

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia

Laís Simões Sampaio

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR DIFERENTES
INTENSIDADES CONTRA *Enterococcus faecalis* E *Cutibacterium*
acnes

Araraquara

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia

Laís Simões Sampaio

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR DIFERENTES
INTENSIDADES CONTRA *Enterococcus faecalis* E *Cutibacterium*
acnes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana

Araraquara

2019

S192t Sampaio, Laís Simões.
Terapia fotodinâmica mediada por diferentes intensidades
contra *Enterococcus faecalis* e *Cutibacterium acnes* / Laís Simões
Sampaio. – Araraquara, 2019.
89 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação
Em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Carla Raquel Fontana.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Azul de metileno. 3. Clorina-e6. 4.
Curcumina. 5. *Enterococcus faecalis*. 6. *Cutibacterium acnes*. I.
Fontana, Carla Raquel, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Terapia fotodinâmica mediada por diferentes intensidades contra *Enterococcus faecalis* e *Cutibacterium acnes*

AUTORA: LAÍS SIMÕES SAMPAIO

ORIENTADORA: CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

COORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: Bacteriologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. LEONARDO DE BONI
Departamento de Física e Ciências dos Materiais / Instituto de Física de São Carlos - USP

Dra. LILIAN TAN MORIYAMA
Departamento de Física e Ciências dos Materiais / Instituto de Física de São Carlos - USP

Dra. JULIANA CABRINI CARMELLO
Doutora em Reabilitação Oral / Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara da UNESP

Dra. NATÁLIA MAYUMI INADA
Departamento de Física e Ciências dos Materiais / Instituto de Física de São Carlos - USP

Araraquara, 29 de abril de 2019

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Eduardo e Isabel, e ao meu irmão Daniel,
que sempre estiveram ao meu lado.

Amo vocês.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha orientadora professora Dra. Carla Raquel Fontana pela oportunidade e confiança.

Aos amigos de laboratório Malu, Lucas, Laura, William, Virginia e Rafa pelos ensinamentos e ajuda.

A Sarah pela mão amiga e ajuda principalmente nessa reta final do doutorado.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP pela oportunidade de realizar este trabalho, e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos Kely, Jufner, Paula, Paulo, Marília pela amizade, pelas risadas e pela ajuda.

As meninas da banda Hell Dolls por entenderem os meus horários loucos durante o doutorado e ajudarem a realizar um outro sonho meu.

Aos meus avós, por terem criado as duas pessoas mais maravilhosas do mundo. Aos meus primos e tios!!!

Agradeço ao meu irmão Daniel, que além de irmão, é meu grande amigo, e sempre esteve ao meu lado.

Aos meus cachorros, Pingo e Spike, por sempre me ouvirem nas horas de estresse e nunca me julgarem.

A Deus, pela saúde que tenho.

A todos que me ajudaram durante toda minha vida.

E por último, e não menos importante, gostaria de agradecer aos meus pais, Eduardo e Isabel, pela dedicação, paciência, amor, ensinamentos e tudo o que eles me propiciaram, e acima de tudo por acreditarem no meu potencial. Amo muito vocês, e obrigada por tudo!!!

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a fototoxicidade do azul de metileno (AM), clorina-e6 (Ce-6) e curcumina (CUR) associados a irradiações com diferentes intensidades de luz para a terapia fotodinâmica (TFD) contra cepas de *Enterococcus faecalis* e *Cutibacterium acnes*, em suspensão e em biofilme. As fontes de luz utilizadas na TFD foram LEDs no comprimento de onda azul (450 nm) e vermelho (660 nm) de acordo com cada fotossensibilizador testado. Como resultado observamos que, em *E. faecalis* a TFDa mediada por AM e Ce6 foi mais eficiente quando exposta a intensidade de luz de 153 mW/cm², porém com a CUR os melhores resultados foram obtidos com a intensidade de luz de 103 mW/cm². Para *C. acnes* em suspensão, a Ce6 e a CUR submetidas às diferentes intensidades de luz, causaram reduções bacterianas similares. Em biofilme, a Ce6 associada a intensidade de 122 mW/cm² de luz foi mais eficiente, no entanto, a CUR não proporcionou morte de biofilmes de *C. acnes* independente das intensidades testadas. O AM, independente da fase, apresentou os melhores resultados com a intensidade de luz de 153 mW/cm². Considerando a quantificação de espécies reativas de oxigênio, a concentração de AM foi determinante na produção de EROs. Na concentração de 100 µg/mL de AM na dose de 120 J/cm² radicais hidroxila foram mais evidentes em relação a quantidade de oxigênio singleto formado. Na concentração de 50 µg/mL, a intensidade de 61 mW/cm² gerou similarmente as espécies testadas, quanto que a intensidade de 153 mW/cm² produziu mais oxigênio singleto. Para Ce6, observamos maior produção de oxigênio singleto em ambas concentrações e intensidades. CUR produziu mais oxigênio singleto quando submetida a intensidade de 103 mW/cm², e nas maiores intensidades (151 e 153 mW/cm²) a geração de espécies reativas de oxigênio foi semelhante entre as espécies avaliadas. Quanto à fotodegradação, o AM, nas intensidades de 151 e 153 mW/cm² tiveram uma maior degradação. No entanto, a fotodegradação de Ce6 e CUR foi maior quando submetidos às intensidades de 61 e 103 mW/cm², respectivamente.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Azul de metileno. Clorina-e6. Curcumina. *Enterococcus faecalis*. *Cutibacterium acnes*.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the phototoxicity of methylene blue (MB), chlorin-e6 (Ce-6) and curcumin (CUR) associated with irradiation with different light intensities for photodynamic therapy (PDT) against strains suspension and biofilm phases of *Enterococcus faecalis* and *Cutibacterium acnes*. The light sources used in the PDT were LEDs at blue (450 nm) and red (660 nm) wavelengths according to each photosensitizer tested. As a result, we observed that, for *E. faecalis*, MB and Ce6 mediated PDT were more efficient when exposed to light intensity of 153 mW/cm², but with CUR the best results were obtained with the light intensity of 103 mW/cm². For *C. acnes* in suspension, Ce6 and CUR exposed to different light intensities caused similar bacterial reductions. In biofilm, the Ce6 associated with the light intensity of 122 mW/cm² was more efficient; however, CUR did not reduce *C. acnes* biofilms independent of the intensities tested. MB, independent of the phase, showed the best results with the light intensity of 122 and 151 mW/cm². Considering the quantification of reactive oxygen species, the concentration of MB was determinant in ROS production. MB at 100 µg/mL and dose of 120 J/cm² showed more evident hydroxyl radicals production e in relation to the amount of singlet oxygen formed. At the concentration of 50 µg/mL, the light intensity of 61 mW/cm² similarly generated the tested species, while the light intensity of 153 mW/cm² produced more singlet oxygen. For Ce6, we observed greater production of singlet oxygen in both concentrations and intensities. CUR produced more singlet oxygen when submitted to light intensity of 103 mW/cm², and at higher intensities (151 and 153 mW/cm²) the ROS generation was similar among the evaluated species. Photodegradation showed that MB at light intensity of 151 and 153 mW/cm² had a greater degradation. However, the Ce6 and CUR photodegradation was higher when submitted to light intensities of 61 and 103 mW/cm², respectively.

Keywords: Photodynamic therapy. Methylene blue. Chlorin-e6. Curcumin. *Enterococcus faecalis*; *Cutibacterium acnes*.

LISTA DE ABREVIATURAS/SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
O_2^-	Radical superóxido
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
AM	Azul de Metileno
APF	3'-p-(aminofenil) fluoresceína
BHI	Meio de cultura de infusão de cérebro e coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
Ce6	Clorina-e6
cél/mL	Célula por mililitro
CUR	Curcumina
D.O.	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
F+L-	Com fotossensibilizador sem luz
F-L-	Sem fotossensibilizador sem luz
FS	Fotossensibilizador
g/mol	Grama por mol
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
J/cm^2	Joules por centímetro quadrado
LED	<i>Light Emitting Diodes</i>
Log_{10}	Logarítimo na base 10
mL	Mililitro
mW/cm^2	Milliwatts por centímetro quadrado
nm	Nanometros
NT	Não Tratado
$\bullet\text{OH}$	Radical Hidroxila
SOSG	<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i>
TFD	Terapia fotodinâmica
TFDa	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>

TSB	Caldo <i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espectro de absorção e estrutura molecular do azul de metileno	18
Figura 2 - Espectro de absorção e estrutura molecular da clorina-e6.....	20
Figura 3 - Espectro de absorção e estrutura molecular da curcumina	21
Figura 4 - Modos de irradiação	23
Figura 5 - Biofilme bacteriano	28
Figura 6 – Fontes de luz sistema a base de LEDs.....	31
Figura 7 – Geração de espécies reativas de oxigênio pelo azul de metileno na concentração de 100 µg/mL	39
Figura 8 – Geração de espécies reativas de oxigênio pelo azul de metileno na concentração de 50 µg/mL	40
Figura 9 – Fotodegradação do azul de metileno na concentração de 75 µg/mL.....	41
Figura 10 – Taxa de fotodegradação do azul de metileno na concentração de 75 µg/mL.....	41
Figura 11 – Fotodegradação do azul de metileno na concentração de 50 µg/mL.....	42
Figura 12 – Taxa de fotodegradação do azul de metileno na concentração de 75 µg/mL.....	42
Figura 13 – Geração de espécies reativas de oxigênio pela clorina-e6 na concentração de 50 µg/mL	43
Figura 14 – Geração de espécies reativas de oxigênio pela clorina-e6 na concentração de 12,5 µg/mL	44
Figura 15 – Fotodegradação da clorina-e6 na intensidade de 61 mW/cm ² na concentração de 100 µg/mL	45
Figura 16 – Fotodegradação da clorina-e6 na intensidade de 153 mW/cm ² na concentração de 100 µg/mL	45
Figura 17 – Taxa de fotodegradação da clorina-e6 na concentração de 100 µg/mL.....	46
Figura 18 – Fotodegradação da clorina-e6 na concentração de 12,5 µg/mL	46

Figura 19 – Taxa de fotodegradação da clorina-e6 na concentração de 12,5 µg/mL.....	47
Figura 20 – Geração de espécies reativas de oxigênio pela curcumina na concentração de 50 µg/mL	48
Figura 21 – Geração de espécies reativas de oxigênio pela curcumina na concentração de 2,5 µg/mL	49
Figura 22 – Fotodegradação da curcumina na concentração de 50 µg/mL	49
Figura 23 – Taxa de fotodegradação da curcumina na concentração de 50 µg/mL.....	50
Figura 24 – TFDa em suspensão de <i>E. faecalis</i> com azul de metileno e intensidade de 61 mW/cm ² de modo contínuo	54
Figura 25 – TFDa em suspensão de <i>E. faecalis</i> com azul de metileno e intensidade de 153 mW/cm ² de modo fracionado	55
Figura 26 – TFDa em suspensão de <i>E. faecalis</i> com clorina-e6 e intensidade de 61 mW/cm ² de modo contínuo	56
Figura 27 – TFDa em suspensão de <i>E. faecalis</i> com clorina-e6 e intensidade de 153 mW/cm ² de modo fracionado	57
Figura 28 – TFDa em suspensão de <i>E. faecalis</i> com curcumina e intensidade de 103 mW/cm ² de modo contínuo	58
Figura 29 – TFDa em suspensão de <i>E. faecalis</i> com curcumina e intensidade de 151 mW/cm ² de modo fracionado	59
Figura 30 – TFDa em biofilme de <i>E. faecalis</i> com azul de metileno e intensidade de 46 mW/cm ² de modo contínuo	60
Figura 31 – TFDa em biofilme de <i>E. faecalis</i> com azul de metileno e intensidade de 153 mW/cm ² de modo fracionado	61
Figura 32 – TFDa em biofilme de <i>E. faecalis</i> com clorina-e6 e intensidade de 46 mW/cm ² de modo contínuo	62
Figura 33 – TFDa em biofilme de <i>E. faecalis</i> com clorina-e6 e intensidade de 153 mW/cm ² de modo fracionado	62
Figura 34 – TFDa em biofilme de <i>E. faecalis</i> com curcumina e intensidade de 103 mW/cm ² de modo contínuo	63

Figura 35 – TFDa em biofilme de <i>E. faecalis</i> com curcumina e intensidade de 154 mW/cm ² de modo fracionado	64
Figura 36 – TFDa em suspensão de <i>C. acnes</i> com azul de metileno e intensidade de 61 mW/cm ² de modo contínuo	69
Figura 37 – TFDa em suspensão de <i>C. acnes</i> com azul de metileno e intensidade de 151 mW/cm ² de modo fracionado	70
Figura 38 – TFDa em suspensão de <i>C. acnes</i> com clorina-e6 e intensidade de 61 mW/cm ² de modo contínuo	71
Figura 39 – TFDa em suspensão de <i>C. acnes</i> com clorina-e6 e intensidade de 151 mW/cm ² de modo fracionado	72
Figura 40 – TFDa em suspensão de <i>C. acnes</i> com curcumina e intensidade de 103 mW/cm ² de modo contínuo	73
Figura 41 – TFDa em suspensão de <i>C. acnes</i> com curcumina e intensidade de 107 mW/cm ² de modo fracionado	74
Figura 42 – TFDa em biofilme de <i>C. acnes</i> com azul de metileno e intensidade de 46 mW/cm ² de modo contínuo	75
Figura 43 – TFDa em biofilme de <i>C. acnes</i> com azul de metileno e intensidade de 122 mW/cm ² de modo fracionad.....	76
Figura 44 – TFDa em biofilme de <i>C. acnes</i> com clorina-e6 e intensidade de 46 mW/cm ² de modo contínuo	76
Figura 45 – TFDa em biofilme de <i>C. acnes</i> com clorina-e6 e intensidade de 122 mW/cm ² de modo fracionado	77
Figura 46 – TFDa em biofilme de <i>C. acnes</i> com curcumina e intensidade de 103 mW/cm ² de modo contínuo	78
Figura 47 – TFDa em biofilme de <i>C. acnes</i> com curcumina e intensidade de 154 mW/cm ² de modo fracionado	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações e parâmetros utilizados para cada fotossensibilizador em suspensão de <i>E. faecalis</i>	33
Tabela 2 - Concentrações e parâmetros utilizados para cada fotossensibilizador em suspensão de <i>C. acnes</i>	33
Tabela 3 - Concentrações e parâmetros utilizados para cada fotossensibilizador em biofilme de <i>E. faecalis</i>	35
Tabela 4 - Concentrações e parâmetros utilizados para cada fotossensibilizador em biofilme de <i>C. acnes</i>	35
Tabela 5 – Concentrações e doses utilizadas para quantificação de espécies reativas de oxigênio (parâmetros estudados para <i>E. faecalis</i>) ..	36
Tabela 6 - Concentrações e doses utilizadas para quantificação de espécies reativas de oxigênio (parâmetros estudados para <i>C. acnes</i>)	37
Tabela 7 - Concentrações e dose utilizada para fotodegradação (parâmetros estudados para <i>E. faecalis</i>)	38
Tabela 8 - Concentrações e dose utilizada para fotodegradação (parâmetros estudados para <i>C. acnes</i>)	38
Tabela 9 – descrição dos melhores resultados para terapia fotodinâmica antimicrobiana em suspensão e biofilme em <i>E. faecalis</i>	64
Tabela 10 – descrição dos melhores resultados para terapia fotodinâmica antimicrobiana em suspensão e biofilme em <i>C. acnes</i>	79

SUMÁRIO

1	Introdução	16
1.1	Terapia Fotodinâmica	16
1.1.1	Fotossensibilizadores	18
1.1.2	Fontes de Luz	22
1.2	Enterococcus faecalis	25
1.3	Cutibacterium acnes	26
1.4	Biofilme bacteriano	27
2	Objetivos	29
2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	Material e Métodos	30
3.1	Materiais	30
3.1.1	Cepas bacteriana	30
3.1.2	Meios de cultivo	30
3.1.4	Fontes de luz	31
3.2	Métodos	32
3.2.1	Recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC) por microplaqueamento	32
3.2.2	Estudo <i>in vitro</i> da Terapia Fotodinâmica em suspensão bacteriana	32
3.2.3	Desenvolvimento de biofilme de 72 horas	34
3.2.4	Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio por fluorescência	36
3.2.5	Fotodegradação	37
3.2.6	Análises estatísticas	38
4	Resultados e Discussões	39
4.1	Estudo I – Avaliação dos fotossensibilizadores	39
4.1.1	Quantificação de espécies reativas de oxigênio para azul de metileno	39
4.1.2	Ensaio de fotodegradação para o azul de metileno	40
4.1.3	Quantificação de espécies reativas de oxigênio para clorina-e6	43
4.1.4	Ensaio de fotodegradação para clorina-e6	44
4.1.5	Quantificação de espécies reativas de oxigênio para curcumina	47
4.1.6	Ensaio de fotodegradação para curcumina	49

4.1.7 Discussão	50
4.2 Estudo II: Enterococcus faecalis.....	53
4.2.1 Terapia fotodinâmica em suspensão.....	53
4.2.2 Terapia fotodinâmica em biofilme.....	60
4.2.3 Resumo dos resultados.....	64
4.2.4 Discussão	65
4.3 Estudo III – Cutibacterium acnes.....	68
4.3.1 Terapia fotodinâmica em suspensão.....	68
4.3.2 Terapia Fotodinâmica em Biofilme	74
4.3.3 Resumo dos resultados.....	79
4.3.4 Discussão	79
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	82

1 Introdução

1.1 Terapia Fotodinâmica

O uso da luz solar (“helioterapia”) para tratar doenças como vitiligo, raquitismo, psoríase, psicose e até mesmo câncer de pele foi utilizada por civilizações antigas, incluindo egípcios, indianos, chineses e gregos. Somente no final do século 18, realizou-se o tratamento de varíola e tuberculose cutânea utilizando uma luz vermelha artificial desenvolvida pelo cientista dinamarquês Niels Finsen, o que fez com que ele recebesse o Prêmio Nobel em 1903 (SCHERER et al, 2017). Em 1904, Oscar Raab, aluno do professor Herman von Tappeiner, relatou que a combinação de laranja de acridina e luz poderia destruir organismos vivos (paramécio) (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). No mesmo laboratório do professor von Tappeiner foi elaborado o termo “ação fotodinâmica”, quando ficou reconhecido que o oxigênio era essencial para induzir a morte celular observada no experimento com o paramécio. Os primeiros ensaios clínicos com TFD foram relatados em 1905 utilizando eosina e vermelho Magdala como fotossensibilizadores. A hematoporfirina foi utilizada pela primeira vez em experimentos pré-clínicos em ratos por Hausmann em 1911 (SCHERER et al, 2017).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento alternativa que, isoladamente ou em combinação com os tratamentos clássicos, visa proporcionar melhores resultados clínicos (SCHERER et al, 2017). A TFD é um tratamento promissor para o câncer e vem sendo utilizada no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas e virais (ACKROYD et al., 2001).

A terapia consiste na ativação de um fotossensibilizador pela luz de comprimento de onda adequado, que passa do seu estado fundamental para o estado singleto excitado. Esse fotossensibilizador pode perder energia por processos de fluorescência e voltar ao estado fundamental ou sofrer um cruzamento intersistemas passando para o estado tripleto. Nesse estado tripleto, ele pode perder energia por fosforescência e voltar ao estado fundamental ou transferir energia para outras moléculas do meio e gerar espécies citotóxicas. Essas espécies citotóxicas podem ocorrer de duas maneiras: pela reação do tipo I onde o fotossensibilizador no estado tripleto

interage com um substrato orgânico produzindo radicais ou íons radicais através de reações de transferência de cargas (átomos de hidrogênio ou de elétrons). Esses radicais podem reagir com oxigênio produzindo espécies citotóxicas, como radicais superóxidos, hidroxila e peróxido de hidrogênio. E pela reação do tipo II que envolve transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto para o oxigênio molecular no estado fundamental produzindo oxigênio singleto, que é altamente citotóxico (HAMBLIN; HASANA, 2004; RIBEIRO et al., 2007). Atualmente, estudos propõem a existência de mais dois mecanismos de ação da TFD, as reações do tipo III e do tipo IV. Na reação do tipo III ocorre uma interação entre o FS no estado tripleto e os radicais livres, exercendo um efeito citotóxico em relação às estruturas intracelulares, sem a necessidade de oxigênio. Acredita-se que esse mecanismo compete com as reações do tipo I e II (SCHERER et al, 2017). Na reação do tipo IV, Scherer e colaboradores (2017) propõem novos mecanismos via absorção de dois fótons utilizando E-combretastatina como fotossensibilizador que pode ser convertida em Z-combretastatina, que é altamente citotóxica, por fotoisomerização. Essa fotoisomerização da combretastatina representa um mecanismo diferente que, diferentemente dos tipos I e II, não requer a presença de oxigênio ou, como para o tipo III, não envolve interação do estado tripleto excitado com qualquer outra molécula para produzir uma espécie citotóxica. (SCHERER et al, 2017).

Em comparação com outras terapias citotóxicas, a TFD tem vantagem da dupla seletividade: o fotossensibilizador pode ser direcionado para tecidos ou células alvo, e a luz pode ser focalizada no local da lesão (HAMBLIN; HASANA, 2004). Outras vantagens são o custo da terapia, minimizados efeitos colaterais, não há o desenvolvimento de resistência pelo microrganismo, possui um largo espectro de ação e é eficiente em cepas resistentes a antimicrobianos (MELLO; PERUSSI, 2012; EDUARDO et al., 2015).

A TFD vem sendo utilizada como tratamento coadjuvante na periodontia, implantodontia (YAMADA et al., 2004) e endodontia para tentar eliminar os microrganismos restante após o tratamento mecânico (AMARAL et al., 2010). A TFD também vem sendo empregada na dermatologia no tratamento do câncer de pele não-melanocítico, na psoríase, doença de Darier, sarcoidose,

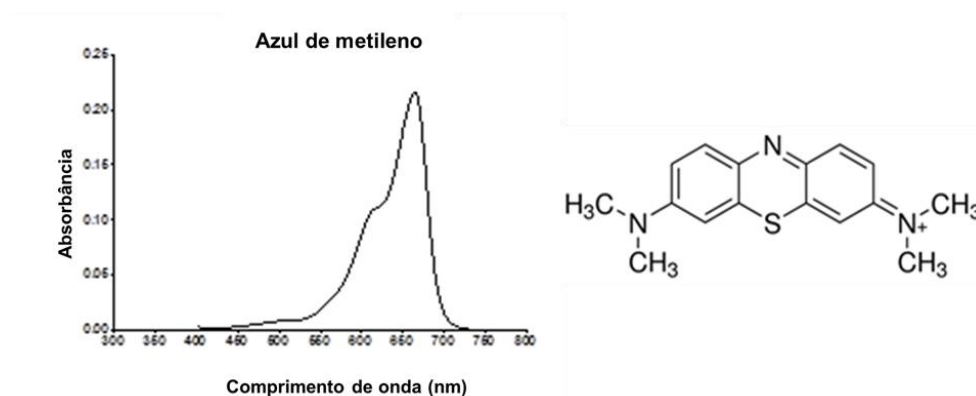
necrobiose lipóidica, queratoses actínicas, carcinoma basocelular superficial e leishmaniose cutânea (TOREZAN et al., 2009; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

1.1.1 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são compostos capazes de absorver luz de comprimento de onda específico e usar essa energia para induzir reações citotóxicas para células (SIBATA et al, 2000). Diversos fotossensibilizadores foram estudados visando a inativação bacteriana. Dentre eles, a curcumina, o azul de metileno e a clorina-e6 têm apresentado propriedades fotossensíveis que já estão bem descritas na literatura (FONTANA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2017; DE ANNUNZIO et al., 2018; FRADE et al., 2018).

O azul de metileno é um corante fenotiazínico, hidrofílico, com carga positiva e baixo peso molecular, capaz de penetrar na membrana externa através da ligação às proteínas da superfície microbiana, exerce fototoxicidade tanto para o DNA quanto para a membrana externa da espécie-alvo e apresenta absorção máxima de luz em 664 nm (Figura 1) (SOUKOS et al., 2006; POURHAJIBAGHER et al., 2018). É utilizado como desinfetante e antisséptico (LONGHINOTTI et al., 1996).

Figura 1 - Espectro de absorção e estrutura molecular do azul de metileno

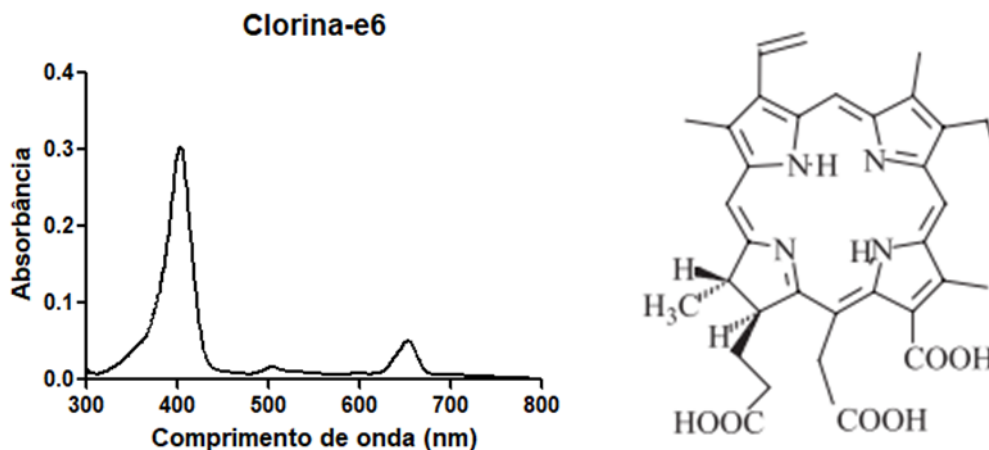


Espectro de absorção Ultravioleta-Visível de solução diluída de azul de metileno (solução aquosa) obtido com o equipamento UV-1601PC (Shimadzu, Kyoto, KYT, Japão) no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química – UNESP Araraquara, e estrutura molecular do fotossensibilizador.

Nos últimos anos, o azul de metileno vem sendo utilizado como fotossensibilizador para inativação de uma variedade de bactérias, fungos e vírus (USACHEVA et al., 2001). de Annunzio et al. (2017) mostraram que para eliminação bacteriana total da suspensão de *E. faecalis* precisou de uma dose de 90 J/cm² e 312 µM de azul de metileno, e para *Propionibacterium acnes*, 90 J/cm² e 156 µM de azul de metileno. Fontana et al. (2009) demonstraram uma morte bacteriana de 63% em suspensão de *Enterococcus faecalis* contra 31% em biofilme da mesma, utilizando azul de metileno como fotossensibilizador na TFDa. Outro estudo com biofilme de *E. faecalis* obteve uma morte bacteriana de 95% (LÓPEZ-JIMÉNEZ et al, 2015). Quando avaliado *in vivo*, no canal dentário de pacientes com infecções endodônticas, TFDa com azul de metileno mostra ser uma alternativa para desinfecção completa de canais radiculares contaminados por *E. faecalis*, após a preparação quimiomecânica convencional (AHANGARI et al., 2017; SILVA et al., 2018). Tanto para *E. faecalis* como para *C. acnes* o azul de metileno mostrou-se um fotossensibilizador eficiente na TFDa antimicrobiana, tendo seu uso aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration).

