reactions and antimicrobial resistance. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is then proposed as an alternative treatment to inactivate *C. acnes* together with the incorporation of the photosensitizer (PS) into a topical formulation to optimize therapy. This work aimed to evaluate the *in vitro* efficacy of methylene blue (MB) mediated TFDa incorporated in chitosan and poloxamer (HG-MB) hydrogels against planktonic and biofilm *C. acnes*. Cell viability after aPDT was evaluated by quantifying the colonies formed per milliliter of sample (CFU / mL). To characterize structurally the HG were performed the oscillatory and behavior of flow in a controlled stress rheometer with cone-plate geometry and bioadhesion in pig ear skin using a texture analyser. The statistical analysis of the data was the Analysis of Variance (one way ANOVA) with post-test of Tukey. The results of this study showed that aPDT was effective using HG-MB in planktonic phase. The minimum bactericidal concentration was 12.5 µg/mL associated with a fluence of 90 J/cm<sup>2</sup>. The *C. acnes* biofilm was not totally eliminated by the aPDT with HG-MB under the conditions tested. The maximum microbial reduction achieved with HG-MB was 1.9 log<sub>10</sub> with 75 µg/mL of the PS using 150 J/cm<sup>2</sup> and 30 minutes biofilm incubation with HG-MB. HG at 0.25% of chitosan (HG1) was adequate for application to the skin surface because higher concentrations of chitosan increase the elasticity of the hydrogel and may delay PS release. The incorporation of MB did not significantly affect its rheological and bioadhesive characteristics. It was possible to conclude that HG-MB mediated aPDT was more efficient than MB solution for the total reduction of planktonic microbial load under the same conditions.

**Keywords:** Antimicrobial photodynamic therapy. Acne vulgaris. *Cutibacterium acnes*. Methylene blue. Hydrogel.

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1- Esquema ilustrativo sobre o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 2- Estrutura química do Azul de Metileno (CAS: 122965-43-9).....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 3-Estrutura geral dos poloxamers.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 4-Semeadura de C. acnes pelo método de esgotamento em RCA.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 5- Sistema de iluminação LED- 660 nm (Biotable). ....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 6- Representação da técnica utilizada para o teste de susceptibilidade bacteriana a TFDa em fase planctônica.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 7-Representação esquemática da técnica utilizada para o teste de susceptibilidade bacteriana à TFDa em biofilme.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 8-Representação esquemática da pele adaptada à sonda do analisador de textura. ...</i>	<i>47</i>
<i>Figura 9- Curva de crescimento de C. acnes ATCC 6919.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 10-Espectro de absorção UV-VIS do AM e dos HG-AM.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 11-Avaliação da susceptibilidade de C. acnes ao HG1 em caldo MH e TSB.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 12-Valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL entre os grupos controle negativo (CN) e HG1- AM em diferentes concentrações na ausência de luz.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 13-Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a TFDa mediada por HG1-AM e LED 660 nm.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 14-Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a TFDa mediada por HG1-AM e LED 660 nm.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 15-Comparação entre o tratamentos: TFDa mediada por AM em solução e HG-AM....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 16-Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando AM em solução sem luz.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 17- Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução e LED 660 nm.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 18- Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução e LED 660 nm.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 19- Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução e LED 660 nm.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 20- Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução e LED 660 nm.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 21- Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução e LED 660 nm.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 22-Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução e LED 660 nm.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 23- Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por HG1-AM, HG2-AM e HG3-AM e LED 660 nm. ....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 24-Avaliação da susceptibilidade bacteriana do biofilme frente HG1- AM sem luz.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 25- Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por HG1-AM e LED 660 nm. ....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 26- Reogramas de fluxo.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 27- Perfil de varredura de frequência do módulo viscoso (G') e módulo elástico (G'')... </i>	<i>68</i>
<i>Figura 28- Pico de bioadesão das formulações HG1, HG1-AM12,5 e HG1-AM75. ....</i>	<i>70</i>

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1- Tempo de irradiação do grupo TFDa em doses de luz específicas e tempo de incubação (tempo de pré-incubação somado ao tempo de irradiação) dos grupos que não foram irradiados em fase planctônica.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 2 - Tempo de irradiação do grupo TFDa em doses de luz específicas e tempo de incubação (tempo de pré-incubação somado ao tempo de irradiação) dos grupos que não foram irradiados em biofilme.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 3- Composição dos hidrogéis.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 4- Índice de fluxo (<math>\eta</math>) e índice de consistência (<math>k</math>) de HG1, HG2, HG3, HG1-AM12,5 e HG1-AM75 à temperatura ambiente (<math>25,0 \pm 0,5</math> °C) e à temperatura da pele (<math>32,0 \pm 0,5</math> °C).....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 5- Força da formulação (<math>S</math>) e expoente viscoelástico (<math>\eta</math>) das formulações HG1, HG2, HG3, HG1-AM12,5 e HG1-AM75 à temperatura ambiente (<math>25,0 \pm 0,5</math> °C) e temperatura da pele (<math>32,0 \pm 0,5</math> °C).....</i>	<i>69</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ALA	ácido 5- aminolevulínico
AM	azul de metileno
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA	Califórnia
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
Cél.	célula(s)
cm <sup>2</sup>	centímetro(s) quadrado(s)
CN	Controle negativo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade ótica
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fotossensibilizador
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
HG	Hidrogel
Hz	Hertz
IPL	<i>Intensed pulsed light</i> (Luz Intensa Pulsada)
J	Joule
L-	Ausência de luz
L+	Presença de luz
LED	<i>Light Emitting Diodes</i>
MH	<i>Mueller Hinton</i>
min	minuto(s)
mm	milímetro(s)
mW	miliwatt
nm	nanômetro(s)
Ns	Não significativo
<i>C. acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>

p/v	gramas de soluto em 100 mL de solução
Pa	Pascal
PE	polióxidoetileno
PEG	polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	polihidroxibutirato
PLA	ácido polilático
PLGA	ácido lático-co-ácido glicólico
PO	polióxidopropileno
PS	<i>photosensitizer</i>
RCA	<i>Reinforced Clostridial Agar</i> (Ágar clostridial reforçado)
rRNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucléico ribossômico)
rpm	Rotações por minuto
seg	segundo(s)
TFDa	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Triptona Soja)
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
v/v	Volume de soluto em 100 mL de solução
W	<i>Watt</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Célsius
≅	aproximadamente igual
>	maior
<	menor
Log <sub>10</sub>	logaritmo decimal

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

<b>1.Introdução .....</b>	<b>17</b>
1.1. <i>Acne vulgar</i> .....	19
1.2. <i>Cutibacterium acnes</i> .....	21
1.3. <i>Tratamentos da acne vulgar</i> .....	22
1.4. <i>Terapia Fotodinâmica antimicrobiana</i> .....	25
1.5. <i>Hidrogéis de quitosana e Poloxamer como sistema de liberação de fármacos</i> .....	29
<b>2. Objetivo Geral.....</b>	<b>32</b>
2.1. <i>Objetivos Específicos</i> .....	32
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>33</b>
3.1. <i>Padrões, matérias-primas e meios de cultura</i> .....	33
3.2 <i>Solventes e reagentes</i> .....	33
3.3. <i>Equipamentos e softwares</i> .....	34
3.4. <i>Métodos - Avaliação da TFDa mediada por azul de metileno e hidrogéis de azul de metileno</i> .....	34
3.4.1. <i>Estoque e manutenção da cepa bacteriana</i> .....	34
3.4.2. <i>Reativação bacteriana</i> .....	35
3.4.3. <i>Curva de Crescimento</i> .....	35
3.4.4. <i>Fotossensibilizador e fonte de luz</i> .....	36
3.4.5. <i>Espectros de Absorção</i> .....	37
3.4.6. <i>Terapia Fotodinâmica antimicrobiana</i> .....	37
3.4.7. <i>Teste de viabilidade bacteriana em fase planctônica (UFC/mL)</i> .....	38
3.4.8. <i>Desenvolvimento do biofilme e teste de susceptibilidade bacteriana</i> .....	41
3.4.9. <i>Preparo dos hidrogéis</i> .....	44
3.5. <i>Métodos - Caracterização dos HG</i> .....	45
3.5.1. <i>Ensaio reológicos</i> .....	45
3.5.1.1. <i>Análise reológica contínua</i> .....	46
3.5.1.2 <i>Análises oscilatórias</i> .....	46
3.5.2. <i>Avaliação in vitro da força bioadesiva</i> .....	47
3.6. <i>Análise Estatística</i> .....	48

<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>48</b>
4.1. Curva de crescimento de <i>Cutibacterium acnes</i> .....	48
4.2. Espectro de absorção do fotossensibilizador em hidrogéis.....	49
4.3. TFDa mediada por azul de metileno em hidrogel contra células planctônicas.....	50
4.4. TFDa mediada por azul de metileno em solução aquosa contra biofilme.....	56
4.5. TFDa mediada por azul de metileno em hidrogéis contra biofilme.....	61
4.6. Ensaio de caracterização dos hidrogéis.....	65
4.6.1. Reologia dos hidrogéis com azul de metileno.....	65
4.6.1.1. Determinação das propriedades de fluxo.....	65
4.6.1.2. Análises oscilatórias.....	67
4.6.2. Avaliação <i>in vitro</i> da força bioadesiva.....	69
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>73</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>74</b>
 <b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Artigo publicado .....</b>	<b>87</b>

# **CAPÍTULO I**



## 1.Introdução

*Cutibacterium acnes* é uma bactéria gram-positiva, morfologicamente classificada como bacilo do tipo difterioide, anaeróbia aerotolerante não formadora de esporos (NEVES *et al.*, 2015).

É comumente encontrada na unidade pilo-sebácea e estrato córneo, fazendo parte da microbiota da pele, conjuntiva, trato respiratório e cavidade oral. Tem prevalência em regiões do corpo onde a produção de sebo é maior, tais como rosto, costas, ombros e couro cabeludo. É comum, ainda, nas regiões da virilha e axilas (NEVES *et al.*, 2015; HECKMANN *et al.*, 2018). *C. acnes* tem sido correlacionado como um dos principais agentes patogênicos da acne vulgar.

A acne vulgar também chamada de acne comum é uma das doenças de pele mais frequentes na população, estando entre as dez mais prevalentes em todo o mundo (HAY *et al.*, 2014). Define-se como uma doença inflamatória crônica do folículo pilossebáceo que se inicia com a formação de comedões, caracterizando uma fase não inflamatória. A proliferação de *C. acnes* no folículo leva à instalação do processo inflamatório (DRÉNO, 2016).

*C. acnes* tem importância quanto à gravidade das infecções e doenças que pode causar, (NEVES *et al.*, 2015; KAKEGAWA *et al.*, 2017; NAKASE, 2018) impactando a vida social dos pacientes que apresentam a forma grave da acne, devido às cicatrizes que pode deixar. Além disso, muitas cepas encontram-se resistentes à maioria dos antimicrobianos utilizados na terapia convencional contra acne (NEVES *et al.*, 2015).

Diante deste cenário, onde a maioria das terapias não são satisfatórias ou são associadas com efeitos secundários, aumentou-se a procura por novas alternativas terapêuticas. A falta de adesão à terapia sistêmica, juntamente com o desejo de uso de tecnologia moderna tem levado a um aumento na procura de terapias não médicas para acne. Neste contexto, tem se observado um maior interesse em lasers e outros tratamentos à base de luz. Uma das principais vantagens da utilização destes tratamentos é o elevado grau de adesão e a baixa taxa de efeitos sistêmicos indesejáveis (MOMEN; AL-NIAIMI, 2015; MOFTAH; IBRAHIM; WAHBA, 2016).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) é um exemplo de tratamento emergente para acne que vem sendo amplamente estudado. Seu mecanismo de

ação consiste da ativação de um fármaco denominado fotossensibilizador (FS) por uma fonte de luz. O fotossensibilizador é uma molécula capaz de absorver a energia da luz num comprimento de onda específico e transferi-la para as moléculas de oxigênio ou biomoléculas adjacentes gerando espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singleto e radicais livres, acarretando danos aos microrganismos ou à célula-alvo (WAN; LIN, 2014; BOEN *et al.*, 2017).

O azul de metileno (AM) é um corante derivado tiazínico de fácil obtenção e baixo custo utilizado em inúmeros estudos para aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (ROLIM *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018). Apresenta propriedades fotoquímicas de extrema relevância, com alto rendimento quântico de geração de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) (TARDIVO *et al.*, 2005).

Apesar de ser bastante solúvel em água, a aplicação tópica do fotossensibilizador em solução se torna dificultosa, uma vez que a permanência do fármaco no local de aplicação ficará comprometida por escorrer. Portanto, torna-se necessário o emprego de uma formulação tópica adesiva que possibilite a entrega eficaz do fotossensibilizador para aplicação da terapia fotodinâmica. A formulação também deve ser translúcida para não impedir a penetração da luz durante o tratamento.

Sistemas de liberação de fármacos têm representado plataformas promissoras para incorporação de agentes fotossensibilizadores empregados na TFDa (KANG; CHO; YOO, 2009), dentre eles, têm destaque os hidrogéis. Este trabalho, portanto, avaliou a eficácia da terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno incorporado em hidrogéis de quitosana e poloxamer, que em combinação, dão origem a um sistema que é líquido à temperatura ambiente e forma um gel adesivo quando tem sua temperatura aumentada pelo contato com a pele ou mucosas (GRATIERI *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos dos testes *in vitro* utilizando-se o sistema de liberação (hidrogel) foram comparados com os resultados obtidos com azul de metileno solubilizado em solução aquosa. Além disso, a avaliação do sistema também envolve o estudo reológico, que permite avaliar seu grau de estruturação e prever como ele irá se comportar frente a situações que podem ocorrer desde o processo de fabricação até a utilização pelo paciente durante o tratamento. A capacidade de adesão na pele também foi avaliada, analisando-se o potencial bioadesivo do sistema em pele suína.

## 1.1. Acne vulgar

A acne é uma das dermatoses mais comuns que acomete principalmente os adolescentes (RIBAS; OLIVEIRA; SIMAS RIBEIRO, 2008). Estima-se que de 85 a 100% da população ao menos uma vez ao longo da vida apresentará a doença, afetando principalmente os adolescentes, alcançando taxas de aproximadamente 95% entre os garotos e 85% entre as garotas nesta faixa etária. Destes, cerca de 20% têm as formas moderada e grave que necessitam de tratamento medicamentoso, via oral e/ou tópica (PRETSCH *et al.*, 2014; DA SILVA; DA COSTA; MOREIRA, 2014). Estudos apontam que apesar de ser uma doença que afeta mais os jovens, tem-se observado um aumento de casos em adultos, com cerca de 40% dos pacientes nesta fase da vida (DRÉNO, 2016).

Entre os gêneros, a acne aparece mais precocemente no sexo feminino e é mais incidente e grave nos pacientes do sexo masculino, provavelmente devido ao aumento na produção de hormônios androgênicos e consequente produção de sebo (DRENO; POLI, 2003). Quanto à sua prevalência entre as raças, a acne tem sido mais prevalente em mulheres negras e hispânicas do que em asiáticas, indianas e brancas (PERKINS *et al.*, 2011) e é a principal doença diagnosticada pelos dermatologistas em negros, hispânicos e asiáticos (TUCHAYI *et al.*, 2015).

Apesar da acne vulgar não ser uma doença de grande morbidade, sua forma grave pode vir a trazer muitos prejuízos associados à saúde do paciente, principalmente comorbidades de origem psicológica e emocional. É uma doença muitas vezes subestimada, vista como sendo apenas uma desordem de fundo estético. Isso se deve ao fato de que existem muito poucos estudos que examinaram a existência de doenças sistêmicas associadas à acne.

Em um estudo populacional realizado no Reino Unido por SILVERBERG; SILVERBERG (2014), foi demonstrado que nas pessoas que apresentaram acne, observou-se também um aumento na prevalência de depressão, ansiedade e outros transtornos psicológicos, como déficit de atenção e insônia. Além da presença de comorbidades psicossociais, a acne grave também foi associada a problemas respiratórios e gastrointestinais.

A acne vulgar é uma condição inflamatória da unidade pilosebácea, composta pelo folículo piloso e a glândula sebácea. É uma doença que envolve muitos processos. Os principais são: o aumento da produção de sebo pela glândula

sebácea (hiperseborreia), hiperqueratinização folicular, proliferação de *C. acnes* no folículo e a inflamação. A acne pode ser também causada ou agravada por fatores externos como: dieta, estresse, fumo, radiação ultravioleta, exposição a produtos químicos e utilização de cosméticos comedogênicos ou matérias primas com características comedogênicas (TUCHAYI *et al.*, 2015). Ainda, medicamentos como esteroides anabolizantes, corticosteroides tópicos e sistêmicos, lítio e isoniazida podem desencadear ou agravar a condição clínica do paciente (FIGUEIREDO *et al.*, 2011; LYN *et al.*, 2016).

Sabe-se que o aumento da produção sebácea e hiperqueratinização são acionados pelos altos níveis de andrógenos circulantes. Estes estimulam a hiperproliferação do infundíbulo da glândula e o sebo acumulado forma uma espécie de “rolha” que obstrui o ducto do folículo, dando origem aos comedões (ROCHA; BAGATIN, 2018). O folículo pilossebáceo é predominantemente colonizado por *C. acnes* e com a formação de um ambiente anaeróbio rico em lipídeos ocorrem: a proliferação da bactéria, o estímulo e liberação de mediadores da inflamação na derme adjacente e a consequente instalação do processo inflamatório (HUH *et al.*, 2012).

A pele pode ser considerada um órgão endócrino por ser capaz de sintetizar e expressar receptores para diversos hormônios. A glândula sebácea é o principal local de biossíntese de hormônios esteroides, dentre estes, estão incluídos os hormônios androgênicos. A testosterona é o principal hormônio deste tipo envolvido na estimulação da produção do sebo pela glândula sebácea. No organismo, a enzima 5- $\alpha$ -redutase tipo I converte a testosterona em 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) que é mais potente que a testosterona. Esta enzima também é responsável por alterações sebáceas nas áreas que apresentam maiores quantidades de unidades pilossebáceas como face e tronco. Os outros hormônios são bem pouco estudados e não se sabe ainda se existe relação destes com o aparecimento da acne (JU *et al.*, 2017).

O sebo, além de servir como fonte de alimento para *C. acnes*, ainda exerce um efeito pró-inflamatório devido às frações lipídicas de ácidos graxos monoinsaturados e lipoperóxidos resultantes da peroxidação do esqualeno. Este conteúdo sebáceo influencia na proliferação e diferenciação de queratinócitos, contribuindo assim para a hiperqueratinização do folículo. No canal folicular, o sebo se mistura com a queratina formando um tampão, apresentando-se como um

comedão que pode ser aberto ou fechado. O comedão fechado ou “cravo branco” caracteriza o processo inicial da comedogênese. Neste caso, o ducto do folículo está coberto pela epiderme e conforme o acúmulo de sebo e queratina aumenta o orifício do folículo abre e surge o comedão aberto ou “cravo preto”. A cor escura aparece em decorrência da oxidação dos lipídeos e da melanina presentes na epiderme. Caso a parede folicular se rompa, há o extravasamento do conteúdo do folículo para a derme adjacente, agravando o processo inflamatório originando pústulas, pápulas e nódulos ou cistos (TUCHAYI *et al.*, 2015).

A inflamação, por sua vez, é o componente principal da patogênese da acne vulgar. A unidade pilossebácea é uma estrutura imunocompetente, onde os queratinócitos e sebócitos que a compõem podem realizar o papel de células imunes ativas. Os sebócitos podem reconhecer a produção anormal de lipídes e a microbiota alterada, ativando a produção de citocinas. Em pacientes com acne, observa-se uma superexpressão de genes envolvidos na via regulatória da inflamação com a ativação de NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição crítico para a regulação positiva de vários genes de citocinas inflamatórias (KIM *et al.*, 2017).

Atualmente, dois microrganismos estão descritos como agentes associados ao aparecimento da acne: a bactéria *C. acnes* e o fungo *Malassezia sp.* Ambos estão presentes na microbiota normal da pele humana. Porém, *C. acnes* é o principal microrganismo envolvido na patogênese da acne atuando como promotor da inflamação (LYNN *et al.*, 2016).

## 1.2. *Cutibacterium acnes*

O gênero *Propionibacterium* foi inicialmente descrito em 1909 e engloba espécies bacterianas que produzem ácido propiônico durante o processo fermentativo que realizam. Compreende espécies de vários habitats como queijo maduro, rúmen bovino e pele humana. Inicialmente, estas espécies foram agrupadas como Propionibactérias clássicas ou cutâneas, baseado em fenótipos característicos e fonte de isolamento. Recentemente, foi feita uma reclassificação do gênero *Propionibacterium*, com base em evidências genômicas. A proposta é coerente à árvore de sequenciamento do gene 16S rRNA e permite que novas espécies sejam atribuídas pela homologia dessa sequência (SCHOLZ; KILIAN, 2016).

De acordo com seu habitat e sua diversidade genética de várias outras Propionibactérias, foi proposto renomear *Propionibacterium acnes* para *Cutibacterium acnes*. Esta bactéria está associada à várias doenças, incluindo, endocardite infecciosa (IE), infecção crônica de implantes médicos devido à formação de biofilme, câncer de próstata e à mais comum doença de pele, a acne (PETERSSON *et al.*, 2018).

A pele é o maior órgão do corpo humano e assim como diversos outros órgãos, é colonizada por vários tipos de microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. Na sua grande maioria, estes microrganismos são inócuos ao hospedeiro, podendo ser até mesmo benéficos (EDMONDS-WILSON *et al.*, 2015).

*C. acnes* predomina na microbiota da pele, podendo chegar a uma densidade de até  $10^7$  microrganismos viáveis em uma unidade pilossebácea (LEVIN, 2016). É mais comumente isolada de áreas da pele ricas em sebo e quando ocorre um aumento da sua produção na unidade pilossebácea, há uma acentuada proliferação da bactéria tratando-se, portanto, de um microrganismo oportunista (DESSINIOTI; KATSAMBAS, 2010).

*C. acnes* é capaz de produzir grandes quantidades de lipases extracelulares que hidrolisam os triglicerídeos do sebo em ácidos graxos e glicerol. O glicerol, por sua vez, é utilizado como fonte de alimento pela bactéria na fermentação, resultando na produção de ácido propiônico. Estes ácidos graxos livres produzidos também tem importante papel na patogênese da doença acne, gerando uma resposta inflamatória. Quando há a infecção instalada e ocorre o rompimento do folículo, *C. acnes* pode atingir camadas mais superficiais da pele como a epiderme, caracterizando a doença (BOJAR; HOLLAND, 2004; HONRAET; ROSSEL; COENYE, 2014).

### **1.3. Tratamentos da acne vulgar**

Existem vários produtos disponíveis para o tratamento da acne atualmente. Por ser uma doença multifatorial, a terapia combinada parece ser a abordagem mais razoável na maioria dos casos, cujas recomendações seguem diretrizes que são estabelecidas de acordo com a gravidade da doença e a presença ou ausência de inflamação (THIBOUTOT *et al.*, 2009).

O principal tratamento para acne tem sido baseado na utilização de antimicrobianos sistêmicos, tais como a tetraciclina e trimetoprim -sulfametoxazol e os macrolídeos eritromicina e clindamicina, sendo que estes últimos também são utilizados topicamente (OPRICA; NORD, 2005; NAGLER; MILAM; ORLOW, 2016). Os antibióticos de uso tópico normalmente são utilizados para casos de pacientes que apresentam o quadro clínico da acne leve a moderada. Já a via sistêmica é indicada para casos mais graves. A tetraciclina apresenta efeitos anti-inflamatórios adicionais ao seu potencial antimicrobiano, mas tem-se observado que a doxiciclina e a minociclina estão sendo prescritas em sua substituição na maioria dos casos. Porém, ainda não existem dados consistentes que indiquem a superioridade da minociclina e doxiciclina em relação à tetraciclina (TUCHAYI *et al.*, 2015).

A principal e preocupante desvantagem da utilização dos antibióticos é a pressão seletiva e o conseqüente surgimento de cepas resistentes. Existem dados que confirmam a utilização e prescrição incorretas dos antimicrobianos e/ou a não aderência ao tratamento. Por exemplo, a utilização de um antibiótico tópico deveria ser sempre combinada com o peróxido de benzoíla, zinco ou algum retinoide tópico nos casos de acne de grau leve a moderado para tentar evitar a resistência. Dados de pacientes, no entanto, revelaram que em cerca de 60% dos tratamentos, não ocorria a associação entres os medicamentos (TUCHAYI *et al.*, 2015; FOX *et al.*, 2016). Isso tem levado a uma mudança no padrão de resistência de *C. acnes* aos antimicrobianos, revelando que cerca de 2/3 das cepas encontram-se resistentes à maioria deles atualmente (CANAVAN, CHEN, ELEWSKI, 2016).

Outra opção de tratamento tópico contra *C. acnes* é o peróxido de benzoíla que tem se tornado o medicamento tópico mais utilizado em dermatologia para o tratamento da acne de grau leve a moderado (TANGHETTI; POPP, 2009; WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012). Essa droga tem propriedades anti-inflamatória, cicatrizante e certo grau de atividade comedolítica e queratolítica, atuando no tampão folicular e promovendo esfoliação epitelial. Ainda, apresenta ação antimicrobiana contra bactérias Gram positivas como *Staphylococcus epidermidis* e *Cutibacterium acnes* (OKAMOTO *et al.*, 2016).

Os medicamentos retinoides são também muito utilizados contra acne, podendo ser de uso tópico ou sistêmico. Isotretinoína e a tretinoína são compostos derivados do metabolismo do retinol (vitamina A) que suprimem a produção de sebo e minimizam o tamanho das glândulas sebáceas. Também atuam reduzindo a

proliferação basal e terminal de sebócitos. Estes efeitos levam a diminuição da colonização do *C. acnes* na unidade pilossebácea (EICHENFIELD *et al.*, 2013).

Retinoides de uso tópico normalmente são associados com outros agentes na acne inflamatória e não devem ser utilizados por períodos maiores do que três meses, pois podem causar eritema, descamação, ardor e fotossensibilidade (SMITH; GRINDLAY; WILLIAMS, 2011). Dentre estes, destacam-se a tretinoína e o adapaleno. Já os retinoides sistêmicos como a isotretinoína tem grande eficácia na acne grave. Age inibindo a formação de cerca de 90% do sebo de todas as glândulas sebáceas presentes no corpo, porém podem causar muitos efeitos adversos desde os muco-cutâneos como queilite, ressecamento da pele, alopecia até os mais graves como teratogenicidade, elevação de lipídeos séricos e muito raramente desenvolvimento de pseudotumor cerebral quando associados com tetraciclina (BRUNTON *et al.*, 2012).

Na tentativa de contornar ou diminuir os efeitos adversos das terapias tradicionais contra a acne, têm-se destacado terapias alternativas ou complementares, com destaque às terapias óticas. Há indícios que este tipo de terapia resolve acne mais rapidamente, é eficaz e causa poucos efeitos colaterais, aumentando assim a satisfação do paciente. Numerosas fontes de luz estão disponíveis para melhorar a condição clínica, tendo como alvo *C. acnes* (FOX *et al.*, 2016).

A fototerapia pode ser realizada com luz intensa pulsada (IPL), luz visível de espectro total (luz verde, luz violeta, azul ou vermelha), lasers como os de titanilfosfato de potássio, pulsados e infravermelhos e a TFD, que além da luz, requer a utilização de um fármaco fotossensibilizante (TUCHAYI *et al.*, 2015). Os lasers podem atingir as glândulas sebáceas alterando sua estrutura termicamente ou a oxihemoglobina para melhorar o eritema. Os tratamentos à base de luz e laser parecem reduzir as lesões inflamatórias da acne, direcionando sua ação nos principais fatores fisiopatológicos da acne (MOFTAH; IBRAHIM; WAHBA, 2016).

A luz visível pode ser usada isoladamente ou na TFD. A luz azul, por exemplo, tem efeito isoladamente por ter como alvo as porfirinas endógenas de *C. acnes*, excitando estas moléculas e levando ao dano oxidativo e morte bacteriana. Porém, a luz azul tem uma capacidade menor em penetrar em camadas mais profundas da pele (TUCHAYI *et al.*, 2015). A atividade bactericida aumentada torna-se possível com a adição de um precursor de porfirina exógena, o ácido 5 -



aminolevulínico (5-ALA). Seguido pela irradiação com luz vermelha, tem demonstrado ser uma boa escolha, visto que esta luz penetra mais profundamente na pele e tem efeitos sobre lesões inflamatórias e não inflamatórias (ZHENG, *et al.*, 2014).

A TFDa mediada pelo 5-ALA vem sendo empregada como tratamento em dermatologia para o controle da acne nos pacientes que não respondem ou que as terapias convencionais são contra indicadas. Sua atividade contra *C. acnes* tem demonstrado bons resultados (MA *et al.*, 2013; DONG *et al.*, 2016; FOX *et al.*, 2016).

#### **1.4. Terapia Fotodinâmica antimicrobiana**

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), como é normalmente denominada, pode também ser chamada de inativação fotodinâmica ou ainda quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (YUAN *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2018) é uma modalidade de tratamento que tem sido extensivamente estudada para inativar microrganismos entre fungos, bactérias e vírus.

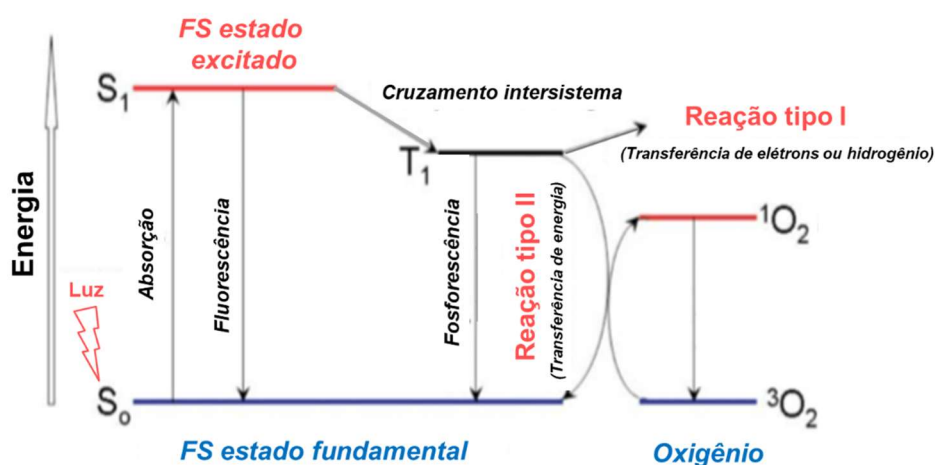
Apesar de ter sido descoberta há mais de 100 anos, a terapia fotodinâmica primordialmente foi muito utilizada nos tratamentos de doenças oftálmicas e câncer. Somente nas últimas décadas, a TFDa vem sendo mais explorada, principalmente na tentativa de erradicar bactérias resistentes aos antimicrobianos disponíveis para a população (KHARKWAL *et al.*, 2011).

Acidentalmente, o princípio fotodinâmico foi descoberto e descrito no ano de 1900, na Alemanha, por Oscar Rabb, um aluno de Herman von Tappeiner, professor de medicina. Ele observou a morte de *Paramecium caudatum* após terem sido expostos à luz solar quando tratados com o corante laranja de acridina. Com esta observação, os pesquisadores passaram a questionar se existia influência da luz na morte do protozoário e, realizando novos estudos, H. von Tappeiner e A. Jesionek descobriram a ação tumoricida da terapia através do tratamento de um tumor de pele com eosina e posterior exposição à luz branca. Estes acontecimentos então permitiram designar o termo “ação fotodinâmica” para descrever a reação que ocorria, dependente de uma molécula absorvedora de luz capaz de reagir com o oxigênio do ambiente para matar células tanto procarióticas quanto eucarióticas (RABB, 1900; VON TAPPEINER; JESIONEK, 1903; RKEIN; OZOG, 2014).

Dessa forma, três fatores são imprescindíveis para que a TFD ocorra: o fotossensibilizador, a luz e o oxigênio. Isoladamente, nem a luz nem o FS devem exercer efeito deletério ao substrato biológico (LIM., *et al.*, 2012). A terapia fotodinâmica se inicia com o acúmulo e captação do FS pela célula, o que a torna sensível à luz de comprimento de onda que o FS absorve. O resultado é uma resposta fototóxica e morte celular devido aos danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas, incluindo oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) e radicais livres como radical hidroxila ( $HO^*$ ) e ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (MROZ *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação da TFD se inicia quando a molécula de FS no seu estado fundamental absorve fótons e se converte em um estado eletrônico singleto excitado  $S_1$  (figura 1). Alguns FS tem moléculas que exibem curta meia vida podendo decair novamente para o estado fundamental emitindo fluorescência. Outras, porém, podem sofrer relaxação e serem transformadas pelo cruzamento intersistema num estado tripleto excitado ( $T_1$ ). Neste estado, a molécula pode reagir com um substrato biológico oxidável como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, transferindo elétrons para formar radicais e íons radicais, que por sua vez reagem com oxigênio para produzir espécies citotóxicas como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, e radicais hidroxila. Essa reação é denominada tipo I. Na reação de tipo II, o que ocorre é uma transferência de energia da molécula para o oxigênio molecular gerando oxigênio singleto. As EROs podem danificar a célula através da oxidação de lipídios de membrana, aminoácidos em proteínas, ligação cruzada de proteínas e dano aos ácidos nucleicos com a subsequente perturbação do funcionamento normal celular (ST. DENIS *et al.*, 2011; KASHEF; HAMBLIN, 2017).

Figura 1 - Esquema ilustrativo sobre o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.



Fonte: AGOSTINIS, *et al.*, 2011 (modificado).

A TFDa tem demonstrado ser um tratamento alternativo promissor para tratar infecções causadas por patógenos multidroga resistentes (KHARKWAL *et al.*, 2011) e infecções superficiais principalmente devido à dificuldade da entrega da luz em tecidos profundos e órgãos. Por isso a TFDa vem sendo bastante explorada principalmente para o tratamento de infecções superficiais dermatológicas como acne, feridas, infecções orais e dentais (ST. DENIS *et al.*, 2011).

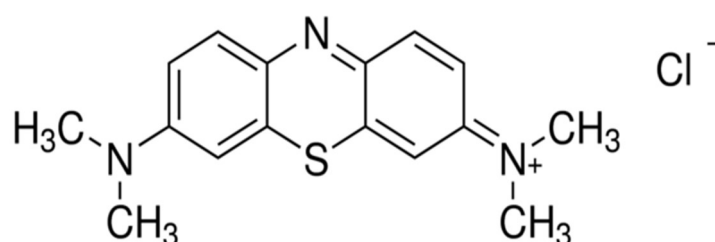
A escolha do fotossensibilizador é fundamental para garantir a efetividade da terapia. Num aspecto geral, o FS deve ser uma molécula biologicamente estável, capaz de absorver luz preferencialmente do espectro visível e que não exerça citotoxicidade na ausência da luz. Deve apresentar boa seletividade e baixa toxicidade sistêmica e que seja preferencialmente de baixo custo e fácil síntese.

O azul de metileno se encaixa nestas condições e já é fortemente empregado em estudos envolvendo TFDa contra vários microrganismos tanto *in vitro* (FONTANA *et al.*, 2009; NEMEZIO *et al.*, 2017) como *in vivo* (MOFTAH; IBRAHIM; WAHBA, 2016), demonstrando eficácia em inativar vírus e espécies bacterianas via TFD (TUIITE; KELLY, 1993; MILLSON *et al.*, 1996), incluindo *C. acnes* (ZEINA; GREENMAN; PURCELL, 2001; WAINWRIGHT, *et al.*, 2012; MOFTAH; IBRAHIM; WAHBA, 2016).

Trata-se de um corante orgânico com propriedades fluorescentes e fotossensibilizadoras (JOCKUSCH *et al.*, 1996; PHOENIX; HARRIS, 2003; HARRIS; CHATFIELD; PHOENIX, 2005) e seu uso tem muitas vantagens, como alto rendimento quântico, alta solubilidade em água, absorção de luz em comprimentos de onda na região do vermelho que permite grande penetração de luz nos tecidos (SILVA JR *et al.*, 2016).

A carga positiva presente em sua molécula (figura 2) e sua massa molecular baixa promove uma melhor interação com bactérias (SOUKOS *et al.*, 2006). Nas Gram-negativas, o azul de metileno é difundido através das porinas que são pequenos canais na membrana externa que permitem a difusão de moléculas de baixa massa molecular. Já nas bactérias Gram-positivas, desprovidas da membrana externa, a passagem das moléculas se dá pela espessa parede celular. Apesar de espessa, esta membrana permite a difusão de muitas moléculas. Além disso, uma ampla variedade de diferentes polímeros (ácidos teicoicos) confere carga negativa à superfície exterior, facilitando ainda mais o transporte de moléculas com carga positiva para dentro da célula.

Figura 2 - Estrutura química do Azul de Metileno (CAS: 122965-43-9)



Como já é sabido, a luz é um dos três componentes imprescindíveis para que ocorra a TFD, por isso a escolha correta da fonte de luz é essencial para a eficácia da terapia. As fontes de luz que podem ser utilizadas para realizar a TFD, de acordo com a literatura, incluem os LEDs, lasers e as lâmpadas halógenas de amplo espectro.

As principais fontes utilizadas nos estudos atualmente são o LED e o laser. Ambos apresentam a vantagem da emissão de luz em um único comprimento de onda, levando a alta compatibilidade com o comprimento de onda máximo no qual o fotossensibilizador usado absorve. Porém os lasers podem ter ação potencializada por ser possível utilizá-los através de fibras ópticas de alta potência que direcionam o feixe de luz. No entanto, existem as desvantagens de apresentarem custo elevado e irradiar apenas pequenas áreas (NAGATA *et al.*, 2012).

Os LEDs, por outro lado tem ganhado espaço por apresentarem um custo mais acessível e poderem ser dispostos em matrizes e apresentar diversos formatos, facilitando sua aplicação em áreas maiores do que seria possível utilizando-se o laser. Por exemplo, no caso de uma placa de 96 poços que necessita ser irradiada, os LEDs podem ser dispostos em um sistema que irradia cada um dos poços visto que com o laser isso não seria possível. Dessa forma, a utilização do LED torna a prática da TFD mais acessível, segura e otimizada tanto na prática quanto na pesquisa (CHEN *et al.*, 2012).

### **1.5. Hidrogéis de quitosana e Poloxamer como sistema de liberação de fármacos**

Os hidrogéis constituem uma classe de sistemas poliméricos de liberação de fármacos compostos de uma rede tridimensional hidrofílica capaz de absorver grandes quantidades de água e se expandirem devido a ligações inter e intra moleculares entre as cadeias dos polímeros. As ligações podem ser físicas (enredamento) ou químicas, como ligações iônicas, de van der Waals, covalentes e hidrofóbicas. O grande conteúdo de água e os poros largos da maioria dos hidrogéis geram uma liberação relativamente rápida do fármaco. (LIN; METTERS, 2006; HOFFMAN, 2012).

Os hidrogéis podem ser formados por polímeros naturais ou sintéticos e também pela mistura dos dois tipos. Dentre os naturais, pode-se destacar a pectina, ácido hialurônico, agarose, goma gelana, dextrana, colágeno, quitosana dentre outros. Já os sintéticos mais comuns utilizados na síntese de hidrogéis são PEG-PLA-PEG [Polietilenoglicol (PEG) / Ácido Polilático (PLA)], PEG-PLGA-PEG [poli

(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)], PHB (Polihidroxibutirato); PE-PO-PE [Polióxidoetileno (PE)/ Polióxidopropileno (PO)], dentre outros (HOFFMAN, 2012).

Hidrogéis têm sido amplamente utilizados para formulações cutâneas. A bioadesão desses sistemas, que é a capacidade da formulação ficar aderida na pele, pode ser melhorada através da incorporação de polímeros bioadesivos na formulação, tais como quitosana, goma gelana, dentre outros (REDDY *et al.*, 2012). Dessa forma, utilizar as propriedades bioadesivas dos polímeros com vista a prolongar o tempo de permanência dos fármacos na pele seria muito útil para conceber novos sistemas de administração tópica de fármacos (CARVALHO, *et al.*, 2013).

Hidrogéis à base de quitosana também são bastante estudados em aplicações em campos biomédicos, destacando-se no tratamento de feridas, engenharia de tecidos e como sistema de liberação de fármacos (GRIJALVO *et al.*, 2016). Por ser um biopolímero bioadesivo, a quitosana pode ser utilizado como sistemas de liberação de fármacos para uso tópico e oral, sendo uma boa proposta de agente liberador de antibióticos e fotossensibilizadores (FONTANA *et al.*, 2008).

Neste trabalho, os polímeros utilizados para o preparo do hidrogel foram a quitosana e o poloxamer 407.

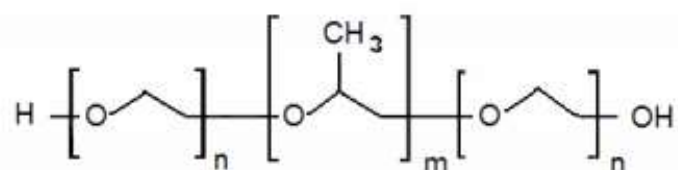
A quitosana é um polímero bioadesivo natural derivado da quitina, principal componente estrutural do exoesqueleto de crustáceos. Apresenta caráter policatiônico e dependendo do grau de desacetilação, o polímero pode ter um extenso conjunto de grupamentos amino, tornando-se protonada em meio cujo pH é menor que seu pKa (6,3 - 6,5). Isso que confere à quitosana propriedades antimicrobianas (FRIEDMAN, *et al.* 2013).

O mecanismo de ação da quitosana ainda não é totalmente elucidado, mas sabe-se que a interação do polímero com os microrganismos se dá ao nível da superfície celular, comprometendo a parede ou a membrana celular. Por isso, pode-se afirmar que o grau de atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionada também com as características da superfície celular. Nas bactérias Gram-positivas, os ácidos lipoteicoicos são, possivelmente, os prováveis responsáveis pela ligação da quitosana, levando a desestabilização da membrana e conseqüentemente ao extravasamento do conteúdo celular (RAAFAT *et al.*, 2008; KONG *et al.*, 2010).

Além das características da superfície dos microrganismos, existem diversos fatores que podem interferir na atividade antimicrobiana da quitosana inerentes ao próprio polímero, como peso molecular, densidade de carga positiva, a concentração no hidrogel, além de fatores externos como força iônica e pH do meio (KONG *et al.*, 2010).

O poloxamer é um copolímero tribloco poliéter não iônico com propriedades surfactanes que tem sido útil na detergência, dispersão, estabilização e emulsificação na indústria farmacêutica. É constituído por dois polímeros, PE de caráter hidrofílico e PO de caráter hidrofóbico, seguindo a estrutura geral  $PE_nPO_mPE_n$  conforme representado na figura 3.

Figura 3 - Estrutura geral dos poloxamers.



Existem dois polímeros desta classe, o poloxamer 188 e o 407, que mostram termossensibilidade inversa, isto é, são solúveis em soluções aquosas à baixas temperaturas e gelificam em temperaturas mais elevadas. Apresenta outras propriedades úteis em várias preparações farmacêuticas como a otimização da liberação do fármaco a partir da sua formulação com uma transição solução-gel (PATEL *et al.*, 2009; DEVI; SANDHYA; HARI, 2013). A natureza termo responsiva do poloxamer torna-o um excelente candidato para o fornecimento de vários sítios de aplicação. Nos últimos anos, tem atraído atenção na concepção de sistemas de administração dérmica e promovendo melhorar ou retardar a permeação do fármaco através da pele (ALMEIDA *et al.*, 2012).

## 2. Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o efeito da terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno incorporado a um hidrogel à base de quitosana e Poloxamer contra *Cutibacterium acnes* em fase planctônica e biofilme, bem como caracterizar os hidrogéis mais eficazes na TFDa.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Padronizar curva de crescimento de *Cutibacterium acnes*;
- Determinar o efeito tóxico das formulações sobre *C. acnes*;
- Avaliar o efeito tóxico do LED (*Light Emitting Diodes*) vermelho sobre a bactéria;
- Avaliar a eficácia da TFDa mediada pela formulação sobre o crescimento do *C. acnes* em fase planctônica e biofilme;
- Definir os melhores parâmetros de irradiação (dose de luz e concentração do azul de metileno);
- Avaliar a viabilidade celular por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) após o tratamento;
- Caracterizar os hidrogéis quanto aos seus comportamentos reológicos e bioadesão *in vitro*.



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Padrões, matérias-primas e meios de cultura

- Alça de inoculação 1 µL (Copan Diagnostics Inc.- Murrieta, CA, EUA)
- Alça de inoculação 10 µL (Labor plast – Cassinetta di Lugagnano, Itália)
- Azul de metileno (Sigma Aldrich - Steinheim, Alemanha)
- Cepa padrão de *C. acnes* (ATCC 6919) (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil)
- Contador de colônias manual de 4 dígitos (Trade Mark Line, Tokio, Japão)
- Fitas indicadoras pH (Macherey-Nagel - Düren, Alemanha)
- Hemina (Sigma Chemical Co. – St. Louis, MO, EUA)
- Meio de cultura caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB – Acumedia - Lansing, MI, EUA)
- Meio de sólido *Reinforced Clostridial Agar* (Himedia - Mumbai, Índia)
- Meio de cultura caldo *Mueller Hinton* (Difco - Detroit, MI, EUA)
- Placa com 96 poços de fundo plano estéril (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis, estéreis (Pleion - Barueri, SP, Brasil)
- Poloxamer 407 (Sigma Aldrich®)
- Ponteiras para micropipetas nos volumes: 5 - 20 µL; 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Quitosana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich - Steinheim, Alemanha)

#### 3.2 Solventes e reagentes

- Ácido Acético (Synth - Diadema, SP, Brasil)
- Cloreto de Sódio (Synth - Diadema, SP, Brasil)
- Fosfato de Potássio (Synth - Diadema, SP, Brasil)
- Hidróxido de sódio (Synth - Diadema, SP, Brasil)

### 3.3. Equipamentos e softwares

- Agitador Vórtex (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Analisador de textura (TA-XTplus - Surrey, Reino Unido)
- Aparelho de luz LED de 660 nm IrradLED® (Biopdi - São Carlos, SP, Brasil)
- Autoclave vertical (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda. - Araraquara, SP, Brasil)
- Balança de precisão Modelo: AG 200 (Gehaka – São Paulo, SP, Brasil)
- Cabine de segurança Bio Seg 12 (Vecoflow – Campinas, SP, Brasil)
- Espectrofotômetro (Biotek - Winooski, VT, USA)
- Estufa bacteriológica (Quimis - Diadema, São Paulo, SP - Brasil)
- Jarra de anaerobiose (Permutation - Curitiba, PR, Brasil)
- Micropipeta de 0,5 - 10 µL (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Micropipeta de 20 - 200 µL (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Micropipeta de 100 - 1000 µL (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil)
- Reômetro AR2000 com geometria placa-cone de 40 mm de diâmetro (TA Instruments - New Castle, DE, EUA)
- Sistema de purificação de água (Milli-Q Plus, MILLIPORE® - Molsheim, França)
- Software GraphPadPrism® versão 5.01 (GraphPad Software INC. - La Jolla, CA, EUA);
- Synergy H1M Mode Reader (Biotek - Winooski, VT, EUA)

### 3.4. Métodos - Avaliação da TFDa mediada por azul de metileno e hidrogéis de azul de metileno

#### 3.4.1. Estoque e manutenção da cepa bacteriana

Os estoques de *C. acnes* foram preparados a partir de uma cultura crescida em ágar clostridial reforçado (RCA). Para tanto, foi raspado todo o crescimento desta placa e depositado em caldo triptonsoja (TSB) com glicerol na proporção 1:1. Esta

suspensão bacteriana foi alíquotada em micro-tubos e armazenada em ultrafreezer (-80 °C).

Para os ensaios, as cepas eram reativadas semanalmente em meio adequado e incubados conforme descrito no item a seguir.

### 3.4.2. Reativação bacteriana

A cepa padrão de *C. acnes* dos estoques definidos no item anterior teve uma alíquota de 30  $\mu$ L semeada em meio sólido RCA suplementado com hemina através do método de esgotamento (figura 4).

Figura 4- Semeadura de *C. acnes* pelo método de esgotamento em RCA.



Fonte: O autor

### 3.4.3. Curva de Crescimento

Foram preparados 2 mL da suspensão celular de *C. acnes* ajustada a uma  $DO_{630nm}$  entre 0,01 e 0,02 ( $\cong 10^8$  células) para a determinação da curva de crescimento. A partir dessa suspensão uma alíquota de 100  $\mu$ L foi retirada e acondicionada em gelo. Posteriormente, 100  $\mu$ L da mesma suspensão foi adicionada

em 12 poços da microplaca de 96 poços sendo então imediatamente incubadas em anaerobiose a 37 °C, dando início à cronometragem da primeira hora.

A cada hora decorrida, uma alíquota de 100 µL foi retirada da placa incubada e medida a  $DO_{630nm}$  em espectrofotômetro. Realizada a leitura, essa alíquota foi diluída seriadamente em caldo TSB (100 µL da cultura em 900 µL de meio). As suspensões bacterianas foram diluídas até a concentração de aproximadamente  $10^4$  cél/mL. Então, 5 µL de cada suspensão final foram plaqueados em RCA. As colônias bacterianas formadas foram contadas após um dia de incubação nas mesmas condições do item anterior.

#### **3.4.4. Fotossensibilizador e fonte de luz**

Neste trabalho, o azul de metileno foi utilizado como fotossensibilizador.

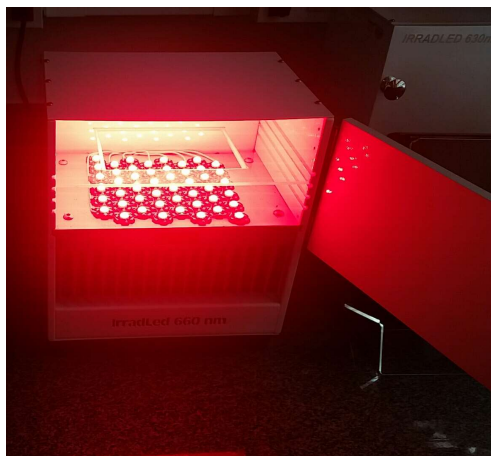
Para realizar os experimentos com solução de azul de metileno, foi utilizado o FS a partir de estoques concentrados. Estes foram preparados solubilizando 10 mg do corante em 1 mL de água milliQ estéril. Esta solução estoque foi alíquotada e armazenada sob proteção da luz a -20°C.

Para a realização dos ensaios, o FS foi diluído em caldo TSB para obter as concentrações desejadas utilizando micro-tubos que foram envolvidos em papel alumínio para proteção da luz durante a realização do experimento, bem como a microplaca de 96 poços utilizada para o ensaio, até o momento da irradiação. Na irradiação dos experimentos em fase planctônica a intensidade do LED foi de 151 mW/cm<sup>2</sup> e em biofilme, 153 mW/cm<sup>2</sup>.

A fonte de luz empregada no estudo é composta de um sistema LED emissor de luz vermelha de 660 nm, comprimento de onda que corresponde ao de absorção do azul de metileno. As irradiações foram realizadas em modo fracionado.

Os equipamentos de luz, denominadas *biotables* (Figura 5) geram um sistema de feixe num formato que permite uma irradiação pontual uniformemente circular, de forma a cobrir toda a extensão da placa a ser irradiada.

Figura 5- Sistema de iluminação LED- 660 nm (*biotable*).



Fonte: O autor.

### 3.4.5. Espectros de Absorção

O espectro de absorção do azul de metileno em solução aquosa e nos hidrogéis foram realizados através da varredura compreendendo a faixa do espectro ultravioleta (UV) e o visível (VIS), ou seja, de 300 até 800 nm. Para isso, foram adicionados 100  $\mu$ L das amostras de interesse em um poço da microplaca e 100  $\mu$ L do branco em outro poço. Em seguida, iniciou-se a varredura.

Os espectros de absorção da solução e dos hidrogéis incorporados com azul de metileno foram realizados no equipamento Synergy H1M.