A clorina-e6 é um fotossensibilizador neutro, de segunda geração, derivado da porfirina, apresenta um anel tetrapirrólico o qual lhe confere características anfipáticas e possui um alto rendimento quântico de ¹O₂ (ROVALDI et al., 2000; PERUSSI, 2007; DOVIGO et al., 2013; CIEPLIK et al., 2018). Suas principais bandas de absorção nos comprimentos de onda de 400 e 660 nm (Figura 2) (MORITZ, 2014).

Figura 2 - Espectro de absorção e estrutura molecular da clorina-e6



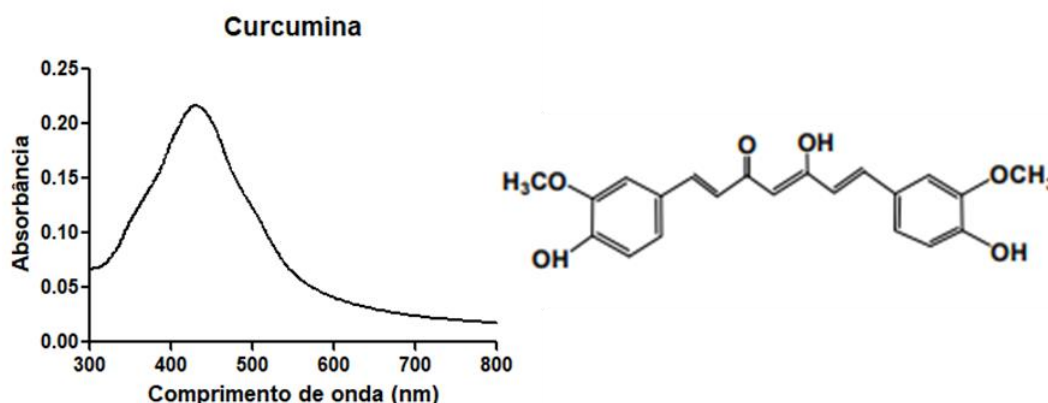
Espectro de absorção Ultravioleta-Visível de solução diluída de clorina-e6 (solução 10% DMSO, 90% água) obtido com o equipamento UV-1601PC (Shimadzu, Kyoto, KYT, Japão) no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química – UNESP Araraquara, e estrutura molecular do fotossensibilizador.

Estudos vêm mostrando a utilização e eficiência da clorina-e6 em TFDa em patógenos dentais (ROVALDI et al., 2000). Park et al. (2010) avaliaram diferentes cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica serovar Typhimurium*) com 10 e 20 μM de clorina-e6 e diferentes doses de luz. Para *S. aureus* e *P. aeruginosa* houve uma forte inibição bacteriana nas doses de 30 a 50 J/cm^2 e 20 a 50 J/cm^2 , respectivamente. Para *E. coli* e *S. typhimurium* houve moderada inibição. de Annunzio et al. (2017) demonstraram que para eliminação bacteriana total da suspensão de *E. faecalis* precisou de uma dose de 60 J/cm^2 e 42 μM de clorina-e6, e para *Propionibacterium acnes*, 3,25 J/cm^2 e 2,62 μM de clorina-e6. A clorina-e6 mostrou ser um fotossensibilizador promissor na TFDa contra *E. faecalis* e *C. acnes*, necessitando de doses e concentrações razoavelmente baixas.

A curcumina é um dos três pigmentos encontrados na cúrcuma (*Curcuma longa* L.), é um composto fenólico, insolúvel em meio aquoso, que pode interagir com a monocamada lipídica e se acumular na região hidrofóbica da cadeia acíclica (YANG et al., 2018). Possui uma banda de absorção entre 300 e 500 nm (Figura 3) (BALBI-PENÃ et al., 2006). A curcumina é um antioxidante capaz de neutralizar possíveis danos celulares decorrentes da

ação de radicais livres (SUETH-SANTIAGO et al., 2015) além de possuir efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios e antibacterianos (YANG et al., 2018).

Figura 3 - Espectro de absorção e estrutura molecular da curcumina



Espectro de absorção Ultravioleta-Visível de solução diluída de curcumina (DMSO) obtido com o equipamento UV-1601PC (Shimadzu, Kyoto, KYT, Japão) no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química – UNESP Araraquara, e estrutura molecular do fotossensibilizador.

Da Frota et al. (2015) avaliaram, *in vitro*, a TFDa com curcumina em biofilme de *E. faecalis* e obtiveram 41% de redução bacteriana quando irradiado por 5 minutos e 30% irradiando por 10 minutos, não eliminando significativamente a contaminação bacteriana por *E. faecalis*. Pileggi et al. (2013) avaliaram suspensão e biofilme de *E. faecalis* e observaram uma redução total na carga bacteriana com 10 μ M de curcumina quando a bactéria está em suspensão, e com 50 μ M quando em biofilme. de Annunzio et al. (2017) demonstraram que para eliminação bacteriana total da suspensão de *E. faecalis* precisou de uma dose de 12,5 J/cm² e 136 μ M de curcumina, e para *Propionibacterium acnes*, 12.5 J/cm² e 14 μ M. Estudos utilizando curcumina como fotossensibilizador em bactérias orais mostraram resultados promissores (ARAÚJO et al, 2012a; ARAÚJO et al, 2012b). Curcumina contra *E. faecalis* e *C. acnes* mostrou ser um fotossensibilizador favorável à TFD antimicrobiana, com doses menores de luz e de fotossensibilizador é possível uma eficiência na morte bacteriana (DE ANNUNZIO et al., 2017).

1.1.2 Fontes de Luz

Lasers (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radioation*), lâmpadas e LEDs (*Light Emitting Diode*) são empregados como fontes de luz na TFD e, até o momento, não foi demonstrado que uma é melhor que a outra, portanto a escolha da fonte de luz depende da aplicação da terapia e do fotossensibilizador. Historicamente, os lasers de argônio e lasers de vapor de metal foram as escolhas iniciais para utilização na TFD. A disponibilidade de fontes de banda larga (lâmpadas) desafiou o uso de lasers, já que a luz poderia ser entregue diretamente ao local de aplicação da terapia sem a necessidade de acoplar uma fibra óptica a fonte (BRANCALEON; MOSELEY, 2002).

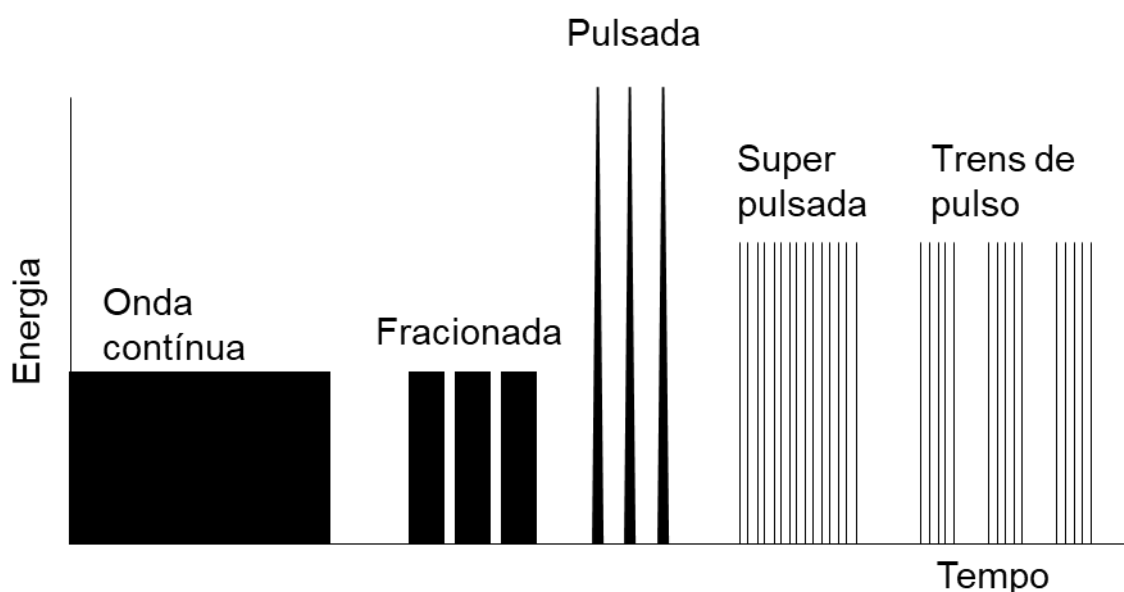
Os lasers têm como propriedades ser monocromáticos (têm o mesmo comprimento de onda), suas ondas propagam-se coerentemente (as ondas estão em fase no tempo e no espaço), de forma colimada (as ondas têm a mesma direção, a luz é paralela, não divergente, estreita e concentrada) e direcional (CATORZE, 2009; CAVALCANTI et al., 2011). Alguns dos lasers utilizados na TFD são laser de argônio bombeado por corante com comprimento de onda de 630nm em onda contínua; laser de vapor de ouro com comprimento de onda de 627,8 nm, com uma saída pulsada; laser de vapor de cobre com comprimentos de onda de 511 e 578 nm; laser Nd:YAG combinado com KTP com comprimentos de onda de 1.064 e 532 nm; laser de diodo com comprimento de onda de 630 nm (MANG, 2004).

Uma alternativa para o uso de *laser* são os sistemas a base de LEDs (*light-emitting diode*), que são compactos, leves e requerem menos energia para produzir os comprimentos de onda desejados. Esses sistemas são fabricados em vários comprimentos de onda que podem ser utilizados na TFD para iluminação da superfície plana (MANG, 2004). Algumas das propriedades dos LEDs são luz policromática, propagam-se de forma não coerente e não colimada (DE PAULA, 2016).

A irradiação da luz pode ser feita de diferentes modos, fracionada, pulsada ou contínua (Figura 4). Neste estudo utilizamos o modo contínuo e fracionado. O modo fracionado consiste na ativação da luz por um determinado período seguido do desligamento da mesma por um determinado período tempo, voltando a ativação da luz e assim sucessivamente até atingir o tempo total de

irradiação (MARINIC et al., 2015). O fracionamento da dose de luz permite a reoxigenação dos tecidos durante o período em que esse não está sendo iluminado (TSUTSUI et al, 2002).

Figura 4 - Modos de irradiação



Modos de emissão do laser. Onda contínua, fracionada, pulsada, super pulsada e trens de pulso onde há uma interrupção mecânica ou elétrica de uma onda contínua com uma determinada frequência (Adaptada de ROMAGNOLI; CAFARO, 2017).

Estudos mostram a eficiência tanto do modo contínuo quanto do modo fracionado na TFD. Vignion-Dewalle et al. (2017) avaliaram dois protocolos de TFD utilizando protoporfirina IX como fotossensibilizador no tratamento de queratose actínica. O protocolo padrão utiliza luz vermelha com comprimento de onda de 635 nm, taxa de fluência de 75 mW/cm² e uma dose de 37 J/cm² durante 493 segundos no modo contínuo; o protocolo *FLEXITHERALIGHT* utiliza o fracionamento da luz com dois minutos de intervalo escuro a cada três minutos de luz, com uma taxa de fluência de 12,3 mW/cm² e uma dose de 37 J/cm² por 9.024 segundos. A taxa de resposta à TFD em 3 meses foi de 54,2% e 65,3% para o protocolo padrão e o protocolo *FLEXITHERALIGHT*, respectivamente, e para 6 meses foi de 64% e 71,7%, respectivamente. Foi avaliado o nível de dor de 0 (sem dor) a 10 (dor insuportável) no dia do tratamento e no sétimo dia. Para o protocolo padrão, no dia do tratamento a

média de dor foi de 5,2 e no sétimo dia foi de 0,1; para o protocolo *FLEXITHERALIGHT*, a média de dor no dia do tratamento foi de 0,4 e no sétimo dia foi de 0,1. Quanto ao dano local, a irradiação fracionada gera um dano em torno de 30 vezes maior que a irradiação contínua. Este estudo mostrou que a irradiação fracionada permite a reoxigenação do tecido e re-síntese do fotossensibilizador durante os períodos escuros, além de ser mais tolerado pelos pacientes.

Navaeipour et al. (2016) avaliaram linhagem celular de câncer de fibroblastos humanos e linhagem de células dérmicas humanas normais, com ftalocianina de zinco e laser de diodo no comprimento de onda de 675 nm. O laser de ondas contínuas foi modulado em potências de 25, 50 e 80 mW e o laser fracionado foi utilizado em 30, 70 e 100mW. Com a potência maior a irradiação contínua foi capaz de reduzir a viabilidade das células cancerígenas para 2,23% enquanto a irradiação fracionada reduziu para 13,17%. Nas células normais, a irradiação contínua reduziu a viabilidade para 20,83% enquanto a irradiação fracionada foi para 36,23%. Os dados obtidos neste estudo mostram que o desempenho do laser de modo contínuo é melhor que o laser fracionado, além de nas mesmas condições, a taxa de morte de células cancerosas é maior que a de células normais, expectativa desejada para tratamento de tumores.

Misba e Khan (2018) avaliaram suspensão e biofilme de *S. mutans* com azul de toluidina, azure A e novo azul de metileno como fotossensibilizadores e laser no comprimento de onda de 630 nm com potência de 100 mW, fluência de 5 J/cm² irradiada por 40 segundos continuamente e 5 J/cm² de luz fracionada (dois pulsos de 20 segundos de luz interrompido por um minuto de fase escura). Em suspensão, utilizando 10 µM dos FS, a irradiação fracionada teve uma redução na viabilidade de *S. mutans* de 6 a 6,5 log₁₀ enquanto na irradiação contínua foi de 4,5 log₁₀. Em biofilme, com 50 µM dos FS e dose de 50 J/cm², a irradiação contínua teve uma redução de 3,6 a 4,2 log₁₀. Na dose de 100 J/cm² na irradiação fracionada houve total redução bacteriana. Estudos a respeito destes parâmetros são necessários para melhorar a eficiência da TFD.

1.2 *Enterococcus faecalis*

O gênero *Enterococcus* faz parte do grupo das bactérias gram-positivas, são anaeróbias facultativas e suas espécies são residentes do trato gastrointestinal, da vagina e da cavidade bucal (PARADELLA et al., 2007), podendo se comportar como um patógeno oportunista, causando infecções do trato urinário, infecções de feridas operatórias, bacteremia e endocardite bacteriana (TOLEDO-ARANA et al, 2001). Eles sobrevivem a ambientes severos, incluindo pH alcalino extremo (9,6) e altas concentrações de sal. Resistem aos sais biliares, detergentes, metais pesados, etanol, azida e dessecação. Na década de 1970, o gênero *Enterococcus* foi reconhecido como o principal patógeno nosocomial causando bacteremia, endocardite, meningite bacteriana, infecções do trato urinário entre outros. As fontes das bactérias nessas infecções têm origem das mãos de profissionais de saúde, de instrumentos clínicos, ou de paciente para paciente. Em odontologia, *E. faecalis* está associado a diferentes formas de doença perirradicular, incluindo infecções endodônticas primárias e infecções persistentes. Estudos demonstraram que *E. faecalis* é capaz de se translocar do sistema radicular para os linfonodos submandibulares de camundongos saudáveis, sugerindo que esta via de infecção pode desempenhar um papel na patogênese das infecções oportunistas (STUART et al, 2006).

Após o preparo químico-mecânico e medicação intracanal, pode haver microrganismos residuais, pois algumas partes do canal radicular permanecem intactos pela instrumentação, assim necessitando uma desinfecção para não haver recidiva. *E. faecalis* está associado a falhas endodônticas e apresenta resistência aos medicamentos utilizados intracanal (FOSCHI et al., 2007). *E. faecalis* é capaz de formar biofilme o que o torna cerca de 1000 vezes mais resistentes à fagocitose, anticorpos e antimicrobianos do que organismos não formadores de biofilme (STUART et al, 2006). Estudos de TFDa na odontologia tem sido de grande importância para eliminação total das bactérias para não ocorrer as recidivas.

1.3 *Cutibacterium acnes*

Cutibacterium (antigamente *Propionibacterium*) *acnes* é uma bactéria gram-positiva anaeróbia facultativa, não esporulante, (COSTA et al., 2008) faz parte da flora normal da pele, também pode ser encontrada na cavidade oral, intestino grosso, conjuntiva e canal auditivo externo (GHARAMTI; KANAFANI, 2017).

A acne vulgar é uma doença causada por esse microrganismo, onde observa-se a hiperprodução sebácea, hiperqueratinização folicular, aumento da colonização por *C. acnes* e inflamação local (COSTA et al., 2008). O tratamento da acne vulgar consiste no controle da hiperqueratose, na diminuição da produção de sebo, na redução da população bacteriana e na eliminação da inflamação. Atualmente, seu tratamento consiste na associação de medicamentos, podendo ser de uso tópico ou oral. Entre esses medicamentos estão os retinoides, que atuam na normalização da descamação do epitélio; os antibióticos tópicos e orais, atuam na colonização por *C. acnes* e na inflamação; contraceptivos orais e corticosteroides, atuam na diminuição da produção de sebo (FIGUEIREDO et al., 2011).

Pesquisas mostram que mais de 40% de *C. acnes* são resistentes aos antibióticos convencionais usados para o tratamento de acne. E as outras terapias anti-acne possuem efeitos colaterais indesejáveis (ASHKENZAI et al., 2003). Estudos demonstram que a TFDa na acne inflamatória tem a vantagem de ser um tratamento tópico, tendo a diminuição de efeitos colaterais e não leva resistência bacteriana (TOREZAN et al., 2009).

Embora *C. acnes* seja bem conhecida por seu papel na patogênese da acne vulgar, recentemente, tem sido associada em infecções relacionadas a implantes, como infecções protéticas do ombro e próteses de quadril e joelho, infecções de dispositivos eletrônicos implantáveis cardiovasculares e infecções por implantes neurocirúrgicos (GHARAMTI; KANAFANI, 2017). Ramage et al. (2003) demonstraram, *in vitro*, pela primeira vez que *C. acnes* é capaz de formar biofilme em biomateriais ortopédicos.

Além disso, o gênero *Cutibacterium* também é encontrado em infecções endodônticas primária e persistente (SIQUEIRA JÚNIOR; LOPES, 1999). Rôças e Siqueira (2012) avaliaram amostras pós-tratamento de canais

radiculares de dentes com periodontite apical tratados e submetidas a retratamento, quanto à presença de 28 espécies bacterianas utilizando a abordagem de *checkerboard* (hibridização reversa por DNA-DNA). Nesse estudo, uma das bactérias que foram detectadas com maior frequência foi *C. acnes*. Siqueira Júnior et al. (2007) avaliaram a microbiota em dentes com infecções intra-radiculares primárias e periodontite apical crônica em três diferentes momentos: amostras bacterianas foram coletadas antes do tratamento (S1), após preparo químico-mecânico utilizando limas manuais de NiTi e hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (S2), e após 7 dias de medicação com uma pasta de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) em paramonoclorofenol canforado fenol (CPMC) (S3). Neste estudo, *C. acnes* foi detectado nos três momentos, sendo em S3 a única bactéria remanescente. A razão pela qual esta espécie anaeróbica gram-positiva persistiu após cada etapa do tratamento permanece desconhecida, mas pode estar relacionada à sua capacidade de formar biofilmes e resistência a agentes antimicrobianos.

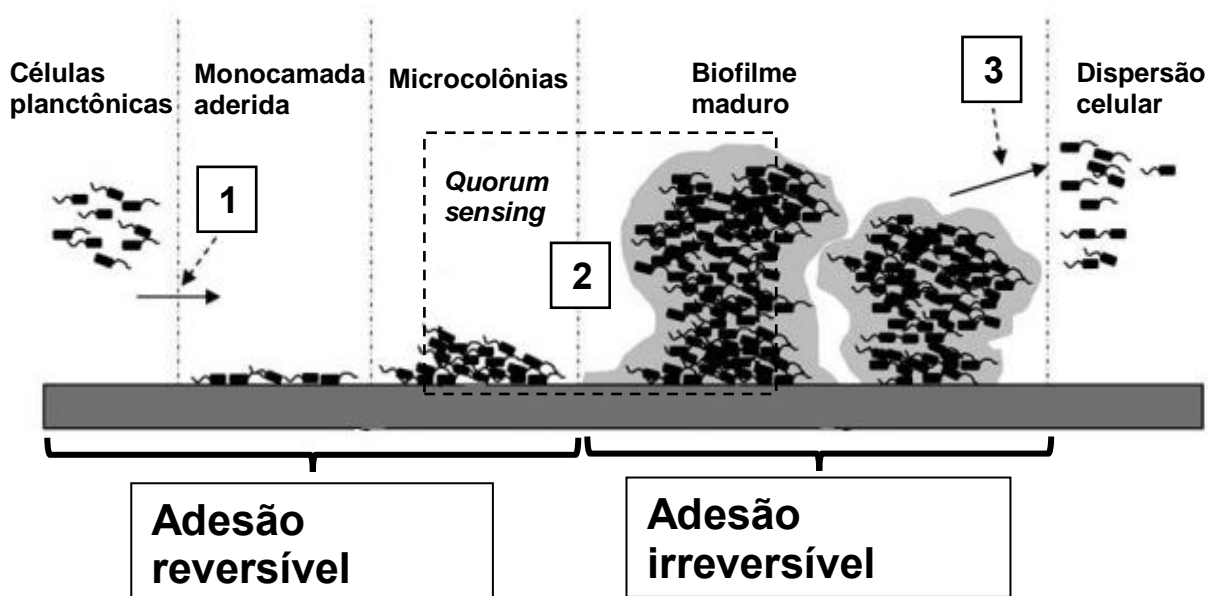
1.4 Biofilme bacteriano

Os biofilmes bacterianos são comunidades estruturadas de células aderidas a uma superfície embebidas em uma matriz polimérica autoproduzida (WHITCHURCH et al., 2002). Eles podem ser constituídos por uma ou múltiplas espécies bacterianas. Estima-se que na cavidade oral há 700 espécies bacterianas e que o biofilme dental contém mais de 500 espécies diferentes (MAH; O'TOOLE, 2001; PASTER et al., 2006).

A formação do biofilme envolve a adesão bacteriana, onde essas células passaram do estado planctônico para o estado sésil, seguida do aumento na produção da matriz de substância extracelular polimérica (EPS), responsável pela manutenção da adesão, e multiplicação das bactérias aderidas formando microcolônias, seguida da maturação do biofilme e destacamento de células, retornando ao estado planctônico (Figura 5) (LINDHE et al., 2005; BOARI et al., 2009). Após a adesão das células bacterianas, ocorre um aumento na produção, na liberação e na detecção de moléculas sinalizadoras autoindutoras. Quando a densidade populacional se torna suficiente, essas

moléculas autoindutoras induzem a transcrição de genes específicos que regulam várias funções como motilidade, virulência, produção de EPS e a formação de biofilmes. Essa comunicação entre as células bacterianas é denominada *Quorum sensing* (DAVIES et al., 1998; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Figura 5 - Biofilme bacteriano



Etapas da formação do biofilme bacteriano. 1: adesão bacteriana, 2: comunicação celular microbiana, 3: maturação e dispersão (adaptada de MACEDO; ABRAHAM, 2009).

Uma das vantagens deste método de crescimento é a proteção contra microrganismos competitivos, fatores ambientais e substâncias presentes no meio que podem ser tóxicas para as bactérias. Também facilitam o processamento e absorção de nutrientes, alimentação cruzada, onde uma espécie provê alimento para outras, e remoção de metabolitos tóxicos, que podem ser utilizados por outra bactéria (LINDHE et al., 2005).

Os biofilmes bacterianos são mais difíceis de erradicar que células planctônicas, e apresentam maior resistência a uma ampla gama de compostos antimicrobianos (GARCEZ et al, 2007). Os mecanismos de resistência dos

biofilmes são diferentes de espécie para espécie, e de antibiótico para antibiótico (LINDHE et al., 2005).

Neste contexto, avaliar diferentes parâmetros para TFDa visando melhorias no tratamento é de grande valia, prevenindo infecções secundárias, minimizando o uso de antibióticos reduzindo assim o número de bactérias resistentes.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a fototoxicidade da irradiação com diferentes modos e intensidades de luz na terapia fotodinâmica antimicrobiana com azul de metileno, clorina-e6 e curcumina contra suspensões e biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Cutibacterium acnes*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a fototoxicidade da irradiação com uma intensidade de luz maior de modo fracionado e uma intensidade de luz menor de modo contínuo sobre suspensão e biofilme de *Enterococcus faecalis* e *Cutibacterium acnes* com azul de metileno e clorina-e6 e luz vermelha (660 nm);
- Avaliar a fototoxicidade da irradiação com uma intensidade de luz maior de modo fracionado e uma intensidade de luz menor de modo contínuo sobre suspensão e biofilme de *E. faecalis* e *C. acnes* com curcumina e luz azul (450 nm);
- Avaliar a produção de espécies radicalares e oxigênio singleto produzidas durante TFDa com azul de metileno, clorina-e6 e;
- Avaliar a cinética de fotodegradação durante a TFDa para azul de metileno, clorina-e6 e curcumina.

3 Material e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Cepas bacteriana

Neste estudo, foram utilizados as cepas:

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212);
- *Cutibacterium acnes* (ATCC 6919);

3.1.2 Meios de cultivo

- Caldo infusão de cérebro e coração (*brain heart infusion* – BHI; Kasvi, PR, Brasil): Infusão de Cérebro de Bezerro 20%; Infusão de Coração Bovino 25%; Protease peptona 1%; Cloreto de sódio 0,5%; Dextrose 0,2%; Fosfato Dissódico 0,25%.

- Ágar sangue de carneiro (Laborclin, PR, Brasil): sangue de carneiro desfibrinado 5%; BHI 2,6%; TSA 2%; extrato de levedura 1%.

- *Reinforced Clostridium Medium* (Ágar) (HIMEDIA ®) enriquecido com hemina (Sigma Chemical Co. St Louis, MD).

- Caldo Triptona Soja (*Tryptic Soy Broth* – TSB, Kasvi, PR, Brasil)

As cepas anaeróbias foram cultivadas em atmosfera livre de oxigênio em jarra de anaerobiose.

3.1.3 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores utilizados foram o azul de metileno, a clorina-e6 e a curcumina.

A clorina-e6 e a curcumina, ambas sintéticas, foram fornecidas pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia (Departamento de Química) da UFSCar (ULIANA et al., 2014; CARMONA-VARGAS et al., 2017), enquanto o azul de metileno (M9140-25G) foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA).