### 3.4.6. Terapia Fotodinâmica antimicrobiana

A fluência (densidade de energia) empregada em cada experimento é determinada de acordo com as variáveis: potência do LED, dimensões do campo de irradiação (área) e tempo de exposição à luz. Dessa forma, têm-se o seguinte:

- A potência do LED é definida como energia (J) dividida pelo tempo (s);
- A intensidade pode ser selecionada no equipamento e é definida pela potência (W) dividida pela área ( $\text{cm}^2$ ), cuja unidade é  $\text{W}/\text{cm}^2$ ;
- A dose de luz então é determinada pela intensidade vezes o tempo:

$$\text{Dose de luz (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência} \times \text{tempo}}{\text{Área}} = \frac{\text{Energia}}{\text{Área}} \text{ ou Intensidade} \times \text{tempo}$$

Dessa forma, a equação 1 foi utilizada para o cálculo do tempo de irradiação para cada dose de luz estipulada foi:

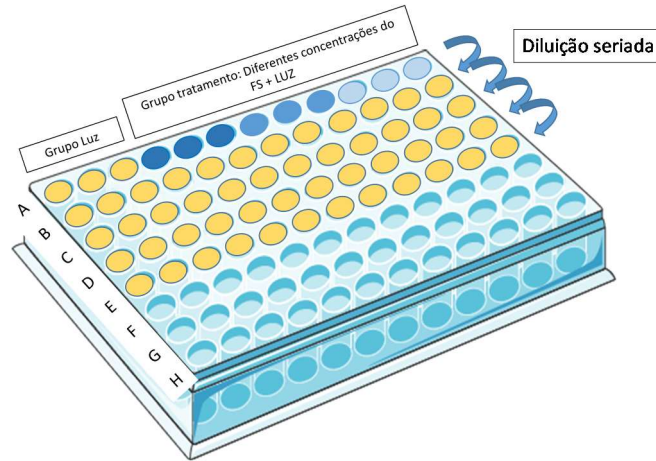
$$\text{Dose de luz (J/cm}^2\text{)} = I \text{ (W/cm}^2\text{)} \times t \text{ (seg)} \quad (1)$$

### 3.4.7. Teste de viabilidade bacteriana em fase planctônica (UFC/mL)

As soluções e hidrogéis foram preparados incorporando-se o FS com o dobro da concentração de trabalho desejada. Em seguida, foram adicionados 50 µL nos poços da linha A da microplaca e cada concentração foi adicionada em triplicata. A cepa bacteriana já crescida em placa contendo RCA sob condições de anaerobiose a 37°C por 24 horas foi raspada e suspensa em caldo TSB (para os ensaios com AM) e em MH (para os ensaios com HG-AM) em quantidade suficiente para formar uma suspensão com valores de absorvância entre 0,08 a 0,1 ( $\cong 1 \times 10^8$  cél/mL) em 630 nm ( $DO_{630\text{nm}}$ ), lida em espectrofotômetro. Foram transferidos 50 µL da suspensão bacteriana em cada um dos poços da microplaca contendo as amostra. Dessa forma, o inóculo apresenta-se diluído pela metade, resultando numa concentração celular de  $\cong 5 \times 10^7$  cél/mL.

Terminados os tempos de pré-incubação e tratamento, as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 por quatro vezes até a concentração  $\cong 5 \times 10^3$  cél/mL, apresentando um fator de diluição de  $10^{-4}$ . Um volume de 5 µL de cada grupo diluído foi plaqueado em placa de RCA. As colônias bacterianas formadas foram contadas após um dia de crescimento.

Figura 6 - Representação da técnica utilizada para o teste de susceptibilidade bacteriana a TFDa em fase planctônica



Fonte: <https://smart.servier.com> modificado pelo autor.

Esta técnica (figura 6) foi padronizada pelo grupo de pesquisa do laboratório de Microbiologia Clínica comparando-se o protocolo tradicional de microdiluição em tubos para contagem de UFC e a análise estatística dos resultados revelou que não houve diferença entre as duas metodologias. Para calcular o número de UFC/ mL foi utilizado o seguinte cálculo da equação 2:

$$\frac{N^{\circ} \text{ colônias} \times 10^n}{v} \quad (2)$$

Onde:  $n$  corresponde ao número de diluições realizadas ou fator de diluição e  $v$  é o volume da amostra diluída plaqueada em mL. Dessa forma, tem-se que, para os ensaios em fase planctônica, fator de diluição = 4 e  $v = 0,005$  mL.

Os grupos analisados foram:

### Grupo controle negativo (CN)

Grupo que não recebeu nenhum tratamento onde 50 µL da suspensão de *C. acnes* foram transferidos para três dos poços da microplaca. A seguir, o mesmo volume de meio de cultura estéril foi adicionado nos mesmos poços e a amostra ficou em repouso protegida da luz durante o tempo de pré-incubação somado ao tempo de tratamento. Os resultados obtidos com as culturas desse grupo foram utilizados como parâmetro para comparação com os grupos de tratamento.

### Grupo Escuro (L-)

O grupo escuro realizado para determinar o efeito tóxico do AM (A) sobre *C. acnes* e também dos hidrogéis de azul de metileno (HG-AM) (B) sobre o microrganismo. Os grupos escuro estão descritos a seguir:

**A) Grupo AM solubilizado em TSB:** Para avaliar a ação do azul de metileno sobre *C. acnes* foram adicionados em três poços 50 µL da suspensão de *C. acnes* com 50 µL das soluções do FS nas concentrações a serem testadas. Em seguida, a placa foi mantida no escuro durante o tempo correspondente ao período de pré-incubação mais o de tratamento.

**B) Grupo (HG-AM):** Para avaliar a toxicidade de HG-AM sobre *C. acnes*, adicionou-se 50 µL das formulações com as concentrações de FS em 50 µL de suspensão bacteriana, que foram mantidas no escuro durante o tempo correspondente ao período de pré-incubação mais o de tratamento.

### Grupo Luz (L+)

Neste grupo foi avaliado se a exposição ao LED na ausência da formulação poderia apresentar efeitos tóxicos para *C. acnes*. Desta forma, 50 µL da suspensão de *C. acnes* foram transferidos para três dos poços da microplaca de diluição. Em seguida, o mesmo volume de meio de cultura estéril foi transferido para os poços e a amostra foi mantida no escuro durante o tempo de pré-incubação e em seguida submetida à irradiação nas doses de luz desejadas.



### Grupo TFDA

Para avaliar a ação da TFDA, 50µL da suspensão de *C. acnes*, foram inoculados em triplicata nos poços. Em seguida, alíquotas de 50 µL de AM em solução e HG-AM foram adicionadas aos poços e após o tempo de pré-incubação, a placa contendo as amostras foi irradiada. As doses de luz avaliadas foram: 45 e 90 J/cm<sup>2</sup> (151 mW/cm<sup>2</sup>) e as seguintes concentrações de azul de metileno foram testadas: 12,5; 25; 37,5 e 50 µg/mL. O tempo de pré-incubação foi de 10 min para os grupos TFDA com hidrogel. O modo de irradiação empregado foi o modo fracionado, ou seja, o LED alterna entre modo ligado e desligado em intervalos de 60 segundos.

Os tempos de irradiação correspondentes para cada dose de luz avaliada estão expostos na tabela 1.

Tabela 1- Tempo de irradiação do grupo TFDA em doses de luz específicas e tempo de incubação (tempo de pré-incubação somado ao tempo de irradiação) dos grupos que não foram irradiados em fase planctônica.

Dose de luz Intensidade de 151 mW/cm <sup>2</sup>	Tempo de irradiação (grupo TFDA)	Tempo de incubação (grupo L- e CN)
45 J/cm <sup>2</sup>	9' 34 "	19' 34 "
90 J/cm <sup>2</sup>	19' 51"	29' 51"

#### **3.4.8. Desenvolvimento do biofilme e teste de susceptibilidade bacteriana**

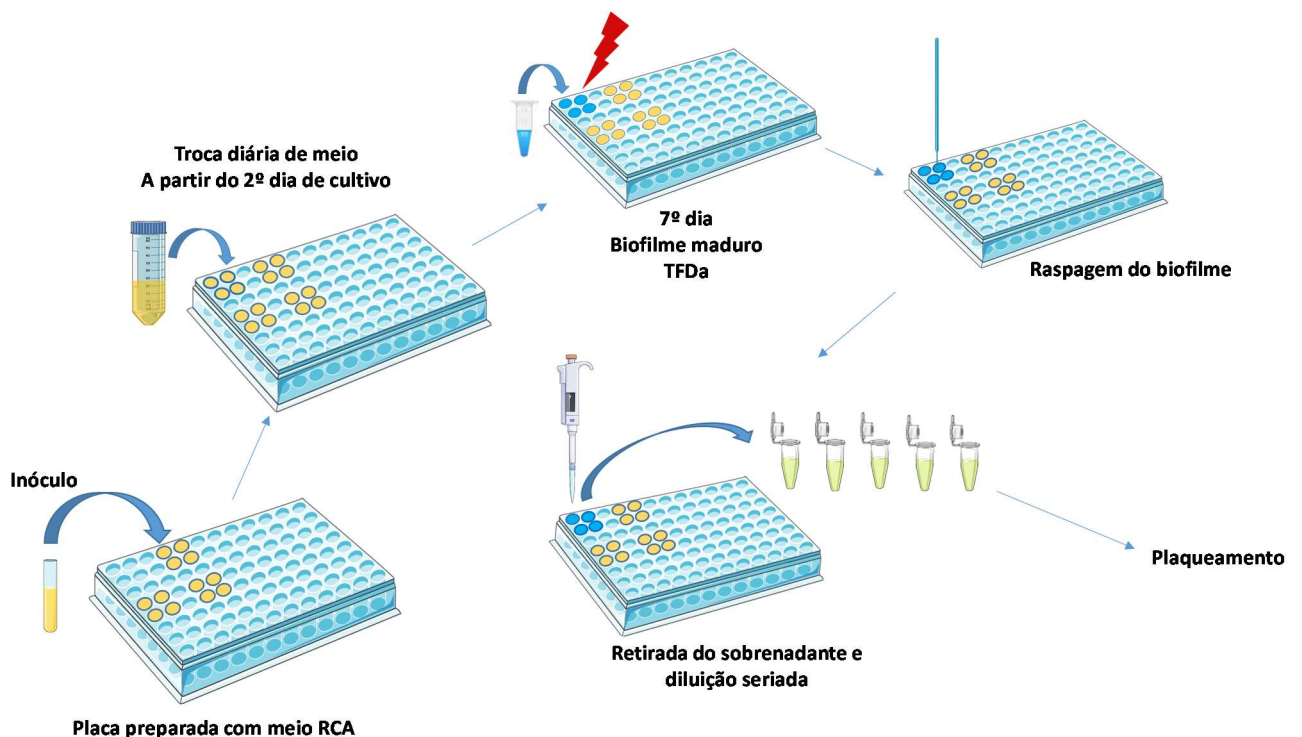
O preparo e cultivo do biofilme foram realizados de acordo com a técnica *in vitro* estabelecida por FONTANA *et al.* (2009) modificado (figura 7). Para avaliar a TFDA em biofilme, inicialmente a microplaca foi preparada com uma base de ágar para o crescimento do biofilme. Para tanto, foram adicionados 150 µL de RCA enriquecido com hemina em cada poço. Cada grupo de tratamento foi avaliado em quadruplicata.

Para iniciar o crescimento do biofilme, 150 µL da suspensão bacteriana preparada em caldo TSB e ajustada com valor de absorvância entre 0,08 a 0,1 ( $\cong 1 \times 10^8$  cél/mL) em 630 nm (DO<sub>630nm</sub>). A placa foi incubada em anaerobiose a 37°C

por sete dias. Após 48 horas de incubação foi iniciada a troca diária de meio de cultura até o sétimo dia de cultivo quando o biofilme atinge seu estado maduro. No sétimo dia foi realizado o tratamento.

O biofilme foi pré-incubado no escuro com AM e os HG-AM e posteriormente as amostras foram irradiadas. Após o tratamento, cada poço contendo as amostras foi cuidadosamente raspado com uma alça de inoculação de 1  $\mu\text{L}$  de forma que o biofilme fosse despreendido da base do ágar e então transferido para um micro-tubo onde foi realizada a diluição seriada. Por fim, uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de cada suspensão a  $\cong 10^2$  cél/mL foi plaqueado em RCA. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C. As colônias bacterianas formadas foram contadas após um dia de crescimento.

Figura 7- Representação esquemática da técnica utilizada para o teste de susceptibilidade bacteriana à TFDa em biofilme.



Fonte: <https://smart.servier.com> modificado pelo autor.

Os grupos analisados em biofilme foram:

#### Grupo controle negativo (CN)

Grupo que não recebeu nenhum tratamento onde apenas 50  $\mu$ L do caldo foram transferidos para os quatro poços deste grupo na microplaca com o biofilme maduro, de acordo com representação do esquema da figura 6. A seguir, a placa ficou em repouso protegida da luz durante o tempo de pré-incubação somado ao tempo de tratamento. Os resultados obtidos com as culturas desse grupo foram utilizados como parâmetro para comparação com os grupos de tratamento.

#### Grupo Escuro (L-)

O grupo escuro foi avaliado para determinar se o azul de metileno (AM) (A) e os hidrogéis de azul de metileno (HG-AM) (B) exerceriam algum efeito tóxico sobre o biofilme de *C. acnes*. Os grupos escuro estão descritos a seguir:

**A) Grupo AM solubilizado em TSB:** Para avaliar a ação do azul de metileno sobre o biofilme de *C. acnes* foram adicionados 50  $\mu$ L das soluções do AM nas concentrações a serem testadas. A seguir, a placa ficou em repouso protegida da luz durante o tempo de pré-incubação somado ao tempo de tratamento.

**B) Grupo (HG-AM):** Para avaliar a toxicidade de HG-AM, adicionou-se 50  $\mu$ L das formulações com as concentrações de FS nas concentrações desejadas, que foram mantidas no escuro durante o tempo correspondente ao período de pré-incubação mais o de tratamento.

#### Grupo Luz (L+)

Neste grupo foi avaliado se somente as exposições ao LED vermelho nas doses de luz avaliadas poderiam apresentar efeitos tóxicos no biofilme maduro. Dessa forma, alíquotas de 50 $\mu$ L meio de cultura foram adicionadas aos poços desejados. Essa amostra foi mantida no escuro e em seguida foi realizado o ensaio com as doses de luz desejadas.

### Grupo TFDa

Para avaliar a ação da TFDa, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  do AM e dos HG-AM foram dispensadas sobre os poços contendo o biofilme formado. Após o tempo de pré-incubação, a placa contendo as amostras foi irradiada. As doses de luz empregadas para a realização dos ensaios foram: 60, 90 e 120, 150  $\text{J}/\text{cm}^2$  (153  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) em modo de irradiação fracionada e as concentrações de AM avaliadas foram: 25; 50; 75; 100 e 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os tempos de pré-incubação para as doses de 60, 90 e 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  foram de 10 minutos e para a dose de 150  $\text{J}/\text{cm}^2$ , foram avaliados os tempos 10, 20 e 30 minutos. Nos testes com HG-AM foram testadas as concentrações de 75, 100 e 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a uma fluência de 150  $\text{J}/\text{cm}^2$  com 30 minutos de pré-incubação. Os tempos de irradiação correspondentes para cada dose de luz avaliada estão expostos na tabela 2.

Tabela 2 - Tempo de irradiação do grupo TFDa em doses de luz específicas e tempo de incubação (tempo de pré-incubação somado ao tempo de irradiação) dos grupos que não foram irradiados em biofilme.

<b>Dose de luz (153 <math>\text{mW}/\text{cm}^2</math>)</b>	<b>Tempo de irradiação (grupo TFDa)</b>	<b>Tempo de incubação (grupo L- e CN)</b>
60 $\text{J}/\text{cm}^2$ (10 min de pré-incubação)	13' 4"	23' 4"
90 $\text{J}/\text{cm}^2$ (10 min de pré-incubação)	19' 36"	29' 36"
120 $\text{J}/\text{cm}^2$ (10 min de pré-incubação)	26' 8"	36' 8"
150 $\text{J}/\text{cm}^2$ (10 min de pré-incubação)	32'41"	42' 41"
150 $\text{J}/\text{cm}^2$ (20 min de pré-incubação)	32'41"	52' 41"
150 $\text{J}/\text{cm}^2$ (30 min de pré-incubação)	32'41"	62' 41"

#### **3.4.9. Preparo dos hidrogéis**

As concentrações dos polímeros dos hidrogéis foram estabelecidas de acordo com GRATIERI *et al.*, 2010. A escolha da concentração do poloxamer para o sistema deste estudo (16%) se deu devido a temperatura de gelificação do polímero

ser próxima a temperatura da pele, ou seja, 32°C. A quitosana foi dispersa em solução de ácido acético a 0,5% (v/v) nas concentrações de 0,25% (HG1), 0,5% (HG2) e 1,0% (HG3) (p/v) e homogeneizadas sob agitador magnético (1000 rpm) por cerca de 24 horas. Em seguida, as dispersões foram mantidas em banho de gelo adicionando-se aos poucos o poloxamer (PO) na concentração de 16% (p/v). Em seguida, o fotossensibilizador foi incorporado em diversas concentrações sob agitação para assegurar a sua dissolução completa. O pH das formulações foram ajustados entre 6,0 e 6,5 com NaOH a 2% (p/v). As formulações foram mantidas sob refrigeração e protegidas da luz. As composições das formulações avaliadas neste trabalho são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3- Composição dos hidrogéis.

Hidrogel	Quitosana (%) (p/v)	Poloxamer (%) (p/v)
HG1	0,25	16
HG2	0,50	16
HG3	1,00	16

### 3.5. Métodos - Caracterização dos HG

#### 3.5.1. Ensaio reológico

O comportamento reológico das amostras, tanto para reologia oscilatória quanto contínua, foi avaliado utilizando reômetro AR2000 de estresse controlado com geometria da placa cone (40 mm de diâmetro) com um intervalo de amostra de 52 µm. As amostras foram avaliadas em triplicata e frente às temperaturas ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C) e da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C) de modo a identificar se há variação do comportamento reológico quando este for aplicado na superfície da pele.

As amostras foram cuidadosamente aplicadas na placa inferior do reômetro para minimizar o corte da amostra e foram deixadas em equilíbrio durante 1 minuto antes da análise (CALIXTO *et al.*, 2015; SALMAZI *et al.*, 2015).

### 3.5.1.1. Análise reológica contínua

Na análise reológica contínua, foram avaliadas as propriedades de fluxo e escoamento dos hidrogéis com e sem o FS. Foram determinadas utilizando um procedimento de taxa de cisalhamento controlado variando de 0,1 a 100 s<sup>-1</sup> de ida e de volta. Cada estágio durou 120 segundos com um intervalo de 10 segundos entre as curvas. Os índices de consistência e fluxo foram determinados a partir da lei de poder para uma análise quantitativa do comportamento do fluxo (Equação 3):

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad (3)$$

Onde " $\tau$ " é o estresse de cisalhamento, " $\gamma$ " é a taxa de cisalhamento, " $k$ " é o índice de consistência e " $n$ " é o índice de fluxo.

### 3.5.1.2 Análises oscilatórias

As análises oscilatórias foram submetidas a uma varredura de estresse para determinar a região viscoelástica das formulações. A varredura de estresse foi realizada a uma frequência constante de 1Hz sobre uma faixa de tensão de 0,1-10 Pa. Foi selecionado um estresse de cisalhamento constante de 1,0 Pa para executar a varredura de frequência em uma faixa de 0,1-10 Hz, que estava dentro da região viscoelástica linear anteriormente determinada para todas as formulações. Assim, os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ) foram gravados. A variação do módulo de armazenamento ( $G'$ ) em baixas frequências em uma parcela log-log de  $G''$  versus  $\omega$  seguiu a lei de potência descrita em na Equação 2, dada por:

$$G' = S \cdot \omega^n \quad (4)$$

Onde  $G'$  é o módulo de armazenamento, " $S$ " é a força da formulação, " $\omega$ " é a frequência de oscilação e " $n$ " é o expoente viscoelástico.

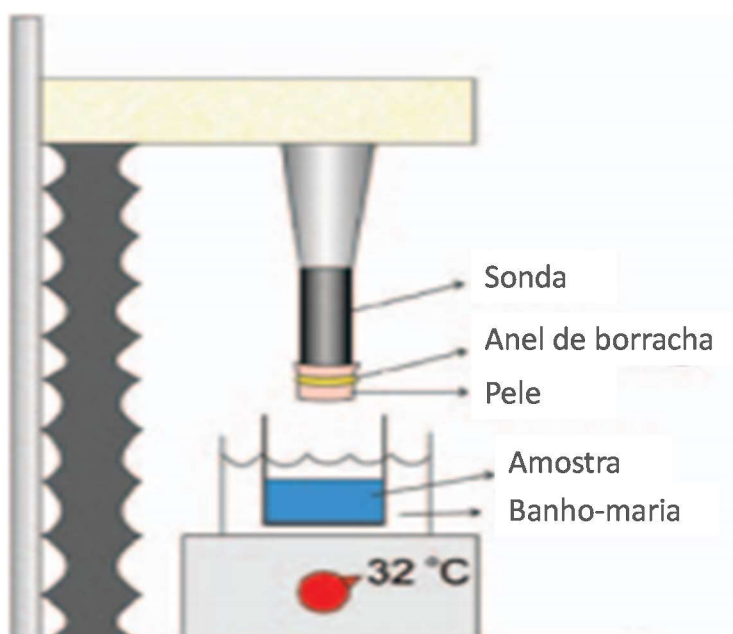
### 3.5.2. Avaliação *in vitro* da força bioadesiva

A pele da orelha suína foi obtida de um matadouro e preparada para o teste como descrito por CARVALHO *et al.* (2013).

As orelhas foram selecionadas, descartando-se as que apresentaram alguma lesão. Em seguida foram limpas com água ( $25 \pm 0,5$  ° C) e removidas da cartilagem com o auxílio de um bisturi. Uma camada fina de 400  $\mu$ m de espessura do estrato córneo e epiderme foi separada do tecido adiposo com um dermatomo. As peles preparadas foram congeladas a -20 °C e armazenadas no máximo por 4 semanas. No dia do experimento, a pele foi descongelada em solução salina a 0,9% de NaCl (p / v) a  $25 \pm 0,5$  ° C por 30 min e em seguida, os pelos foram cortados.

A força bioadesiva entre a pele da orelha de porco e as formulações foi avaliada pelo teste de desprendimento usando um analisador de textura conforme ilustrado na figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da pele adaptada à sonda do analisador de textura.



Fonte: CARVALHO, *et al.*, 2013 (modificado).

Antes do teste, a pele estava presa à extremidade inferior de uma sonda cilíndrica (diâmetro 10 mm) com um anel de borracha. As amostras de hidrogéis foram acondicionadas em vasos cilíndricos rasos e então começou-se a baixar a sonda analítica que continha a pele a uma velocidade constante (1 mm/s) na superfície da amostra. A pele e a amostra foram mantidas em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este intervalo. Em seguida, a pele foi puxada para cima (0,5 mm/s) até que o contato entre as superfícies foi quebrado. A força bioadesiva das formulações foi a medida da força máxima de separação como a resistência à retirada da sonda, o que reflete a característica de bioadesão. Cinco repetições foram realizadas a  $32,0 \pm 0,5$  °C.

### **3.6. Análise Estatística**

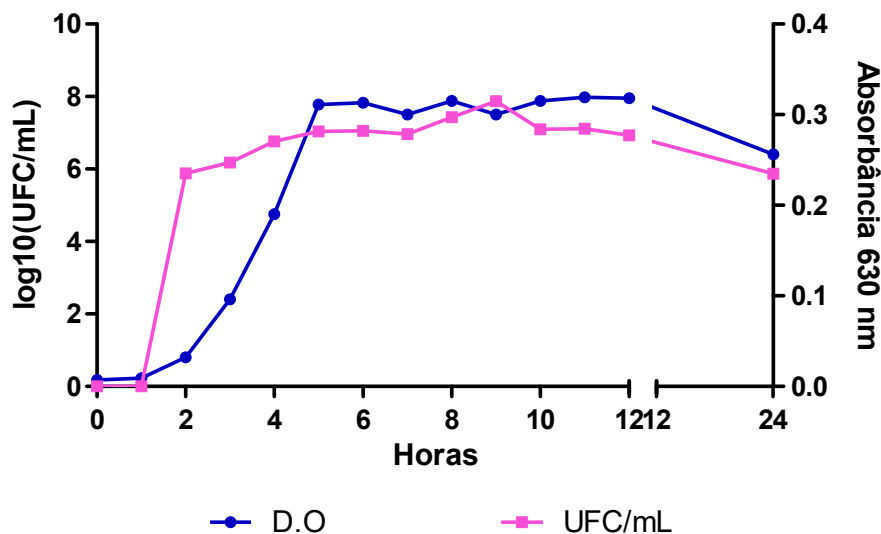
Para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foi utilizado testes de Análise de Variância (*one way ANOVA*), com pós Teste de *Tukey*. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0.05$ . O coeficiente de variação máximo aceitável dos ensaios foi estipulado em 25%.

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Curva de crescimento de *Cutibacterium acnes***

O procedimento de padronização da curva de crescimento de *C. acnes* gerou duas curvas. A primeira mostra os valores de absorvância da suspensão medidos após os determinados tempos de incubação e a segunda, a viabilidade celular através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).



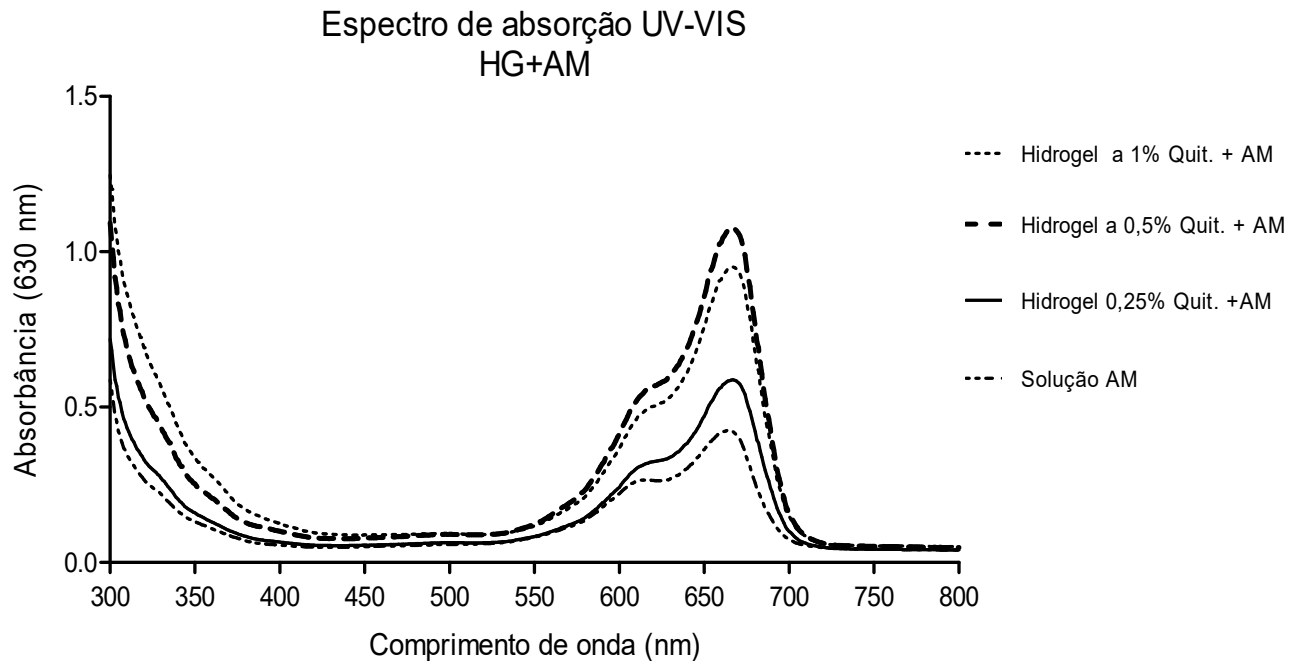
Figura 9 - Curva de crescimento de *C. acnes* ATCC 6919.

Através da figura 9, pode-se observar que a cepa de *Cutibacterium acnes* em estudo, apresenta-se em período de adaptação (fase lag) entre o tempo 0 e 2 horas de incubação. O início da fase exponencial, isto é, de multiplicação celular (fase log) se dá a partir da segunda hora de cultivo, estendendo-se até aproximadamente 5 horas. A fase estacionária, definida pelo platô, estende-se até 12 horas de cultivo. Neste período, o crescimento microbiano equilibra-se às taxas de morte e após 12 horas de incubação, as fontes de alimento começam a se esgotarem, culminando na fase de morte celular.

#### 4.2. Espectro de absorção do fotossensibilizador em hidrogéis

Os espectros de absorção dos hidrogéis com azul de metileno foram realizados para avaliar se a presença do hidrogel não causaria deslocamento da banda de absorção do fotossensibilizador. Como é possível observar na figura 10, o espectro do azul de metileno em hidrogéis não foram alterados, demonstrado pico máximo de absorção em torno de 660 nm.

Figura 10 - Espectro de absorção UV-VIS do AM e dos HG-AM.

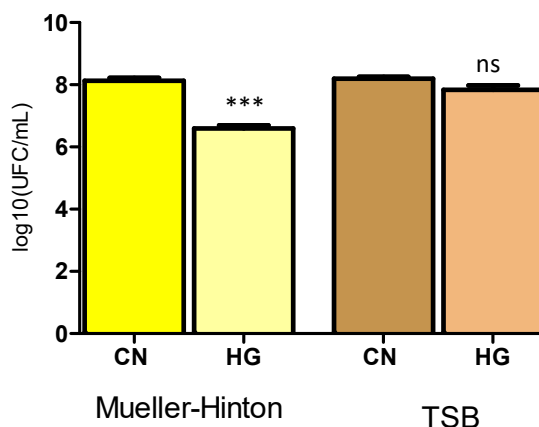


#### 4.3. TFDa mediada por azul de metileno em hidrogel contra células planctônicas

É sabido que a quitosana tem sua solubilidade influenciada pelo pH e força iônica do meio. E considerando que os meios de cultura possuem sais, componentes hidrolisados e pH próximo de 7, há possibilidade de interferência do meio com o polímero, afetando diretamente sua ação antimicrobiana também (KONG *et al.*, 2010). O meio de cultura padrão utilizado para o teste de susceptibilidade bacteriana de *C. acnes* à TFD é o TSB. Entretanto, testes preliminares mostraram que o hidrogel de quitosana precipita neste meio. Apenas no meio Mueller-Hinton (MH) não foram observados os grumos característicos da precipitação do polímero.

A figura 11 representa o resultado do teste de susceptibilidade de *C. acnes* em caldo MH e TSB.

Figura 11- Avaliação da susceptibilidade de *C. acnes* ao HG1 em caldo MH e TSB.



Valores médios de log<sub>10</sub> entre os grupos controle negativo(CN) e hidrogel (HG1) realizados em caldo MH e TSB. As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo (\*\*\*) (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

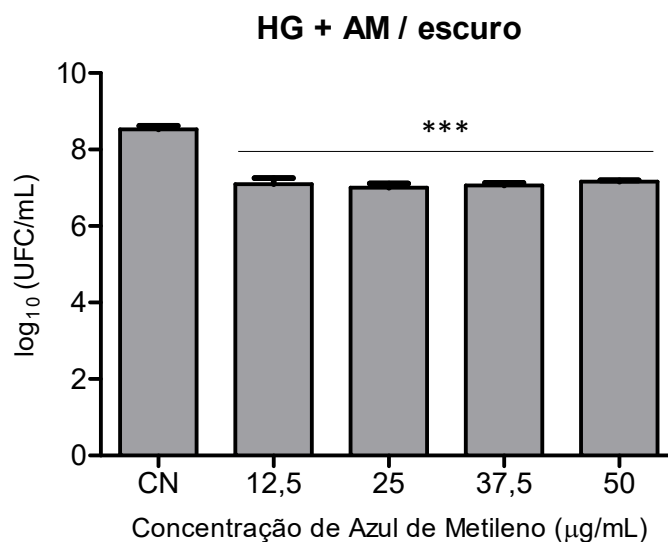
Após trinta minutos de incubação do microrganismo com o hidrogel nos diferentes meios de cultura, obteve-se redução microbiana de 1,53 log<sub>10</sub> em MH e 0,4 log<sub>10</sub>. Este resultado evidencia que a composição dos meios provavelmente influenciou na atividade da quitosana, uma vez que o pH final dos dois meios eram iguais e não se variou nenhuma outra condição durante este teste. O polímero, quando precipitado, sugere causar interferência na atividade antimicrobiana.

O TSB tem uma composição química mais complexa do que o caldo MH, apresentando sais que podem se ionizar, modificando a força iônica do meio, podendo interagir com as cargas positivas da molécula de quitosana.

Dessa forma, para os ensaios de TFDa que avaliaram o AM em HG, o meio utilizado foi o MH.

Inicialmente, foi necessário determinar a atividade antimicrobiana dos HG-AM na ausência de luz. Portanto, de acordo com a figura 12, é possível observar que quando a suspensão bacteriana foi incubada com HG1-AM houve redução de 1,4 log<sub>10</sub> em todas as concentrações de fotossensibilizador avaliadas. O tempo de incubação para este ensaio foi o equivalente a irradiação com a maior dose de luz avaliada em fase planctônica, de acordo com a tabela 1.

Figura 12 - Valores médios de  $\log_{10}$  UFC/mL entre os grupos controle negativo (CN) e HG1- AM com diferentes concentrações do FS na ausência de luz.



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

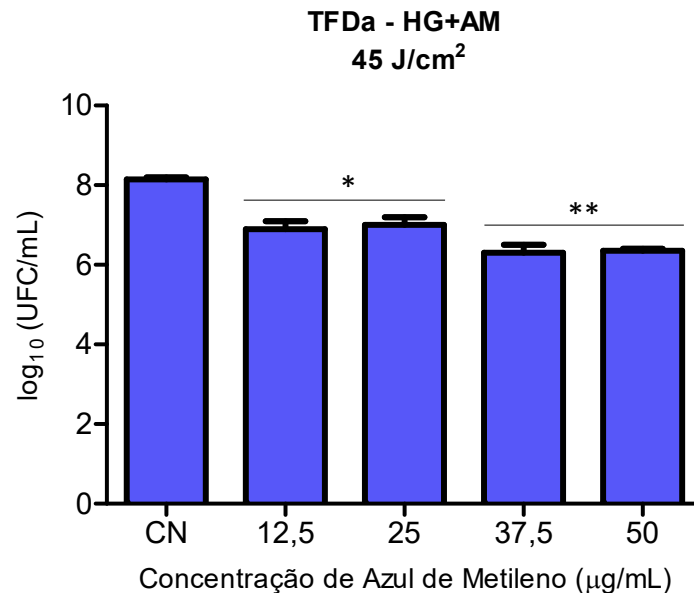
Os resultados desse método quantitativo de susceptibilidade ao sistema de liberação escolhido para este trabalho revelam, como esperado, um efeito do hidrogel de quitosana na viabilidade celular de bactérias livres. Porém, a comparação destes resultados com a literatura é dificultado visto que a quitosana, por ser um polímero natural, apresenta peso molecular e graus de acetilação muito variados e distintos do que foi abordado para este estudo.

FRIEDMAN e colaboradores (2013) também demonstraram atividade antimicrobiana da dispersão de quitosana contra *C. acnes* em fase planctônica. Seus achados evidenciaram que a incubação da bactéria com concentrações próximas a 0,25% do polímero por 4 horas resultaram em redução de mais de 2 log da suspensão bacteriana. Apesar de existirem poucos dados na literatura, estes achados corroboram os resultados obtidos neste estudo. Uma redução menor demonstrada na figura 12 provavelmente se deve ao fato de que o tempo de tratamento com a quitosana e o grau de acetilação do polímero utilizados foram menores em comparação com o que FRIEDMAN e colaboradores encontraram.

Os testes de TFDa foram iniciados aplicando-se uma dose de luz de 45 J/cm<sup>2</sup> associadas a quatro diferentes concentrações do FS no hidrogel, 12,5; 25; 37,5 e 50 µg/mL.

O resultado de morte bacteriana foi da ordem de 1,25 e 1,15 log<sub>10</sub> para 12,5 e 25 µg/mL de azul de metileno, respectivamente e 1,8 log<sub>10</sub> nas concentrações de 37,5 e 50 µg/mL. (Figura 13).

Figura 13 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a TFDa mediada por HG1-AM e LED 660 nm.

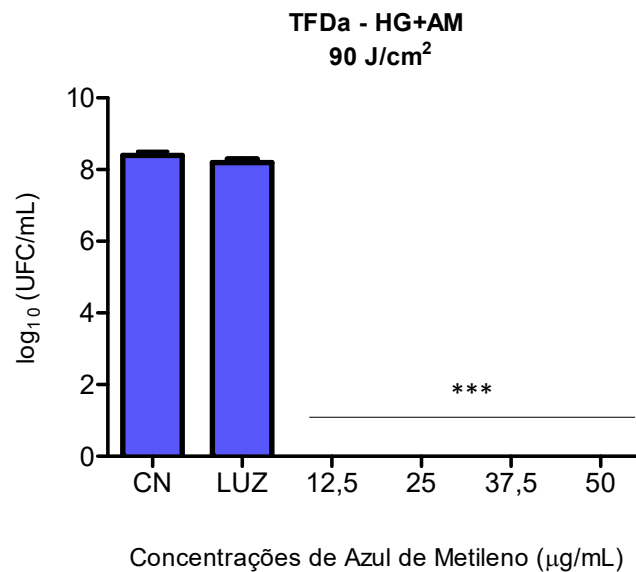


As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey (\*p<0,05; \*\*p< 0,01).

Este resultado mostra que a dose de 45 J/cm<sup>2</sup> não foi suficiente para causar eliminação da carga microbiana nas concentrações de FS avaliadas, não havendo, portanto, efeito sinérgico da quitosana com a TFDa.

Foi então avaliado o efeito da TFDa com os mesmos HG-AM, aplicando-se uma dose de luz de 90 J/cm<sup>2</sup>.

Figura 14 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em fase planctônica empregando a TFDa mediada por HG1-AM e LED 660 nm.

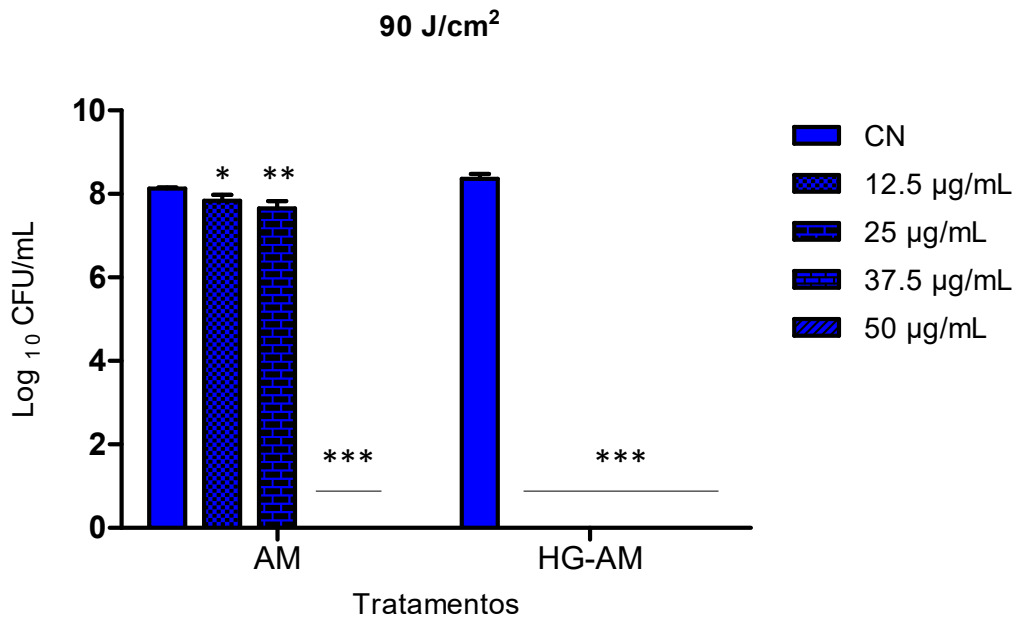


As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey (\*\*p < 0,001).

Nestas condições, foi possível observar que todas as concentrações de AM avaliadas foram letais à suspensão microbiana e que a luz isoladamente não apresentou toxicidade ao microrganismo. Obteve-se 8,4 log<sub>10</sub> de redução com 12,5 µg/mL do fotossensibilizador (Figura 14).

A concentração bactericida mínima do azul de metileno na TFDa frente ao *Cutibacterium acnes* estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa foi de 37,5 µg/mL do FS solubilizado em solução aquosa (meio de cultura) associada a 90 J/cm<sup>2</sup>. Quando o mesmo tratamento foi realizado utilizando-se HG1-AM, verificou-se que a TFDa foi mais eficaz quando comparada utilizando-se o AM em solução (figura 15).

Figura 15 - Comparação entre os tratamentos: TFDa mediada por AM em solução e HG-AM.



As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. As colunas referentes as concentrações de 37,5 e 50 µg/mL não aparecem no gráfico devido a total eliminação da carga microbiana nestas condições nos dois tratamentos. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os grupos e o controle negativo ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey (\*p<0,05; \*\*p< 0,01; \*\*\*p< 0,001).

Na TFDa mediada pelo HG1-AM, foi necessária uma concentração de AM três vezes menor para inativar a carga microbiana comparada a terapia mediada por azul de metileno em solução. Estes resultados sugerem que a quitosana presente no hidrogel possa ter atuado na membrana de *C. acnes*, facilitando a internalização do FS na bactéria. O microrganismo, portanto, pode sofrer modificações ou rupturas em sua membrana, o que facilitaria a captação do FS pela célula até chegar em seu alvo.

É sabido que o azul de metileno tem afinidade pela molécula de DNA e que quando excitado por uma luz num comprimento de onda adequado, reage com bases nitrogenadas, especificamente a guanina, formando 8-hidroxil-2-desoxiguanosina. Este produto pode levar a formação de adutos e rupturas da cadeia de DNA celular (SCHNEIDER *et al.*, 1990; CHOI *et al.*, 2014).

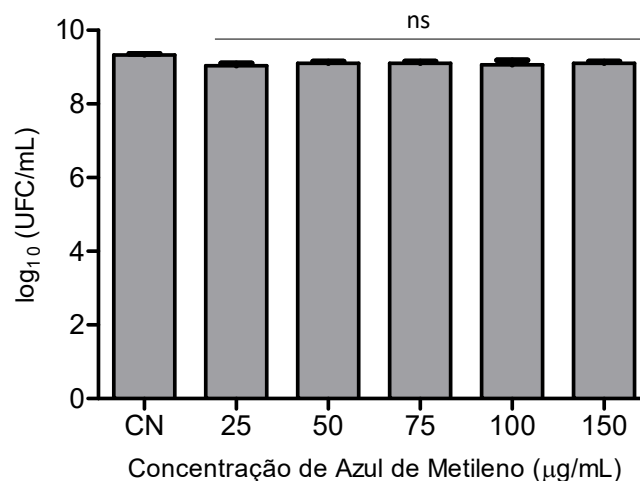
Isso poderia justificar a necessidade de menores concentrações do fotossensibilizador para a eliminação da carga microbiana durante a terapia fotodinâmica com o hidrogel.

#### 4.4. TFDa mediada por azul de metileno em solução aquosa contra biofilme

Neste trabalho, também foi realizado o *screening* para determinar a menor concentração de AM e menor dose de luz necessárias para a eliminação do biofilme. Estes experimentos foram realizados combinando diversas concentrações do AM em solução (solubilizado em meio de cultura) frente a doses de luz crescentes.

Conforme o esperado, os resultados de avaliação da toxicidade do azul de metileno em solução demonstraram que as concentrações de FS avaliadas não foram tóxicas para o biofilme de *C. acnes* isoladamente (figura 16).

Figura 16 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando AM em solução sem luz.



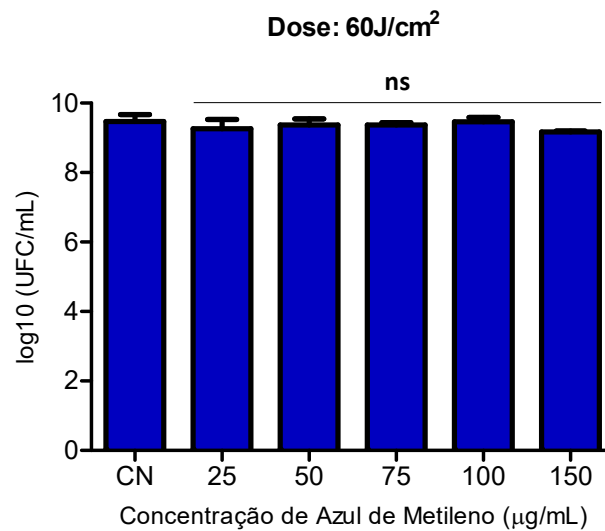
As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: não significativo, (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Foram utilizadas as concentrações: 25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL, associados à irradiação de 60, 90, 120 e 150 J/cm<sup>2</sup>. Todas as doses de luz foram avaliadas incubando-se o biofilme com AM por 10 minutos. A maior dose de luz avaliada (150



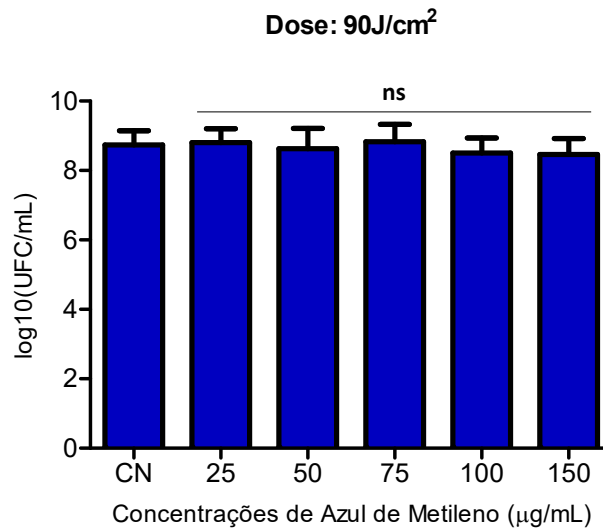
J/cm<sup>2</sup>) foi testada variando-se o tempo de pré-incubação. Os tempos avaliados foram de dez minutos (figuras 17 a 20), vinte minutos (figura 21) e trinta minutos (figura 22).

Figura 17 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução com dez minutos de pré- incubação.



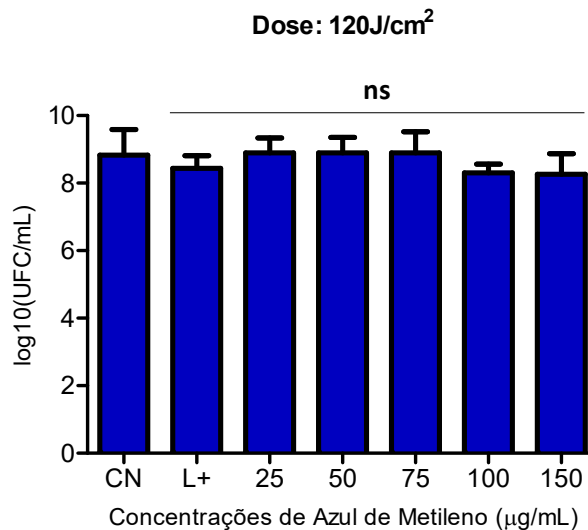
As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão (one-way ANOVA com pós - teste de Tukey); ns: não significativo.

Figura 18- Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução com dez minutos de pré- incubação.



As colunas representam os valores de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão (one-way ANOVA com pós - teste de Tukey); ns: não significativo.

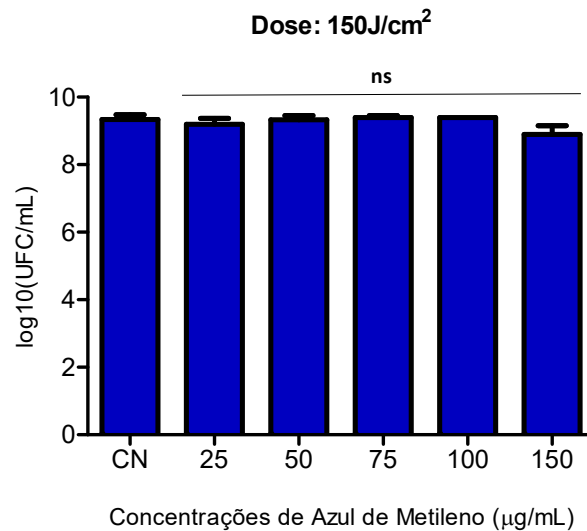
Figura 19 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução com dez minutos de pré- incubação.



As colunas representam os valores de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão (one-way ANOVA com pós - teste de Tukey); ns: não significativo.

Para a dose de 120 J/cm<sup>2</sup> (figura 19), houve apenas redução de 0,5 log<sub>10</sub> nas concentrações de 100 e 150 µg/mL de azul de metileno em relação ao CN, também não ocorreu efeito tóxico ao microrganismo.

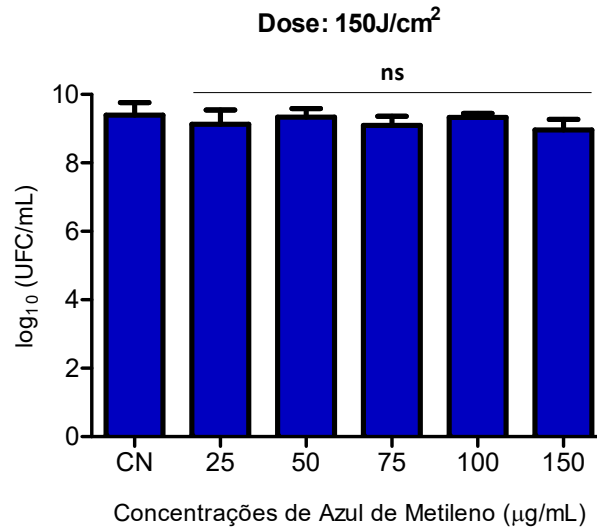
Figura 20 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução com dez minutos de pré- incubação.



As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ns: não significativo.

Não houve redução significativa do biofilme submetendo-os às doses de 60, 90 e 120 e 150 J/cm<sup>2</sup> com 10 minutos de pré-incubação com o FS. Aumentando-se esse tempo para 20 minutos, ainda para a dose de luz mais alta testada (150 J/cm<sup>2</sup>), foram obtidos os resultados expressos na Figura 21.

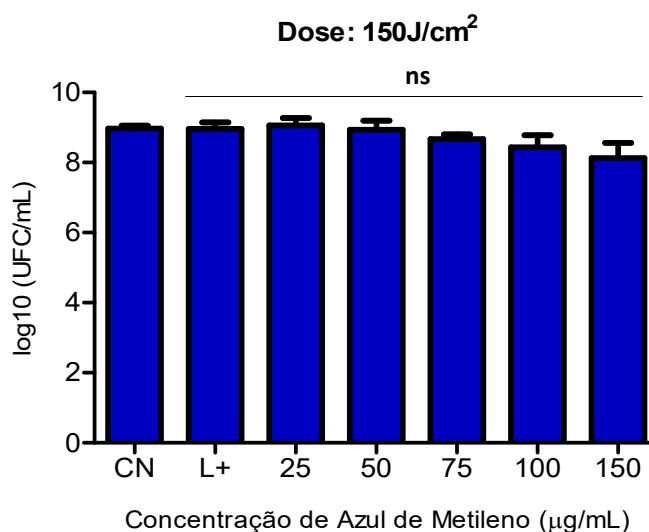
Figura 21 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM em solução com vinte minutos de pré- incubação.



As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. (one-way ANOVA com pós teste de Tukey). ns: não significativo.

É possível observar na figura 21 que a concentração de 150 µg/mL reduziu 0,5 log<sub>10</sub> em relação ao controle negativo. Diante destes resultados, após serem aumentados os parâmetros concentração e dose de luz, considerou-se testar a susceptibilidade do biofilme à terapia após trinta minutos de pré-incubação, objetivando favorecer ainda mais a penetração do FS no biofilme.