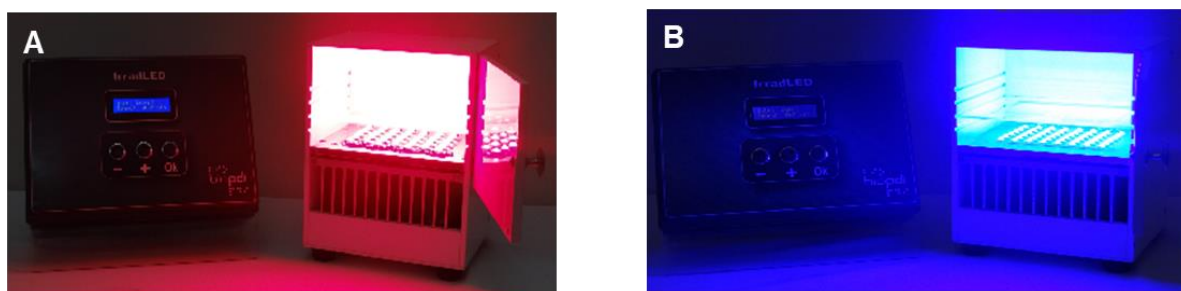
A solução estoque do azul de metileno foi preparado em água deionizada na concentração de 10 mg/mL, e as diluições foram feitas em meio de cultura líquido. A solução estoque de clorina-e6 foi preparada em 10% DMSO na concentração final de 2 mg/mL, e as diluições foram preparadas em

meio de cultura líquido. A solução estoque de curcumina foi preparada em 100% DMSO, e as diluições foram realizadas em sacarose 0,5%.

3.1.4 Fontes de luz

As fontes de luz (Figura 6) utilizadas foram sistemas a base de LEDs, de comprimento de onda de emissão adequado a cada fotossensibilizador (450 e 660 nm), fabricados pela empresa BioPDI (São Carlos, SP, Brasil). O dispositivo é composto por fonte de irradiação com comprimento de onda fixo e um módulo eletrônico que controla a intensidade dos LEDs e o tempo de irradiação. Esse sistema possui 48 LEDs, com potência elétrica individual de 3 W, dispostos em uma matriz com uma área de irradiação de 16 cm de largura por 11 cm de profundidade, dentro de uma câmara escura. Possui também 4 níveis de alocação para o suporte de acrílico onde as amostras são apoiadas, podendo distanciar de 2 à 7 centímetros dos LEDs (<https://biopdi.com.br>). Nas intensidades de luz até 61 mW/cm² a luz é irradiada de modo contínuo, acima desta intensidade o sistema fraciona a luz – a luz é ativada por um minuto, seguido de um minuto de escuro, voltando a ativação da luz e assim sucessivamente até o término do tempo total de irradiação. Os espectros de emissão para cada sistema são de 660 nm com 40 nm de largura de banda, e 450 nm com 50 nm de largura de banda.

Figura 6 – Fontes de luz sistema a base de LEDs



Imagens representativas das fontes de luz de 660 nm (A) e 450 nm (B). (Fonte: <http://www.biopdi.com.br>).

3.2 Métodos

3.2.1 Recuperação de unidades formadoras de colônias (UFC) por microplaqueamento

Em placas de 96 poços, foram adicionadas as soluções do fotossensibilizador com o dobro da concentração de trabalho desejada, em duplicatas, com um volume final de 50 µL. A cepa bacteriana crescida em ágar (placas) em estufa a 37°C em anaerobiose, foi raspada da placa e suspensa em 5 mL de caldo, ajustando-se a leitura da densidade óptica em 630 nm (D.O._{630nm}) para 0,08 - 0,1 (~1x10⁸ cél/mL). Alíquotas de 50 µL da suspensão com D.O. 0,08-0,1 foram transferidas para cada um dos poços da placa de 96 poços contendo as soluções preparadas, resultando em um volume final de 100 µL por poço e na diluição das soluções e do inóculo em 50% (concentração final de células ~5x10⁷ cél/mL). Terminado o tempo de incubação dos tratamentos, as suspensões bacterianas de cada poço foram diluídas seriadamente na base 10 até a concentração de ~10¹ cél/mL. Um volume de 5 µL de cada diluição foi plaqueado em gota em placa de ágar. As colônias bacterianas formadas foram contadas após 48 horas de crescimento a 37°C em anaerobiose.

3.2.2 Estudo *in vitro* da Terapia Fotodinâmica em suspensão bacteriana

Com base no trabalho de De Annunzio et al., (2018), foram escolhidas as concentrações e parâmetros para suspensão de *E. faecalis* presentes na tabela 1 (DE ANNUNZIO et al., 2018).

Tabela 1 - Concentrações e parâmetros utilizados para cada fotossensibilizador em suspensão de *E. faecalis*

Fotossensibilizador	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Doses (J/cm^2)	Intensidade (mW/cm^2)
Azul de Metileno	12,5; 25; 50; 75; 100	80; 100; 120	61 (contínuo); 153 (fracionado)
Clorina-e6	12,5; 25; 50; 75; 100	30; 45; 60	61 (contínuo); 153 (fracionado)
Curcumina	6,25; 12,5; 25; 50	12,5; 18,75; 25	103 (contínuo); 151 (fracionado)

Com base no trabalho de De Annunzio et al., (2018), foram escolhidas as concentrações e parâmetros para suspensão de *C. acnes* presentes na tabela 2 (DE ANNUNZIO et al., 2018).

Tabela 2 - Concentrações e parâmetros utilizados para cada fotossensibilizador em suspensão de *C. acnes*

Fotossensibilizador	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Doses (J/cm^2)	Intensidade (mW/cm^2)
Azul de Metileno	12,5; 25; 50	30; 60; 90	61 (contínuo); 151 (fracionado)
Clorina-e6	0,12; 3,12; 12,5	10; 12,5; 15	61 (contínuo); 151 (fracionado)
Curcumina	0,62; 1,25; 2,5	3,13; 6,25; 12,5	103 (contínuo); 107 (fracionado)

As diluições dos fotossensibilizadores foram realizadas com o dobro das concentrações de estudo. O azul de metileno e a clorina-e6 foram diluídos em meio de cultura, a curcumina foi diluída em sacarose 0,5%. Os fotossensibilizadores foram pré-incubados no escuro com a bactéria durante 5 minutos para azul de metileno e curcumina, e durante 10 minutos para clorina-e6. Após este tempo, os grupos teste foram expostos a luz utilizando o sistema

a base de LEDs no comprimento de onda apropriado para cada fotossensibilizadores. Essa exposição foi realizada no modo fracionado, onde a placa é irradiada por um minuto, seguida por um minuto de escuro, sucessivamente até o tempo total da irradiação, e no modo contínuo, onde a placa é irradiada continuamente. Após os tratamentos, as suspensões bacterianas de cada poço foram diluídas seriadamente na base 10 até a concentração de $\sim 10^1$ cél/mL. Um volume de 5 μ L de cada poço foi plaqueado em placa de ágar. As colônias bacterianas formadas foram contadas após 48 horas de crescimento a 37°C em anaerobiose.

Os grupos avaliados foram não tratado (NT), onde a bactéria é incubada no escuro sem o fotossensibilizador, somente com meio de cultura; fotossensibilizador menos, luz mais (F-L+), onde a bactéria é irradiada com luz porém sem a presença do fotossensibilizador; e os grupos tratados com as concentrações de FS segundo descritos nas tabelas 1 e 2.

Foram realizados 3 experimentos independentes em duplicata.

3.2.3 Desenvolvimento de biofilme de 72 horas

Para a realização do desenvolvimento deste modelo de biofilme, técnica *in vitro* (FONTANA *et al.*, 2009), foram utilizadas placas com 96 poços, previamente preparadas com ágar. Para iniciar o crescimento do biofilme foi preparado uma suspensão bacteriana ajustando-se a leitura da densidade óptica em 630 nm ($D.O_{630nm}$) para 0,08-0,1 ($\sim 1 \times 10^8$ cél/mL). Cuidadosamente foram adicionados 150 μ L da suspensão bacteriana em cada poço da placa e incubado em anaerobiose a 37°C por 48 horas. Após 48 horas, foi realizada a troca do meio de cultura, aspirando 150 μ L do meio antigo e adicionando 150 μ L de meio novo e incubamos novamente. Após 24 horas, da troca do meio de cultura, foi retirado o meio de cultura e adicionado o fotossensibilizador na concentração de estudo para realização da TFDa. As concentrações e parâmetros utilizados são apresentadas na tabela 3 (*E. faecalis*) e tabela 4 (*C. acnes*).

Tabela 3 - Concentrações e parâmetros utilizados para cada fotossensibilizador em biofilme de *E. faecalis*

Fotossensibilizador	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Doses (J/cm^2)	Intensidade (mW/cm^2)
Azul de metileno	50; 75; 100; 125; 150	100; 150	46 (contínuo); 153 (fracionado)
Clorina-e6	50; 75; 100; 125; 150	105; 150	46 (contínuo); 153 (fracionado)
Curcumina	25; 50; 75	60; 90	103 (contínuo); 154 (fracionado)

Tabela 4 - Concentrações e parâmetros utilizados para cada fotossensibilizador em biofilme de *C. acnes*

Fotossensibilizador	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Doses (J/cm^2)	Intensidade (mW/cm^2)
Azul de metileno	75; 100; 125	150; 200	46 (contínuo); 122 (fracionado)
Clorina-e6	75; 100; 150	150; 200	46 (contínuo); 122 (fracionado)
Curcumina	6,25; 12,5; 25	45; 60	103 (contínuo); 154 (fracionado)

As diluições dos fotossensibilizadores foram preparadas nas concentrações de estudo, adicionadas nos poços contendo o biofilme e pré-incubados no escuro durante 15 minutos. Após este tempo, os grupos teste foram expostos à luz utilizando o sistema a base de LEDs no comprimento de onda apropriado para cada fotossensibilizadores. Essa exposição foi realizada no modo fracionado e no modo contínuo. Após os tratamentos, os biofilmes foram raspados da base de ágar com auxílio de uma alça de inoculação estéril e o sobrenadante transferido para uma nova placa de 96 poços. Foi realizada a diluição seriada na base 10 até a concentração de $\sim 10^1$ cél/mL e um volume de 5 μL de cada poço foi plaqueado em placa de ágar. As colônias bacterianas

formadas foram contadas após 48 horas de crescimento a 37°C em anaerobiose.

Os grupos avaliados foram não tratado (NT), onde a bactéria é incubada no escuro sem o fotossensibilizador, somente com meio de cultura; e os grupos tratados com as concentrações de FS segundo descritos nas tabelas 3 e 4.

Foram realizados 3 experimentos independentes em quadruplicata.

3.2.4 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio por fluorescência

Os fotossensibilizadores foram diluídos em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2. Foram adicionados em placa preta de 96 poços juntamente com as sondas 3'-p-(aminofenil) fluoresceína (APF; Thermo Fisher Scientific Inc.) e *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG; Thermo Fisher Scientific Inc.) a 6 µM cada em poços distintos. A placa foi irradiada, no modo contínuo e no modo fracionado, por cima e após o tempo total de irradiação foi realizada a leitura de fluorescência no Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT). Os comprimentos de onda de excitação/emissão para APF são 490/515 nm e para SOSG são 505/525 nm. As concentrações, doses e intensidades estão na tabela 5 (parâmetros estudados para *E. faecalis*) e tabela 6 (parâmetros estudados para *C. acnes*).

Tabela 5 – Concentrações e doses utilizadas para quantificação de espécies reativas de oxigênio (parâmetros estudados para *E. faecalis*)

Fotossensibilizador	Concentração (µg/mL)	Dose (J/cm²)
Azul de metileno	100	120
Clorina-e6	50	60
Curcumina	50	25

Tabela 6 - Concentrações e doses utilizadas para quantificação de espécies reativas de oxigênio (parâmetros estudados para *C. acnes*)

Fotossensibilizador	Concentração (µg/mL)	Dose (J/cm²)
Azul de metileno	50	90
Clorina-e6	12,5	15
Curcumina	2,5	12,5

A sonda APF não é fluorescente até reagir com radical hidroxila, ânion peroxinitrito e ânion hipoclorito. Após a oxidação, a sonda exibe fluorescência verde brilhante.

A sonda SOSG apresenta inicialmente fluorescência azul fraca, com picos de excitação a 372 e 393 nm e picos de emissão a 395 e 416 nm. Na presença de oxigênio singleto, ele emite uma fluorescência verde semelhante à da fluoresceína (excitação/emissão máxima aproximadamente 504/525 nm).

3.2.5 Fotodegradação

Photobleaching refere-se à destruição irreversível do fotossensibilizador durante TFD (DYSART et al., 2005). O experimento foi realizado no Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT). As doses e concentrações avaliadas estão na tabela 7 (parâmetros estudados para *E. faecalis*) e tabela 8 (parâmetros estudados para *C. acnes*).

Tabela 7 - Concentrações e dose utilizada para fotodegradação (parâmetros estudados para *E. faecalis*)

Fotossensibilizador	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Dose (J/cm^2)
Azul de metileno	75	120
Clorina-e6	100	60
Curcumina	50	25

Tabela 8 - Concentrações e dose utilizada para fotodegradação (parâmetros estudados para *C. acnes*)

Fotossensibilizador	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Dose (J/cm^2)
Azul de metileno	50	90
Clorina-e6	12,5	15
Curcumina	2,5	12,5

O azul de metileno e a clorina-e6 foram diluídos em água e a curcumina em sacarose 0,5%, que também foram utilizados como padrão branco. Foi realizado o espectro de absorvância (300 a 800 nm) em cinco tempos.

3.2.6 Análises estatísticas

Foram realizados teste de análise de variância - ANOVA *one way* com pós teste Tukey e teste t com nível de significância de 5%, ou seja, $p < 0.05$. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

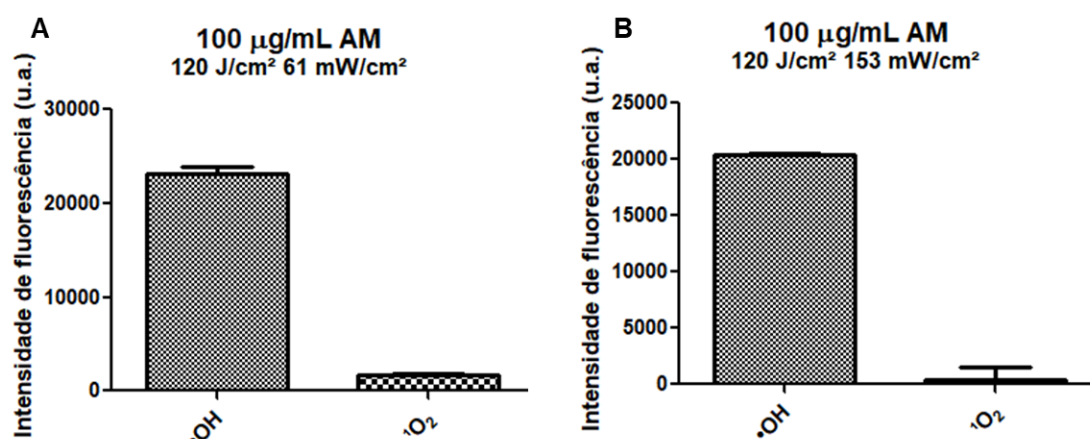
4 Resultados e Discussões

4.1 Estudo I – Avaliação dos fotossensibilizadores

4.1.1 Quantificação de espécies reativas de oxigênio para azul de metileno

A quantificação de espécies reativas de oxigênio empregando o azul de metileno nas condições estudadas para *E. faecalis* (concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e dose de 120 J/cm^2), revelou uma maior produção de espécies radicalares (reação do tipo I) do que oxigênio singlete (reação do tipo II) em ambas as intensidades utilizadas (Fig. 7).

Figura 7 – Geração de espécies reativas de oxigênio pelo azul de metileno na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$

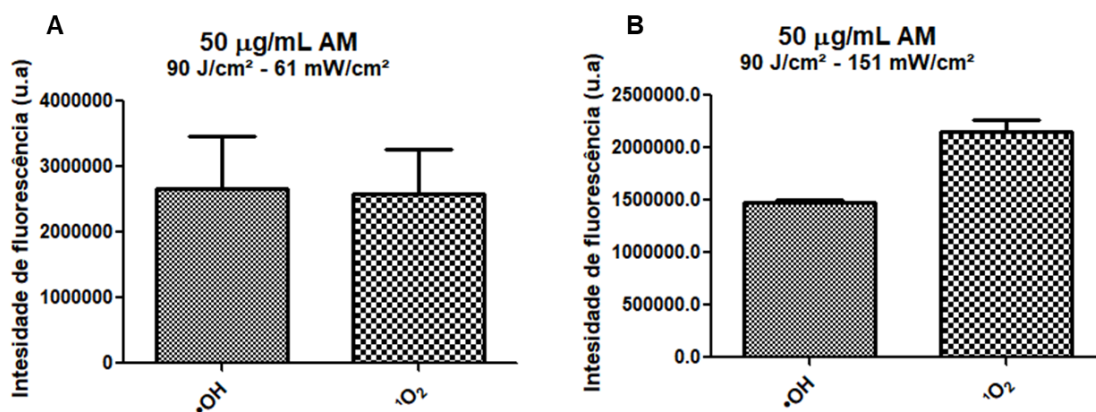


Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio por fluorescência de azul de metileno na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, dose de luz de 120 J/cm^2 e intensidades de 61 mW/cm^2 de modo contínuo (A) e 153 mW/cm^2 de modo fracionado (B). A análise estatística (test t) não revelou diferenças significativas inter grupos ($p > 0,05$ para todos os testes).

A quantificação de espécies reativas de oxigênio empregando o azul de metileno nos parâmetros estudados para *C. acnes* (concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e dose de 90 J/cm^2), revelou uma produção semelhante de espécies radicalares (reação do tipo I) e oxigênio singlete (reação do tipo II) quando utilizado a intensidade menor (61 mW/cm^2) (Fig. 8A). Porém quando utilizado a

intensidade maior (151 mW/cm^2) a produção de oxigênio singlete foi maior (Fig. 8B) que a produção de espécies radicalares.

Figura 8 – Geração de espécies reativas de oxigênio pelo azul de metileno na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$

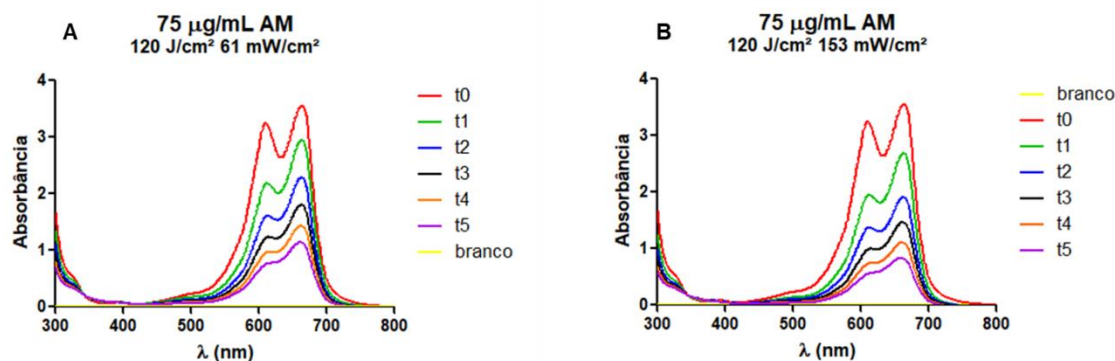


Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio por fluorescência de azul de metileno na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ e dose de luz de 90 J/cm^2 e intensidade de 61 mW/cm^2 de modo contínuo (A) e intensidade de 151 mW/cm^2 de modo fracionado (B). A análise estatística (test t) não revelou diferenças significativas inter grupos ($p > 0,05$ para todos os testes).

4.1.2 Ensaio de fotodegradação para o azul de metileno

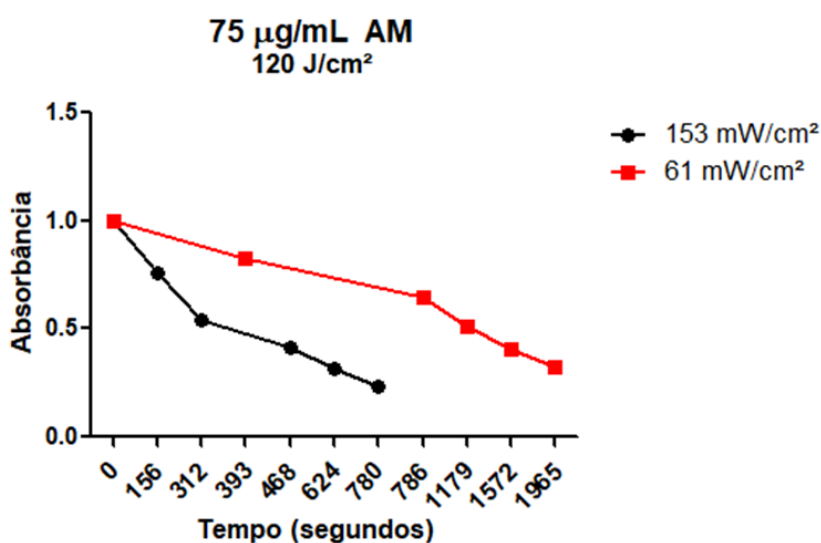
A partir dos dados de avaliação da cinética de fotodegradação do azul de metileno nos parâmetros estudados para *E. faecalis* (concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ e dose de luz de 120 J/cm^2), observou-se que em ambas intensidades, 61 mW/cm^2 (Fig. 9A) e 153 mW/cm^2 (Fig. 9B), a absorvância diminuiu em relação ao tempo, não apresentando nenhum deslocamento, surgimento ou desaparecimento de banda. Quando observada a absorvância no comprimento de onda de 660 nm utilizando a intensidade de 61 mW/cm^2 de modo contínuo, a taxa de fotodegradação foi menor comparada à irradiação de intensidade de 153 mW/cm^2 de modo fracionado (Fig. 10).

Figura 9 – Fotodegradação do azul de metileno na concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$



Espectros de absorvância do azul de metileno na concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$, dose de 120 J/cm^2 e nas intensidades de 61 mW/cm^2 de modo contínuo (t_0 : 0 seg.; t_1 : 393 segs.; t_2 : 786 segs.; t_3 : 1.179 segs.; t_4 : 1.572 segs.; t_5 : 1.965 segs.) (A) e 153 mW/cm^2 de modo fracionado (t_0 : 0 seg.; t_1 : 156 segs.; t_2 : 312 segs.; t_3 : 468 segs.; t_4 : 624 segs.; t_5 : 780 segs.) (B).

Figura 10 – Taxa de fotodegradação do azul de metileno na concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$

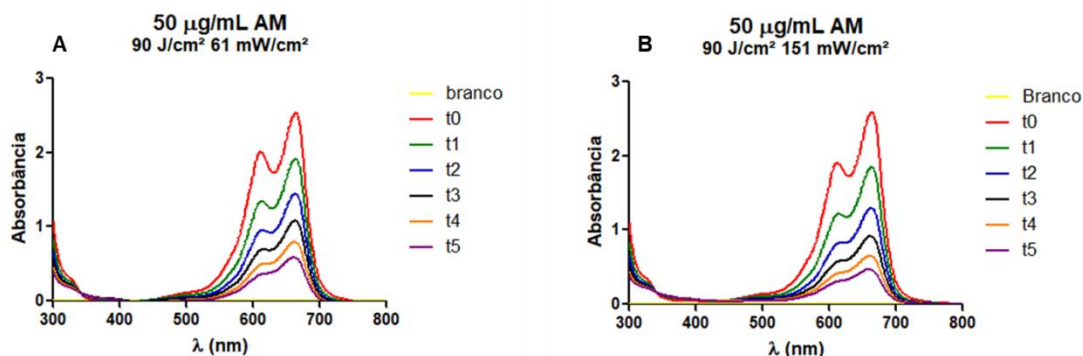


Taxa de fotodegradação em 660 nm do azul de metileno para concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$, dose de 120 J/cm^2 e intensidades de 61 mW/cm^2 de modo contínuo (em vermelho) e 153 mW/cm^2 de modo fracionado (em preto).

A partir dos dados de avaliação da cinética de fotodegradação do azul de metileno nos parâmetros estudados para *C. acnes* (concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e dose de 90 J/cm^2), foi possível verificar que em ambas intensidades, 61 mW/cm^2 (Fig. 11A) e 151 mW/cm^2 (Fig. 11B) a absorvância diminui em relação ao tempo, não apresentando nenhum deslocamento, surgimento ou

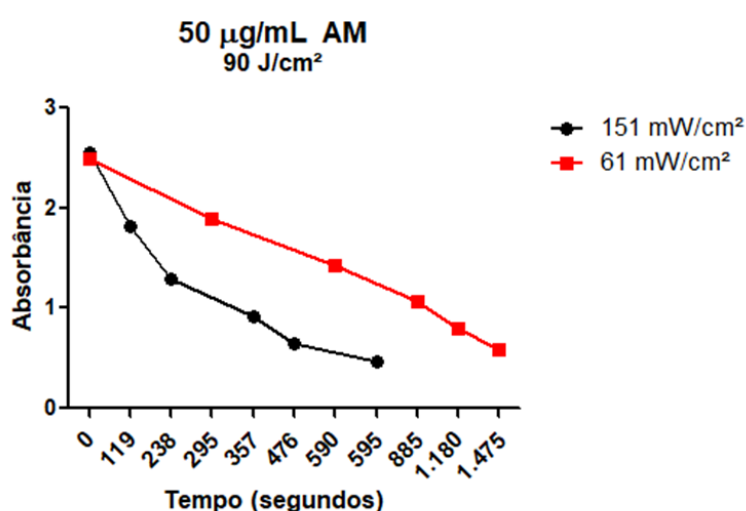
desaparecimento de banda. Quando observada a absorvância no comprimento de onda de 660 nm utilizando a intensidade de 61 mW/cm², a taxa de fotodegradação foi menor comparada a irradiação de intensidade de 151 mW/cm² (Fig. 12).

Figura 11 – Fotodegradação do azul de metileno na concentração de 50 µg/mL



Espectros de absorvância do azul de metileno na concentração de 50 µg/mL, dose de 90 J/cm² nas intensidades de 61 mW/cm² de modo contínuo (t0: 0 seg.; t1: 295 segs.; t2: 590 segs.; t3: 885 segs.; t4: 1.180 segs.; t5: 1.475 segs.) (A) e 151 mW/cm de modo fracionado (t0: 0 seg.; t1: 119 segs.; t2: 238 segs.; t3: 357 segs.; t4: 476 segs.; t5: 595 segs.) (B).

Figura 12 – Taxa de fotodegradação do azul de metileno na concentração de 50 µg/mL

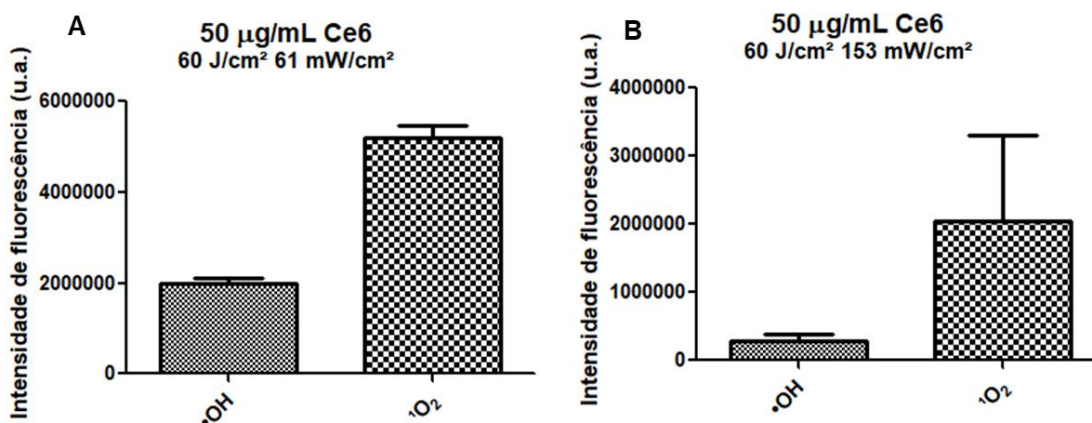


Taxa de fotodegradação em 660 nm do azul de metileno na concentração de 50 µg/mL, dose de 90 J/cm² e intensidades de 61 mW/cm² de modo contínuo (em vermelho) e 153 mW/cm² de modo fracionado (em preto).