Figura 22 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por AM com trinta minutos de pré- incubação.



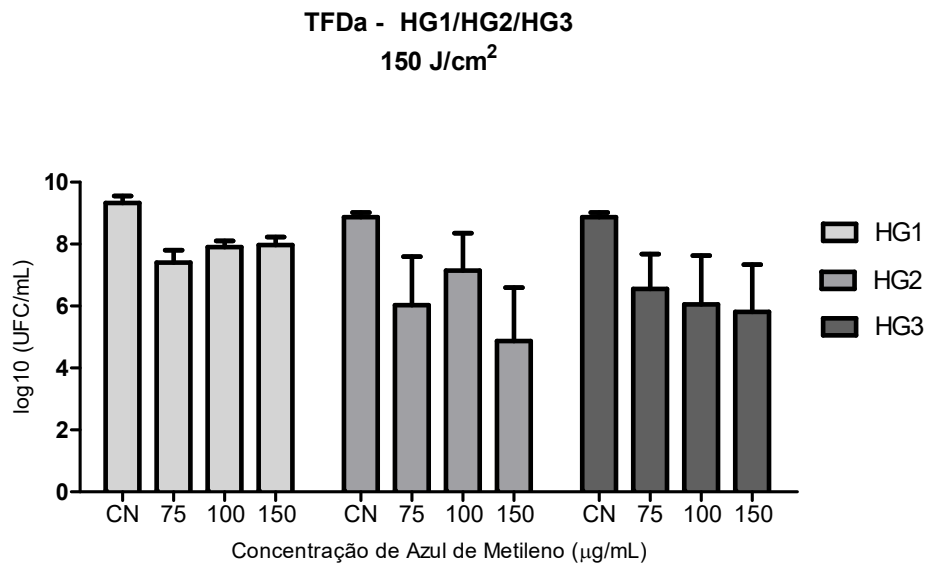
As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: não significativo, (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

A concentração de 150 µg/mL associada a 150 J/cm<sup>2</sup> e 30 minutos de pré- incubação foi capaz de reduzir 0,9 log<sub>10</sub> da carga microbiana do biofilme. Esta dose de luz isoladamente não apresentou toxicidade para o microrganismo (figura 22).

#### 4.5. TFDa mediada por azul de metileno em hidrogéis contra biofilme

HG1, HG2 e HG3 (tabela 3) foram testados em biofilme. Incorporou-se a eles, as três maiores concentrações de AM avaliadas neste trabalho: 75, 100 e 150 µg/mL. A TFDa foi realizada após os grupos de tratamento ficarem por 30 minutos sob pré- incubação e uma fluência de 150 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados da TFDa mediada pelos hidrogéis estão ilustrados na figura 23.

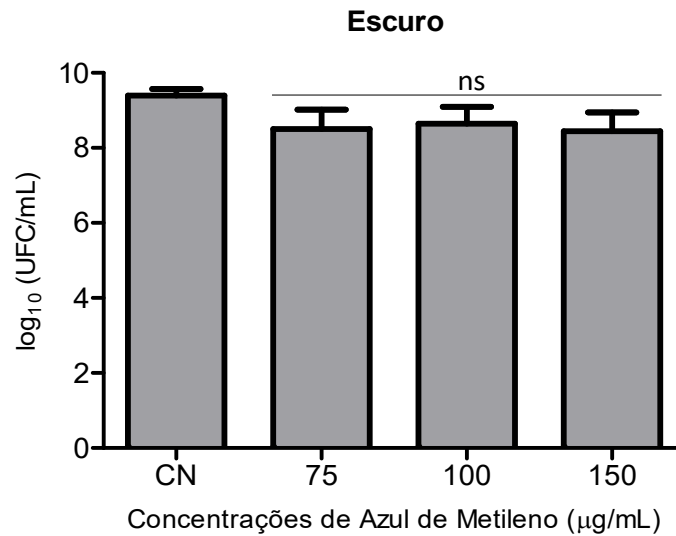
Figura 23 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por HG1-AM, HG2-AM e HG3-AM e LED 660 nm.



Valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL após TFDa com hidrogéis nas concentrações de 0,25% (HG1), 0,5% (HG2) e 1% (HG3) de quitosana e azul de metileno nas concentrações de 75, 100 e 150 µg/mL. CN = controle negativo. As colunas representam os valores médios de log<sub>10</sub> UFC/mL de três experimentos independentes (HG1) e sete experimentos independentes (HG2 e HG3). As barras representam o desvio-padrão.

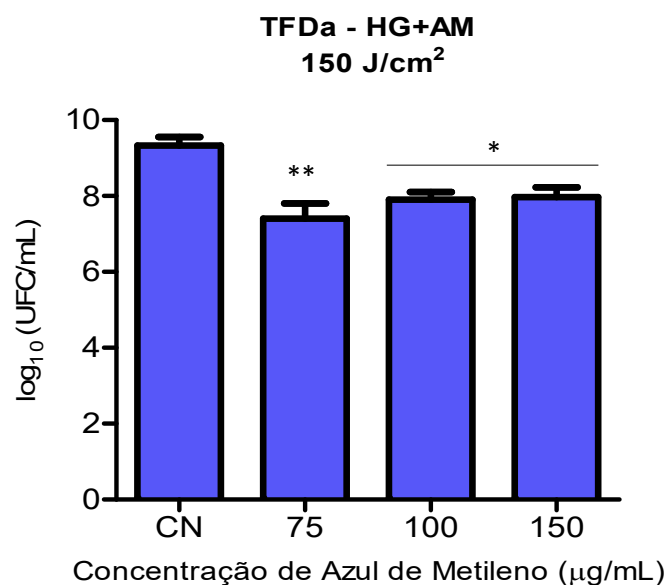
De acordo com a figura 23, é possível observar que houve dificuldade na reprodutibilidade dos ensaios com HG2 e HG3. Foram realizados sete experimentos independentes em quadruplicata para cada grupo de tratamento. Os desvios padrões e coeficientes de variação mostraram-se muito acima do valor estipulado para esta pesquisa, não havendo portanto, diferença estatística entre os grupos estudados. Os experimentos com HG1 em biofilme demonstraram resultados reprodutíveis à metodologia utilizada. Isso ocorreu provavelmente em decorrência da viscosidade do hidrogel que aumenta proporcionalmente à concentração de quitosana, conforme será demonstrado adiante nos ensaios reológicos.

Figura 24 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana do biofilme frente HG1- AM sem luz.



Valores médios de  $\log_{10}$  UFC/mL entre os grupos controle negativo (CN) e as concentrações de AM na ausência de luz. As colunas representam os valores médios de  $\log_{10}$  UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ns: não significativo, (one-way ANOVA com pós teste de Tukey).

Figura 25 - Avaliação da susceptibilidade bacteriana em biofilme empregando a TFDa mediada por HG1-AM e LED 660 nm.



Valores médios de  $\log_{10}$  UFC/mL entre os grupos de tratamento: TFDa mediada por hidrogel (HG1) com AM. As colunas representam os valores médios de  $\log_{10}$  UFC/mL de três experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey (ns: não significativo).

Quando a terapia foi realizada com o azul de metileno em HG, as três concentrações testadas reduziram o biofilme. É possível observar redução estatisticamente significativa em relação ao CN. As reduções foram de 1,9  $\log_{10}$  com 75  $\mu\text{g/mL}$  e 1,3  $\log_{10}$  com 100 e 150  $\mu\text{g/mL}$  de AM.

As formulações com o FS não apresentaram atividade antimicrobiana na ausência da luz, possivelmente devido as características intrínsecas das bactérias produtoras de biofilmes. Tamanhos reduzidos, alta taxa de reprodução, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares as protegem do meio circundante (SBORDONE; BORTOLAIA, 2003; WUERTZ; OKABE; HAUSNER, 2004).

A capacidade de formação de biofilmes de *C. acnes* está bem estabelecida na literatura e foi demonstrada em estudos *in vitro* (BAYSTON *et al.*, 2007; HOLMBERG *et al.*, 2009) e *in vivo* (JAHNS *et al.*, 2012; JAHNS *et al.*, 2013; JAHNS; ALEXEYEV, 2014). Esse modo de organização celular pode ser considerado o fator chave na patogênese da acne, pois o biofilme formado por *C. acnes* contribui para a formação de uma "*adhesive glue*" (cola adesiva) que leva à ligação de corneócitos resultando em microcomedões (BURKHART; BURKHART, 2007). Em um estudo realizado por COENYE e colaboradores (2007), os autores demonstraram que as células de *C. acnes* envolvidas em biofilmes eram mais resistentes aos agentes antimicrobianos em comparação com as células em forma planctônica, produzindo uma maior quantidade de lipases extracelulares. Este fato pode explicar o número de antibioticoterapias falhas no tratamento da acne vulgar (BEYLOT *et al.*, 2014).

Incompleta redução bacteriana em biofilmes tem sido observada em estudos recentes (DARABPOUR *et al.*, 2016; RONQUI *et al.*, 2016; GIANNELLI *et al.*, 2017). Dados da literatura corroboram os resultados do presente estudo, uma vez que a principal característica das células organizadas em biofilmes é a maior resistência frente aos antimicrobianos em razão a fatores como: penetração restrita dos antimicrobianos, diminuição da taxa de crescimento, expressão de genes de resistência e a presença de *persistor cells* (HONRAET; ROSSEL; COENYE, 2014).



Além disso, trabalhos demonstraram que as bombas de efluxo são altamente ativas em biofilmes bacterianos. As bombas são o principal fator de resistência a antimicrobianos exibido pelos microrganismos podendo ser seletivas a uma molécula em específico ou multirresistentes englobando uma gama de compostos (KISHEN *et al.*, 2010). Fotossensibilizadores fenotiazínicos como AM, caracterizados como cátions anfipáticos são substratos naturais das bombas multidroga resistentes tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (RINEH *et al.* 2018).

Estas propriedades poderiam justificar os resultados da TFDa mediada por AM em biofilmes de *C. acnes*

## **4.6. Ensaio de caracterização dos hidrogéis**

### **4.6.1. Reologia dos hidrogéis com azul de metileno**

Considerando que quaisquer fatores, tais como concentração de quitosana, incorporação de azul de metileno e temperatura, podem modificar as propriedades físico-químicas dos hidrogéis, estudos reológicos e bioadesivos foram realizados para caracterizar as formulações.

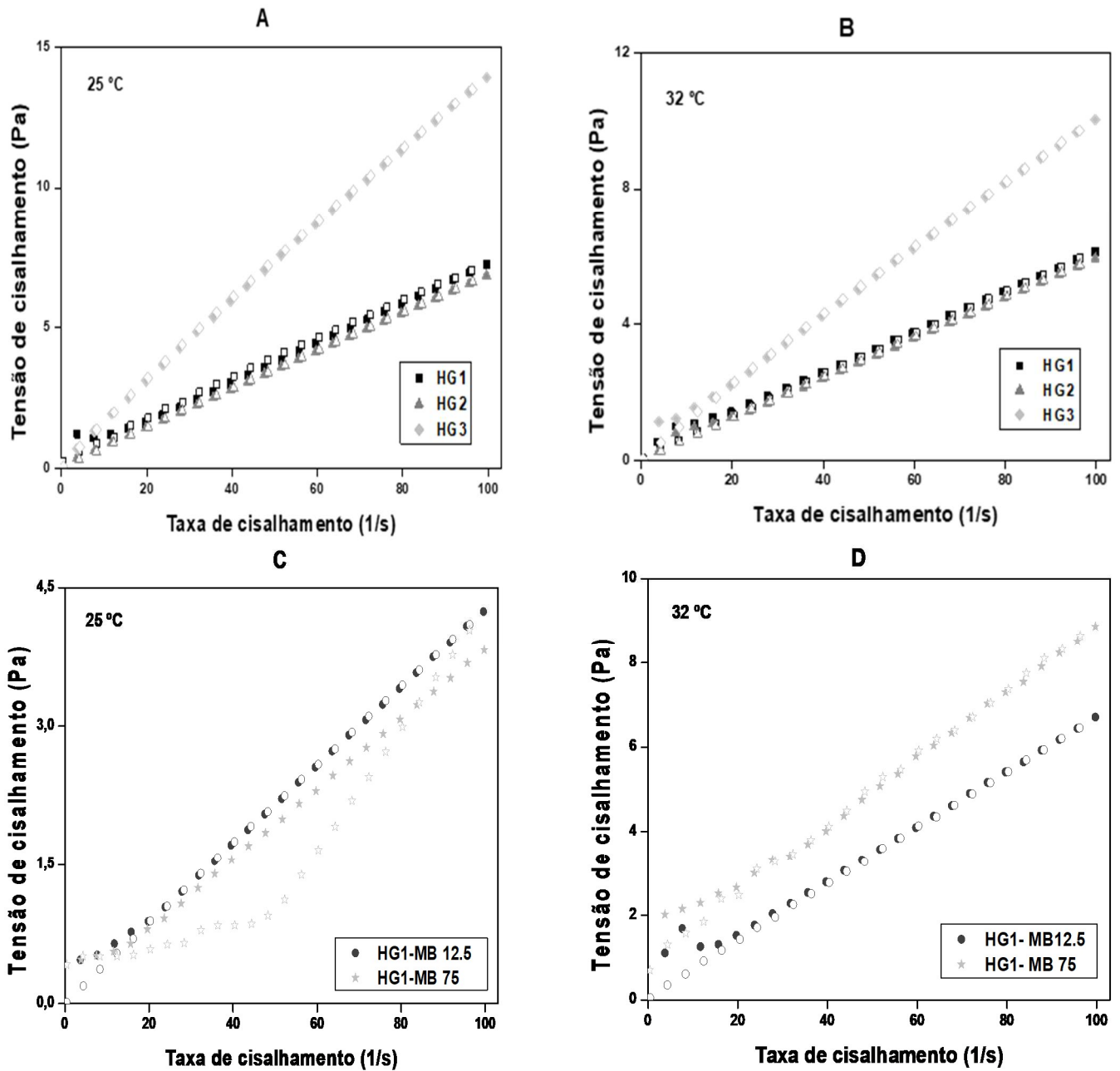
Foram caracterizados HG1-12,5 µg/mL AM que foi a concentração bactericida mínima em fase planctônica e HG1-75 µg/mL AM que demonstrou maior redução em biofilme.

#### **4.6.1.1. Determinação das propriedades de fluxo**

Os comportamentos de fluxo de HG1, HG2 e HG3 à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C) e a temperatura da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C) estão ilustrados nos reogramas na figuras 26 (A e B) e os dados obtidos pela Equação 3 são mostrados na Tabela 4.

Os resultados mostraram que todas as formulações, independentemente da temperatura, apresentaram comportamento pseudoplástico não-newtoniano sem tixotropia pois os valores  $\eta$  foram inferiores à unidade ( $\eta < 1$ ) e as curvas superiores se sobrepunham às curvas inferiores. Observou-se também que o índice de consistência (k) de HG3 foi notavelmente superior ao HG1 e HG2 (Tabela 4) em ambas as temperaturas, mostrando que a viscosidade da formulação é afetada pela concentração de quitosana.

Figura 26 - Reogramas de fluxo.



(A) HG1, HG2 e HG3 à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C), (B) HG1, HG2 e HG3 à temperatura da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C), (C) HG1-AM 12,5 e HG1-AM 75 à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C) e (D) HG1-AM12,5 e HG1-AM75 à temperatura da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C). O símbolo fechado representa a curva ascendente e o símbolo aberto representa a curva descendente. Os desvios-padrões foram omitidos para maior clareza.

Tabela 4- Índice de fluxo ( $\eta$ ) e índice de consistência (k) de HG1, HG2, HG3, HG1-AM12,5 e HG1-AM75 à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C) e à temperatura da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C).

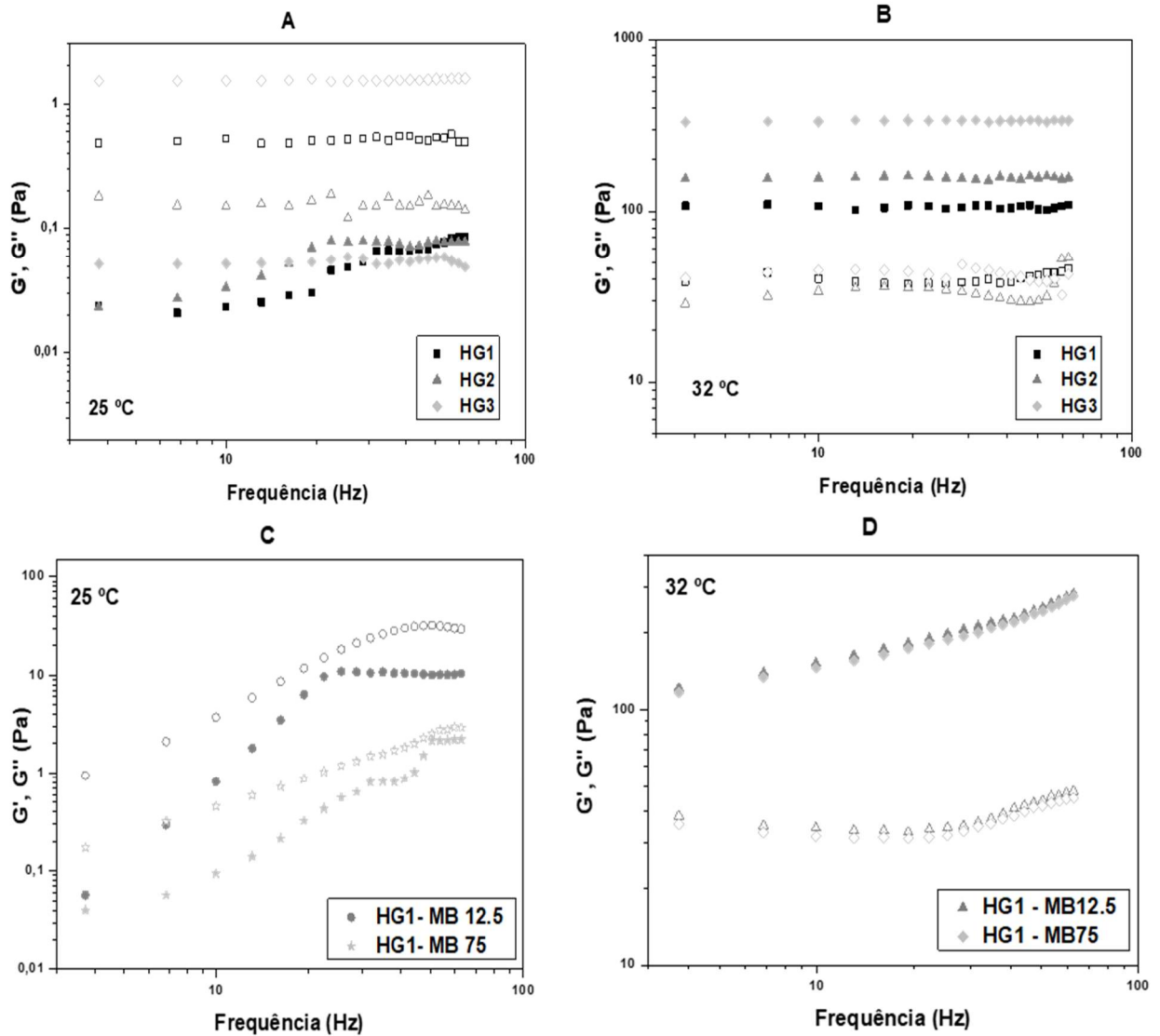
Temperatura	Formulações	Índice de fluxo ( $\eta$ )	Índice de consistência (k)
25 °C	HG1	$0.90680 \pm 0.02237$	$0.11022 \pm 0.01066$
	HG2	$0.96372 \pm 0.00389$	$0.08112 \pm 0.00137$
	HG3	$0.92231 \pm 0.00076$	$0.20006 \pm 0.00066$
32 °C	HG1	$0.87836 \pm 0.02885$	$0.10582 \pm 0.01317$
	HG2	$0.95296 \pm 0.01441$	$0.07338 \pm 0.00459$
	HG3	$0.91371 \pm 0.01426$	$0.14924 \pm 0.00920$
25 °C	HG1-AM12,5	$0.95514 \pm 0.01731$	$0.05200 \pm 0.00390$
	HG1- AM75	$0.95345 \pm 0.01982$	$0.04711 \pm 0.00405$
32 °C	HG1- AM12,5	$0.8717 \pm 0.03723$	$0.11857 \pm 0.01904$
	HG1- AM75	$0.71933 \pm 0.03334$	$0.31082 \pm 0.04419$

A Tabela 4, bem como as Figuras 26 C e 26 D, mostram que HG1-AM12,5 e HG1-AM75 continuaram apresentando o comportamento não-newtoniano pseudoplástico ( $\eta < 1$ ) em ambas as temperaturas. No entanto, a incorporação de AM diminuiu a consistência tanto de HG1-AM 12,5 como de HG1-AM 75 a 25 °C indicando que o AM pode ter interferido na rede de formulação. Já a 32°C, AM aumentou a consistência de HG1.

#### 4.6.1.2. Análises oscilatórias

As análises oscilatórias de HG1, HG2 e HG3 à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C) e temperatura da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C) são mostradas nas Figuras 27 (A e B), nas quais o módulo de armazenamento  $G'$  e o módulo de perda  $G''$  foram plotados contra a frequência. A resistência da formulação (S) obtida da Equação 4 é mostrada na Tabela 5. Todos os dados indicaram que a elasticidade das formulações aumenta com o aumento da temperatura.

Figura 27- Perfil de varredura de frequência do módulo viscoso ( $G'$ ) e módulo elástico ( $G''$ ).



Módulo de armazenamento  $G'$  (símbolos fechados) e módulo de perda  $G''$  (símbolos abertos) de (A) HG1, HG2 e HG3 à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C), (B) HG1, HG2 e HG3 à temperatura da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C), (C) HG1- AM12,5 e HG1-AM75 à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C) e (D) HG1-AM12,5 e HG1-MB75 à temperatura da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C). Os desvios-padrão foram omitidos para maior clareza.

Tabela 5- Força da formulação (S) e expoente viscoelástico ( $\eta$ ) das formulações HG1, HG2, HG3, HG1-AM12,5 e HG1-AM75 à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,5$  °C) e temperatura da pele ( $32,0 \pm 0,5$  °C).

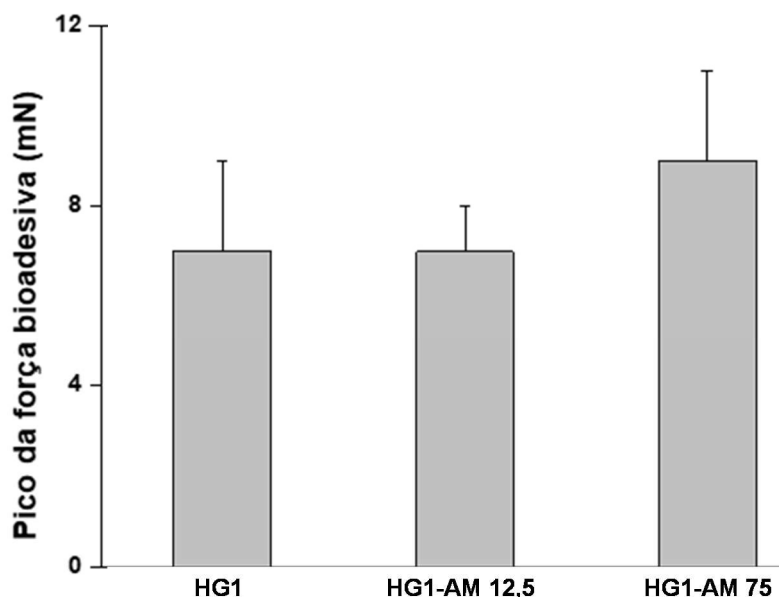
Temperatura	Formulação	Força de formulação (S)	Expoente viscoelástico ( $\eta$ )
25 °C	HG1	$0.00564 \pm 0.00096$	$0.66476 \pm 0.04482$
	HG2	$0.02120 \pm 0.00395$	$0.34040 \pm 0.05131$
	HG3	$0.05149 \pm 0.00174$	$0.01859 \pm 0.01020$
32 °C	HG1	$106.18612 \pm 1.62739$	$0.00920 \pm 0.00466$
	HG2	$154.58812 \pm 1.65599$	$0.00360 \pm 0.00325$
	HG3	$335.40866 \pm 1.99548$	$0.00062 \pm 0.00181$
25 °C	HG1-AM12,5	$0.98450 \pm 0.47602$	$0.61013 \pm 0.12848$
	HG1- AM75	$0.00152 \pm 0.00089$	$1.78589 \pm 0.14604$
32 °C	HG1- AM12,5	$72.48737 \pm 2.79814$	$0.31668 \pm 0.01068$
	HG1- AM75	$67.61907 \pm 3.38183$	$0.32623 \pm 0.01381$

Os dados oscilatórios das Figuras 27 C e 27 D mostraram que o AM não alterou a propriedade de viscoelasticidade de HG1-AM12,5 e HG1-AM75 porque ambas as formulações tornaram-se formulações elásticas a 32 °C, como HG1.

#### 4.6.2. Avaliação *in vitro* da força bioadesiva

O pico da força bioadesiva entre as formulações (HG1, HG1-AM12,5 e HG1-AM75) e a pele está ilustrada na Figura 28. Como é possível observar, a incorporação de AM não influenciou a força bioadesiva de HG1 ( $p < 0,001$ ).

Figura 28- Pico de bioadesão das formulações HG1, HG1-AM12,5 e HG1-AM75.



Cada valor representa a média e o desvio padrão de quatro repetições. Os dados foram coletados a  $32 \pm 0,5$  °C.

Os resultados mostraram que as formulações possuem características pseudoplásticas e não tixotrópicas que são adequadas para sistemas de administração de fármacos cutâneos porque ambos os comportamentos facilitam a aplicação da formulação. Isto porque a rede do hidrogel se organiza no caminho de cisalhamento, reduzindo a viscosidade da formulação com o aumento da taxa de cisalhamento. Com isso, a formulação começa a fluir facilmente na superfície da pele, mas a remoção do esforço de cisalhamento resulta na recuperação rápida da estrutura interna do hidrogel e retorno da viscosidade ao estado original, ajudando a fixação da formulação na pele fazendo com que não escorra (CARVALHO *et al.*, 2012).