4.1.3 Quantificação de espécies reativas de oxigênio para clorina-e6

A partir do ensaio fotodinâmico mediado por clorina-e6 nos parâmetros estudados para *E. faecalis* (concentração de 50 µg/mL e dose de 60 J/cm²), foi possível observar uma maior produção de oxigênio singlete do que espécies radicalares em ambas intensidades (Fig. 13).

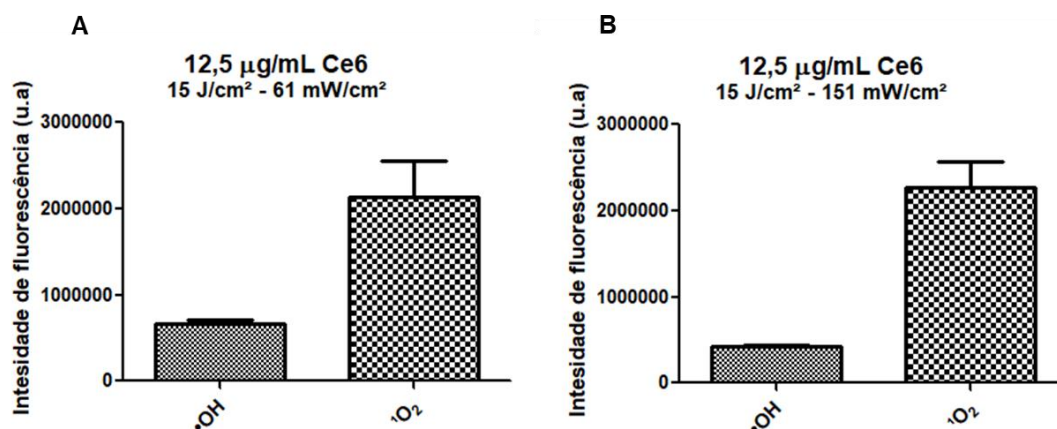
Figura 13 – Geração de espécies reativas de oxigênio pela clorina-e6 na concentração de 50 µg/mL



Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio por fluorescência de clorina-e6 na concentração de 50 µg/mL, dose de luz de 60 J/cm² e intensidades de 61 mW/cm² de modo contínuo (A) e 153 mW/cm² de modo fracionado (B). A análise estatística (test t) não revelou diferenças significativas inter grupos ($p > 0,05$ para todos os testes).

A quantificação de espécies reativas de oxigênio empregando o clorina-e6 nos parâmetros estudados para *C. acnes* (concentração de 12,5 µg/mL e dose de 15 J/cm²), revelou uma produção maior de oxigênio singlete (reação do tipo II) do que espécies radicalares (reação do tipo I) tanto para a intensidade menor (61 mW/cm²) (Fig. 14A) quanto para intensidade maior (151 mW/cm²) (Fig.14B).

Figura 14 – Geração de espécies reativas de oxigênio pela clorina-e6 na concentração de 12,5 µg/mL

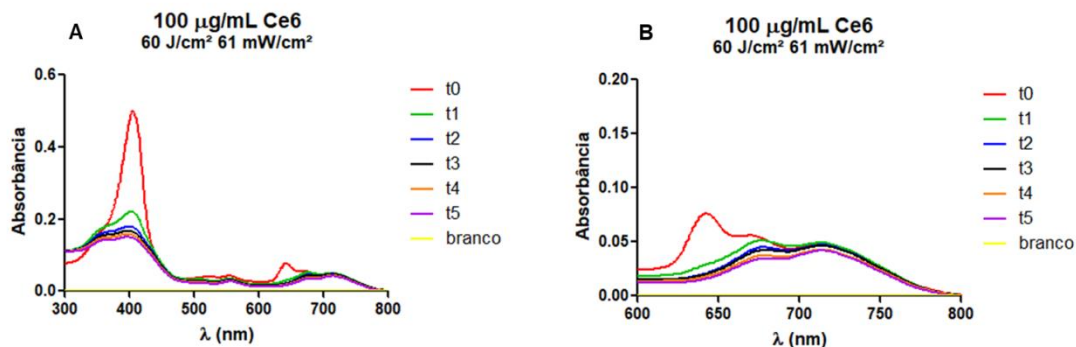


Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio por fluorescência de clorina-e6 na concentração de 12,5 µg/mL, dose de luz de 15 J/cm² e intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo (A) e intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado (B). A análise estatística (test t) não revelou diferenças significativas inter grupos ($p > 0,05$ para todos os testes).

4.1.4 Ensaio de fotodegradação para clorina-e6

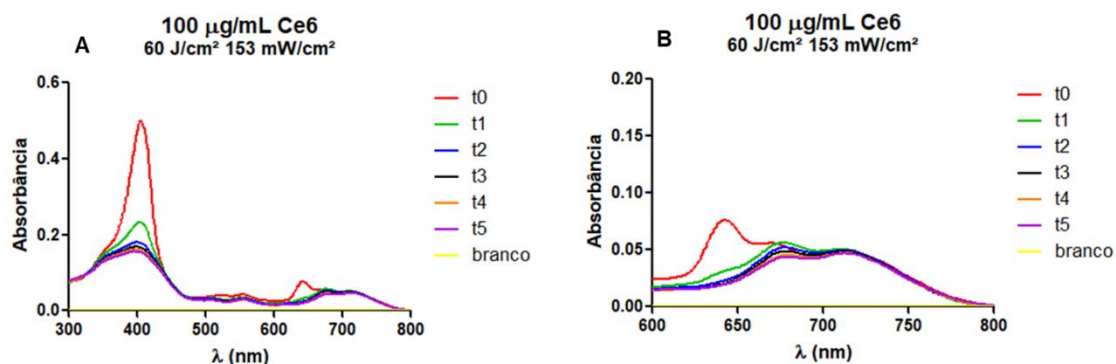
Quanto aos ensaios utilizando a clorina-e6 nos parâmetros estudados para *E. faecalis* (concentração de 50 µg/mL na e dose de 60/cm²), na faixa do comprimento de onda de 660 nm, observou-se que para ambas as intensidades, de 61 mW/cm² (Fig. 15) e de 153 mW/cm² (Fig. 16), o ocorreu o consumo do FS com a diminuição da absorbância, porém, menos acentuado do que para o azul de metileno. Quanto à taxa de fotodegradação, ela foi maior quando irradiada com a intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo (Fig. 17).

Figura 15 – Fotodegradação da clorina-e6 na intensidade de 61 mW/cm² na concentração de 100 µg/mL



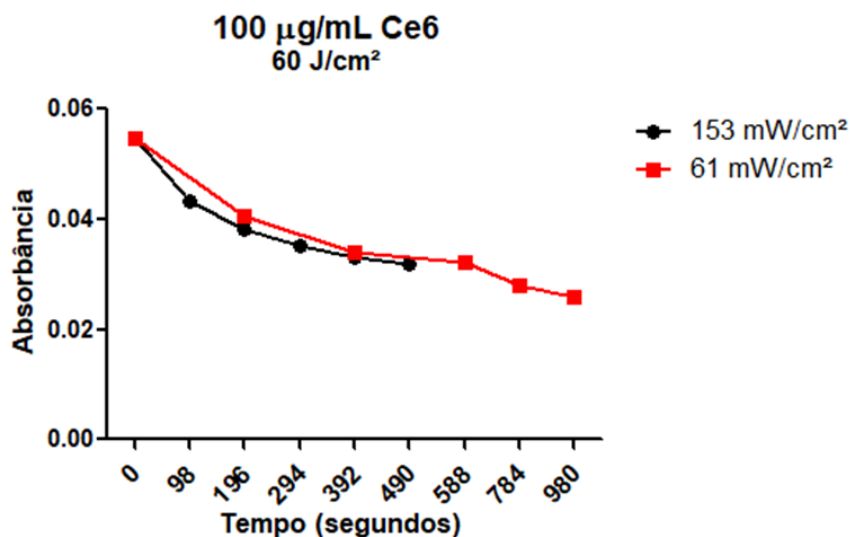
Espectro de absorvância da clorina-e6 na concentração de 100 µg/mL, na dose de 60 /cm² e intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo (A) e mesmo espectro de absorvância ampliado para região de 600 – 800 nm (B) (t0: 0 seg.; t1: 196 segs.; t2: 392 segs.; t3: 588 segs.; t4: 784 segs.; t5: 980 segs.).

Figura 16 – Fotodegradação da clorina-e6 na intensidade de 153 mW/cm² na concentração de 100 µg/mL



Espectro de absorvância da clorina-e6 na concentração de 100 µg/mL, dose de 60 /cm² e intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado (A) e mesmo espectro de absorvância ampliado para região de 600 – 800 nm (B) (t0: 0 seg.; t1: 98 segs.; t2: 196 segs.; t3: 294 segs.; t4: 392 segs.; t5: 490 segs.).

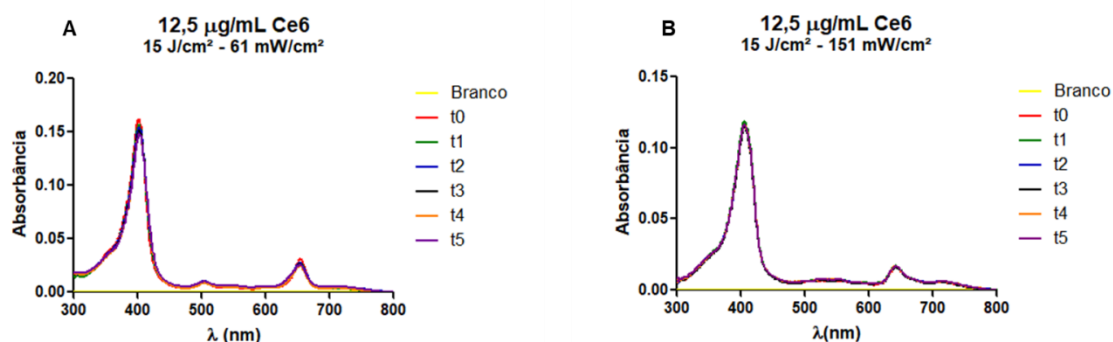
Figura 17 – Taxa de fotodegradação da clorina-e6 na concentração de 100 µg/mL



Taxa de fotodegradação em 660 nm da clorina-e6 na concentração de 100 µg/mL, dose de 60 J/cm² e intensidades de 61 mW/cm² de modo contínuo (em vermelho) e 153 mW/cm² de modo fracionado (em preto).

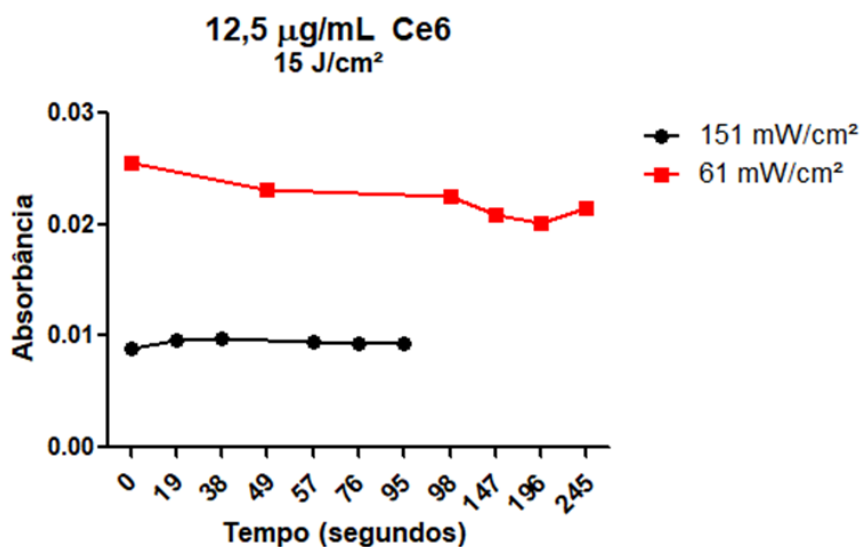
Quanto aos ensaios utilizando a clorina-e6 nos parâmetros estudados para *C. acnes* (concentração de 12,5 µg/mL e dose de 15 J/cm²), observou-se que para ambas intensidades, 61 mW/cm² (Fig. 18A) e 151 mW/cm² (Fig. 18B) o consumo do FS foi baixo bem como a taxa de fotodegradação (Fig. 19).

Figura 18 – Fotodegradação da clorina-e6 na concentração de 12,5 µg/mL



Espectros de absorbância da clorina-e6 na concentração de 12,5 µg/mL, dose de 15 J/cm² e intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo (t0: 0 seg.; t1: 49 segs.; t2: 98 segs.; t3: 147 segs.; t4: 196 segs.; t5: 245 segs.) (A) e 151 mW/cm² de modo fracionado (t0: 0 seg.; t1: 19 segs.; t2: 38 segs.; t3: 57 segs.; t4: 76 segs.; t5: 95 segs.) (B).

Figura 19 – Taxa de fotodegradação da clorina-e6 na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$

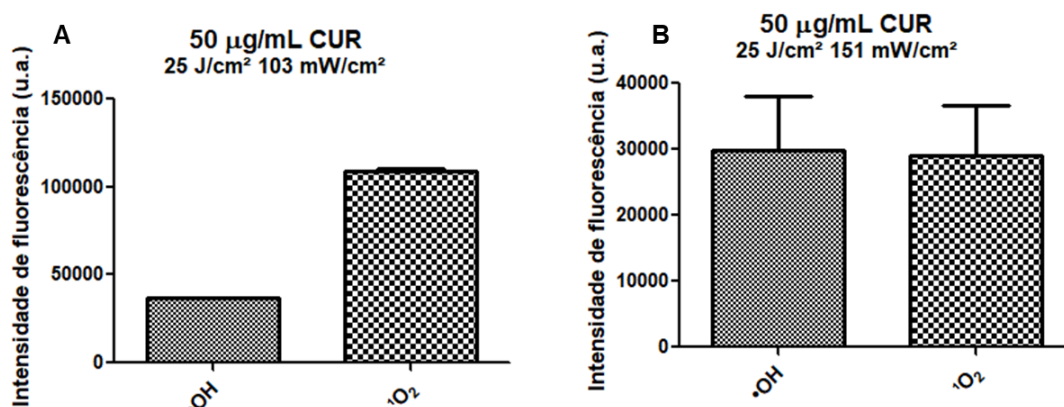


Taxa de fotodegradação em 660 nm da clorina-e6 na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, dose de 15 J/cm² e intensidades de 61 mW/cm² de modo contínuo (em vermelho) e 151 mW/cm² de modo fracionado (em preto).

4.1.5 Quantificação de espécies reativas de oxigênio para curcumina

A partir dos dados obtidos com os ensaios utilizando a curcumina como FS nos parâmetros estudados para *E. faecalis* (concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e dose de 25 J/cm²), verificou-se que a curcumina produz mais oxigênio singleto quando utilizado a menor intensidade de 103 mW/cm² (Fig. 20A) porém produz similarmente espécies radicalares e oxigênio singleto quando utilizado a maior intensidade de 151 mW/cm² (Fig. 20B).

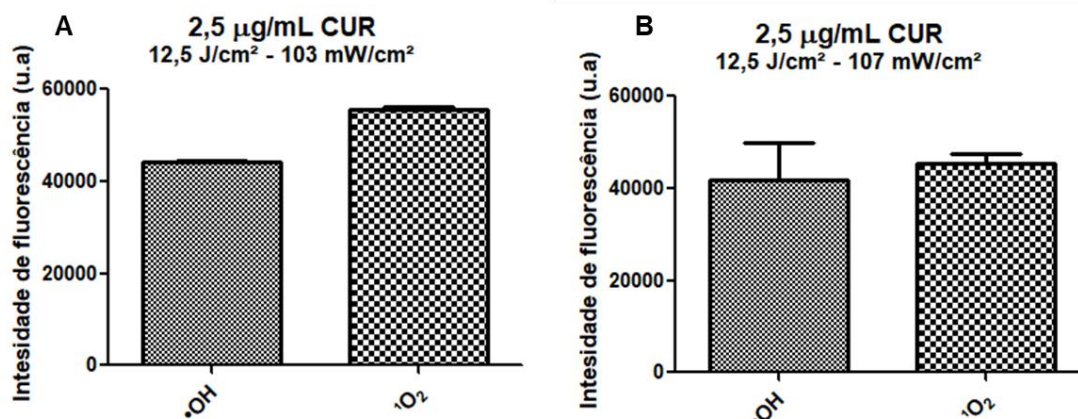
Figura 20 – Geração de espécies reativas de oxigênio pela curcumina na concentração de 50 µg/mL



Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio por fluorescência de curcumina na concentração de 50 µg/mL, dose de luz de 25 J/cm² e intensidades de 103 mW/cm² de modo contínuo (A) e 151 mW/cm² de modo fracionado (B). A análise estatística (test t) não revelou diferenças significativas inter grupos ($p > 0,05$ para todos os testes).

A quantificação de espécies reativas de oxigênio empregando a curcumina nos parâmetros estudados para *C. acnes* (concentração de 2,5 µg/mL e dose de 12,5 J/cm²) revelou uma produção maior de oxigênio singleto quando utilizado a intensidade menor de 103 mW/cm² (Fig. 21A) e uma produção semelhante de espécies radicalares (reação do tipo I) e oxigênio singleto (reação do tipo II) quando utilizado a maior intensidade de 107 mW/cm² (Fig. 21B).

Figura 21 – Geração de espécies reativas de oxigênio pela curcumina na concentração de 2,5 µg/mL

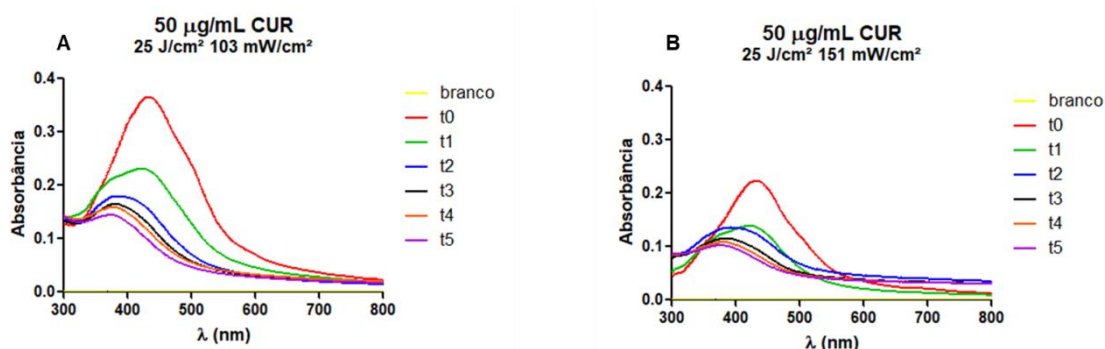


Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio por fluorescência de curcumina na concentração de 2,5 µg/mL, dose de luz de 12,5 J/cm² e intensidade de 103 mW/cm² de modo contínuo (A) e intensidade de 107 mW/cm² de modo fracionado (B). A análise estatística (test t) não revelou diferenças significativas inter grupos ($p > 0,05$ para todos os testes).

4.1.6 Ensaio de fotodegradação para curcumina

Avaliando a curcumina nos parâmetros estudados para *E. faecalis* (concentração de 50 µg/mL e dose de 25 J/cm²), para ambas as intensidades, 103 mW/cm² (Fig. 22A) e 151 mW/cm² (Fig. 22B), observa-se um deslocamento do pico de absorção, passando de 440 nm para 380 nm, enquanto que a taxa de degradação da irradiação com intensidade de 103 mW/cm² demonstra uma maior de degradação do que a intensidade de 151 mW/cm² (Fig. 23).

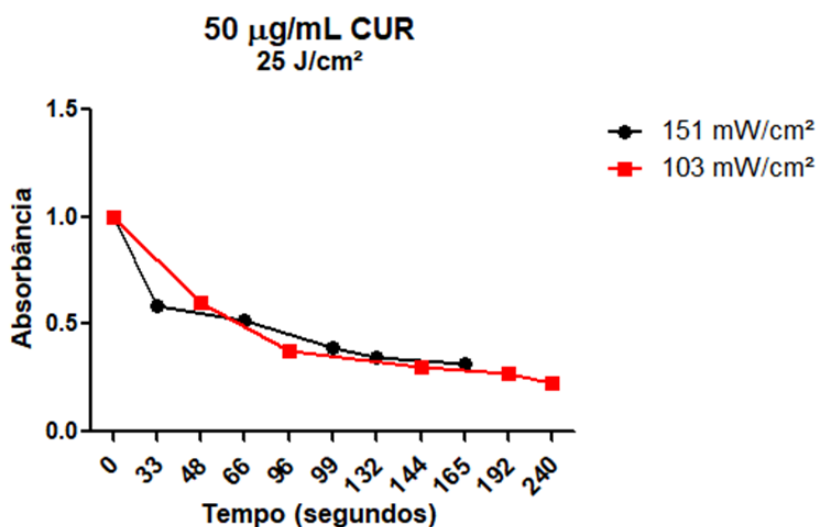
Figura 22 – Fotodegradação da curcumina na concentração de 50 µg/mL



Espectros de absorvância da curcumina na concentração de 50 µg/mL, dose de luz de 25 J/cm² e intensidades de 103 mW/cm² de modo contínuo (t0: 0 seg.; t1: 48 segs.; t2: 96 segs.;

t_3 : 144 segs.; t_4 : 192 segs.; t_5 : 240 segs.) (A) e 151 mW/cm² de modo fracionado (t_0 : 0 seg.; t_1 : 33 segs.; t_2 : 66 segs.; t_3 : 99 segs.; t_4 : 132 segs.; t_5 : 165 segs.) (B).

Figura 23 – Taxa de fotodegradação da curcumina na concentração de 50 µg/mL



Taxa de fotodegradação em 450 nm da curcumina na concentração de 50 µg/mL, dose de 25 J/cm² e intensidades de 103 mW/cm² de modo contínuo (em vermelho) e 151 mW/cm² de modo fracionado (em preto).

Para a concentração de 2,5 µg/mL de curcumina não foi detectado sinal de absorbância.

4.1.7 Discussão

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas e radicais livres derivados do oxigênio molecular (TURREN, 2003). Um radical livre é um átomo ou molécula que contenha um ou mais elétrons não pareados. Os elétrons não pareados alteram a reatividade química de um átomo ou molécula, geralmente tornando-a mais reativa do que o correspondente não radical. Algumas espécies de radicais livres são oxigênio singleto (¹O₂); radical superóxido (O₂⁻); radical hidroxila (OH[·]); peróxido de hidrogênio (H₂O₂) entre outros (HALLIWELL, 1994).

Quantificando as espécies reativas de oxigênio geradas pelo AM durante iluminação em 660 nm, foi possível observar uma maior produção de espécies

radicalares (o que indica a ocorrência de reação do tipo I) do que oxigênio singleto (reação tipo II). Esses achados sugerem que o azul de metileno estava agregado, com uma alta concentração de dímeros. Junqueira et al., (2002) descreveram que dependendo da razão molar de fotossensibilizador, os dímeros de AM são favorecidos, e a fotoquímica do mesmo é deslocada de gerador de oxigênio singleto para gerador de espécies radicalares, sem adição de qualquer outro agente fotoativo ou redox. Nuñez et al., (2015), relataram que agregados de AM tendem para as reações de transferência de elétrons (reação tipo I), enquanto os monômeros para as reações de transferência de energia (reação tipo II). Quanto à quantificação utilizando AM para *C. acnes*, foi possível observar uma produção similar de espécies radicalares e oxigênio singleto quando utilizado a intensidade de 61 mW/cm², e quando utilizado a intensidade de 153 mW/cm², houve uma maior produção de oxigênio singleto (o que indica maior ocorrência de reação do tipo II) do que espécies radicalares (reação tipo I). Esses achados sugerem que o azul de metileno estava pouco agregado, com uma baixa concentração de dímeros, diferente do encontrado para *E. faecalis*. Em um estudo conduzido por Tardivo et al., (2005), os autores relataram que em soluções homogêneas, onde não há dímeros, o AM quando irradiado, produz tripleto com alto rendimento quântico funcionando como uma fonte geradora de oxigênio singleto (reação tipo II). Porém quando há altas concentrações de dímeros na solução, a geração de espécies reativas de oxigênio é deslocada da reação do tipo II para a reação do tipo I, cessando a produção de oxigênio singleto. Dessa forma, os resultados encontrados estão de acordo com a literatura.

No teste de avaliação da cinética de fotodegradação do AM para as duas concentrações avaliadas, observou-se que em ambas as intensidades a absorvância diminui em relação ao tempo, não apresentando nenhum deslocamento, surgimento ou desaparecimento de pico. Ao observar a absorvância no comprimento de onda de 660 nm foi possível verificar que a aplicação da luz em uma intensidade menor resultou em uma taxa de fotodegradação menor quando comparada com a intensidade maior de irradiação. Além disso, foi observado um primeiro pico no comprimento de onda de aproximadamente 600 nm o que indica agregação do AM, possivelmente devido à alta concentração do FS. No entanto, com o passar do tempo, durante

a irradiação, foi possível observar que essa molécula fotossensível tende a desagregar com o quase desaparecimento do pico em 600 nm, esse mesmo achado foi observado por Dantas, (2017).

Os resultados obtidos com o ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio utilizando a Ce6 como FS para as duas concentrações testadas, revelou uma maior produção de oxigênio singlete do que espécies radicalares, conforme esperado. Esses dados corroboram com os achados de Freitas et al. (2018) e Garcia-Diaz et al., (2016).

Quanto à avaliação da cinética de fotodegradação da Ce6 em maior concentração (100 µg/mL), foi possível verificar que na faixa do comprimento de onda de 660 nm, para ambas as intensidades, houve o consumo do FS com o decréscimo da intensidade da absorbância, porém menos acentuado quando comparado com o AM. Para menor concentração, foi possível verificar que o consumo de FS na maior intensidade foi muito pequeno, já na menor intensidade foi um pouco maior. Além disso, não foi observado deslocamento ou surgimento de banda. Referente à taxa de fotodegradação, notou-se que essa taxa é igual para ambas intensidades utilizadas.

No ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio, foi verificado que a curcumina para as duas concentrações estudadas, produz mais oxigênio singlete quando utilizada a intensidade de 103 mW/cm², mostrando assim, que a CUR não agiu como antioxidante, captando o ¹O₂ do meio. Porém utilizando a intensidade maior, a produção foi similar tanto para espécies radicalares quanto oxigênio singlete. A formação de EROs em decorrência do tratamento fotodinâmico utilizando a CUR como FS já foi descrito por Carmello et al., 2015. Chignell et al. (1994) mostraram que o solvente onde a curcumina é diluída interfere na geração de radicais livres. Quando diluída em tolueno, benzeno e acetonitrila é capaz de produzir uma maior quantidade de oxigênio singlete, enquanto quando diluída em etanol e isopropanol observaram uma queda de 10 vezes na produção de oxigênio singlete. Dahl et al. (1989), observaram a não formação de oxigênio singlete pela curcumina fotoativada e sim a formação de peróxido de hidrogênio.