Além disso, à medida que a concentração de quitosana aumentou, a viscosidade da formulação aumentou. A dispersão de quitosana apresenta-se em uma conformação praticamente globular estabilizada por extensa ligação de hidrogênio intra e intermolecular. Então o aumento de grupos amina e hidroxilo podem afetar a rigidez da película de polímero e causar a alta viscosidade da dispersão de quitosana (HEJAZI; AMIJI, 2003; RINAUDO, 2006). As análises

oscilatórias de HG1, HG2 e HG3 mostraram que essas formulações são mais viscosas do que elásticas ( $G'' > G'$ ) a 25 °C indicando uma rede fraca que consiste de sistemas fisicamente enredados, enquanto que em temperaturas mais altas (32 °C), eles se tornam elásticos, mostrando uma forte rede composta por ligações secundárias (JUNQUEIRA *et al.*, 2015).

Além disso, o aumento da força da formulação pode ser atribuído à presença de polímero PO que é um copolímero de polióxidoetileno que sofre a gelificação quando a temperatura é aumentada. Esta transição da fase de solução para gel ocorre devido à desidratação do bloco hidrofóbico de PO, resultando em agregados de polímeros em micelas com alta viscosidade (SALMAZI *et al.*, 2015).

A quitosana também alterou as propriedades viscoelásticas das formulações. Pode-se sugerir que o aumento da concentração do polímero resulte em formulações elásticas com fortes ligações de hidrogênio entre os grupos de aminas, melhorando as interações entre as redes de polímeros (HAM-PICHAVANT *et al.*, 2005).

Não existe uma formulação padrão disponível para sistemas tópicos de administração de fármacos. No entanto, é bem sabido que formulações muito elásticas podem influenciar a interação entre a formulação e o substrato biológico porque existem poucos locais de interação entre os polímeros e as proteínas da pele. Além disso, as altas concentrações de polímero também podem atrasar a liberação do fotossensibilizador (PARK *et al.*, 2012).

Portanto, o HG1 mostrou ser a formulação mais adequada a ser aplicada na superfície da pele, pois apresentou o comportamento de fluxo útil, além de ser levemente elástico a 32 °C. Portanto, HG1 foi selecionado para prosseguir com estudos reológicos para observar se o azul de metileno pode influenciar suas características de reologia (OYAFUSO *et al.*, 2017). Para isso, as duas concentrações de AM (12,5 µg/mL e 75,0 µg/mL) foram incorporadas em HG1, sendo as formulações denominadas HG1-AM12,5 e HG1-AM75, respectivamente.

Os resultados dos estudos reológicos indicaram que HG1-AM 12,5 e HG1-AM 75 mantêm as grandes propriedades reológicas de HG1 a 32 °C, ajudando no desempenho clínico do tratamento.

A principal vantagem dos sistemas de administração de fármacos bioadesivos é prolongar o tempo de residência do fármaco no local da aplicação, o que permite um maior contato da formulação com a barreira biológica, diminuindo a frequência

de aplicação do produto e aumentando desse modo, a adesão do paciente ao tratamento (SMART *et al.*, 2003).

O teste de bioadesão demonstra que a incorporação de AM não influenciou a interação adesiva entre o HG1 e a pele estudada. Além disso, os valores encontrados de bioadesão estão próximos dos valores encontrados por CINTRA *et al* (2016), que também desenvolveram sistemas de entrega em pele.



## 5. Conclusões

De forma geral e de acordo com as metodologias empregadas, pode-se concluir que a TFDa mediada por azul de metileno no hidrogel de quitosana aplicada para a eliminação de *C. acnes* em fase planctônica foi completa.

Em biofilme a eliminação foi parcial, porém o hidrogel de AM se mostrou mais eficiente do que quando o fotossensibilizador estava em solução.

De forma pontual, conclui-se que:

- A utilização de HG1-AM demonstrou-se eficaz na inativação bacteriana pela TFDa em fase planctônica. A concentração bactericida do AM em hidrogel foi pelo menos três vezes menor do que quando este encontrava-se em solução.
- O biofilme de *C. acnes* não foi reduzido após terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno em solução nas condições avaliadas.
- A TFDa mediada por HG1-AM foi capaz de reduzir significativamente o biofilme com 75 µg/mL de AM, revelando que a utilização do HG1-AM também foi mais eficaz do que quando o FS estava em solução.
- O HG1 mostrou ser uma formulação adequada a ser aplicada na superfície da pele estudada pois concentrações maiores de quitosana aumentam a elasticidade do hidrogel, podendo atrasar a liberação do FS. Ainda, a incorporação do AM não afetou as características reológicas e bioadesivas de forma significativa.

## 6. Referências

AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

ALMEIDA, H. *et al.* Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 4, p. 592-605, 2012.

BAYSTON, R. *et al.* Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* on biomaterials *in vitro* and *in vivo*: impact on diagnosis and treatment. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 81, n. 3, p. 705-709, 2007.

BEYLOT, C. *et al.* *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 3, p. 271-278, 2014.

BOEN, M. *et al.* The Role of Photodynamic Therapy in Acne: An Evidence-Based Review. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 18, n. 3, p. 311-321, 2017.

BOJAR, R. A.; HOLLAND K.T. Acne and *Propionibacterium acnes*. **Clinics in dermatology** 22.5: 375-379, 2004.

BRUNTON, L. L.; BRUCE, A. C.; BJÖRN C. K. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, v.12, 1809-1812, 2012.

BURKHART, C. G.; BURKHART, C. N. Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug. 2007.

CALIXTO, G.M.F *et al.* Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery preparation and characterization. **Pharm. Dev. Technol.**, v. 20, p. 490–496, 2015.

CANAVAN, T. N.; CHEN, E.; ELEWSKI, B. E. Optimizing non-antibiotic treatments for patients with acne: a review. **Dermatology and therapy**, v. 6, n. 4, p. 555-578, 2016.

CARVALHO, F. C. *et al.* Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2013.

CARVALHO, F.C. *et al.* Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, 2012.

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

CHOI, S. S. *et al.* Synergistic in vitro photodynamic antimicrobial activity of methylene blue and chitosan against *Helicobacter pylori* 26695. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 11, n. 4, p. 526-532, 2014.

CINTRA, G.A.D.S *et al.* Bioadhesive surfactant systems for methotrexate skin delivery. **Molecules**, v. 21, p. 231–239, 2016.

COENYE, T.; PEETERS, E.; NELIS, H. J. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. **Research in microbiology**, v. 158, n. 4, p. 386-392, 2007.

DA SILVA, A. M. F., DA COSTA, F. P.; MOREIRA, M. Acne vulgar: diagnóstico e manejo pelo médico de família e comunidade. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 9, n. 30, p. 54-63, 2014.

DARABPOUR, E.; KASHEF, N.; MASHAYEKHAN, S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 14, p. 211-217, 2016.

DESSINIOTI, C.; KATSAMBAS A. D. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. **Clinics in dermatology** 28.1 2-7, 2010.

DEVI, D. R.; SANDHYA, P.; HARI, B.N.V. Poloxamer: a novel functional molecule for drug delivery and gene therapy. **J Pharm Sci Res**, v. 5, n. 8, p. 159-165, 2013.

DONG, Y.*et al.* A new LED device used for photodynamic therapy in treatment of moderate to severe acne vulgaris. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 188-195, 2016.

DRÉNO, B. Bacteriological resistance in acne: A call to action. **European Journal of Dermatology**, v. 26, n. 2, p. 127-132, 2016.

DRENO, B.; POLI, F. Epidemiology of acne. **Dermatology**, v. 206, n. 1, p. 7-10, 2003.

EDMONDS-WILSON, S. L. *et al.* Review of human hand microbiome research. **Journal of Dermatological Science**, v. 80, p. 3-12, 2015.

EICHENFIELD, L. F. *et al.* Evidence-based recommendations for the diagnosis and treatment of pediatric acne. **American Academy Pediatrics**, v.131, supl 3, p.163 - 189, 2013.

FIGUEIREDO A. *et al.* Avaliação e tratamento do doente com acne – Parte I: Epidemiologia, etiopatogenia, clínica, classificação, impacto psicossocial, mitos e realidades, diagnóstico diferencial e estudos complementares. **Rev Port Clin Geral**; v.27, p. 59-65, 2011.

FONTANA, C. R. *et al.* Evaluation of chitosan gel as antibiotic and photosensitizer delivery. **Drug delivery**, v. 15, n. 7, p. 417-422, 2008.

FONTANA, C. R. *et al.* The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of periodontal research**, v. 44, n. 6, p. 751-759, 2009.

FOX, L. *et al.* Treatment Modalities for Acne. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1-20, 2016.

FRIEDMAN, A. J. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1231-1239, 2013.

GAO, Y. *et al.* Antimicrobial properties of a new type of photosensitizer derived from phthalocyanine against planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, 2018.

GIANNELLI, M. *et al.* Effects of photodynamic laser and violet-blue led irradiation on *Staphylococcus aureus* biofilm and *Escherichia coli* lipopolysaccharide attached to moderately rough titanium surface: in vitro study. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 4, p. 857-864, 2017.

GRATIERI, T. *et al.* A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 186-193, 2010.

GRATIERI, T. *et al.* Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 320-327, 2011.

GRIJALVO, S. *et al.* Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications: a marriage of convenience. **Biomaterials science**, v. 4, n. 4, p. 555-574, 2016.

HAM-PICHAVANT, F. *et al.* Fat resistance properties of chitosan-based paper packaging for food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 3, p. 259-265, 2005.

HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitisers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 5, p. 615-627, 2005.

HAY, R. J. *et al.* The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1527-1534, 2014.

HECKMANN, N. *et al.* *Propionibacterium acnes* persists despite various skin preparation techniques. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, 2018.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 89, n. 2, p. 151-165, 2003.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 18-23, 2012.

HOLMBERG, A. *et al.* Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 8, p. 787-795, 2009.

HONRAET K.; ROSSEL B.; COENYE T. The acne biofilm. In: ZOUBOULIS, Christos C. *et al.* (Ed.). **Pathogenesis and treatment of acne and rosacea**. Springer Berlin Heidelberg, 2014.

HUH, S. Y. *et al.* The effect of photodynamic therapy using indole-3-acetic acid and green light on acne vulgaris. **Annals of dermatology**, v. 24, n. 1, p. 56-60, 2012.

JAHNS, A. C. *et al.* An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: a case–control study. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. 1, p. 50-58, 2012.

JAHNS, A. C. *et al.* Simultaneous visualization of *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum* with immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization. **Anaerobe**, v. 23, p. 48-54, 2013.

JAHNS, A. C.; ALEXEYEV, O. A. Threedimensional distribution of *Propionibacterium acnes* biofilms in human skin. **Experimental dermatology**, v. 23, n. 9, p. 687-689, 2014.

JOCKUSCH, S. *et al.* Photo-induced inactivation of viruses: adsorption of methylene blue, thionine, and thiopyronine on Qbeta bacteriophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 15, p. 7446-7451, 1996.

JU, Q. *et al.* Sex hormones and acne. **Clinics in dermatology**, v. 35, n. 2, p. 130-137, 2017.

JUNQUEIRA, M. V. *et al.* Functional polymeric systems as delivery vehicles for methylene blue in photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 32, n. 1, p. 19-27, 2015.

KAKEGAWA, T. *et al.* Frequency of *Propionibacterium acnes* infection in prostate glands with negative biopsy results is an independent risk factor for prostate cancer in patients with increased serum PSA titers. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0169984, 2017.

KANG, M. L.; CHO, C. S.; YOO, H. S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnology advances**, v. 27, p. 857–86, 2009.

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

KHARKWAL, G. B. *et al.* Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 7, p. 755-767, 2011.

KIM, H., *et al.* Insulin-like growth factor-1 increases the expression of inflammatory biomarkers and sebum production in cultured sebocytes. **Annals of dermatology**, v. 29, n. 1, p. 20-25, 2017.

KISHEN, A. *et al.* Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. **Photochemistry and photobiology**, v. 86, n. 6, p. 1343-1349, 2010.

KONG, M. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

LEVIN, J. The relationship of proper skin cleansing to pathophysiology, clinical benefits, and the concomitant use of prescription topical therapies in patients with acne vulgaris. **Dermatologic clinics**, v. 34, n. 2, p. 133-145, 2016.

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

LIN, C.C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 12, p. 1379-1408, 2006.

LYNN, D. D. *et al.* The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence. **Adolescent Health, Medicine and Therapeutics**, v.7, p.13-25, 2016.

MA, L. *et al.* Low-dose topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in the treatment of different severity of acne vulgaris. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 583-590, 2013.

MILLSON, C. E. *et al.* The killing of *Helicobacter pylori* by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **Journal of medical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 245-252, 1996.

MOFTAH, N. H.; IBRAHIM, S. M.; WAHBA, N. H. Intense pulsed light versus photodynamic therapy using liposomal methylene blue gel for the treatment of truncal acne vulgaris: a comparative randomized split body study. **Archives of dermatological research**, v. 308, n. 4, p. 263-268, 2016.

MOMEN, S.; AL-NIAIMI, F. Acne vulgaris and light-based therapies. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 17, n. 3, p. 122-128, 2015.

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

NAGATA, J. Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 122-131, 2012.

NAGLER, A. R.; MILAM, E. C.; ORLOW, S. J. The use of oral antibiotics before isotretinoin therapy in patients with acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 2, p. 273-279, 2016.



NAKASE, K. *et al.* *Propionibacterium acnes* has low susceptibility to chlorhexidine digluconate. **Surgical infections**, 2018.

NEVES, J. R. *et al.* *Propionibacterium acnes* e a resistência bacteriana. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 3, 2015.

OKAMOTO, K. *et al.* In vitro antimicrobial activity of benzoyl peroxide against *Propionibacterium acnes* assessed by a novel susceptibility testing method. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n.6, p.426-429, 2016.

OPRICA, C.; NORD, C. E. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. **Clinical microbiology and infection**, v. 11, n. 3, p. 204-213, 2005.

OYAFUSO, M. H. *et al.* Development and *in vitro* Evaluation of Lyotropic Liquid Crystals for the Controlled Release of Dexamethasone. **Polymers**, v. 9, n. 8, p. 330, 2017.

PARK, D. *et al.* Development of chitosan-based ondansetron buccal delivery system for the treatment of emesis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 9, p. 1077-1083, 2012.

PATEL, H. R. *et al.* Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 2, p. 299-303, 2009.

PEREIRA, A. H. C. *et al.* Methylene blue internalization and photodynamic action against clinical and ATCC *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 22, p. 43-50, 2018.

PERKINS, A. C. *et al.* Comparison of the epidemiology of acne vulgaris among Caucasian, Asian, Continental Indian and African American women. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 9, p. 1054-1060, 2011.

PETERSSON, *et al.* Platelet activation and aggregation by the opportunistic pathogen *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes*. **PloS one**, v. 13, n. 1, p. e0192051, 2018.

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

PRETSCH, A. *et al.* Antimicrobial and anti-Inflammatory activities of endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* extracts against acne-inducing bacteria. **PLoS one**, v. 9, n. 6, p.1-12, 2014.

RAAFAT, D. *et al.* Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3764-3773, 2008.

RABB, O. Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoren. **Z. Biol**, v. 39, p. 524-526, 1900..

REDDY, M. M. S., REDDY, M. S., & PHARM, M. Development of an antibacterial in situ gel formulation for the treatment of vaginitis, 2012.

RIBAS, J.; OLIVEIRA, C.M.P.B.; SIMAS RIBEIRO, J.C. Acne vulgar e bem-estar em acadêmicos de medicina. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 83, n. 6, p. 520-525, 2008.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RINEH, A. *et al.* Attaching NorA efflux pump inhibitors to methylene blue enhances antimicrobial photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 2018.

RKEIN, A. M.; OZOG, D. M. Photodynamic therapy. **Dermatologic clinics**, v. 32, n. 3, p. 415-425, 2014.

ROCHA, M. A.; BAGATIN, E. Adult-onset acne: prevalence, impact, and management challenges. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 11, p. 59, 2018.

ROLIM, J.P.M.L. *et al.* The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 106, p. 40-46, 2012.

RONQUI, M. R. *et al.* Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 122-129, 2016.

SALMAZI, R. *et al.* A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 4815, 2015.

SBORDONE, L.; BORTOLAIA, C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clinical oral investigations**, v. 7, n. 4, p. 181-188, 2003.

SCHNEIDER, J. E. *et al.* Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 3, p. 631-635, 1990.

SCHOLZ, C.F.P.; KILIAN, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4422-4432, 2016.

SILVA JR, Z. S. *et al.* Papain gel containing methylene blue for simultaneous caries removal and antimicrobial photoinactivation against *Streptococcus mutans* biofilms. **Scientific reports**, v. 6, p. 33270, 2016.

SILVERBERG, J. I.; SILVERBERG, N. B. Epidemiology and extracutaneous comorbidities of severe acne in adolescence: a US population-based study. **British Journal of Dermatology**, v. 170, n. 5, p. 1136-1142, 2014.

SMART, J. D. *et al.* The retention of C-labelled poly (acrylic acids) on gastric and esophageal mucosa: an *in vitro* study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 6, p. 83-90, 2003.

SMITH, E. V.; GRINDLAY, D. J. C.; WILLIAMS, H. C. What's new in acne? An analysis of systematic reviews published in 2009-2010. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 36, n. 2, p. 119-123, 2011.

SOUKOS, N. S. *et al.* Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 979-984, 2006.

ST. DENIS, T. G. *et al.* All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 509-520, 2011.

TANGHETTI, E. A.; POPP, K. F. A current review of topical benzoyl peroxide: new perspectives on formulation and utilization. **Dermatologic clinics**, v. 27, n. 1, p. 17-24, 2009.

TARDIVO, J. P. *et al.* Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

THIBOUTOT, D. *et al.* New insights into the management of acne: an update from the global alliance to improve outcomes in acne group. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 5, p. S1-S50, 2009.

TUCHAYI, S. M. *et al.* Acne vulgaris. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15029, 2015.

TUITE, E. M.; KELLY, J. M. New trends in photobiology: photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 21, n. 2-3, p. 103-124, 1993.

VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. **Münch. Med. Wochenschr**, v.47, p. 2042–2044, 1903.

WAINWRIGHT, M. *et al.* Comparative photodynamic evaluation of new phenothiazinium derivatives against *Propionibacterium acnes*. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n. 3, p. 523-526, 2012.

WAN, M. T.; LIN, J. Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 7, p. 145, 2014.

WILLIAMS, H.C.; DELLAVALLE, R.P.; GARNER, S. Acne vulgaris. **The Lancet**, v. 379, n. 9813, p. 361-372, 2012.

WUERTZ, S.; OKABE, S.; HAUSNER, M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. **Water Science and Technology**, v. 49, n. 11-12, p. 327-336, 2004.

YUAN, Y. *et al.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: In vitro and in vivo studies. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0176529, 2017.




ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W.M. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, n. 144, v.2, p. 274-278, 2001.

ZHENG, W. *et al.* Evidence-based review of photodynamic therapy in the treatment of acne. **European Journal of Dermatology**, v. 24, n. 4, p. 444-456, 2014.

## **CAPÍTULO II**

Article

# Assessment of Chitosan-Based Hydrogel and Photodynamic Inactivation against *Propionibacterium acnes*

Maria Lucia Frade <sup>1,†</sup>, Sarah Raquel de Annunzio <sup>1,†</sup>, Giovana Maria Fioramonti Calixto <sup>2</sup> ,  
Francesca Damiani Victorelli <sup>2</sup>, Marlus Chorilli <sup>2</sup>  and Carla Raquel Fontana <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), 14800-903 Araraquara, São Paulo, Brazil; marifrad@hotmail.com (M.L.F.); sarinha\_annunzio@hotmail.com (S.R.d.A.)

<sup>2</sup> Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), 14800-903 Araraquara, São Paulo, Brazil; giovana.calixto@gmail.com (G.M.F.C.); francescavictorelli@gmail.com (F.D.V.); chorilli@fcar.unesp.br (M.C.)

\* Correspondence: fontanacr@fcar.unesp.br; Tel.: +55-16-3301-5727

† These authors contributed equally to this work.

Received: 11 October 2017; Accepted: 23 November 2017; Published: 22 February 2018

**Abstract:** Chitosan (CH) is a biopolymer that exhibits a number of interesting properties such as anti-inflammatory and antibacterial activity and is also a promising platform for the incorporation of photosensitizing agents. This study aimed to evaluate the efficacy of antimicrobial activity of chitosan hydrogel formulation alone and in combination with the methylene blue (MB) associated with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) against planktonic and biofilm phase of *Propionibacterium acnes*. Suspensions were sensitized with 12.5, 25.0, 37.5, 50.0 µg/mL of MB for 10 min and biofilms to 75, 100 and 150 µg/mL for 30 min then exposed to red light (660 nm) at 90 J/cm<sup>2</sup> and 150 J/cm<sup>2</sup> respectively. After treatments, survival fractions were calculated by counting the number of colony-forming units. The lethal effect of aPDT associated with CH hydrogel in planktonic phase was achieved with 12.5 µg/mL MB and 1.9 log<sub>10</sub> biofilm reduction using 75 µg/mL MB. Rheological studies showed that formulations exhibited pseudoplastic non-Newtonian behavior without thixotropy. Bioadhesion test evidenced that the formulations are highly adhesive to skin and the incorporation of MB did not influence the bioadhesive force of the formulations.

**Keywords:** chitosan hydrogel; photodynamic therapy; methylene blue; *Propionibacterium acnes*

## 1. Introduction

Acne vulgaris exemplifies a disease whose main bacterium related to its etiology is the Gram-positive *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). This bacterium is commonly isolated from areas of skin rich in sebum and when there is an increase of its production in the pilosebaceous unit, there is a greater proliferation of the bacterium which thus behaves as an opportunistic microorganism. When the infectious process is installed and follicle rupture occurs, *P. acnes* can reach more superficial layers of the skin such as the epidermis, characterizing the disease [1].

This dermatosis is mainly observed in adolescents and young adults, being more prevalent in males and more precocious in female adolescents [2]. The disease can persist in 50% of cases in adulthood, and can leave deep scars. Although the disease is not associated with severe morbidity, it causes patients significant psychological repercussions, among them, low self-esteem, social inhibition, depression and anxiety, mainly due to scarring that can be minimized with appropriate early treatment [3]. Currently, there are a large number of acne treatment options available to patients.

The disease has been treated in recent decades with antimicrobials such as erythromycins, clindamycins and tetracyclines and with topical and systemic retinoids. However, adverse effects of the use of retinoids and resistance to systemic antimicrobials reaching high levels make their use restricted, emphasizing the need for alternative treatment options [4].

Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) is a new treatment modality that has been extensively studied. Its mechanism of action consists of the activation of a drug called photosensitizer by a light source. The photosensitizer is a molecule capable of absorbing light energy at a specific wavelength and transferring it to the surrounding oxygen molecules or biomolecules, generating singlet oxygen or free radicals, causing damage to the microorganism or to target cells [5].

One of the photosensitizers that is already heavily employed in studies involving aPDT in vitro [6,7] and in vivo [8] is methylene blue (MB). Its use has many advantages such as a high quantum yield, high water solubility, absorption of light at red wavelengths that allows great penetration of light in the tissues, becoming one of the most used photosensitizers in both in vitro and in vitro PDT studies [9].

Drug delivery systems have represented promising platforms for incorporation of photosensitizing agents employed in aPDT [10]. Among them, hydrogels occupy a prominent position. These are a three-dimensional polymer networks capable of absorbing large amounts of water while remaining insoluble due to interconnections between the individual polymer chains [11].

Chitosan is a natural, high molecular weight polycationic linear polysaccharide. It is derived from chitin, the main structural component of arthropod exoskeletons (including crustaceans and insects), diatoms and seaweed, and also contributes to the mechanical strength of some fungal cell walls [12]. Due to its bioadhesion and permeability properties, it is able to form a hydrogel that can be used as a drug release systems for topical and oral use, being a good candidate as an antibiotic and photosensitizer releasing agent [13]. In addition to being an interesting option as a local drug delivery system, the antimicrobial action of chitosan itself may increase the bactericidal effect of therapy [14].

Studies have shown that chitosan has anti-inflammatory and antioxidant activity, antimicrobial effects, and is also used as a drug delivery system, among other important functions in the biological field [15]. Its antimicrobial activity has been explained by several theories [16]. The most accepted hypothesis is that its action on bacteria would occur by the loss of its intercellular components. Due to its positive charge, it binds to the bacterial membrane causing a change in permeability and the output of its intercellular components, thus leading to cell death [17]. The antimicrobial activity of chitosan was observed against a wide variety of microorganisms, including fungi, algae and bacteria, being more active against Gram-positive bacteria than Gram-negative ones [18].

The large water content and broad pores of most hydrogels often generates a relatively rapid release of the drug [19]. This is an important feature in the choice of such formulation, considering that the concentrations of the photosensitizers and the light doses applied are dependent on these fundamental properties for the success of photodynamic therapy.

In this context, the present study aimed to evaluate the in vitro efficacy of a chitosan hydrogel formulation alone and chitosan hydrogel doped with methylene blue as a photosensitizer to be associated with aPDT under irradiation of a red light emitting system (660 nm) against *P. acnes* in planktonic and biofilm phase.