Quanto à cinética de fotodegradação, foi observado nesse estudo o deslocamento do pico de absorção, passando de 440 nm para 380 nm para ambas as intensidades. Esse deslocamento pode ter sido ocasionado devido à

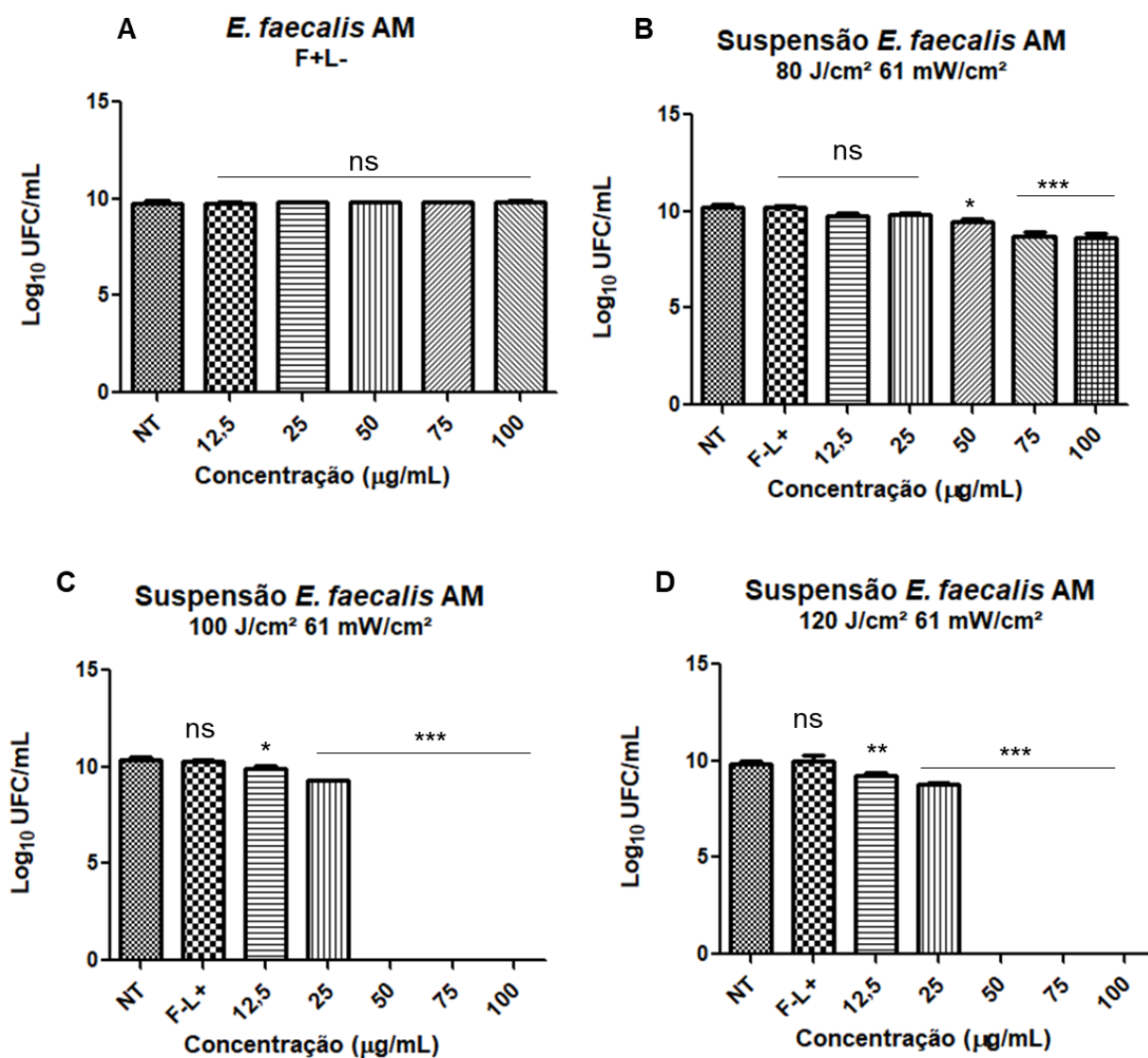
geração de fotorodutos que absorvem luz em comprimentos de onda menores do que a CUR assim como observado por Dantas (2017). Gordon (2014) observou que a curcumina sofre uma autoxidação, clivando a cadeia e gerando um novo produto. A análise espectrofotométrica dessa autoxidação da curcumina mostrou o desaparecimento do pico de 430 nm e surgindo novo pico em 263 nm (GORDON, 2014). Ao que diz respeito à taxa de degradação, ela é igual para ambas intensidades testadas.

4.2 Estudo II: *Enterococcus faecalis*

4.2.1 Terapia fotodinâmica em suspensão

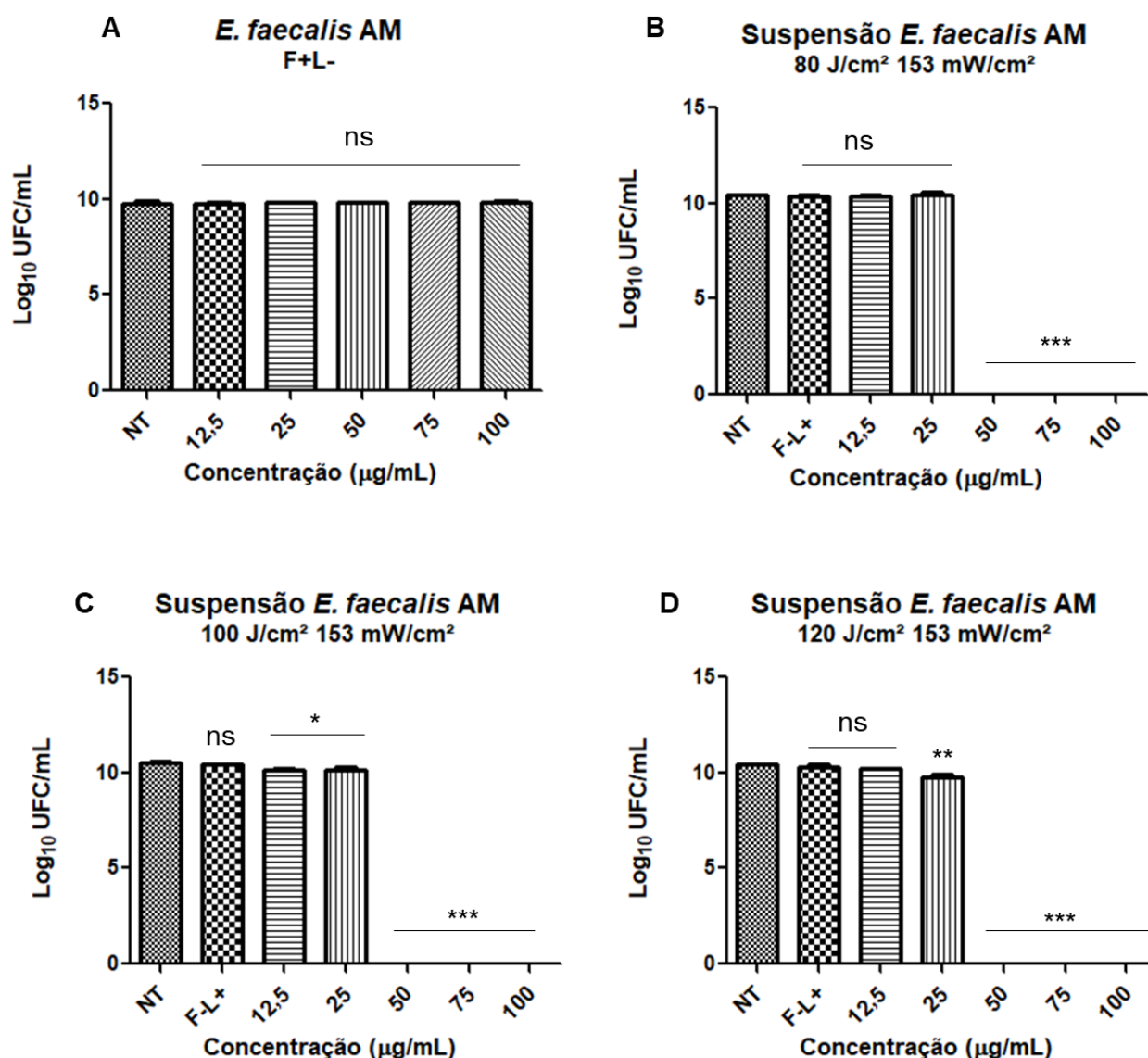
Os resultados do fotossensibilizador azul de metileno na ausência da luz (escuro) mostraram que as concentrações utilizadas não são tóxicas para a bactéria de estudo. Quanto à análise da viabilidade celular empregando o azul de metileno, ao aplicar uma intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo (Figura 24) a redução total da carga microbiana foi obtida a partir da dose de 100 J/cm² e da concentração de 50 µg/mL. Ao passo que quando aplicada a intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado (Figura 25) a mesma morte foi observada utilizando uma dose de luz mais baixa, 80 J/cm².

Figura 24 – TFDa em suspensão de *E. faecalis* com azul de metileno e intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a terapia fotodinâmica em suspensão de *E. faecalis* com azul de metileno no escuro (A) e com intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo e doses de 80 J/cm² (B), 100 J/cm² (C) e 120 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Figura 25 – TFDa em suspensão de *E. faecalis* com azul de metileno e intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado

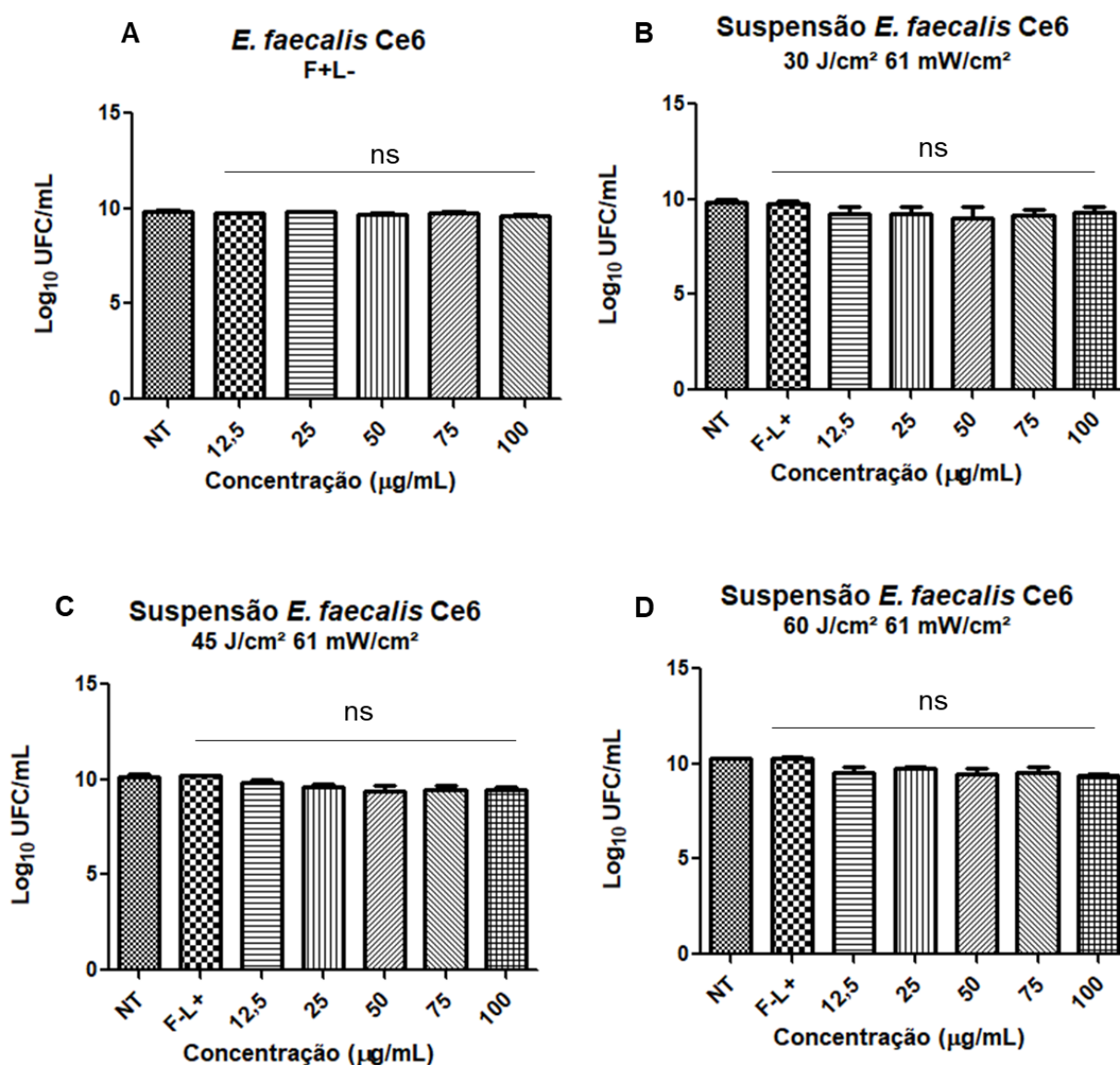


Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *E. faecalis* com azul de metileno no escuro (A) e com intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado e doses de 80 J/cm² (B), 100 J/cm² (C) e 120 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Quando realizada a TFDa mediada por clorina-e6, os resultados do fotossensibilizador na ausência da luz (escuro) mostraram que as concentrações utilizadas não são tóxicas para a bactéria de estudo. Aplicando uma intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo (Fig. 26) não foi observada

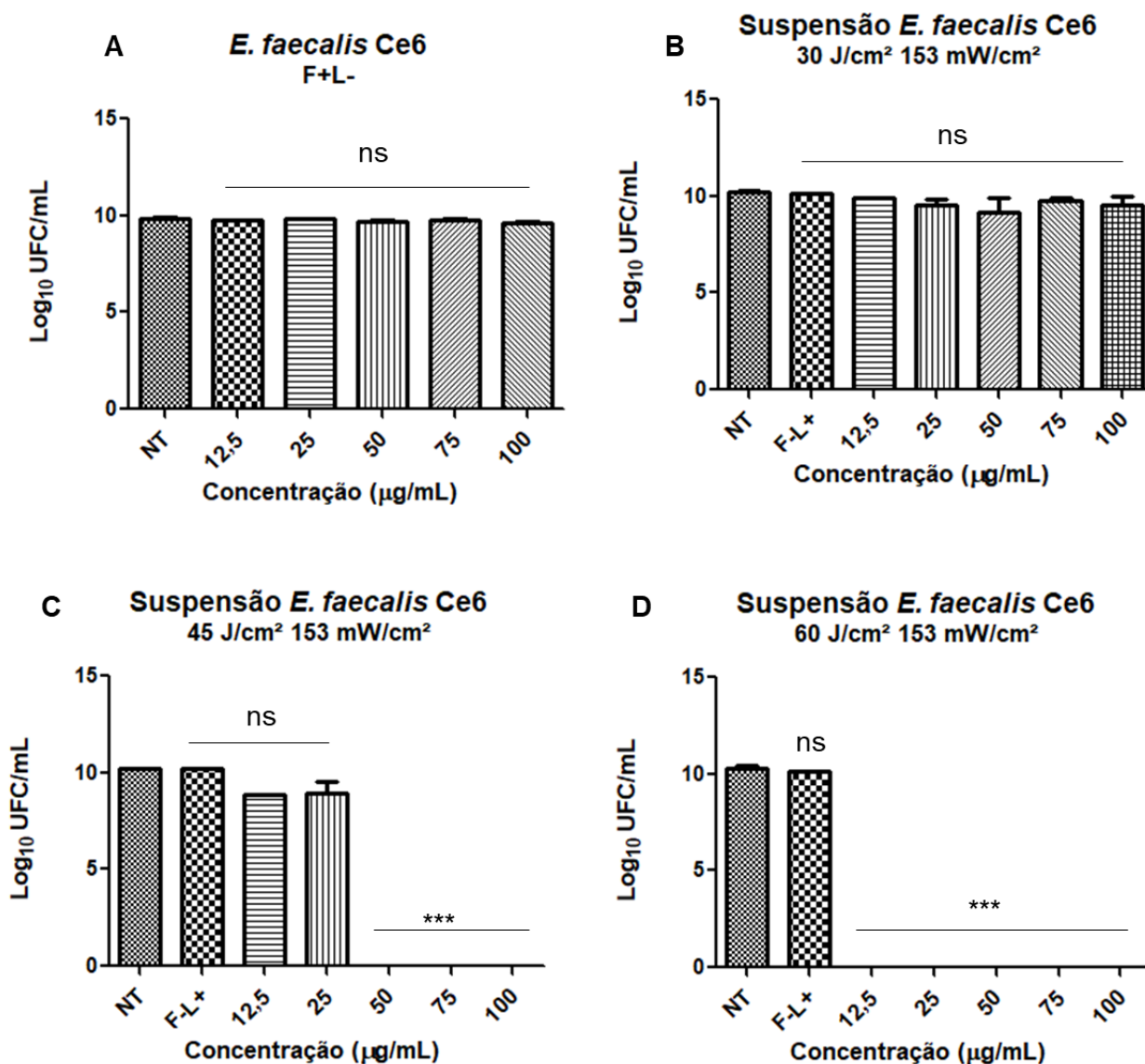
redução da carga bacteriana em nenhuma dose e concentração do FS avaliadas. No entanto, ao aplicar uma intensidade de 153 mW/cm^2 de modo fracionado (Fig. 27) na dose de 45 J/cm^2 a partir da concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ foi obtida a erradicação bacteriana total e ao aumentar a dose de luz para 60 J/cm^2 , o mesmo resultado foi obtido utilizando a menor concentração de clorina-e6 testada ($12,5 \mu\text{g/mL}$).

Figura 26 – TFDa em suspensão de *E. faecalis* com clorina-e6 e intensidade de 61 mW/cm^2 de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *E. faecalis* com clorina-e6 no escuro (A) e com intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo e doses de 30 J/cm² (B), 45 J/cm² (C) e 60 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey.

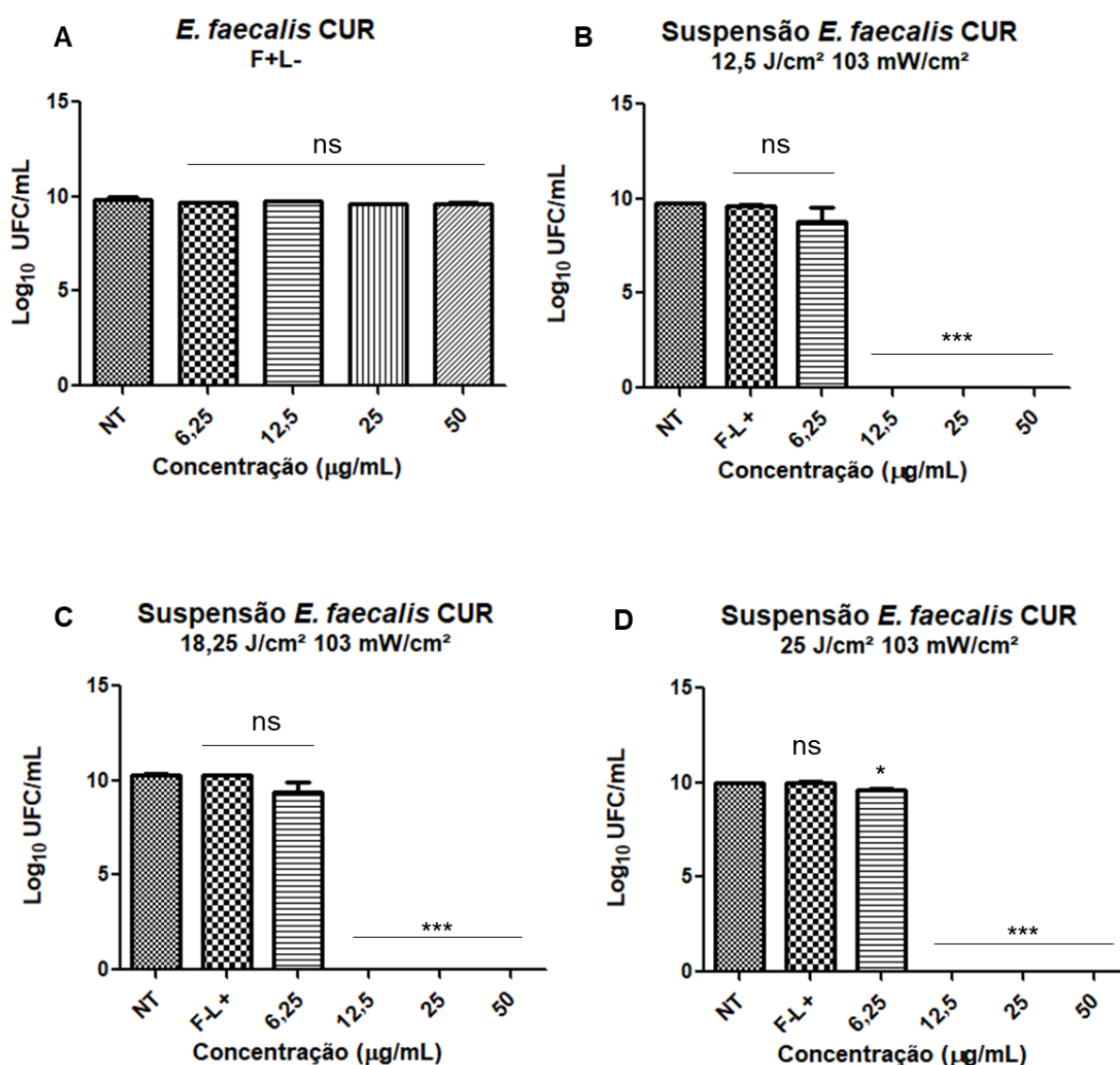
Figura 27 – TFDa em suspensão de *E. faecalis* com clorina-e6 e intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado



Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *E. faecalis* com clorina-e6 no escuro (A) e com intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado e doses de 30 J/cm² (B), 45 J/cm² (C) e 60 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

Utilizando LED azul associado à curcumina aplicando uma intensidade de 103 mW/cm² de modo contínuo (Fig. 28) foi possível verificar a redução total da carga bacteriana a partir da dose de 12,5 J/cm² e da concentração de 12,5 µg/mL, enquanto que empregando a intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado (Fig. 29) observou-se a mesma redução nas doses de 12,5 e 18,25 J/cm² na concentração de 50 µg/mL e na dose de 25 J/cm² a partir da concentração de 25 µg/mL.

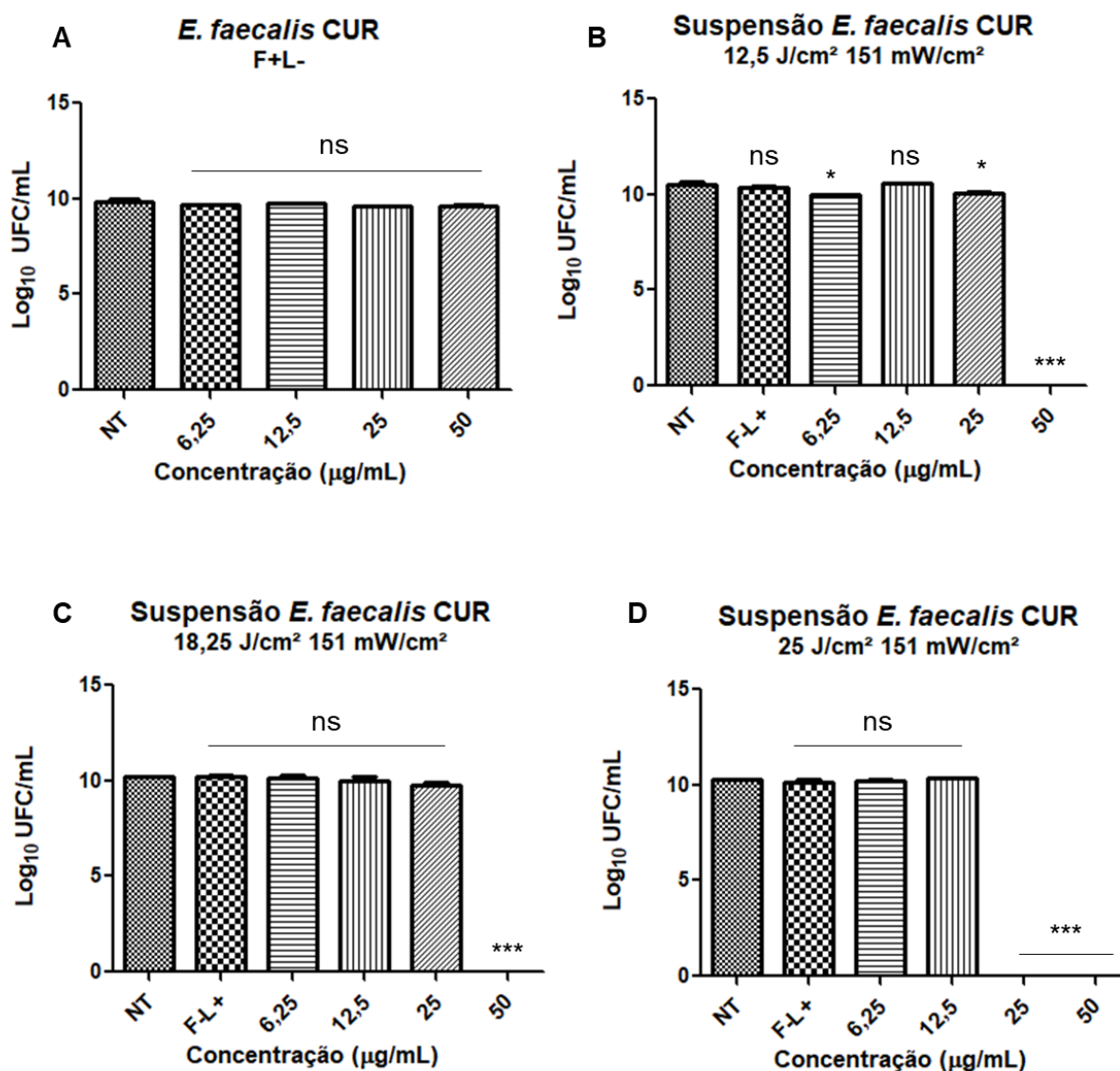
Figura 28 – TFDa em suspensão de *E. faecalis* com curcumina e intensidade de 103 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *E. faecalis* com curcumina no escuro (A) e com intensidade de 103 mW/cm² de modo contínuo e doses de 12,5 J/cm² (B), 18,75 J/cm² (C) e 25 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as

barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Figura 29 – TFDa em suspensão de *E. faecalis* com curcumina e intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado

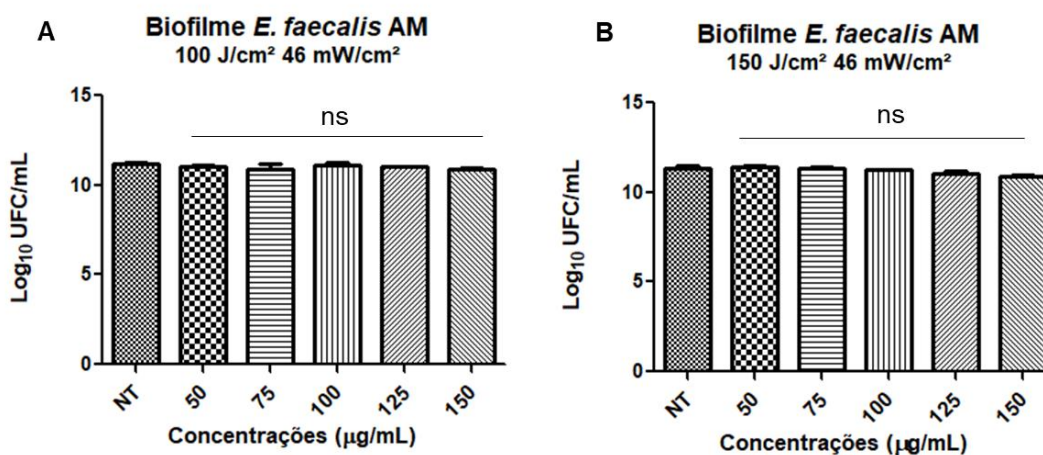


Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *E. faecalis* com curcumina no escuro (A) e com intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado e doses de 12,5 J/cm² (B), 18,75 J/cm² (C) e 25 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

4.2.2 Terapia fotodinâmica em biofilme

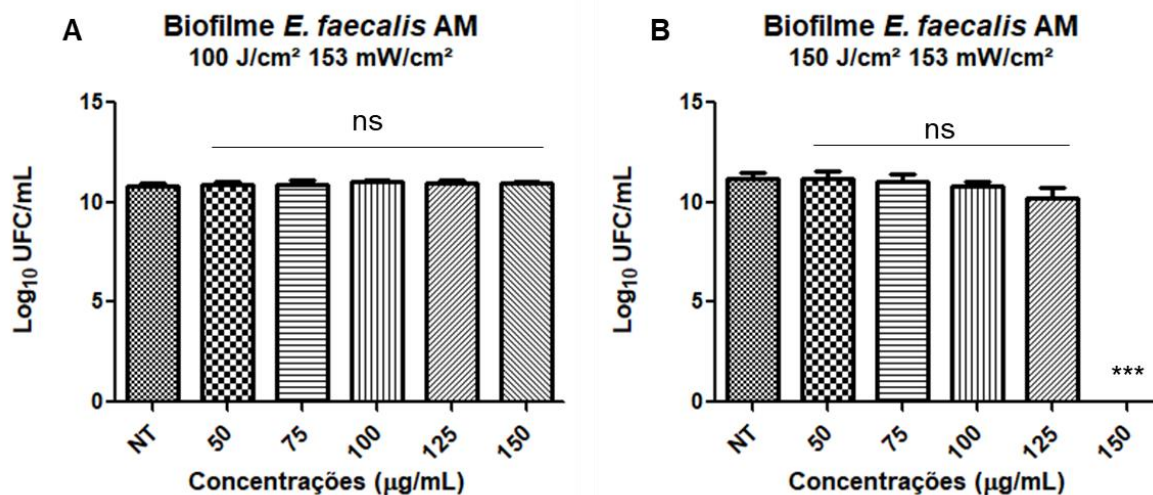
Os resultados da terapia fotodinâmica em biofilme de *E. faecalis* com azul de metileno mostraram somente redução da carga total bacteriana com 150 µg/mL do FS com 150 J/cm² de luz vermelha e intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado (Fig. 31). Na intensidade menor de 46 mW/cm² de modo contínuo (Fig.30) não houve nenhuma alteração em nenhuma das duas doses testadas.

Figura 30 – TFDa em biofilme de *E. faecalis* com azul de metileno e intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *E. faecalis* com azul de metileno e intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo e doses de 100 J/cm² (A) e 150 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey.

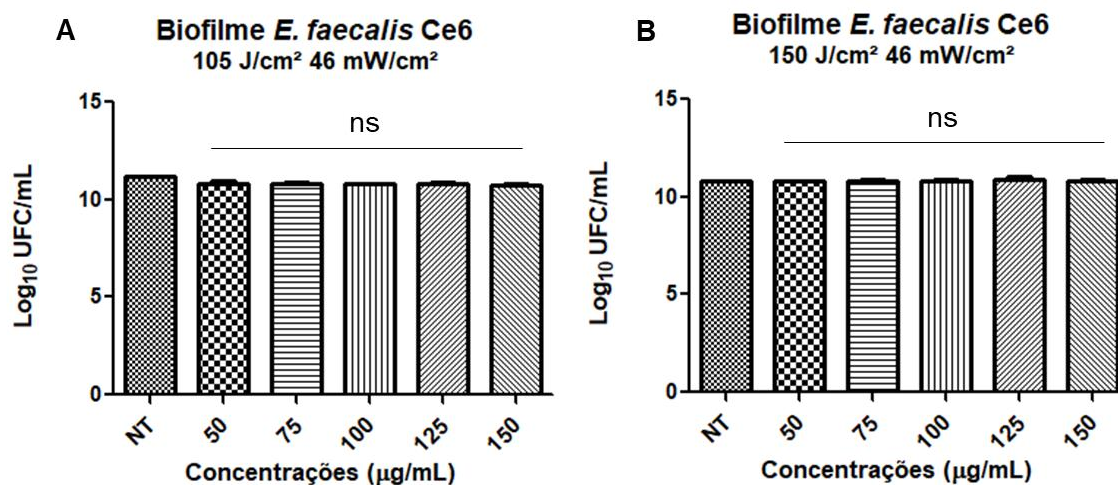
Figura 31 – TFDa em biofilme de *E. faecalis* com azul de metileno e intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *E. faecalis* com azul de metileno e intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado e dose de 100 J/cm² (A) e 150 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

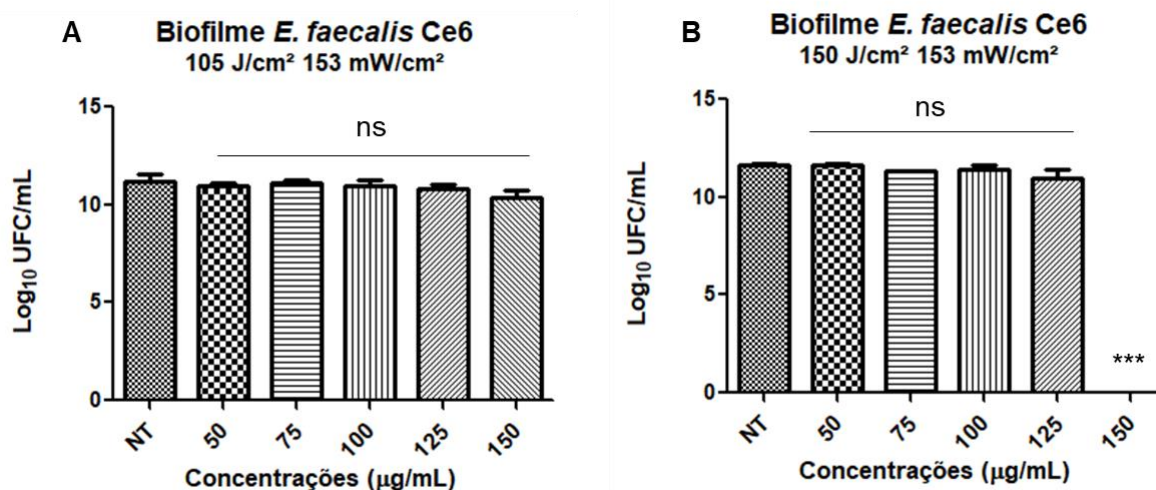
Quando avaliamos o biofilme com clorina-e6 na intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo (Fig.32) não houve nenhuma alteração em relação ao controle. Quando avaliamos na intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado, obtivemos somente redução da carga total bacteriana com 150 µg/mL do FS com 150 J/cm² de luz vermelha (Fig.33).

Figura 32 – TFDa em biofilme de *E. faecalis* com clorina-e6 e intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *E. faecalis* com clorina-e6 e intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo e dose de 105 J/cm² (A) e 150 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey.

Figura 33 – TFDa em biofilme de *E. faecalis* com clorina-e6 e intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado

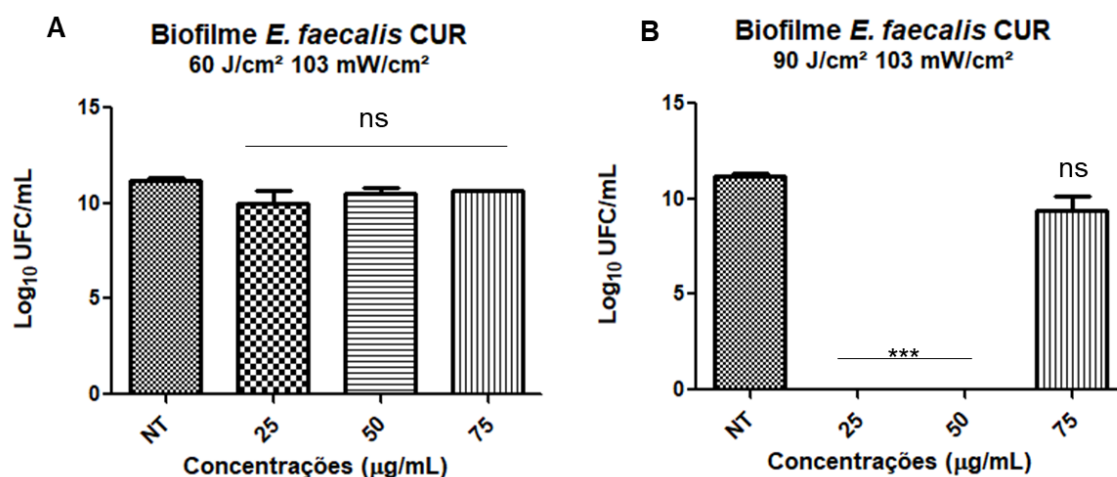


Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *E. faecalis* com clorina-e6 e intensidade de 153 mW/cm² de modo fracionado e dose de 105 J/cm² (A) e 150 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

Os resultados de biofilme com curcumina e luz azul obtivemos redução na carga bacteriana com a intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo

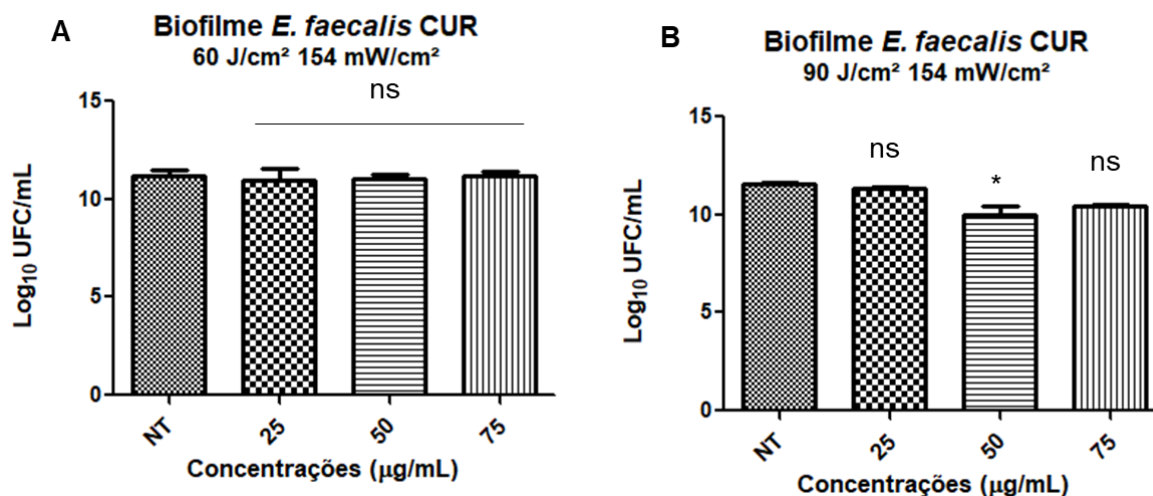
(Fig.34) nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, na intensidade de 154 mW/cm^2 de modo fracionado (Fig.35) houve uma pequena redução na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 34 – TFDa em biofilme de *E. faecalis* com curcumina e intensidade de 103 mW/cm^2 de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *E. faecalis* com curcumina e intensidade de 103 mW/cm^2 de modo contínuo e dose de 60 J/cm^2 (A) e 90 J/cm^2 (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

Figura 35 – TFDa em biofilme de *E. faecalis* com curcumina e intensidade de 154 mW/cm² de modo fracionado



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *E. faecalis* com curcumina e intensidade de 154 mW/cm² de modo fracionado e dose de 60 J/cm² (A) e 90 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (**p*<0,05).

4.2.3 Resumo dos resultados

Na tabela 9 podemos ter uma visão geral dos resultados satisfatórios para TFDa contra *E. faecalis* em suspensão e em biofilme.

Tabela 9 – descrição dos melhores resultados para terapia fotodinâmica antimicrobiana em suspensão e biofilme em *E. faecalis*

<i>E. faecalis</i>	Suspensão			Biofilme	
Azul de metileno	80 J/cm ²	100 J/cm ²	120 J/cm ²	100 J/cm ²	150 J/cm ²
	Fracionado	Contínuo/ Fracionado	Contínuo/ Fracionado		Fracionado
Clorina-e6	30 J/cm ²	45 J/cm ²	60 J/cm ²	105 J/cm ²	150 J/cm ²
		Fracionado	Fracionado		Fracionado
Curcumina	12,5 J/cm ²	18,75 J/cm ²	25 J/cm ²	60 J/cm ²	90 J/cm ²
	Contínuo	Contínuo	Contínuo		Contínuo

4.2.4 Discussão

A TFD tem sido estudada amplamente nas últimas décadas objetivando avaliar a ação contra diferentes patógenos (HAMBLIN, 2016). Em função do gradual aumento de infecções resistentes associado à falta de perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos, investigações a fim de encontrar terapias alternativas e eficientes são necessárias. Estudar os melhores parâmetros *in vitro* e detectar a resposta biológica frente à TFD utilizando modos de irradiação e intensidades variadas, auxiliam no entendimento dos mecanismos fotoquímicos envolvidos nessa terapia bem como no desenvolvimento de protocolos eficientes e seguros que possam ser utilizados em ensaios clínicos.

Enterococcus spp. possui resistência intrínseca a alguns antimicrobianos, tais como oxacilina, meticilina, clindamicina, cefalosporinas e sulfametoxazol/trimetoprim; e resistência adquirida a antimicrobianos utilizados frequentemente a infecções enterocócicas como por exemplo, os aminoglicosídeos e as ampicilinas. É importante mencionar também a resistência às vancomicinas, que ocorre devido à produção de precursores de peptidoglicano na parede celular os quais se ligam de forma fraca à vancomicina impedindo que esse agente terapêutico bloqueie a síntese de parede celular (LAI et al., 1998; ELIOPOULOS et al., 1998). *E. faecalis* está associada a infecções que podem ser fatais, tais como as endocardites, meningite e infecções do trato urinário (TEBRUEGGE et al., 2011; DAHL; BRUUN, 2013). Além disso, essa bactéria está relacionada a infecções endodônticas, sendo recuperado frequentemente de infecções persistentes secundárias que podem resultar no desenvolvimento de abscessos devido à invasão desse microrganismo no tecido perirradicular (FOSCHI et al., 2007; WANG et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2014). A eficiência da TFDa mediada por azul de metileno, clorina-e6 e curcumina contra *E. faecalis* utilizando altas intensidades de luz em modo fracionado foi descrita em um estudo pelo nosso grupo de Annunzio et al., (2018).

O azul de metileno (AM) exerce fototoxicidade tanto para o DNA quanto para a membrana externa da espécie-alvo (SOUKOS et al., 2006). Uma redução parcial da carga microbiana de *E. faecalis* em suspensão utilizando

esse FS foi descrita também por Soukos et al. (2006); Pourhajibaghara et al. (2018) e Soares et al. (2018). No presente estudo, a TFDa mediada por AM também foi eficiente na redução parcial de *E. faecalis* em fase planctônica nos dois modos irradiação. No entanto, quando utilizada uma intensidade maior de luz no modo fracionado foi necessária uma fluência menor, ao passo que, uma fluência maior de energia foi necessária quando aplicada a irradiação no modo contínuo utilizando uma intensidade de luz inferior. Quando avaliado biofilme de *E. faecalis* mediado por AM e uma intensidade de luz maior, foi possível obter redução total do biofilme utilizando a maior concentração e a maior fluência, quanto com a menor intensidade não houve redução bacteriana em nenhuma dose utilizada. Pourhajibagher et al. (2018) obtiveram 47,6% de redução de biofilme de *E. faecalis* mediado por AM e uma fluência de 117,18 J/cm². Soukos et al. (2006) observaram uma redução de 97% em biofilme de *E. faecalis* no sistema de canais radiculares de dentes humanos extraídos.

Clorina-e6 (Ce6) é um FS de segunda geração, o qual possui um alto rendimento de ¹O₂ (ROVALDI et al., 2000; DOVIGO et al., 2013; CIEPLIK et al., 2018). A redução de *E. faecalis* ocasionada pela reação fotodinâmica utilizando Ce6 como FS foi descrita também por Al-Ahmad et al. (2013).

Quanto aos resultados que avaliaram a comparação da redução de viabilidade celular pela contagem de colônias de *E. faecalis*, utilizando modos diferentes de intensidade, verificou-se que uma intensidade maior de luz no modo fracionado foi necessária para alcançar a eliminação total da carga microbiana de *E. faecalis*, enquanto que a utilização de uma intensidade menor e luz contínua não foi capaz de alcançar uma eliminação total, mesmo quando utilizada a maior fluência de luz testada nas duas condições (60 J/cm²). O mesmo foi observado para biofilme. Há poucos relatos na literatura da utilização da clorina-e6 na TFDa em biofilme. Garcez et al. (2007) avaliaram biofilme de 3 dias de *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* bioluminescentes em canais radiculares de dentes humanos recém extraídos. A TFDa foi realizada com um conjugado de polietilenimina e clorina-e6 como fotossensibilizador. Os resultados obtidos foram uma redução de 95% na bioluminescência. Hope; Wilson (2006) avaliaram biofilme de *Streptococcus pyogenes* com Sn (IV) clorina-e6 (SnCe6 – derivado da clorofila modificada por estanho) como fotossensibilizador e o laser do microscópio confocal para

ativação do FS. Obtiveram uma redução total do biofilme de *S. pyogenes* com 50 mg/L do composto.

A ação fotodinâmica mediada pela curcumina (CUR) em suspensões de *E. faecalis* foi descrita também por Pourhajibaghera et al., (2018). Além das propriedades fotossensíveis conhecidas da curcumina, essa molécula destaca-se por ser um antioxidante capaz de neutralizar possíveis danos celulares decorrentes da ação de radicais livres (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

No presente estudo, utilizando a CUR como FS, foi possível obter a total eliminação da carga bacteriana de *E. faecalis* nas duas condições de irradiação avaliadas. No entanto, na condição em que foi utilizada a luz no modo contínuo aplicando a intensidade de 103 mW/cm², alcançou-se a redução microbiana total utilizando uma concentração inferior de CUR quando comparada aos ensaios de TFDa utilizando a luz fracionada e intensidade de 151 mW/cm². Quanto aos resultados para biofilme, a TFDa mediada por curcumina conseguiu eliminar 100% das bactérias na maior dose utilizada (90 /cm²) com a intensidade de 103 mW/cm². Porém, quando aumentou a concentração de curcumina essa morte bacteriana não foi observada devido à possível agregação da curcumina em altas concentrações. Quando utilizada a intensidade de 154 mW/cm² não se obteve morte celular em nenhuma concentração avaliada.

Pileggi et al. (2013) avaliaram eosina-y, rosa bengala e curcumina com luz azul em uma intensidade de 450 mW/cm² por 240 segundos para inativação de *E. faecalis* em suspensão e biofilme. A TFDa mediada por curcumina foi capaz de reduzir 100% *E. faecalis* em suspensão em uma concentração de 10 µM e na concentração de 50 µM para biofilme. da Frota et al. (2014) avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em canais radiculares contaminados com biofilme de *E. faecalis* usando LED azul e curcumina. Foi utilizado uma intensidade de 100 mW/cm² de luz, uma concentração de 20 µM de solução de curcumina e a irradiação foi feita por 5 minutos (grupo I) e por 10 minutos (grupo II). No grupo I obtiveram uma redução de 41% da viabilidade bacteriana enquanto no grupo II foi de 32%.

Chan e Wu (2004) avaliou a TFD utilizando a CUR em células de carcinoma epidérmico (A431) e observou que essa molécula e captadores de oxigênio singleto preveniram a formação de espécies reativas de oxigênio

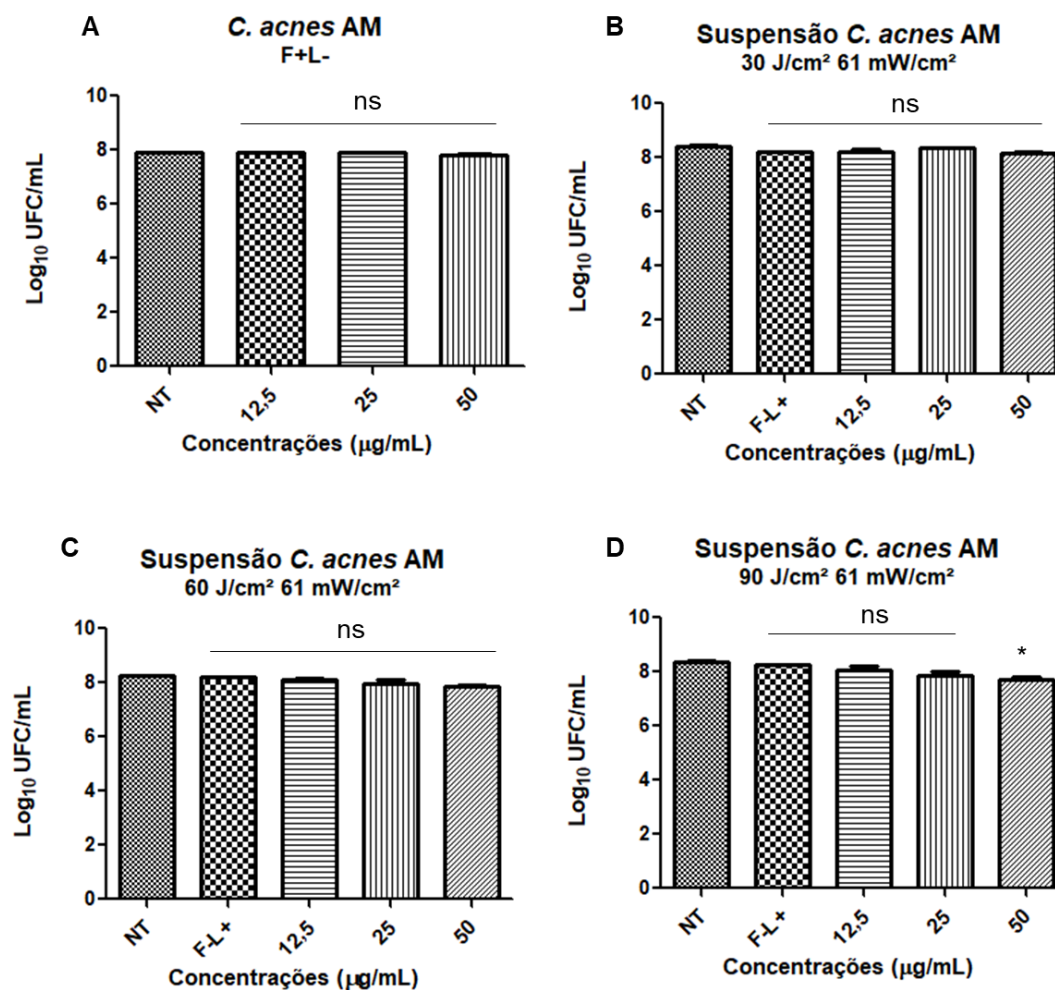
(EROs) pela TFD e alterações bioquímicas apoptóticas subsequentes. O autor avaliou também se a CUR é um captador de oxigênio singlete e quando realizaram um pré-tratamento nas células com curcumina os níveis intracelulares de EROs gerados pela TFD foram atenuados. Esse achado pode justificar os resultados obtidos no presente estudo, pois quando há o desligamento da luz pelo fracionamento, a CUR pode agir como um captador de oxigênio singlete e conseqüentemente impedirem a morte celular.

4.3 Estudo III – *Cutibacterium acnes*

4.3.1 Terapia fotodinâmica em suspensão

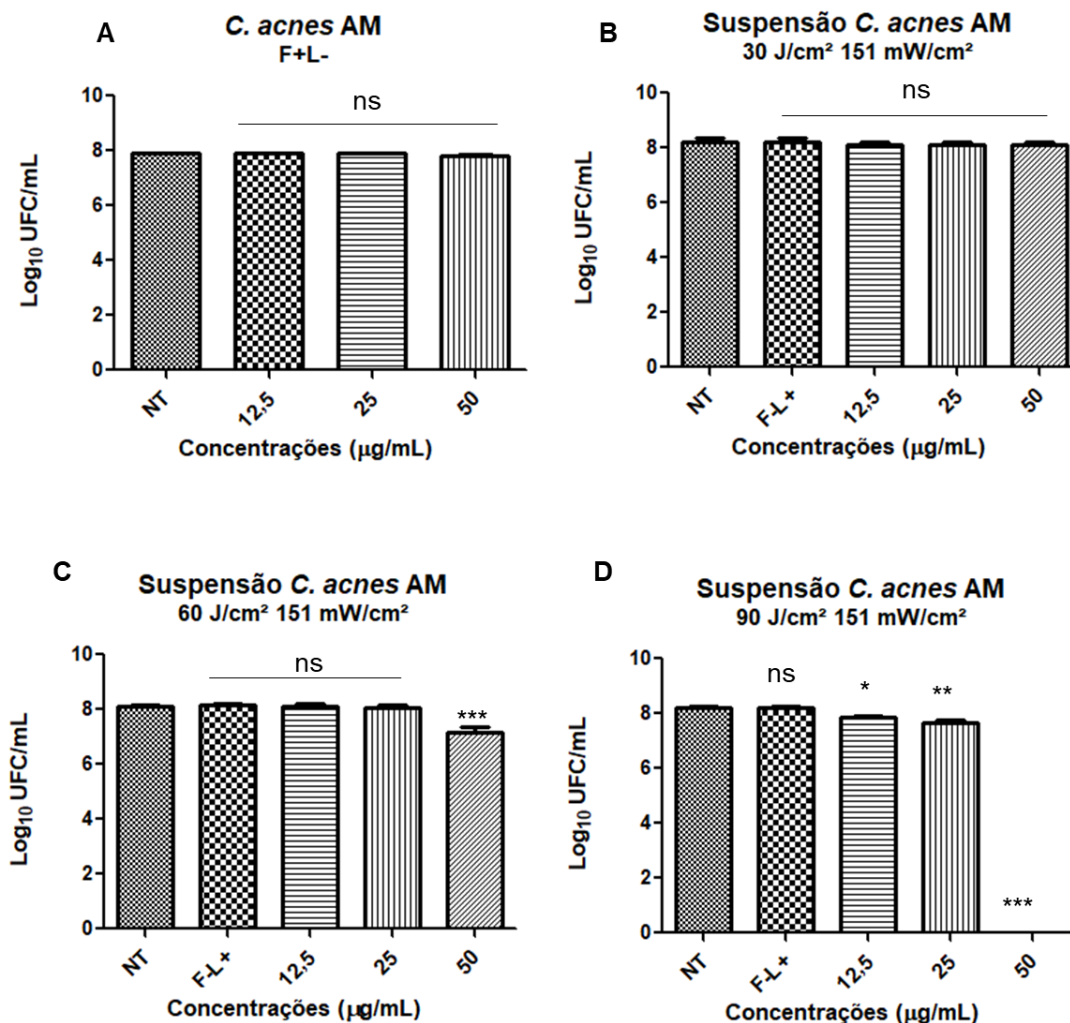
Os resultados da análise da viabilidade celular empregando o azul de metileno como FS demonstraram que ao aplicar uma intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo (Fig. 36) não houve redução da carga microbiana em nenhuma dose de luz e concentração utilizada. Ao passo que quando aplicada a intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado (Fig. 37) houve redução total da carga bacteriana com 50 µg/mL na dose de 90 J/cm².