## 2. Results

### 2.1. Structural Characterization of Formulations

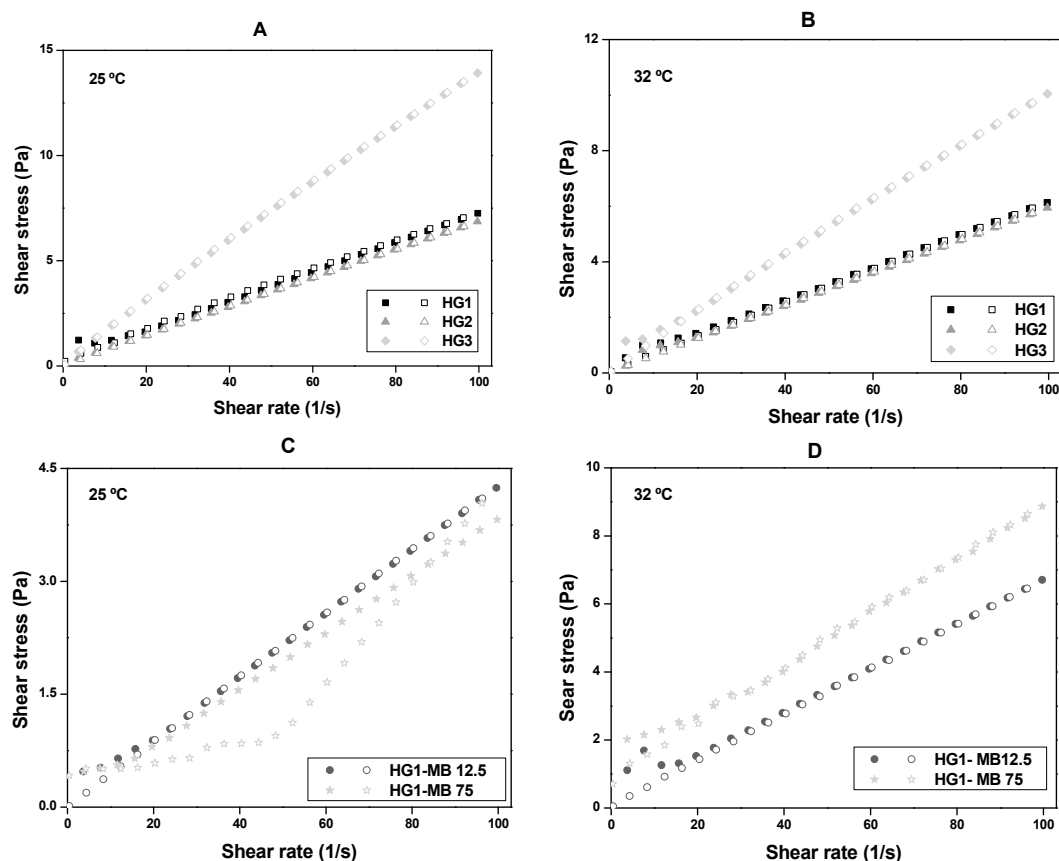
Flow behaviors of CS at room temperature ( $25.0 \pm 0.5$  °C) and skin temperature ( $32.0 \pm 0.5$  °C) are illustrated in the rheograms in Figure 1. Table 1 shows the the consistency ( $k$ ) and flow ( $n$ ) indexes that were determined from the power law described in Equation (1) for a quantitative analysis of flow behavior:

$$\tau = k \cdot \gamma^n, \quad (1)$$



where  $\tau$  is the shear stress,  $\dot{\gamma}$  is the shear rate,  $k$  is the consistency index, and  $n$  is the flow index.

The results showed that all formulations, independent of temperature, exhibited pseudoplastic Non-Newtonian behavior without thixotropy because they presented  $n$ -values less than unity ( $n < 1$ ) and the upward curves overlapped the downward curves. It was also observed that the  $k$  of HG3 was remarkably higher than the HG1 and HG2 (Table 1) at both temperatures, showing that the viscosity of the formulation is affected by CS concentration.



**Figure 1.** Flow rheograms of: (A) HG1, HG2 and HG3 at room temperature ( $25.0 \pm 0.5$  °C); (B) HG1, HG2 and HG3 at skin temperature ( $32.0 \pm 0.5$  °C); (C) HG1-MB12.5 and HG1-MB75 at room temperature ( $25.0 \pm 0.5$  °C) and (D) HG1-MB12.5 and HG1-MB75 at skin temperature ( $32.0 \pm 0.5$  °C). Notes: The flow properties were performed using a controlled shear rate procedure ranging from  $0.01$  to  $100 \text{ s}^{-1}$  (or ascendent curve—filled symbols) and back (or descendant curve—empty symbols). Standard deviations have been omitted for clarity; however, in all cases, the coefficient of variation of triplicate analyses was less than 10%.

The oscillatory analyses of HG1, HG2 and HG3 at room temperature ( $25.0 \pm 0.5$  °C) and skin temperature ( $32.0 \pm 0.5$  °C) are shown in Figure 2A,B, in which the storage modulus  $G'$  and the loss modulus  $G''$  are plotted against the frequency. All data indicated that the elasticity of the formulations increases with increasing temperature.

**Table 1.** Flow index ( $\eta$ ) and consistency index ( $k$ ) of HG1, HG2, HG3, HG1-MB12.5 and HG1-MB75 at room temperature ( $25.0 \pm 0.5$  °C) and at skin temperature ( $32.0 \pm 0.5$  °C).

Temperature (°C)	Formulations	Flow Index ( $\eta$ )	Consistency Index ( $k$ )
25 °C	HG1	$0.90680 \pm 0.02237$	$0.11022 \pm 0.01066$
	HG2	$0.96372 \pm 0.00389$	$0.08112 \pm 0.00137$
	HG3	$0.92231 \pm 0.00076$	$0.20006 \pm 0.00066$
32 °C	HG1	$0.87836 \pm 0.02885$	$0.10582 \pm 0.01317$
	HG2	$0.95296 \pm 0.01441$	$0.07338 \pm 0.00459$
	HG3	$0.91371 \pm 0.01426$	$0.14924 \pm 0.00920$
25 °C	HG1-MB12.5	$0.95514 \pm 0.01731$	$0.05200 \pm 0.00390$
	HG1-MB75	$0.95345 \pm 0.01982$	$0.04711 \pm 0.00405$
32 °C	HG1-MB12.5	$0.8717 \pm 0.03723$	$0.11857 \pm 0.01904$
	HG1-MB75	$0.71933 \pm 0.03334$	$0.31082 \pm 0.04419$

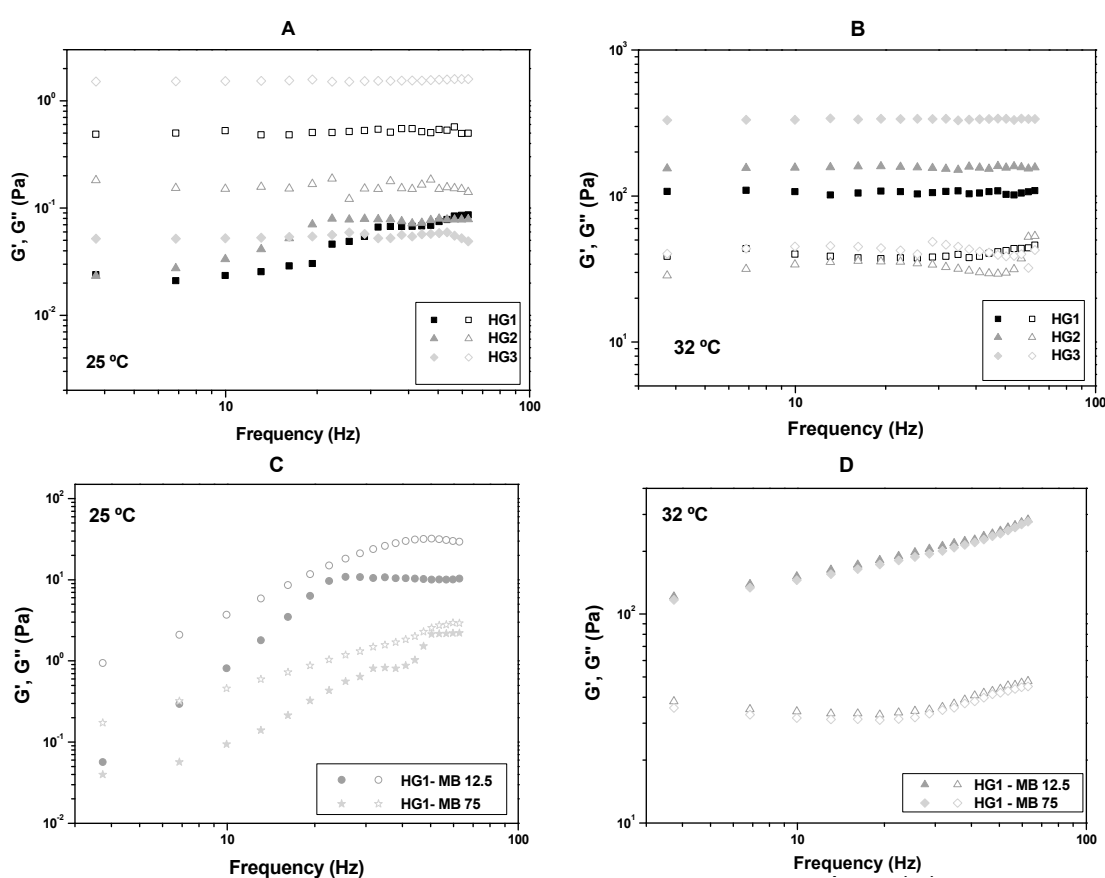
**Figure 2.** Frequency sweep profile of (A) HG1, HG2 and HG3 at room temperature ( $25.0 \pm 0.5$  °C); (B) HG1, HG2 and HG3 at skin temperature ( $32.0 \pm 0.5$  °C); (C) HG1-MB12.5 and HG1-MB75 at room temperature ( $25.0 \pm 0.5$  °C) and (D) HG1-MB12.5 and HG1-MB75 at skin temperature ( $32.0 \pm 0.5$  °C). Notes: The storage modulus  $G'$  are the filled symbols and the loss modulus  $G''$  are the empty symbols. The SDs have been omitted for clarity; however, in all cases, the coefficients of variation of the triplicate analyses were less than 10%.

Table 2 shows the formulation strength ( $S$ ) and the viscoelastic exponent ( $n$ ) obtained using Equation (2):

$$G' = S \cdot \omega^n, \quad (2)$$

where  $\omega$  is the oscillation frequency.

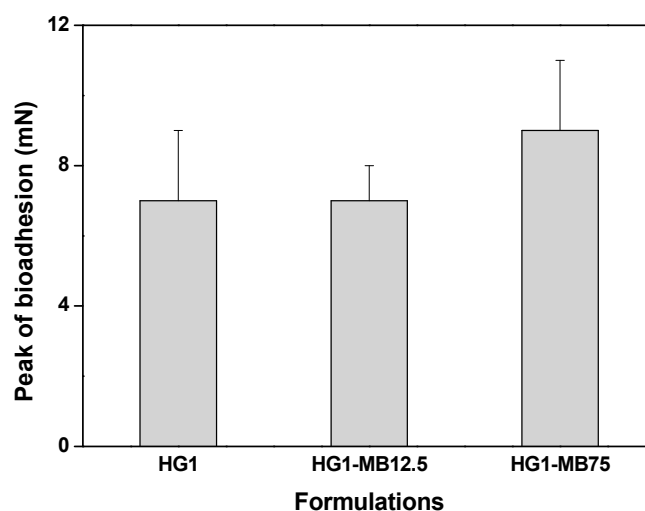
Table 1, as well as Figure 1C,D, show that HG1-MB12.5 and HG1-MB75 continued to present pseudoplastic Non-Newtonian behavior ( $\eta < 1$ ) at both temperatures. However, the incorporation of MB decreased the consistency of both HG1-MB12.5 and HG1-MB75 at 25 °C, indicating that the MB may have interfered in the formulation network. On the contrary, at 32 °C, MB increased the consistency of HG1.

Furthermore, the oscillatory data from Figure 2C,D show that MB did not alter the viscoelasticity property of HG1-MB12.5 and HG1-MB75 because both formulations became elastic at 32 °C, like HG1.

**Table 2.** Formulation strength ( $S$ ) and viscoelastic exponent ( $n$ ) of the formulations HG1, HG2, HG3 at room temperature ( $25.0 \pm 0.5$  °C) and skin temperature ( $32.0 \pm 0.5$  °C).

Temperature (°C)	Formulations	Formulation Strength ( $S$ )	Viscoelastic Exponent ( $n$ )
25 °C	HG1	$0.00564 \pm 0.00096$	$0.66476 \pm 0.04482$
	HG2	$0.02120 \pm 0.00395$	$0.34040 \pm 0.05131$
	HG3	$0.05149 \pm 0.00174$	$0.01859 \pm 0.01020$
32 °C	HG1	$106.18612 \pm 1.62739$	$0.00920 \pm 0.00466$
	HG2	$154.58812 \pm 1.65599$	$0.00360 \pm 0.00325$
	HG3	$335.40866 \pm 1.99548$	$0.00062 \pm 0.00181$
25 °C	HG1-MB12.5	$0.98450 \pm 0.47602$	$0.61013 \pm 0.12848$
	HG1-MB75	$0.00152 \pm 0.00089$	$1.78589 \pm 0.14604$
32 °C	HG1-MB12.5	$72.48737 \pm 2.79814$	$0.31668 \pm 0.01068$
	HG1-MB75	$67.61907 \pm 3.38183$	$0.32623 \pm 0.01381$

The peak bioadhesive force between the formulations (HG1, HG1-MB12.5 and HG1-MB75) and the skin is illustrated in Figure 3. The incorporation of MB did not influence the bioadhesive force ( $p > 0.001$ ) of the HG1.



**Figure 3.** The peak of bioadhesion of the formulations HG1, HG1-MB12.5 and HG1-MB75. Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation of four replicates. The data were collected at  $32 \pm 0.5$  °C.

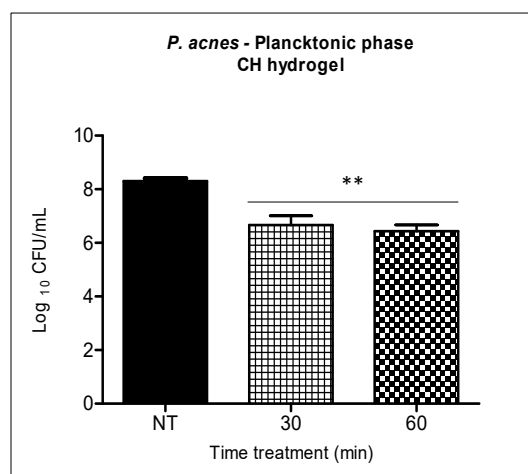
## 2.2. Photodynamic Therapy Studies

The antimicrobial activity of the chitosan hydrogel against *P. acnes* was evaluated separately at two different incubation times (30 and 60 min) for both suspensions (Figure 4) and biofilms of *P. acnes* (Figure 5).

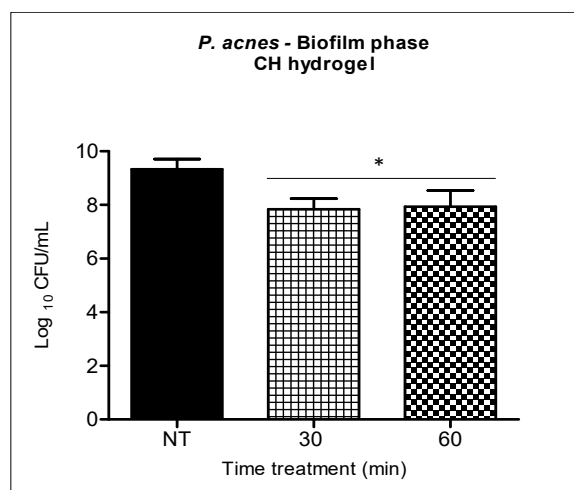
Chitosan evaluated separately reached a reduction of  $1.9 \log_{10}$  when the bacterial suspension was incubated with the chitosan hydrogel at 0.25% for thirty minutes, and a reduction of  $2 \log_{10}$  was

achieved in sixty minutes. These results indicate that there was no statistical difference between the two different analyzed incubation times.

In the biofilm, the reductions were 1.5  $\log_{10}$  and 1.4  $\log_{10}$  after thirty and sixty minutes of chitosan hydrogel incubation respectively. The two times tested with CH provided statistically significant bacterial reduction ( $p < 0.05$ ) in relation to the untreated group, however, there was no statistical difference between the two treatment times (Figure 5).



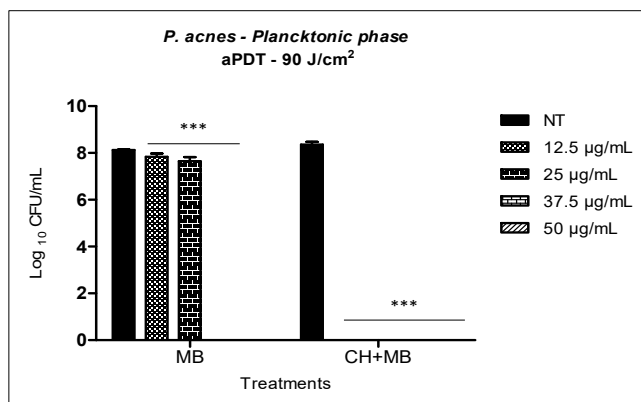
**Figure 4.** Bacterial suspension incubated with the chitosan hydrogel at 0.25% for thirty and sixty minutes. Columns represent the average of three independent assays and bars represent the standard deviation. The asterisks indicate where there is a significant difference in comparison with the groups treated and the group no treated (NT) (one-way ANOVA with Tukey's post-hoc). \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 5.** *P. acnes* biofilm incubated with the chitosan hydrogel at 0.25% for thirty and sixty minutes. Columns represent the average of three independent assays and bars represent the standard deviation. The asterisks indicate the statistical difference between the groups and the group no treated (NT). (One-way ANOVA with Tukey's post-hoc). \*  $p < 0.05$ .

Methylene blue solution associated with red LED system at 90 J/cm<sup>2</sup> fluence against *P. acnes* in planktonic phase, showed a reduction of 0.3  $\log_{10}$  when the concentration was 12.5  $\mu\text{g/mL}$  of MB and 0.4  $\log_{10}$  with 25  $\mu\text{g/mL}$  of MB. However, increasing MB concentration to 37.5  $\mu\text{g/mL}$  and 50  $\mu\text{g/mL}$ , it was possible to obtain the total reduction of the microbial load, reaching a reduction of 8.1  $\log_{10}$  (Figure 6). When the same MB concentrations were incorporated into 0.25% chitosan hydrogel (CH), still in the planktonic phase; it was possible to note the synergistic effect involving the antimicrobial

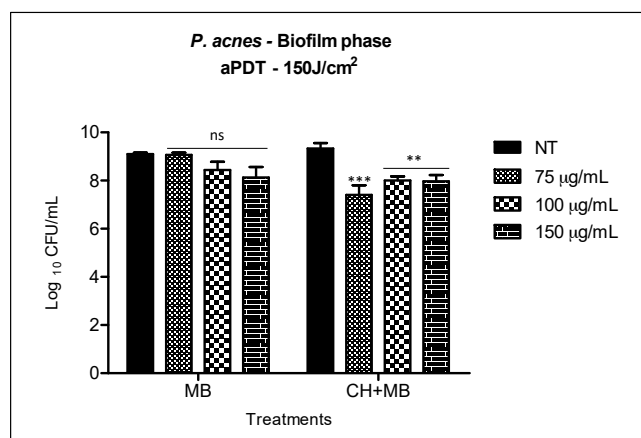
action of chitosan and aPDT. In the CH + MB mediated aPDT, a three-fold lower concentration of PS was required when compared to aPDT with MB in solution. The synergistic effect of aPDT with chitosan hydrogel provided 8.3 logs<sub>10</sub> reductions with only 12.5 µg/mL of MB.



**Figure 6.** aPDT mediated by MB in solution and MB concentrations incorporated into 0.25 chitosan hydrogel over the standard suspension of *P. acnes*. Columns represent the average of three independent assays and bars represent the standard deviation. The asterisks indicate where there is a statistical difference in comparison with the groups treated and the group no treated (NT); (two-way ANOVA with post-test Bonferroni), \*\*\*  $p < 0.001$ .

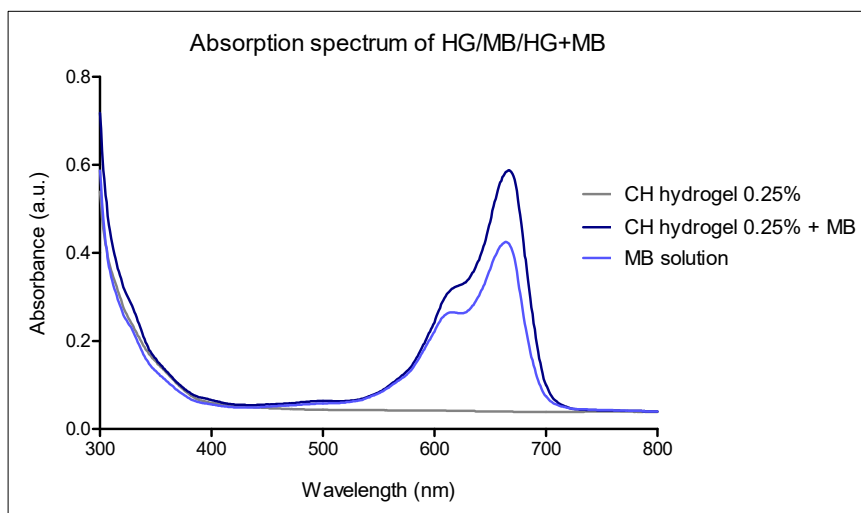
The bacterial reduction observed with MB solution associated with irradiation at 150 J/cm<sup>2</sup> against *P. acnes* biofilm, was not statistically significant for the three concentrations evaluated (75, 100 and 150 µg/mL). The highest biofilm reduction was found when 150 µg/mL of MB (0.9 log<sub>10</sub>) was applied. Once the therapy was associated to chitosan hydrogel doped with methylene blue, all the three concentrations tested increased biofilm reduction. We observed statistically significant reduction when comparing the two treatments (1) MB with (2) CH + MB (Figure 7).

However, the reduction observed in (2) CH + MB (1.9 log<sub>10</sub> with 75 µg/mL and 1.3 log<sub>10</sub> with both 100 and 150 µg/mL of MB) was very similar to that obtained when we treated biofilm only with chitosan hydrogel (Figure 5). Thus, we consider there is no synergism with the two antimicrobial therapies in the treatment of *P. acnes* biofilm.



**Figure 7.** aPDT mediated by MB in solution and MB concentrations incorporated into 0.25 chitosan hydrogel over biofilm of *P. acnes*. The columns represent the average of three independent assays and bars represent the standard deviation. The asterisks represent the statistical difference between the groups treated and the group no treated (NT) (two-way ANOVA with post-test Bonferroni). \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

The absorption spectrum of 0.25% chitosan hydrogel with methylene blue was performed to make sure that the hydrogel would not cause the methylene blue absorption band shifts. As can be seen in Figure 8, the absorption spectrum of MB was unaffected when it was incorporated into the hydrogel, thus not compromising the effectiveness of the photodynamic therapy.



**Figure 8.** Absorption spectrum of 0.25% chitosan hydrogel with methylene blue.

### 3. Discussion

The skin at times is afflicted with a variety of inflammatory and non-inflammatory disorders. One such disorder is acne, a multifactorial common disease that comprises lesions of various skin morphologies, ranging from non-inflammatory (comedones) to inflammatory lesions such as a pustule, papule, nodule, or cyst depending on the depth in the dermis and degree of inflammation.

Briefly, acne vulgaris develops as the result of an interplay of the following factors: (1) follicular epidermal hyper proliferation with subsequent plugging of the follicle; (2) excess sebum production; (3) the presence and activity of the commensal *Propionibacterium acnes* bacteria; and (4) inflammation [20].

Considering the major goals of acne treatment are the resolution of inflammatory lesions, prevention of persistent inflammation and comedones formation and assuming the growing occurrence of antibiotic-resistant bacteria and the severity of the consequences of this trend it is appropriate to maximize use of non-conventional antimicrobial therapy when treating acne [21].

Chitosan and aPDT are non-conventional alternative antimicrobial therapies and therefore, the purpose of this work was to evaluate the effectiveness of photodynamic therapy against *P. acnes* infection using a biomaterial that has, in addition to its own antimicrobial properties, the ability to serve as a vehicle for the administration of the photosensitizer for the accomplishment of combined therapies.

Chitosan may be a good alternative in this treatment because it exhibited anti-inflammatory properties, intrinsic antibacterial activity, analgesic effect and prevention of scar formation [22]. As a non-toxic, biocompatible and biodegradable biopolymer [23], chitosan has not been shown to cause irritation or foreign body reactions at the application sites and is therefore considered a safe product. Chitosan has demonstrated antimicrobial activity against different pathogens, including *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Helicobacter pylori* and *Porphyromonas gingivalis* [13,14,18,24]. The mechanism of chitosan's action is not fully elucidated, but it is known that the interaction of the polymer with the microorganisms occurs at the cell surface level, compromising the wall or cell membrane integrity. Therefore, it can be stated that the degree of microbicidal activity of chitosan is closely related to the characteristics of the cell surface. In Gram-positive bacteria, lipoteichoic acids are the probable

responsible for the connection of the chitosan, leading to the destabilization of the cellular membrane and consequently to the extravasation of the intracellular content [16]. Chitosan-based hydrogels are well studied for applications in biomedical fields, especially in wound treatment, tissue engineering and as a drug delivery system [25].

Considering that any factors such as chitosan (CS) concentration, MB incorporation and temperature, can modify the physicochemical properties of the hydrogels, rheological and bioadhesive studies were performed to characterize the formulations.

Our findings showed that the formulations have pseudoplastic and non-thixotropic characteristics that are suitable for skin drug delivery systems because both behaviors facilitate the formulation application. It occurs due to the hydrogel network arranges itself in the path of shear, reducing the formulation viscosity with increasing the shear rate. Hence, the formulation begins easily flowing on the skin surface, but the removal of shear stress results in the fast recovery the internal structure of the hydrogel and returning the viscosity to the original state, helping the formulation fixation on the skin, because it will not leak [26].

Moreover, as the chitosan concentration increased, the viscosity of the formulation increased. The CS dispersion presents in the form of quasi-globular conformation stabilized by extensive intra- and inter-molecular hydrogen bonding; then the increase of amine and hydroxyl groups can affect the rigidity of the polymer film and cause the high viscosity of chitosan dispersion [27].

The oscillatory analyses of HG1, HG2 and HG3 showed that these formulations are more viscous than elastic ( $G'' > G'$ ) at 25 °C indicating a weak network consisting of physically entangled systems, while with increasing temperature to 32 °C, they become elastics, showing a strong network consisting of secondary bonds [28].