Figura 36 – TFDa em suspensão de *C. acnes* com azul de metileno e intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *C. acnes* com azul de metileno no escuro (A) e com intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo e doses de 30 J/cm² (B), 60 J/cm² (C) e 80 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (**p*<0,05).

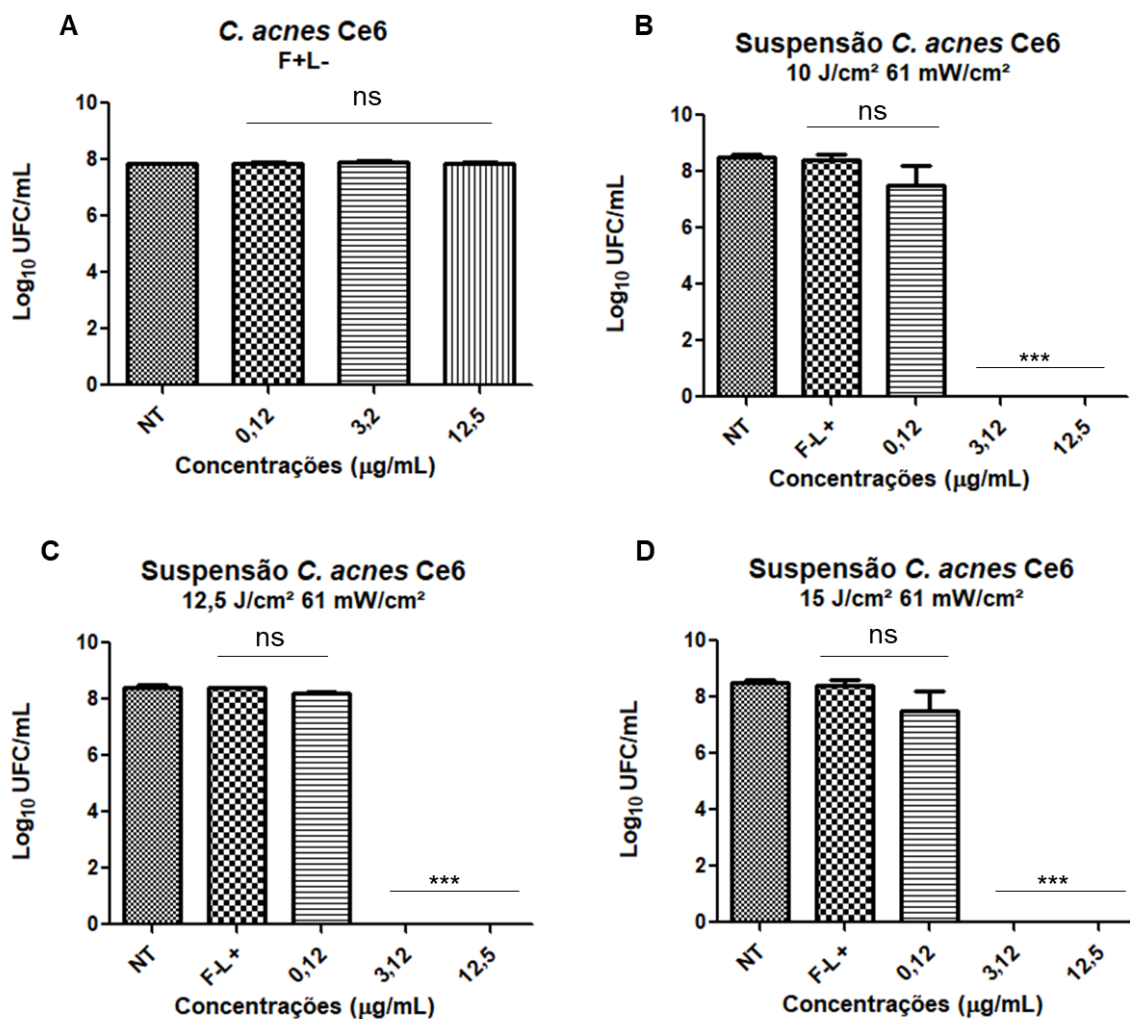
Figura 37 – TFDa em suspensão de *C. acnes* com azul de metileno e intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado



Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *C. acnes* com azul de metileno no escuro (A) e com intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado e doses de 30 J/cm² (B), 60 J/cm² (C) e 90 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

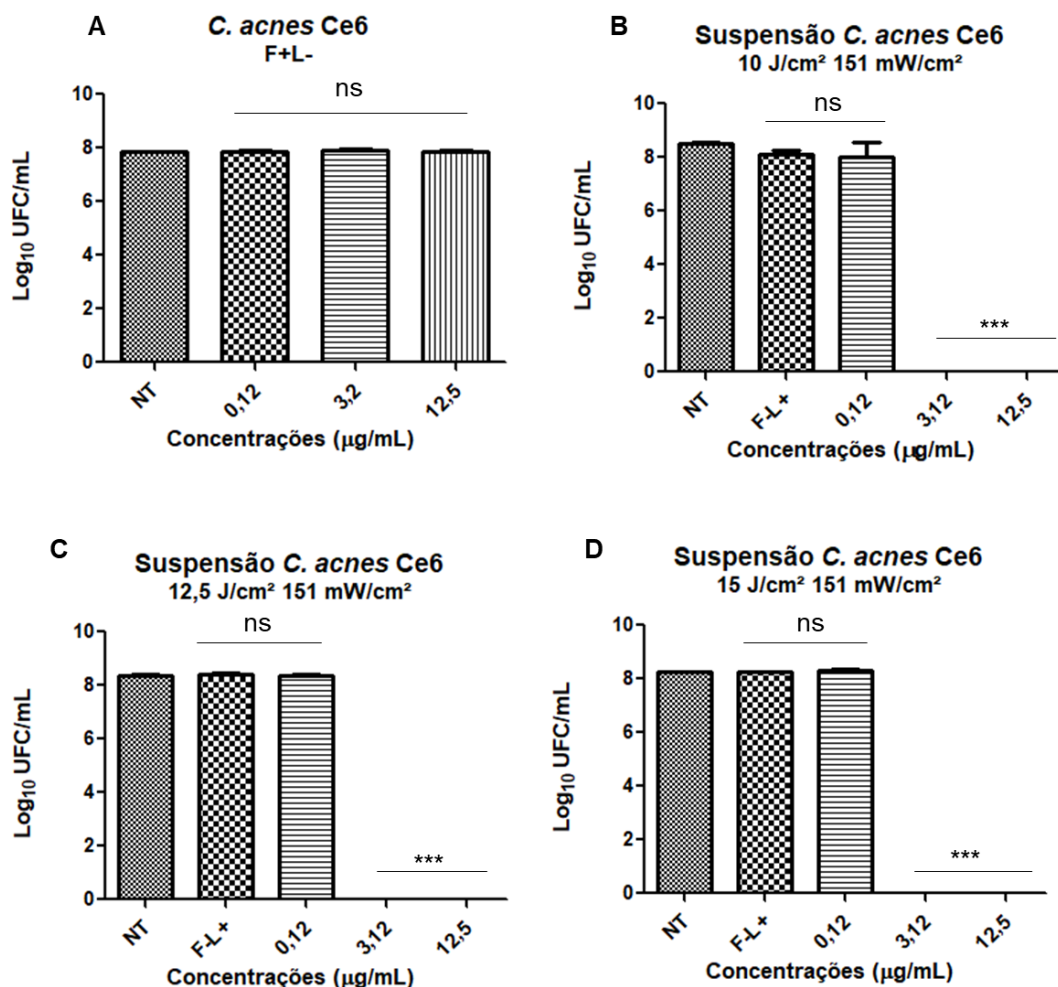
Quando realizada a TFDa mediada por clorina-e6 tanto utilizando uma intensidade menor de 61 mW/cm² de modo contínuo (Fig. 38) quanto uma intensidade maior de 151 mW/cm² de modo fracionado (Fig. 39) nas concentrações de 3,12 e 12,5 µg/mL obtivemos a erradicação total bacteriana.

Figura 38 – TFDa em suspensão de *C. acnes* com clorina-e6 e intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *C. acnes* com clorina-e6 no escuro (A) e com intensidade de 61 mW/cm² de modo contínuo e doses de 10 J/cm² (B), 12,5 J/cm² (C) e 15 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

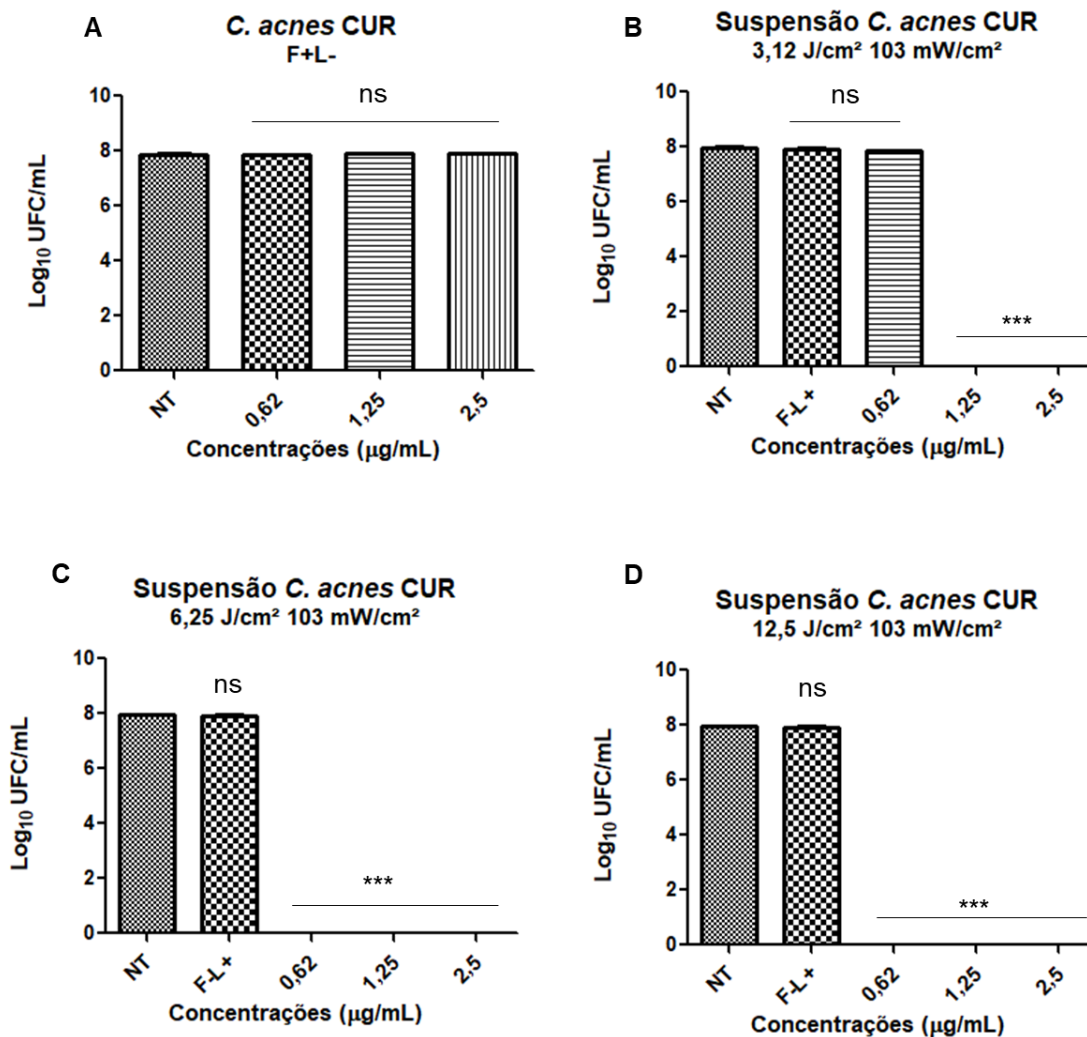
Figura 39 – TFDa em suspensão de *C. acnes* com clorina-e6 e intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado



Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *C. acnes* com clorina-e6 no escuro (A) e com intensidade de 151 mW/cm² de modo fracionado e dose de 10 J/cm² (B), 12,5 J/cm² (C) e 15 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

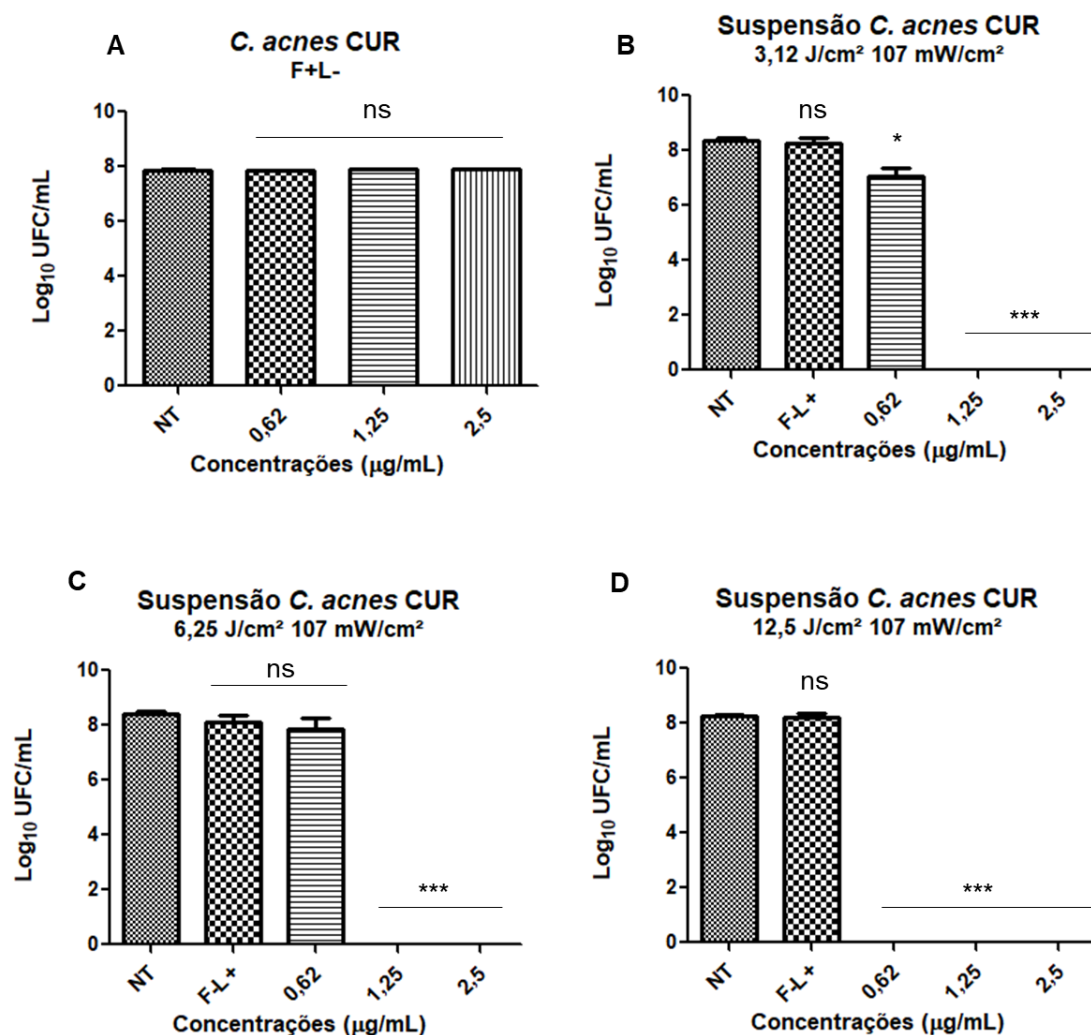
Utilizando LED azul associada à curcumina tanto para 103 mW/cm² (Fig. 40) quanto para 107 mW/cm² (Fig. 41) foi possível verificar a redução total da carga bacteriana com a dose de 3,12 J/cm² e as concentrações de 1,25 e 2,5 µg/mL. Quando aumentamos a dose para 6,25 J/cm² com a intensidade de 103 mW/cm² foi possível observar morte total das bactérias com 0,62 µg/mL, enquanto que com a intensidade de 107 mW/cm² só foi possível o mesmo resultado com a dose de 12,5 J/cm².

Figura 40 – TFDa em suspensão de *C. acnes* com curcumina e intensidade de 103 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *C. acnes* com curcumina no escuro (A) e com intensidade de 103 mW/cm² de modo contínuo e doses de 3,12 J/cm² (B), 6,25 J/cm² (C) e 12,5 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

Figura 41 – TFDa em suspensão de *C. acnes* com curcumina e intensidade de 107 mW/cm² de modo fracionado



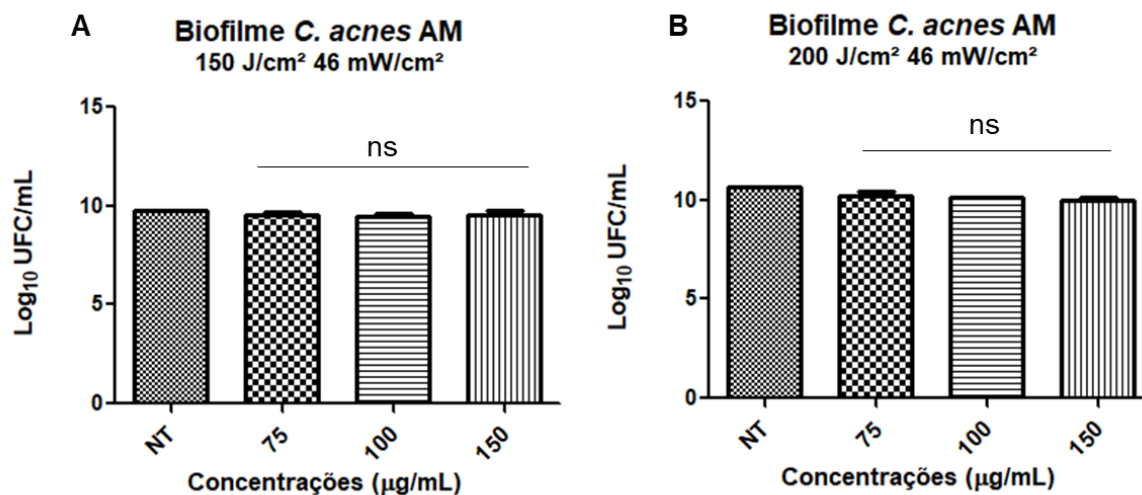
Resultados obtidos com a TFDa em suspensão de *C. acnes* com curcumina no escuro (A) e com intensidade de 107 mW/cm² de modo fracionado e doses de 3,12 J/cm² (B), 6,25 J/cm² (C) e 12,5 J/cm² (D). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

4.3.2 Terapia Fotodinâmica em Biofilme

Os resultados da terapia fotodinâmica em biofilme de *C. acnes* com azul de metileno na intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo (Fig.42), não houve nenhuma alteração em nenhuma das duas doses testadas. Quando avaliado com a intensidade de 122 mW/cm² de modo fracionado, obtivemos

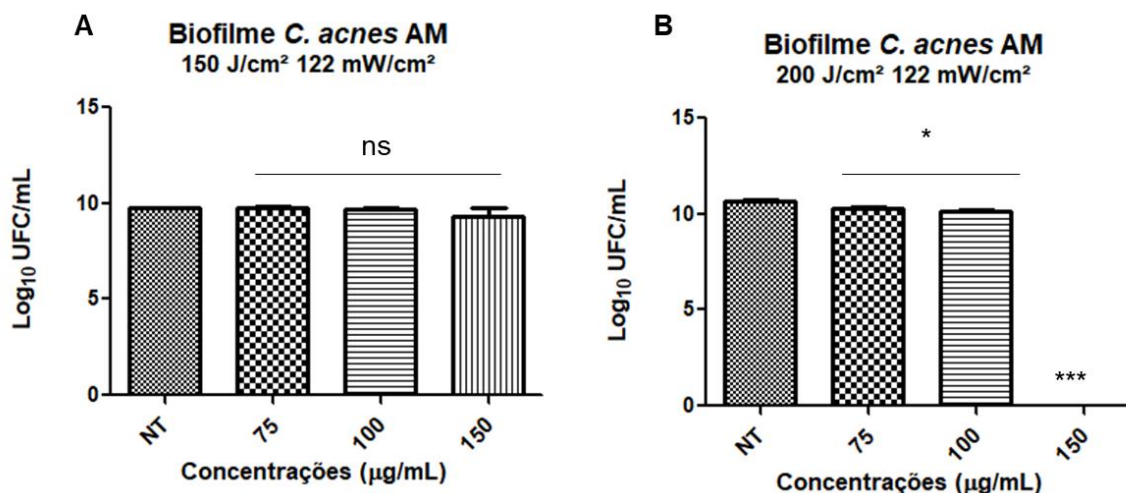
redução total da carga bacteriana com 150 $\mu\text{g/mL}$ do FS e com 200 J/cm^2 de luz vermelha (Fig. 43).

Figura 42 – TFDa em biofilme de *C. acnes* com azul de metileno e intensidade de 46 mW/cm^2 de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *C. acnes* com azul de metileno e intensidade de 46 mW/cm^2 de modo contínuo e doses de 150 J/cm^2 (A) e 200 J/cm^2 (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey.

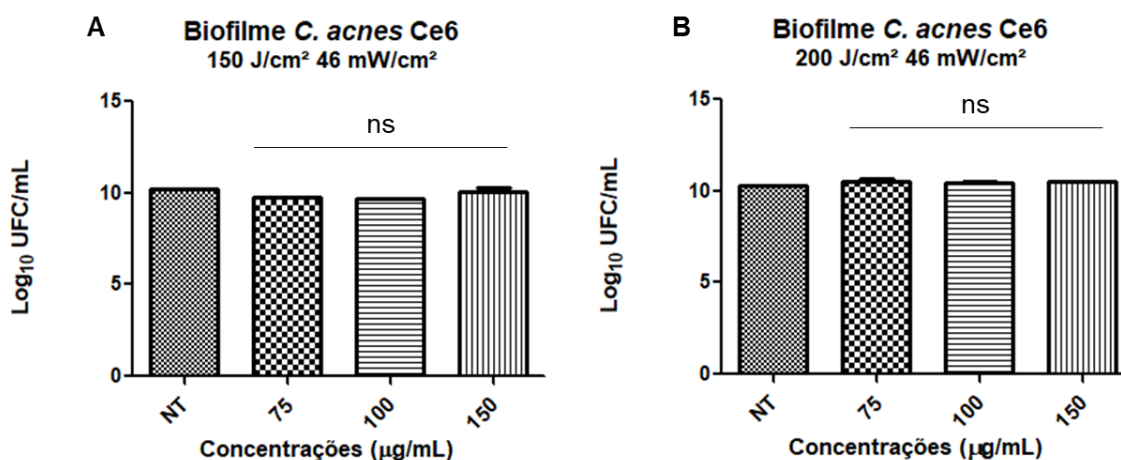
Figura 43 – TFDa em biofilme de *C. acnes* com azul de metileno e intensidade de 122 mW/cm² de modo fracionado



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *C. acnes* com azul de metileno e intensidade de 122 mW/cm² de modo fracionado e doses de 150 J/cm² (A) e 200 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

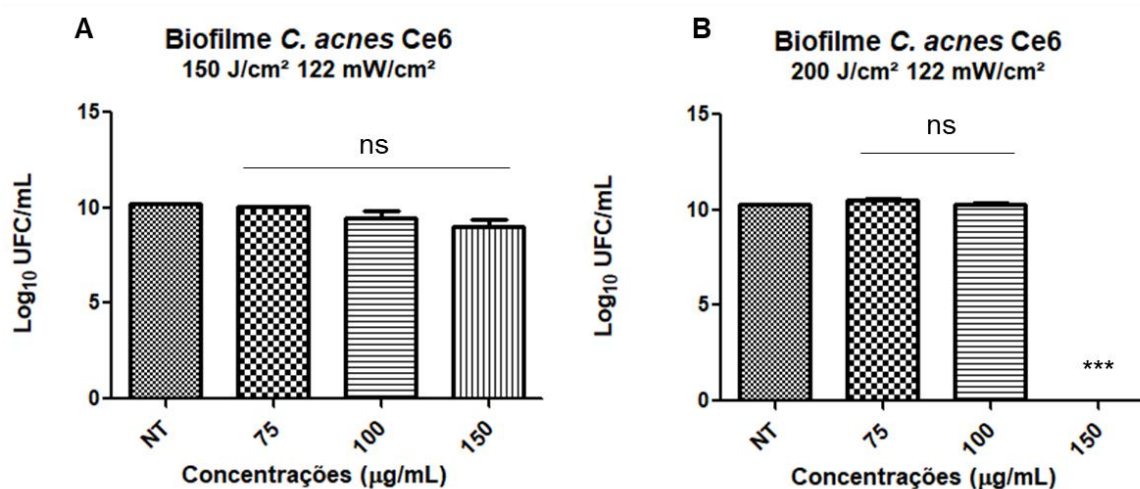
Os resultados da terapia fotodinâmica em biofilme de *C. acnes* com clorina-e6 na intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo (Fig.44), não houve nenhuma alteração em nenhuma das duas doses testadas. Com a intensidade de 122 mW/cm² de modo fracionado, obtivemos redução total da carga bacteriana com 150 µg/mL do FS e 200 J/cm² de luz vermelha (Fig.45).

Figura 44 – TFDa em biofilme de *C. acnes* com clorina-e6 e intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *C. acnes* com clorina-e6 e intensidade de 46 mW/cm² de modo contínuo e doses de 150 J/cm² (A) e 200 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey.

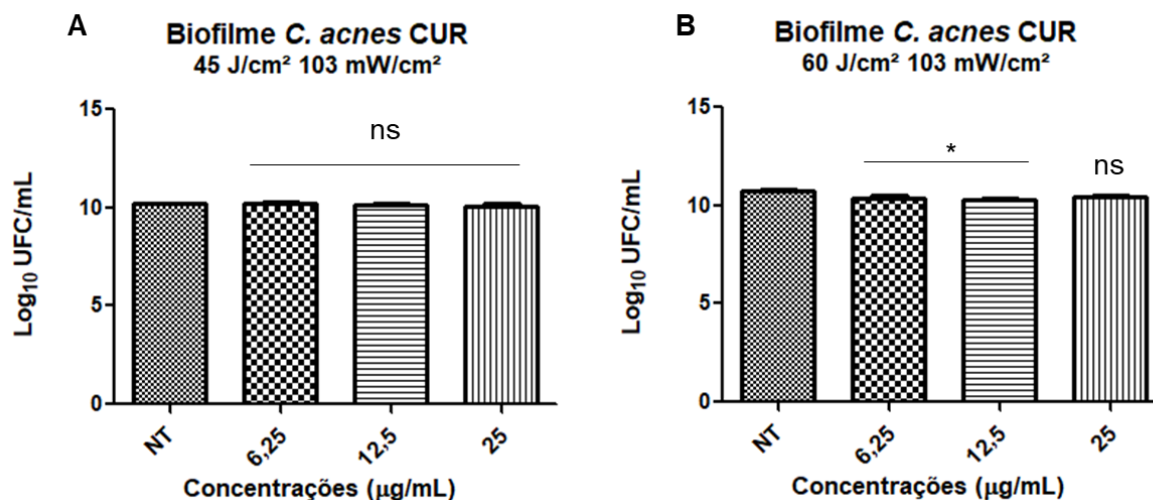
Figura 45 – TFDa em biofilme de *C. acnes* com clorina-e6 e intensidade de 122 mW/cm² de modo fracionado



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *C. acnes* com clorina-e6 e intensidade de 122 mW/cm² de modo fracionado e doses de 150 J/cm² (A) e 200 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

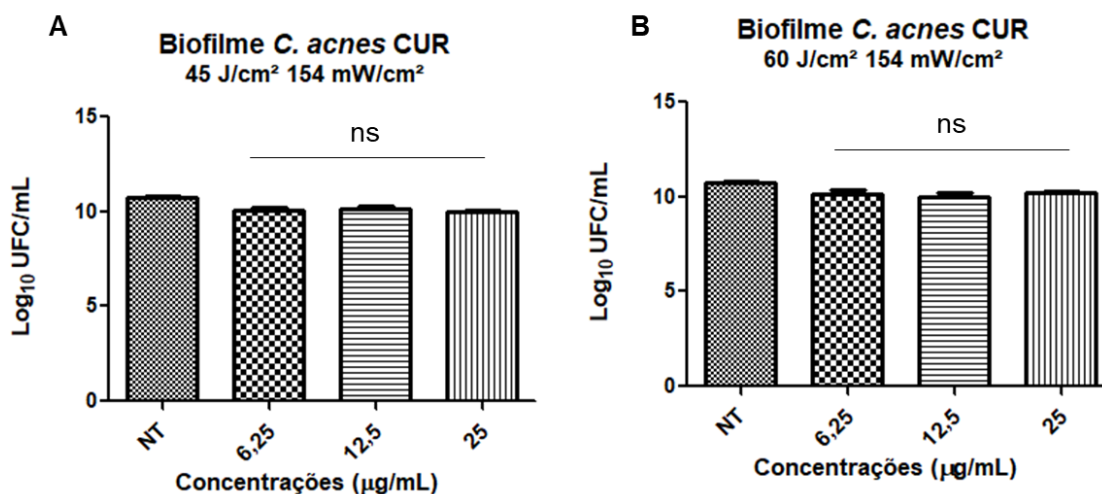
Os resultados da terapia fotodinâmica em biofilme de *C. acnes* com curcumina e luz azul mostram que não obtivemos redução na carga bacteriana em nenhuma das duas intensidades, de 103 mW/cm² de modo contínuo (Fig. 46) e de 154 mW/cm² de modo fracionado (Fig. 47), nenhuma dose e concentrações testadas.

Figura 46 – TFDa em biofilme de *C. acnes* com curcumina e intensidade de 103 mW/cm² de modo contínuo



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *C. acnes* com curcumina e intensidade de 103 mW/cm² de modo contínuo e doses de 45 J/cm² (A) e 60 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle (sem fotossensibilizador, sem luz). ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. (**p*<0,05).

Figura 47 – TFDa em biofilme de *C. acnes* com curcumina e intensidade de 154 mW/cm² de modo fracionado



Resultados obtidos com a TFDa em biofilme de *C. acnes* com curcumina e intensidade de 154 mW/cm² de modo fracionado e doses de 45 J/cm² (A) e 60 J/cm² (B). As colunas representam as médias de 3 experimentos independentes e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey.

4.3.3 Resumo dos resultados

Na tabela 10 podemos ter uma visão geral dos resultados satisfatórios para TFDa contra *C. acnes* em suspensão e em biofilme.

Tabela 10 – descrição dos melhores resultados para terapia fotodinâmica antimicrobiana em suspensão e biofilme em *C. acnes*

<i>C. acnes</i>	Suspensão			Biofilme	
Azul de Metileno	30 J/cm ²	60 J/cm ²	90 J/cm ²	150 J/cm ²	200 J/cm ²
			Fracionado		Fracionado
Clorina-e6	10 J/cm ²	12,5 J/cm ²	15 J/cm ²	150 J/cm ²	200 J/cm ²
	Contínuo/ Fracionado	Contínuo/ Fracionado	Contínuo/ Fracionado		Fracionado
Curcumina	3,12 J/cm ²	6,25 J/cm ²	12,5 J/cm ²	45 J/cm ²	60 J/cm ²
	Contínuo/ Fracionado	Contínuo	Contínuo/ Fracionado		

4.3.4 Discussão

Estudos utilizando a luz associada a diferentes FSs contra *C. acnes* já foram descritos na literatura apresentando resultados satisfatórios, tais como a indocianina verde e o metilaminolevulinato *in vitro* e em um estudo clínico (CHOI et al., 2018) e o azul de toluidina incorporado em hidrogel (Zheng et al., 2019).

Estudos utilizando o corante fenotiazínico azul de metileno contra *C. acnes* em suspensão mostra uma redução parcial na carga bacteriana. Neste estudo, a utilização do azul de metileno em suspensão de *C. acnes* com intensidade de 61 mW/cm² não promoveu morte bacteriana, porém quando utilizado a intensidade de 151 mW/cm², na dose de luz e concentração de fotossensibilizador maiores foi possível a eliminação total da carga bacteriana.

O mesmo foi observado para biofilme. Zeina et al. (2001) utilizou 100 µg/mL de azul de metileno e uma luz policromática com potência de 2,8 W. Na intensidade de 42 mW/cm² obtiveram uma morte de 1,85 log₁₀ (<99%) de *C. acnes* em suspensão. Frade et al. (2018) obteve redução total da carga bacteriana em suspensão de *C. acnes* com 37,5 e 50 µg/mL de azul de metileno e fluência de 90 J/cm² utilizando LED 660 nm. Com biofilme de *C. acnes* obtiveram uma redução de 0,9 log₁₀ (<90%) com uma dose de 150 J/cm² e uma concentração de azul de metileno de 150 µg/mL.

Quanto à TFDa mediada por clorina-e6 em suspensão de *C. acnes* foi observado a morte bacteriana tanto com intensidade menor quanto intensidade maior de luz nas três doses testadas nas concentrações de 3,12 e 12,5 µg/mL. Já em biofilme, só houve morte significativa na intensidade de 151 mW/cm² e na dose e concentração maiores. Jeon et al. (2015) avaliou clorina-e6 com luz halógena em suspensões de *C. acnes*, e obtiveram um valor de MIC₉₉ de >0.49 µg/mL. O MIC₉₉ para *C. acnes* só com clorina-e6 foi de > 31.25 µg/mL. Até o momento, não foi relatado na literatura nenhum estudo utilizando clorina-e6 em modelos de biofilme monoespécie de *C. acnes*.

Para TFDa mediada por curcumina em suspensão de *C. acnes*, nas duas intensidades testadas foi observado a morte bacteriana com a dose de 3,12 J/cm² e com concentração de curcumina a partir de 1,25 µg/mL. Aumentando a dose para 6,25 J/cm², na menor concentração testada (0,62 µg/mL) e na intensidade de 103 mW/cm² obteve redução total da carga bacteriana, porém na intensidade de 107 mW/cm², isso só foi possível quando utilizado uma dose de luz de 12,5 J/cm². Em biofilme de *C. acnes* em ambas as intensidades de luz, não houve morte bacteriana nas doses e concentrações testadas. Yang et al. (2018) avaliou a TFDa com curcumina como FS em suspensões bacterianas de *C. acnes*. Foram avaliadas as concentrações de 0; 1,56; 12,5; 25 e 100 µM de curcumina, com intensidade de 3,0 mW/cm² de luz azul, e nas doses de 0; 0,03; 0,09 e 0,18 J/cm². A taxa de inibição de 100% de *C. acnes* foi alcançada com 1,56 µM de curcumina e com dose de luz de 0,09 J/cm². No entanto, para o nosso conhecimento até o momento, não há relatos da utilização de curcumina, assim como clorina-e6, contra modelos de biofilmes de *C. acnes*.

Além disso, um estudo aplicando os três FSs utilizados nessa pesquisa foi realizado por nosso grupo, mostrando reduções totais da carga microbiana de

C. acnes em suspensão, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo (DE ANNUNZIO et al., 2018).

5 CONCLUSÕES

A terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno e clorina-e6 foi capaz de eliminar a bactéria *E. faecalis*, tanto em suspensão quanto em biofilme, utilizando uma intensidade de luz mais elevada e de modo fracionado. Quanto a TFDa mediada por curcumina frente a mesma bactéria foi capaz de eliminá-la utilizando uma intensidade menor de luz e de modo contínuo, em ambas as fases.

Quando avaliamos a TFDa contra a cepa de *C. acnes* em suspensão, o AM foi mais eficiente quando associado a intensidade maior de luz, já a clorina-e6 e a curcumina foram letais independente da intensidade utilizada. Contra biofilme, azul de metileno e clorina-e6 associados a maior intensidade de luz tiveram maior eficiência, porém com a curcumina nenhum parâmetro estudado gerou redução bacteriana.

Considerando a quantificação de espécies reativas de oxigênio, a concentração de azul de metileno foi determinante na produção de EROs. Para Ce6, observamos maior produção de oxigênio singleto. E para CUR aparentemente o modo de irradiação influenciou na produção de espécies reativas de oxigênio.

Quanto à fotodegradação do AM, a maior intensidade causou maior degradação. No entanto, a fotodegradação de Ce6 e CUR foi maior quando submetidos à menor intensidade.

REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; COLM REED, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- AHANGARI, Z.; BIDABADI, M. 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. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 72-78, 2017.
- AMARAL, R. R.; AMORIM, J. C. F.; NUNES, E.; SOARES, J. A.; SILVEIRA, F. F. Terapia fotodinâmica na endodontia - revisão de literatura photodynamic therapy in endodontics - review of literature. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 15, n. 2, p. 207-211, 2010.
- ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; GERBI, M. E. M.; BAGNATO, V. S. Overall-Mouth Disinfection by Photodynamic Therapy Using Curcumin. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 2, p. 96-101, 2012a.
- ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; GERBI, M. E. M. Photodynamic Effects of Curcumin Against Cariogenic Pathogens. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 7, p. 393-399, 2012b.
- ARAÚJO, N. C.; DE MENEZES, R. F.; CARNEIRO, V. S. M.; SANTOS-NETO, A. P. DOS; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S.; HARVEY, C. M.; GERBI, M. E. M. Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 5, p. 259-263, 2017.
- BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - i. Avaliação in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 310-314, 2006.
- BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.
- BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, p. 173-186, 2002.
- CARMELLO, J. C.; PAVARINA, A. C.; OLIVEIRA, R.; JOHANSSON, B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v.15, n. 4, ID fov018, 2015.
- CARMONA-VARGAS, C. C.; ALVES, L. D. C.; BROCKSOM, T. J.; DE OLIVEIRA, K. T. Combining batch and continuous flow setups in the end-to-end synthesis of naturally occurring curcuminoids. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 3, p. 366-374, 2017.
- CATORZE, M. G. Laser: fundamentos e indicações em dermatologia. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v. 37, n. 1, p. 5 – 27, 2009.
- CAVALCANTI, T. M.; DE ALMEIDA-BARROS, R. Q.; DE VASCONCELOS CATÃO, M. H. C.; FEITOSA, A. P. A.; LINS, R. D. A. U. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na

- odontologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 955 – 960, 2011.
- CHAN, W. H.; WU, H. J. Anti-apoptotic effects of curcumin on photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 92, n. 1, p. 200-212, 2004.
- CHOI, S. H.; SEO, J. W.; KIM, K. H. Comparative study of the bactericidal effects of indocyanine green-and methyl aminolevulinate-based photodynamic therapy on *Propionibacterium acnes* as a new treatment for acne. **The Journal of dermatology**, v. 45, n. 7, p. 824-829, 2018.
- CHIGNELL, C. F.; BILSKJ, P.; RESZKA, K. J.; MOTTEN, A. G.; SIK, R. H.; DAHL, T. A. Spectral and photochemical properties of curcumin. **Photochemistry and photobiology**, v. 59, n. 3, p. 295-302, 1994.
- CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.
- COSTA, A.; ALCHORNE, M. M. de A.; GOLDSCHMIDT, M. C. B. Fatores etiopatogênicos da acne vulgar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 5, p. 451-9, 2008.
- DA FROTA, M. F.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; TANOMARU-FILHO, M.; BAGNATO, V. S.; ESPIR, C. G.; BERBERT, F. L. C. V. Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. **Lasers in Medical Sciences**, v. 30, n. 7, p. 1876 – 1872, 2014.
- DA FROTA, M. F.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; TANOMARU-FILHO, M.; BAGNATO, V. S.; ESPIR, C. G.; BERBERT, F. L. C. V. Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 1867-1872, 2015.
- DAHL, A.; BRUUN, N. E. *Enterococcus faecalis* infective endocarditis: focus on clinical aspects. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 11, p. 1247 - 1257, 2013.
- DANTAS, L. O. **Quantificação da fotodegradação de compostos orgânicos fotossensíveis**. 2017. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Físicas e Biomoleculares) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- DAVIES, D.G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.
- DE ANNUNZIO, S. R.; FREITAS, L; M.; BLANCO, A. L.; DA COSTA, M. M.; CARMONA-VARGAS, C. C.; DE OLIVEIRA, K. T.; FONTANA, C. R. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 178, p. 545-550, 2018.
- DE FREITAS, L. M.; LORENZÓN, E. N.; SANTOS-FILHO, N. A.; ZAGO, L. H. de P.; ULIANA, M. P.; DE OLIVEIRA, K. T.; CILLI, E. M.; FONTANA, C. R. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 4212, 2018.
- DE PAULA, S. Comparação do laser e do led no processo de cicatrização em feridas cutâneas: uma revisão. **Ciência & Saúde**, v. 9, n. 1, p. 55 – 61, 2016.

- DOVIGO, L. N.; CARMELLO, J. C.; CARVALHO, M. T.; MIMA, E. G.; VERGANI, C. E.; BAGNATO, V. S.; PAVARINA A. C. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. **Biofouling**, v. 29, n. 9, p. 1057 - 1067, 2013.
- DYSART, J. S.; SINGH, G.; PATTERSON, M. S. Calculation of Singlet Oxygen Dose from Photosensitizer Fluorescence and Photobleaching During mTHPC Photodynamic Therapy of MLL Cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 196-205, 2005.
- EDUARDO, C. de P.; BELLO-SILVA, M. S.; RAMALHO, K. M.; LEE, E. M. R.; ARANHA, A. C. C. A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 69, n. 3, p. 226 – 235, 2015.
- ELIOPOULOS, G. M.; WENNERSTEN, C. B.; GOLD, H. S.; SCHULIN, T.; SOULI, M.; FARRIS, M. G.; CERWINKA, S.; NADLER, H. L.; DOWZICKY, M.; TALBOT, G. H.; MOELLERING JR. R. C. Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from the United States and their susceptibility in vitro to dalfopristina-quinupristina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1088 – 1092, 1998.
- FIGUEIREDO, A.; MASSA, A.; PICOTO, A.; SOARES, A. P.; BASTO, A. S.; LOPES, C.; RESENDE, C.; REBELO, C.; BRANDÃO, F. M.; PINTO, G. M.; DE OLIVEIRA, H. S.; SELORES, M.; GONÇALO, M.; BELLO, R. T. Avaliação e tratamento do doente com acne – Parte II. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 27, p. 66-76, 2011.
- 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.; SOUKOS, N. S. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 6, p. 751-759, 2009.
- FOSCHI, F.; FONTANA, C. R.; RUGGIERO, K.; RIAHI, R.; VERA, A.; DOUKAS, A. G.; PAGONIS, T. C.; KENT, R.; STASHENKO, P. P.; SOUKOS, N. S. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, p. 782–787, 2007.
- FRADE, M. L.; DE ANNUNZIO, S. R.; CALIXTO, G.; VICTORELLI, F.; CHORILLI, M.; FONTANA, C. R. Assessment of Chitosan-Based Hydrogel and Photodynamic Inactivation against *Propionibacterium acnes*. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 473, 2018.
- GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S.; TEGOS, G. P.; NÚÑEZ, S. C.; JORGE, A. O. C.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy Combined with Conventional Endodontic Treatment to Eliminate Root Canal Biofilm Infection. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 1, p. 59–66, 2007.
- GARCIA-DIAZ, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. **Methods**, v. 109, p. 158 - 166, 2016.
- GHARAMTI, A. A.; KANAFANI, Z. A. *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* infections associated with implantable devices. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 15, n. 12, p. 1083 – 1094, 2017.
- GORDON, O. **Oxidative transformation of curcumin: products and reaction mechanisms**. Nashville (NSH): Vanderbilt University. 2014.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721 - 724, 1994.

- HAMBLIN, M. R.; HASANA, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.
- HOPE, C. K.; WILSON, M. Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 1227-1230, 2006.
- ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501 – 511, 2010.
- JEON, Y. M.; LEE, H. S.; JEONG, D.; OH, H. K.; RA, K. H.; LEE, M. Y. Antimicrobial photodynamic therapy using chlorin e6 with halogen light for acne bacteria-induced inflammation. **Life sciences**, v. 124, p. 56 - 63, 2015.
- JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 4, n. 11, p. 2320 - 2328, 2002.
- LAI, K. K.; KELLEY, A. L.; MELVIN, Z. S.; BELLIVEAU, P. P.; FONTECCHIO, S. A. Failure to eradicate Vancomycin-resistant *Enterococci* in a University hospital and the cost of barrier precautions. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 19, p. 647 – 652, 1998.
- LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- LONGHINOTTI, E.; FURLAN, L.; LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Adsorção de azul de metileno e croconato amarelo pelo biopolímero quitina. **Química Nova**, v. 19, p. 221-224, 1996.
- LÓPEZ-JIMÉNEZ, L.; FUSTÉ, E.; MARTÍNEZ-GARRIGA, B.; ARNABAT-DOMÍNGUEZ, J.; VINUESA, T.; VIÑAS, M. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 1519-1526, 2015.
- MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, p. 105-129, 2001.
- MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R. Can Infectious Biofilm be Controlled by Blocking Bacterial Communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.
- MAH, T-F., C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **TRENDS in Microbiology**, v.9, n.1, p. 34-39, 2001.
- MARINIC, K.; MANOIL, D.; FILIERI, A.; WATAHA, J. C.; SCHRENZEL, J.; LANGE, N.; BOUILLAGUET, S. Repeated exposures to blue light-activated eosin Y enhance inactivation of *E. faecalis* biofilms, *in vitro*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, p. 393-400, 2015.
- MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 43-48, 2004.
- MELLO, W. C. M. A. DE; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 331-340, 2012.
- MISBA, L.; KHAN, A. U. Enhanced photodynamic therapy using light fractionation against *S. mutans* biofilm: type I and type II mechanism. **Future microbiology**, v. 13, n. 4, p. 437 – 454, 2018.
- MORITZ, M. N. O. **Potencial apoptótico de uma nova clorina anfifílica como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica**. 2014. 77 f. Dissertação

- (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- NAVAEIPOUR, F.; AFSHARAN, H.; TAJALLI, H.; MOLLABASHI, M.; RANJBARI, F.; MONTASERI A.; RASHIDI, M-R. Effects of continuous wave and fractionated diode laser on human fibroblast cancer and dermal normal cells by zinc phthalocyanine in photodynamic therapy: A comparative study. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 161, p. 456 – 462, 2016.
- NUÑEZ, S. C.; YOSHIMURA, T. M.; RIBEIRO, M. S.; JUNQUEIRA, H. C.; MACIEL, C.; COUTINHO-NETO, M. D.; BAPTISTA, M. S. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, p. 31 - 37, 2015.
- PARADELLA, T. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 2, p. 163-168, 2007.
- PARK, J. -H.; MOON, Y. -H.; BANG, I. -S.; KIM, Y. -C.; KIMS. -A.; AHN, S. -G.; YOON, J. -H. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. **Lasers in Medical Science**, v. 25, p. 705-710, 2010.
- PASTER, B. J.; OLSEN, I.; AAS, J. A.; DEWHIRST, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontology 2000**, v. 42, p. 80-87, 2006.
- PERCIVAL, S. L.; SULEMAN, L. FRANCOLINI, I; DONELLI, G. The effectiveness of photodynamic therapy on planktonic cells and biofilms and its role in wound healing. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1083-1094, 2014.
- PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.
- PILEGGI, G.; WATAHA, J. C., GIRARD, M., GRAD, I., SCHRENZEL, J., LANGE, N., BOUILLAGUET, S. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 134-140, 2013.
- POURHAJIBAGHERA, M.; KAZEMIAN, H.; CHINIFORUSH, N.; HOSSEINI, N.; POURAKBARI, B.; AZIZOLLAHI, A.; REZAEI, F.; BAHADOR, A. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 206–211, 2018.
- RAMAGE, G.; TUNNEY, M. M.; PATRICK, S.; GORMAN, S. P.; NIXON, J. R. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. **Biomaterials**, n. 24, p. 3221-3227, 2003.
- RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A.; da SILVA, A. R.; FLORES, A. V.; RONCHI, L. M.; TEDESCO, A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2007.
- RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. Comparison of the *In Vivo* Antimicrobial Effectiveness of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Used as Root Canal Irrigants: A Molecular Microbiology Study. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 2, p. 143-150, 2011.
- ROMAGNOLI, E.; CAFARO, A. PBM. Theoretical and Applied Concepts of Adjunctive Use of LLLT/PBM Within Clinical Dentistry. In: COLUZZI, D.;

- PARKER, S. (eds). **Lasers in Dentistry—Current Concepts**: Textbooks in Contemporary Dentistry. Cham: Springer International, 2017. p. 131-160. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-51944-9_7
- RONQUI, M. R.; DE AGUIAR COLETTI, T. M. S. F.; DE FREITAS, L. M.; MIRANDA, E. T.; FONTANA, C. R. Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 158, p. 122-129, 2016.
- ROVALDI, C. R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N. A.; FRIDEN, P. M.; ROTHSTEIN, D. M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive Porphyrin Derivative with Broad-Spectrum Activity against Oral Pathogens In Vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3364–3367, 2000.
- SCHERER, K. M.; BISBY, R. H.; BOTCHWAY, S. W.; PARKER, A. W. New Approaches to Photodynamic Therapy from Types I, II and III to Type IV Using One or More Photons. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 171 – 189, 2017.
- SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; Kinsella, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 869-880, 2000.
- SILVA, C. C.; JUNIOR, S. P. C.; PEREIRA, G. L. D.; FONTES, K. B. F. da C.; ANTUNES, L. A. A.; POVOA, H. C. C.; ANTUNES, L. S.; IORIO, N. L. P. P. Antimicrobial Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment: A Clinical and Molecular Microbiological Study. **Photochemistry and Photobiology**, v. 94, p. 351-356, 2018.
- SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; LOPES, H. P. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1999.
- SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; K. M.; RÔÇAS, I. N. Bacterial Reduction in Infected Root Canals Treated With 2.5% NaOCl as an Irrigant and Calcium Hydroxide/Camphorated Paramonochlorophenol Paste as an Intracanal Dressing. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 6, p. 667-672, 2007.
- SOUKOS, N. S.; CHEN, P. S.; MORRIS, J. T.; RUGGIERO, K.; ABERNETHY, A. D.; SOM, S.; FOSCHI, F.; DOUCETTE, S.; BAMMANN, L. L.; FONTANA, C. R.; DOUKAS, A. G.; STASHENKO, P. P. Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 760-774, 2006.
- STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J.; OWATZ, C. B. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 93-98, 2006.
- SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; DE LIMA, M. E. F. Curcumina, o pó dourado do açafraão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.
- TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; DE OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 3, p. 175 - 191, 2005.
- TEBRUEGGE, M.; PANTAZIDOU, A.; CLIFFORD, V.; GONIS, G.; RITZ, N.; CONNELL, T.; CURTIS, N. The age-related risk of coexisting meningitis in children with urinary tract infection. **PLoS One**, v. 6, n. 11, e26576, 2011.
- TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M. J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADÉS, J. R.;

- LASA, I. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4538 – 4545, 2001.
- TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; NETO, C. F. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445-59, 2009.
- TRENTIN, D. D.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113 - 238, 2013.
- TSUTSUI, H.; MACROBERT, A. J.; CURNOW, A.; ROGOWSKA, A.; BUONACCORSI, G.; KATO, H.; BOWN, S. G. Optimisation of Illumination for Photodynamic Therapy With mTHPC on Normal Colon and a Transplantable Tumour in Rats. **Lasers in Medical Science**, v. 17, p. 101 – 109, 2002.
- TURENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. 2, p. 335 - 344, 2003.
- ULIANA, M. P.; PIRES, L.; PRATAVIEIRA, S.; BROCKSOM, T. J.; DE OLIVEIRA, K. T.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1137 - 1145, 2014.
- USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, p. 165-73, 2001.
- VIGNION-DEWALLE, A-S., BAERT G.; DEVOS, L.; THECUA, E.; VICENTINI, C.; MORTIER, L.; MORDON, S. Red light photodynamic therapy for actinic keratosis using 37 J/cm² : fractionated irradiation with 12.3 mW/cm² after 30 minutes incubation time compared to standard continuous irradiation with 75 mW/cm² after three hours incubation time using a mathematical modeling. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 49, n. 7, p. 686 – 697, 2017.
- WHITCHURCH, C. B.; -NIELSEN, T. T.; RAGAS, P. C.; MATTICK, J. S. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. **Science**, v. 295, 2002.
- YAMADA JR., A. M.; HAYEK, R. R. A.; RIBEIRO, M. S. O emprego da terapia fotodinâmica (pdt) na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 52, n. 3, p. 207-210, 2004.
- YANG, M. Y.; CHANG, K. C.; CHEN, L. Y.; HU, A. Low-dose blue light irradiation enhances the antimicrobial activities of curcumin against *Propionibacterium acnes*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 21 - 28, 2018.
- ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W. M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of dermatology**, v. 144, n. 2, p. 274 - 278, 2001.
- ZHENG, Y.; YU, E.; WENG, Q.; ZHOU, L.; LI, Q. Optimization of hydrogel containing toluidine blue O for photodynamic therapy in treating acne. **Lasers in medical science**, 1-11, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02727-2>