Furthermore, the increase of the formulation strength can be attributed to the presence of PO polymer that is a polyoxyethylene copolymer that undergoes gelling when the temperature is increased. This transition from the sol phase to gel occurs due to the dehydration of the hydrophobic block of PO resulting in polymer aggregates into micelles with high viscosity [29].

CS increasing also altered the viscoelastic properties of the formulations. It can be suggested that the increase in the CS concentration forms elastic formulations with strong H-bonds between the amines groups improving the interactions between the polymer networks [28].

There is no standard formulation available for topical drug delivery systems. However, it is well known that very elastic formulations can influence the interaction between the formulation and the biological substrate because there are few sites of interaction between the polymers and the skin proteins. In addition, high polymer concentrations may also greatly delay the release of the drug, which does not meet our goal [30].

Therefore, HG1 showed to be the most suitable formulation to be applied on the skin surface since it presented the useful flow behavior, besides to be slightly elasticity at 32 °C; hence, HG1 was selected to proceed with rheological studies in order to observe if the MB can influence its rheology characteristics [31]. For this, both concentrations of MB (12.5 µg/mL and 75.0 µg/mL) was incorporated into HG1, being the formulations named HG1-MB12.5 and HG1-MB75, respectively.

The set of results from continuous and rheological studies indicated that HG1-MB12.5 and HG1-MB75 maintain the great rheological properties of HG1 at 32 °C, helping in the clinical performance of the treatment.

The main advantage of the bioadhesive drug delivery systems-based is to prolong the residence time of the drug at the application site, which allows for enhanced contact of the formulation with the biological barrier, decreasing the frequency of application of the product and, thereby increasing patient adherence to the treatment [32].

The bioadhesion test demonstrates that the MB incorporation did not influence the interaction adhesive between the HG1 and the skin. In addition, the found bioadhesion values are close to the values found by Cintra et al. [33], who also developed skin delivery systems.

Our planktonic results showed significant microbial reduction caused by chitosan hydrogel when incubated for 30 and 60 min. Similarly, Friedman et al. [34] also demonstrated antimicrobial activity of chitosan against *P. acnes* in the planktonic phase. However, we observed that there was no complete elimination of *P. acnes* after 30 and 60 min of incubation (Figure 4).

In addition to the surface characteristics of the microorganisms, there are several factors that may interfere with the antimicrobial activity of chitosan inherent in the polymer itself, such as molecular weight, positive charge density, hydrogel concentration, and external factors such as ionic strength and pH, being able to justify the results found in planktonic phase [28].

In this study, trying to improve the biofilm reduction, hydrogels containing 0.5 (HG2) and 1% (HG3) of chitosan were also initially tested. However, they were discarded from the continuity, because the higher their concentration in the hydrogel, the more viscous it becomes, making it difficult to perform the biofilm tests in the adopted methodology, as can be seen on rheology assays.

Since chitosan concentration of 0.25% in planktonic phase and biofilm revealed reasonable bacterial reduction, it was used in the study to evaluate MB-mediated synergism with aPDT. In addition, the use of the standardized culture medium (TSB) caused the chitosan to precipitate in the hydrogel, requiring the modification of the culture medium for the chitosan hydrogel assays.

We carried out experiments with culture medium whose chemical composition was as simple as possible and would cause less interference with the hydrogel. Thus, our results demonstrated that the use of the Mueller-Hinton broth remedied the precipitation problem, possibly by modifying the ionic strength of the medium.

The final pH of the chitosan solution may also decrease its antimicrobial activity, mainly due to the fact that its molecule becomes polycationic at pH lower than its  $pK_a$  (6.3–6.5) [35]. It has been reported that chitosan at pH greater than 7.0 loses the positive charge of the amino groups of the molecule, impairing its antimicrobial capacity. This may have contributed to the results of the present work since the pH of the culture medium used in this study is close to 7.3.

In order to optimize the antimicrobial effect, the 0.25% chitosan hydrogel incorporated with different concentrations of MB was used for a possible synergistic effect after photodynamic therapy.

Considering the results obtained in *P. acnes* planktonic phase (Figure 6), it was possible to observe that the photodynamic therapy mediated by methylene blue (from 12.5 to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) caused significant statistical reductions and a complete elimination of *P. acnes* was obtained with MB at concentrations of 37.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . When MB was incorporated into the chitosan hydrogel, we observed a synergistic effect (aPDT + CH), since all concentrations of MB incorporated into the hydrogel caused complete elimination of *P. acnes*. The synergistic effect of aPDT + chitosan allowed the use of the photosensitizer (MB) at a concentration three times lower than the concentration used in the monotherapy.

These results in the planktonic phase suggest that the action of chitosan on the *P. acnes* membrane may have facilitated the internalization of PS in the bacterium, requiring lower concentrations of the same for the elimination of the microbial load during photodynamic therapy.

Methylene blue, when excited by a light at a suitable wavelength, reacts with nitrogenous bases of the DNA, specifically guanine, to form 8-hydroxyl-2-deoxyguanosine. This product may lead to the formation of adducts and breaks in the cellular DNA chain [24].

In the biofilm, the results showed a great difference in comparison to those obtained in the planktonic phase. The ability to form biofilms of *P. acnes* is well established in the literature and has been demonstrated in *in vitro* studies [36,37] and *in vivo* [38,39]. This mode of cellular organization can be considered the key factor in the pathogenesis of acne since the biofilm formed by *P. acnes* contributes to the formation of an adhesive glue that leads to the attachment of corneocytes resulting in micro-cysts [40].

Coenye et al. [41] demonstrated that *P. acnes* cells involved in biofilms were more resistant to antimicrobial agents compared to planktonic cells, producing a greater amount of extracellular lipases. This fact may explain the number of failed antibiotic therapies in the treatment of acne vulgaris [42].



In this study, a slightly biofilm reduction was achieved when the chitosan hydrogel treatment was applied at 0.25% (Figure 5). However, no significant reduction was achieved in the groups where aqueous solution mediated aPDT of MB was applied. When MB was incorporated into the hydrogel and associated with aPDT, we observed a reduction of up to 1.9 log<sub>10</sub>.

Considering that chitosan presented reduction of 1.5 log<sub>10</sub> after 30 min of contact with *P. acnes* (Figure 5) and 1.9 log<sub>10</sub> reduction in biofilm with aPDT (Figure 7), this cannot be considered a synergistic effect since the reductions were very similar. Although CH-MB was capable of eradicating *P. acnes* in planktonic state, this was not achieved on biofilms, so in further investigation our group will explore not only different parameters but also other photosensitizers under these conditions.

Incomplete bacterial reduction in biofilms has also been observed in many studies [6,7,36,37,40,41,43]. Our studies corroborate the literature since the main characteristic of cells organized in biofilms is the greater resistance to antimicrobials due to factors such as restricted penetration of antimicrobials, a decrease of the growth rate, expression of resistance genes and presence of persister cells [44].

In addition, work has shown that efflux pumps are highly active in bacterial biofilms and, photosensitizers such as MB, phenothiazines, are substrates of these pumps in both Gram-positive and Gram-negative bacteria [45]. These properties could justify our MB-mediated aPDT results in *P. acnes* biofilms [46].

## 4. Material and Methods

### 4.1. Materials

Methylene blue (MB), Poloxamer 407 (PO) and low-molecular-weight chitosan (CS) were purchased from Sigma Aldrich® (Steinheim, North Rhine-Westphalia, Germany). Sodium hydroxide (NaOH) and glacial acetic acid were purchased from Synth® (Diadema, SP, Brazil). The high-purity water was prepared with a Millipore Milli-Q Plus purification system (Molsheim, France), and its resistivity was 18.2 MΩ-cm.

### 4.2. Preparation of Hydrogels for the Structural Characterization

CS was dispersed in 0.5% (*v/v*) acetic acid solution at different concentrations (*w/v*) such as 0.25% (HG1), 0.5% (HG2) and 1.0% (HG3) and homogenized under magnetic stirrer (1000 rpm) for about 24 h. Next, the CS dispersions were kept in an ice bath to add 16% (*w/v*) PO under constant magnetic stirrer (1000 rpm). Then, MB was incorporated at concentrations 12.5 µg/mL (HG1-MB12.5) and 75.0 µg/mL (HG1-MB75) under stirring to ensure its complete dissolution. The pH formulations were adjusted to 6.0 with 2% (*w/v*) NaOH [47,48]. The formulations were stored at 4 °C and protected from light. Table 3 shows the compositions of the formulations for structural characterization.

**Table 3.** Composition of the formulations.

Formulation	Chitosan (%) ( <i>w/v</i> )	Poloxamer (%) ( <i>w/v</i> )	Methylene Blue (µg/mL)
HG1	0.25	16	-
HG2	0.50	16	-
HG3	1.00	16	-
HG1-MB12.5	0.25	16	12.5
HG1-MB75	0.25	16	75

### 4.3. Structural Characterization of the Formulations

#### 4.3.1. Rheological Studies

Both rheological studies below were performed at room temperature (25.0 ± 0.5 °C) and skin temperature (32.0 ± 0.5 °C) in triplicate using a controlled-stress AR2000 rheometer (TA Instruments, New Castle, DE, USA) with cone-plate geometry (40 mm diameter) and a sample gap of 52 µm.

The samples of the formulations were carefully applied to the lower plate to minimize the sample shearing and were allowed to equilibrate for 1 min prior to analysis [29,49].

#### 4.3.2. Determination of Flow Properties

The flow properties were determined using a controlled shear rate procedure ranging from 0.1 to 100 s<sup>-1</sup> and back. Each stage lasted 120 s with an interval of 10 s between the curves.

#### 4.3.3. Oscillatory Analyses

The oscillatory analyses were started by the conduction of a stress sweep in order to determine the viscoelastic region of the formulations. The stress sweep was carried out at a constant frequency of 1 Hz over the stress range of 0.1–10 Pa. A constant shear stress of 1.0 Pa was selected to perform the frequency sweep over a range of 0.1–10 Hz, which was within the previously determined linear viscoelastic region for all formulations. Thus, the  $G'$  and  $G''$  moduli were recorded.

#### 4.3.4. In Vitro Bioadhesion Test

The porcine ear skin was obtained from a slaughterhouse and prepared for the test as described by Carvalho et al. [26]. The bioadhesive force between the pig ear's skin and the formulations was assessed by detachment test using a TA-XTplus texture analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, UK). Before the test, the skin was attached to the lower end of a cylindrical probe (diameter 10 mm) with a rubber ring. Samples of formulations were packed into shallow cylindrical vessels and the test started lowering the analytical probe, which contained the skin at a constant speed (1 mm/s) onto the surface of the sample. The skin and the sample were kept in contact during 60 s and no force was applied during this interval. After 60 s, the skin was drawn upwards (0.5 mm/s) until the contact between the surfaces was broken. The bioadhesive force of the formulations was measured in the maximum detachment force as the resistance to the withdrawal of the probe, what reflects the bioadhesion characteristic. Five replicates were analyzed at 32.0 ± 0.5 °C.

### 4.4. Photodynamic Therapy Studies

#### 4.4.1. Bacterial Strain and Culture Medium

The model strain used in this study was *P. acnes* (ATCC 6919) obtained from the National Institute of Quality Control in Health (INCQS) from the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-Manguinhos, RJ, Brazil). Bacterial culture was performed using Reinforced Clostridium Agar (RCA-Himedia, Mumbai, India) culture medium supplemented with hemin. PDT tests with MB suspension were carried out with Tryptic Soy Broth medium (TSB-Acumedica, Lansing, MI, USA) for planktonic phase and supplemented with hemin when performed on biofilm. To test chitosan hydrogel with MB, Mueller-Hinton (MH) broth medium (Difco, Sparks, MD, USA) was used both in suspension and biofilm tests.

#### 4.4.2. Development of *P. acnes* Biofilm

The biofilm development was performed according to the in vitro technique established by FONTANA et al. [6]. Prior to biofilm formation, 96-well plates were prepared with solid culture medium. To initiate biofilm growth the bacterial inoculum was adjusted to the optical density reading at 630 nm (OD<sub>630nm</sub>) to approximately 1 × 10<sup>8</sup> cells/mL. The plate was carefully filled with 150 µL of the bacterial sample and after an initial incubation period of 48 h, the liquid medium was carefully aspirated from each well and the biofilms were replenished with fresh broth and renewed daily very slowly, to avoid disruption of the biofilm. On the seventh day of biofilm formation, the treatment was performed.

#### 4.4.3. Photosensitizer and Light Source

The phenothiazine-derivative methylene blue (MB) was the photosensitizer used in the bacterial susceptibility tests. For planktonic phase, we used concentrations of 12.5, 25.0, 37.5, 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . For biofilms, the concentrations were 75, 100 and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The light source consisted of 48 LEDs with variable intensities assembled as a compact illumination system with a homogeneous illumination area and a cooling device (IrradLED<sup>®</sup>—biopdi, Sao Carlos, SP, Brazil). The power density of the incident radiation was measured using a power meter (Coherent<sup>®</sup>, Santa Clara, CA, USA). For aPDT in planktonic phase and biofilm, *P. acnes* were incubated for 10 and 30 min in the dark respectively and then irradiated in a switched way (60 s LED on, 60 s LED off) with a system at 660 nm. Intensities of 151  $\text{mW}/\text{cm}^2$  and energy densities of 90  $\text{J}/\text{cm}^2$  for tests in suspension and 153  $\text{mW}/\text{cm}^2$  and 150  $\text{J}/\text{cm}^2$  was used in the biofilm.

#### 4.4.4. Light Absorption Spectrum of the Photosensitizer

The light absorption spectrum of the MB in solution and in the hydrogel was performed on Synergy H1M (Synergy H1 Multi-Mode Reader, Biotek, Winooski, VT, USA). A 100  $\mu\text{L}$  aliquot of the sample of interest was added to a 96-well plate well and 100  $\mu\text{L}$  of the blank was added at the same time in a different well, then reading was performed.

#### 4.4.5. Photodynamic Therapy

The experiments were carried out in planktonic and biofilm phases. The light was delivered uniformly to cover all 96-well of the irradiated plates. According to the power of each LED, with the dimensions of the irradiation field and the time of exposure of the light, the energy densities used was then defined. In order to avoid any kind of interference during irradiation, each plate received only one type of treatment.

#### 4.4.6. Planktonic Bacterial Susceptibility Test

Photosensitizer (PS) solution was prepared at twice the desired working concentration and 50  $\mu\text{L}$  added to the correspondent wells of 96 wells plates, in triplicates. The bacterial strain, grown on agar plates in an anaerobic chamber (80%  $\text{N}_2$ ; 10%  $\text{CO}_2$ ; 10%  $\text{H}_2$ ) at 37 °C, was scraped from the agar and suspended in TSB broth at a concentration of ( $\sim 1 \times 10^8$  cells/ $\text{mL}$ ), confirmed by spectrophotometry reading at 630 nm. Aliquots of 50  $\mu\text{L}$  of the inoculum were transferred to each well of the plate, yielding a final volume of 100  $\mu\text{L}$ , and the dilution of both solution and inoculum by 50%, reaching the work concentrations. Growth control was composed of 50  $\mu\text{L}$  of inoculum and 50  $\mu\text{L}$  of TSB or MH broth incubated for the same period as the treated groups. After incubation time and treatments, bacterial suspensions underwent serial dilutions in the same broth used in treatment groups and aliquots of 5  $\mu\text{L}$  were plated on Reinforced Clostridium Agar and then incubated under anaerobic conditions for 24–48 h.

#### 4.5. Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's post-test and Variance Analysis (two-way ANOVA) with Bonferroni post-test, respectively, using Graph Pad Prism<sup>®</sup> Version 5.01 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$  (confidence level of 95%). The maximum acceptable coefficient of variation was set at 25%.

### 5. Conclusions

Based on the results obtained in this study, it was possible to conclude that chitosan presented antimicrobial activity against *P. acnes* suspension and biofilm. However, the synergistic effect of chitosan and aPDT was observed only in the planktonic phase tests. These in vitro data suggest the

potential utility of topical chitosan hydrogel as MB delivery for antimicrobial photodynamic therapy of dermatologic conditions with infectious and inflammatory components. Chitosan hydrogel is a good candidate to be doped with MB. HG1 (0.25%) was shown to be the most appropriate formulation, since higher concentrations of chitosan may increase the elasticity of the hydrogel, delaying FS release. In addition, the incorporation of MB did not significantly affect rheological and bioadhesive hydrogel's characteristics.

**Acknowledgments:** Financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP—Grant 2016/05345-4) is gratefully acknowledged. We also thank Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico—Faculdade de Ciências Farmacêuticas—UNESP (PADC-FCF) for additional financial support.

**Author Contributions:** Carla Raquel Fontana conceived the idea to test the efficacy of aPDT mediate chitosan hydrogel against *Propionibacterium acnes*. Marlus Chorilli conceived the idea to characterize the chitosan hydrogel formulations. Maria Lucia Frade prepared the hydrogels. The tests of microbial susceptibility of chitosan hydrogel and antimicrobial photodynamic therapy in planktonic phase and biofilm were carried out by Maria Lucia Frade and Sarah Raquel de Annunzio. Maria Lucia Frade obtained the results and organized the figures and Sarah Raquel de Annunzio helped with statistical analysis. Giovana Maria Fioramonti Calixto performed the characterization tests, obtained and organized the results, tables and figures. Francesca Damiani Victorelli helped with the characterization tests. Carla Raquel Fontana, Maria Lucia Frade, Sara Raquel de Annunzio and Giovana Maria Fioramonti Calixto wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Dessinioti, C.; Katsambas, A.D. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: Facts and controversies. *Clin. Dermatol.* **2010**, *28*, 2–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ribas, J.; Oliveira, C.M.P.B.; Simas Ribeiro, J.C. Acne vulgaris and wellness in medical academics. *An. Bras. Dermatol.* **2008**, *83*, 520–525. [[CrossRef](#)]
3. Da silva, A.M.F.; Da costa, F.P.; Moreira, M. Acne vulgaris: Diagnosis and management by the family doctor and community. *Rev. Bras. Med. Fam. Comunidade* **2014**, *9*, 54–63. [[CrossRef](#)]
4. Oprica, C.; Nord, C.E. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2005**, *11*, 204–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wan, M.T.; Lin, J.Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2014**, *7*, 145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. 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.R.; et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J. Periodontal Res.* **2009**, *44*, 751–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nemezio, M.A.; De Souza, S.S.F.; Borsatto, M.C.; Aires, C.P.; Corona, S.A.M. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2017**, *20*, 234–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ahangari, Z.; Mojtahed Bidabadi, M.; Asnaashari, M.; Rahmati, A.; Tabatabaei, F.S. Comparison of the antimicrobial efficacy of calcium hydroxide and photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in teeth with periapical lesions; an in vivo study. *J. Lasers Med. Sci.* **2017**, *8*, 72–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Silva, Z.S., Jr.; Huang, Y.Y.; De Freitas, L.F.; França, C.M.; Botta, S.B.; Ana, P.A.; Mesquita-Ferrari, R.A.; Santos Fernandes, K.P.; Deana, A.; Lima Leal, C.R.; et al. Papain gel containing methylene blue for simultaneous caries removal and antimicrobial photoinactivation against *Streptococcus mutans* biofilms. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kang, M.L.; Cho, C.S.; Yoo, H.S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 857–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lin, C.C.; Metters, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1379–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Raafat, D.; Sahl, H.-G. Chitosan and its antimicrobial potential—A critical literature survey. *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 186–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Fontana, C.R.; dos Santos Junior, D.S.; Bosco, J.M.; Spolidorio, D.M.; Chierici Marcantonio, R.A. Evaluation of chitosan gel as antibiotic and photosensitizer delivery. *Drug Deliv.* **2008**, *15*, 417–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Liu, H.; Du, Y.; Wang, X.; Sun, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95*, 147–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Park, B.K.; Kim, M.-M. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 5152–5164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Raafat, D.; Von Bargen, K.; Haas, A.; Sahl, H.G. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 3764–3773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Camacho-Alonso, F.; Julián-Belmonte, E.; Chiva-García, F.; Martínez-Beneyto, Y. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy and chitosan in root canals experimentally infected with *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Photomed. Laser Surg.* **2017**, *35*, 184–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Costa, E.M.; Silva, S.; Pina, C.; Tavaría, F.K.; Pintado, M.M. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. *Anaerobe* **2012**, *18*, 305–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *43*, 3–12. [[CrossRef](#)]
20. Williams, H.C.; Dellavalle, R.P.; Garner, S. Acne vulgaris. *Lancet* **2012**, *379*, 361–372. [[CrossRef](#)]
21. Canavan, T.N.; Chen, E.; Elewski, B.E. Optimizing non-antibiotic treatments for patients with acne: A review. *Dermatol. Ther.* **2016**, *6*, 555–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Elviri, L.; Bianchera, A.; Bergonzi, C.; Bettini, R. Controlled local drug delivery strategies from chitosan hydrogels for wound healing. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2017**, *14*, 897–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kim, J.H.; Yu, D.; Eom, S.H.; Kim, S.H.; Oh, J.; Jung, W.K.; Kim, Y.M. Synergistic Antibacterial Effects of chitosan-caffeic acid conjugate against antibiotic-resistant acne-related bacteria. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Choi, S.S.; Lee, H.K.; Chae, H.S. Synergistic in vitro photodynamic antimicrobial activity of methylene blue and chitosan against *Helicobacter pylori* 26695. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2014**, *11*, 526–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Grijalvo, S.; Mayr, J.; Eritja, R.; Díaz, D.D. Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications: A marriage of convenience. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 555–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Carvalho, F.C.; da Luz, G.M.; da Silva Barbi, M.; Landgraf, D.S.; Chiavacci, L.A.; Sarmento, V.H.V.; Gremião, M.P.D. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012**, *8*, 280–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603–632. [[CrossRef](#)]
28. Kong, M.; Chen, X.G.; Xing, K.; Park, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144*, 51–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Salmazi, R.; Calixto, G.; Bernegossi, J.; dos Santos Ramos, M.A.; Bauab, T.M.; Chorilli, M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 4815–4824. [[CrossRef](#)]
30. Park, D.M.; Song, Y.K.; Jee, J.P.; Kim, H.T.; Kim, C.K. Development of chitosan-based ondansetron buccal delivery system for the treatment of emesis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2012**, *38*, 1077–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Oyafuso, M.H.; Carvalho, F.C.; Takeshita, T.M.; De Souza, A.L.R.; Araújo, D.R.; Merino, V.; Gremião, M.P.D.; Chorilli, M. Development and in vitro evaluation of lyotropic liquid crystals for the controlled release of dexamethasone. *Polymers* **2017**, *9*, 2–16. [[CrossRef](#)]
32. Smart, J.D.; Riley, R.G.; Tsibouklis, J.; Young, S.A.; Hampson, F.C.; Davis, J.A.; Kelly, G.; Dettmar, P.W.; Wilber, W.R. The retention of <sup>14</sup>C-labelled poly(acrylic acids) on gastric and oesophageal mucosa: An in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *20*, 83–90. [[CrossRef](#)]
33. Cintra, G.A.; Pinto, L.A.; Calixto, G.M.; Soares, C.P.; Von Zuben Ede, S.; Scarpa, M.V.; Gremião, M.P.; Chorilli, M. Bioadhesive surfactant systems for methotrexate skin delivery. *Molecules* **2016**, *21*, 2–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Friedman, A.J.; Phan, J.; Schairer, D.O.; Champer, J.; Qin, M.; Pirouz, A.; Blecher-Paz, K.; Oren, A.; Liu, P.T.; Modlin, R.L.; Kim, J. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 1231–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lim, S.H.; Hudson, S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 313–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Bayston, R.; Ashraf, W.; Barker-Davies, R.; Tucker, E.; Clement, R.; Clayton, J.; Freeman, B.J.; Nuradeen, B. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* on biomaterials in vitro and in vivo: Impact on diagnosis and treatment. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *81*, 705–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Holmberg, A.; Lood, R.; Mörgelin, M.; Söderquist, B.; Holst, E.; Collin, M.; Christensson, B.; Rasmussen, M. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 787–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Jahns, A.C.; Alexeyev, O.A. Three dimensional distribution of *Propionibacterium acnes* biofilms in human skin. *Exp. Dermatol.* **2014**, *23*, 687–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Jahns, A.C.; Lundskog, B.; Ganceviciene, R.; Palmer, R.H.; Golovleva, I.; Zouboulis, C.C.; McDowell, A.; Patrick, S.; Alexeyev, O.A. An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: A case-control study. *Br. J. Dermatol.* **2012**, *167*, 50–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Burkhart, C.G.; Burkhart, C.N. Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *57*, 722–724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Coenye, T.; Peeters, E.; Nelis, H.J. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res. Microbiol.* **2007**, *158*, 386–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Beylot, C.; Auffret, N.; Poli, F.; Claudel, J.P.; Leccia, M.T.; Del Giudice, P.; Dreno, B. *Propionibacterium acnes*: An update on its role in the pathogenesis of acne. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2014**, *28*, 271–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ronqui, M.R.; De Aguiar Coletti, T.M.; de Freitas, L.M.; Miranda, E.T.; Fontana, C.R. Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. *J. Photochem. Photobiol. B* **2016**, *158*, 122–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Honraet, K.; Rossel, B.; Coenye, T. The Acne biofilm. In *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*; Zouboulis, C., Katsambas, A., Kligman, A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 155–159.
45. De Aguiar Coletti, T.M.S.F.; de Freitas, L.M.; Almeida, A.M.F.; Fontana, C.R. Optimization of antimicrobial photodynamic therapy in biofilms by inhibiting efflux pump. *Photomed. Laser Surg.* **2017**, *35*, 378–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kishen, A.; Upadya, M.; Tegos, G.P.; Hamblin, M.R. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86*, 1343–1349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Gratieri, T.; Gelfuso, G.M.; Rocha, E.M.; Sarmiento, V.H.; de Freitas, O.; Lopez, R.F. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *75*, 186–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gratieri, T.; Gelfuso, G.M.; de Freitas, O.; Rocha, E.M.; Lopez, R.F. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79*, 320–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Calixto, G.; Yoshii, A.C.; Rocha e Silva, H.; Stringhetti Ferreira Cury, B.; Chorilli, M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: Preparation and characterization. *Pharm. Dev. Technol.* **2015**, *20*, 490–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Sample Availability:** Samples of the compounds are available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).